

海洋病毒荧光显微计数法的优化与应用

肖劲洲^{1,2,3} 孙国伟^{1,2,3} 王洪明^{1,2,3} 周竞烈^{1,2,3,4} 李柏林¹ 潘迎捷^{1,2,3} 王永杰^{1,2,3*}

(1. 上海海洋大学 食品学院 上海 201306)

(2. 上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心 上海 201306)

(3. 农业部水产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室(上海) 上海 201306)

(4. College of Science and Mathematics, Auburn University, Auburn 36849, USA)

摘要: 【目的】建立一种快速、稳定、可靠的海洋病毒计数方法。【方法】海水水样经福尔马林固定后, 滤过孔径为 0.02 μm 的 Anodisc Al_2O_3 膜。滤膜经 SYBR Green I 染色后, 在相应波长的激发光下进行观察。借助荧光显微镜目镜网格尺, 计数视野中的病毒颗粒, 换算后获得样品中病毒的浓度。【结果】对具体实验方法进行了优化, 可快速、稳定地对海水中的病毒计数。【结论】建立了一种适用于国内实验条件的、可靠的海洋病毒计数方法。

关键词: 海洋病毒, 病毒计数, SYBR Green I

Rapid epifluorescence enumeration of marine viruses: method optimization and application

XIAO Jin-Zhou^{1,2,3} SUN Guo-Wei^{1,2,3} WANG Hong-Ming^{1,2,3} ZHOU Jing-Lie^{1,2,3,4}
LI Bai-Lin¹ PAN Ying-Jie^{1,2,3} WANG Yong-Jie^{1,2,3*}

(1. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

(2. Shanghai Engineering Research Center of Aquatic-Product Processing & Preservation, Shanghai 201306, China)

(3. Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Aquatic Production on Storage and Preservation (Shanghai), Ministry of Agriculture, Shanghai 201306, China)

(4. College of Science and Mathematics, Auburn University, Auburn 36849, USA)

Abstract: [Objective] To establish the epifluorescence microscopic (EFM) method for rapid and reliable enumeration of marine viruses. [Methods] Fixed sea water samples were filtered through 0.02 μm filter, and virus particles were collected on the membrane. After stained with SYBR Green I, viruses were observed and counted under epifluorescence microscope using a grid micrometer. [Results] The EFM method was optimized to count marine viruses rapidly and reliably. [Conclusion] The epifluorescence enumeration method was established as well as applied to count marine viruses.

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 41376135); 上海高校特聘教授东方学者岗位计划基金项目(No. 20101222); 上海市人才发展基金项目(No. 2011010); 上海市科委项目(No. 10540503000); 上海市教委项目(No. 14ZZ144)

*通讯作者: Tel: 86-21-61900505; ✉: yjwang@shou.edu.cn

收稿日期: 2013-06-28; 接受日期: 2013-10-08; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-25

Keywords: Marine virus, Enumeration, SYBR Green I

20 世纪 70 年代, 荧光显微镜(Epifluorescence microscope, EFM)开始应用于海洋细菌的研究工作^[1]。随着几种高灵敏度、高稳定性的荧光染料出现, 借助荧光显微镜计数病毒成为可能^[2-3]。将样品中的病毒颗粒截留在滤膜上, 用高效荧光染料染色后, 在荧光显微镜下可观察到发出荧光的病毒颗粒, 并计算出样品中病毒颗粒的数量。相比于昂贵的透射电子显微镜(Transmission electron microscope, TEM)^[4]或流式细胞仪计数法^[5-6], 荧光显微计数法显然是一种经济、简便、快捷、可靠的病毒计数方法。这一方法迅速取代了原有的空斑法(Plaque forming units, PFU)^[7]和最大可能数法(Most probable number, MPN)^[8-9], 使研究人员认识到每毫升海水中有高达数百万的病毒颗粒及其在生态环境方面的重要性^[10]。现有的研究表明, 海洋病毒在调节海洋生物的种群结构、多样性、遗传物质转移, 甚至物质的生物地球化学循环以及气候变化等方面均起着重要的作用^[11-14]。

近年来, 尽管已有多篇针对病毒荧光显微计数方法的文章发表^[2-3, 15-17], 但因其使用的试剂、程序、计算方法及判断标准不同, 往往对结果会造成较大影响, 主要表现在: (1) 不同的样品固定、保存方法, 导致实验结果的差异; (2) 试剂、仪器的性能、特点不同, 造成病毒计数的不稳定; (3) 不同的计算方法, 造成数据的差异。Suttle 等的研究表明, 同一实验室基于荧光计数法得到的海洋病毒数量是较为可信的, 误差小于 10%, 但不同实验室间的数据往往存在较大差异^[18]。我们在研究中也发现, 用国产试剂较难直接重复国外文献中荧光计数的染色效果。在参阅了国际上普遍采用的几种基于不同荧光染料的病毒计数方案后, 我们经过尝试, 已初步探索出一套稳定的病毒荧光计数方

法。该方法不仅可以用于水体环境中病毒的快速计数, 也适用于其它样品中微生物的计数和观察。

1 材料与方法

1.1 仪器

荧光显微镜(卡尔蔡司, Scope. A1)、金属卤化物灯(EXPO, X-Cite® SERIES 120Q)、10×10 目镜网格尺(卡尔蔡司, 12.5×12.5/5; 10/ d=26 mm, Cat. 474068-0000-000)、微量分析玻璃换膜过滤器(密理博, Cat. XX1002500)、真空泵(密理博, 220 V/ 50 Hz, Cat. WP6122050)、纯水仪(密理博, Milli-Q Biocel)、移液枪(艾本德, 量程: 1 mL, 100 μL, 20 μL, 10 μL)。

1.2 耗材

Anodisc Al₂O₃ 滤膜(0.02 μm 孔径, 25 mm 直径; Whatman, Cat. 6809-6002)、硝酸纤维素滤膜(0.22 μm 孔径, 25 mm 直径; 密理博, Cat. GTTP02500)、载玻片(25 mm×75 mm)、盖玻片[◇](0.17 mm, 25 mm×25 mm)、无菌吸头(1 mL, 100 μL, 10 μL)、无菌离心管(1.5 mL 本色、褐色, 15 mL, 50 mL)、一次性培养皿、低尘纸(Kimtech, Cat. KBC#0131-10)、0.22 μm 孔径针头式过滤器(密理博, Cat. SLGV033RB)。

1.3 主要试剂及配制

1.3.1 试剂: SYBR Green I 核酸染料(Solarbio, Cat. SY1020)、对苯二胺盐酸盐[□](PDA, *p*-phenylenediamine dihydrochloride)(生工生物工程, Cat. PB0702-25g)、甘油(生工生物工程, Cat. G0854-500mL)、Na₂HPO₄·12H₂O(生工生物工程, Cat. SB7793)、NaCl(生工生物工程, Cat. S0241)、无菌超纯水(Milli-Q 超纯水经 0.22 μm 孔径针头式过滤器过滤后, 1×10⁵ Pa 灭菌 20 min)、福尔马林[□](37%–40% 甲醛溶液; 生工生物工程, Cat.

[◇] 尽量选择适合自己显微镜物镜的盖玻片厚度, 通常情况下物镜镜头上会标有相关数据, 如: “∞/0.17”表示适配 0.17 mm 厚度的盖玻片, 如无法确定, 建议向厂家咨询相关数据。

[□] 属于危险品, 药品订购及实验操作时需注意。

F1912-500mL)、乙醇(生工生物工程, Cat. ET0737)、Zeiss "Immersol" 518 F 无荧光镜油(卡尔蔡司, Cat. 444960-0000-000)。

1.3.2 10% (质量体积比)对苯二胺盐酸盐溶液: 称取 1 g 对苯二胺盐酸盐(PDA)溶解于 10 mL 无菌超纯水中, 0.22 μm 孔径针头式过滤器过滤。小份分装, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光保存。该试剂颜色变深时, 应舍弃并重新配制。

1.3.3 甘油-PBS (1:1, 体积比)溶液: 称取 0.85 g 氯化钠(NaCl)和 1.8 g 磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), 溶于 100 mL 无菌超纯水中, 加入 100 mL 甘油, 充分混匀。所得溶液用 0.22 μm 孔径针头式过滤器过滤, 小份分装(1 mL/份), $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.4 样品前处理及准备工作

1.4.1 采样: 先将无菌 500 mL 采样瓶用待测海水润洗 3 遍, 然后加入经 0.22 μm 孔径滤膜过滤的福尔马林溶液 10 mL, 再加入海水样品至福尔马林终浓度为 2% (体积比)。样品于 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下运至实验室。保持固定时间约为 1 h。

1.4.2 工作浓度试剂(当天配制): (1) 1:400 SYBR Green I: 按样品数量计算 SYBR Green I 用量(每个样品 100 μL 工作浓度溶液)。用无菌超纯水按 1:400 稀释 SYBR Green I 核酸染料于无菌 1.5 mL 褐色离心管中, 涡旋混匀, 置于冰上避光待用。(2) 防褪色液[0.1% (体积比)对苯二胺盐酸盐溶液]: 按样品数量计算用量(每个样品 30 μL 防褪色液)。取 1 mL/管的甘油-PBS (1:1, 体积比)溶液, 弃去 10 μL 后加入 10 μL 的 10% (质量体积比)对苯二胺盐酸盐溶液, 充分混匀, 置于冰上避光待用。

1.5 装片制作

(1) 安装滤膜: 如图 1 所示安装微量分析玻璃换膜过滤器。首先用无菌超纯水润湿滤台砂芯及其边缘部分, 之后分别润湿 0.22 μm 滤膜(支持膜)及 Anodisc Al_2O_3 滤膜(0.02 μm 孔径), 并依次叠放于滤台砂芯部分, 确保两片滤膜紧贴, 并将砂芯部分完全覆盖。打开真空泵, 俯视观察滤膜, 确认没有气泡或空隙引起的白色区域后, 关闭真空泵。

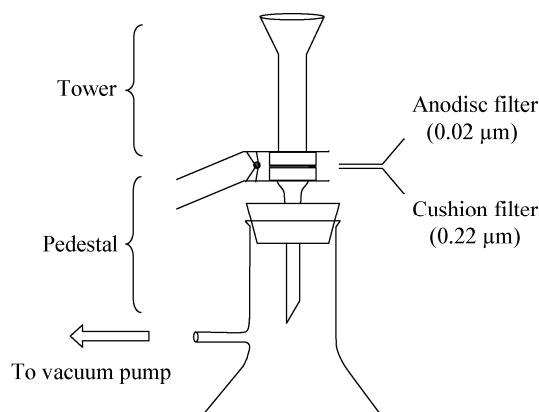


图 1 微量分析玻璃换膜过滤器(改绘自 Thurber 等^[16], 2009)

Figure 1 Filtration setup for viral enumeration (Modified from Thurber et al^[16], 2009)

(2) 清洗并安装滤杯: 滤杯内壁经乙醇淋洗后, 用无尘纸吸干残余液体。将滤杯置于滤台上, 确保其与滤台和滤膜紧密贴合, 用架子夹紧。

(3) 过滤水样: 滴加 1 mL 水样于滤杯中, 之后沿滤杯边缘缓慢、旋转加入 3 mL 无菌超纯水, 冲洗可能滴溅到滤杯内壁上的痕量水样。打开真空泵, 将抽滤压力控制在 20 kPa 左右^[2]。

(4) 干燥滤膜: 滤杯中液面消失后 1-2 min, 在继续保持真空泵处于工作状态的条件下, 将夹子及滤杯移去。用钝头镊子夹取 Anodisc Al_2O_3 滤膜的塑料边缘, 将其光面向上移放到低尘纸上(移取 Anodisc Al_2O_3 滤膜时, 应感觉到一定吸力), 滤膜另一面与无尘纸摩擦数下, 尽可能减少残留的液体。之后将滤膜置于新的无尘纸上, 避光静置, 直至滤膜完全晾干(即在透射光下, 滤膜是均一、无水迹并具有一定的光泽)。支持膜若无破损, 可反复使用多次。

(5) 染色: 将无菌培养皿划分为 4 个区域并做好标记。每个区域滴加 100 μL 工作浓度的 SYBR Green I 染液。将晾干后的 Anodisc Al_2O_3 滤膜光面向上浸入染液。避光条件下浸染约 15-20 min。

(6) 干燥滤膜: 方法同(4), 至滤膜完全干燥为止。

(7) 制作装片: 分别滴加 10 μL 和 20 μL 防褪色液于载玻片和盖玻片上, 将干燥后的滤膜光面向上浸于载玻片防褪色液中, 将盖玻片防褪色液面盖于滤膜上, 轻轻挤压使防褪色液均匀分布于整张滤膜上, 并尽快进行观察计数。

1.6 镜检计数

(1) 对照: 于 1 000 \times 放大倍率, 蓝色/绿色、绿色/红色、紫外/蓝色 3 种激发滤镜/阻断滤镜组合下, 对空白对照和滤膜进行观察, 排除系统污染。

(2) 装片质量: 于 1 000 \times 放大倍率, 蓝色激发滤镜/绿色阻断滤镜下(与 dsDNA 结合的 SYBR Green I 染料于 488 nm 波长附近呈现激发峰^[2])观察装片。先确定所有的亮点均处于同一个平面上(即在同一个焦距可以看到所有的亮点)。之后, 随机观察多个视野判断病毒颗粒分布是否均匀。若非如此, 弃去此类装片。

(3) 计病毒颗粒类似物数量: 利用目镜网格尺 10 \times 10 的小格计数。随机选定一个视野, 数 30–40 个病毒类似物颗粒(VLPs)并记录所需的小格数量。之后随机选择 9 个视野, 记录每个视野相同数目小格中病毒类似物颗粒的数量。

(4) 使用如下公式计算样品病毒数量:

$$\text{病毒数量}(\text{VPLs} / \text{mL}) = \frac{\text{过膜面积}(\text{cm}^2)}{10 \times 10 \text{ 网格尺相对物象面积}(\text{cm}^2)} \times \frac{\text{平均每个视野中病毒类似物颗粒数量}(\text{VPLs}) \times 100}{\text{每个视野中计数用到的小网格数} \times \text{过滤样品体积}(\text{mL})}$$

其中, 过膜面积用载物台上的刻度卡尺实测得出, 10 \times 10 目镜网格尺相对物象面积由显微镜厂家提供。

1.7 荧光显微计数法的优化

我们在建立海洋病毒荧光显微计数法的同时, 尝试对可能影响荧光计数效果、准确度的诸多实验细节进行了探索。

1.7.1 阳性对照: 按照周德庆^[19]的方法自生活污水中分离、纯化 *Escherichia coli* 噬菌体。取裂解液经 0.22 μm 孔径针头式过滤器过滤, 以无菌超纯水梯度稀释 10⁵ 倍后进行荧光染色。于 1 000 \times 放大

倍率、蓝色激发滤镜/绿色阻断滤镜下观察荧光染色效果。

1.7.2 固定时间的优化: 取 4 份水样, 分别在固定后 0、10、30、60 min 取样进行荧光染色。于 1 000 \times 放大倍率、蓝色激发滤镜/绿色阻断滤镜下观察荧光染色效果。

1.7.3 长期保存对计数的影响: 500 mL 水样 4 $^{\circ}\text{C}$ 、避光保存。分别在固定 60 min、两周后对水样进行荧光染色观察和计数。

1.7.4 装片保存时间对计数的影响: 取同一水样制作两张装片, 当日和-20 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存 1 周后, 1 000 \times 放大倍率、蓝色激发滤镜/绿色阻断滤镜下观察荧光染色效果并计数。

1.7.5 支持膜对荧光染色效果的影响: 取同一水样, 制片时不用支持膜(0.22 μm 孔径的硝酸纤维素滤膜), 其它步骤与标准方法相同。1 000 \times 放大倍率、蓝色激发滤镜/绿色阻断滤镜下观察荧光染色效果。

1.8 荧光显微计数法的应用

分别于 2012 年 12 月、2013 年 5 月在洋山深水港海域采样, 调查海域范围 30 $^{\circ}$ 38'36.96"—30 $^{\circ}$ 35'48.54" N、121 $^{\circ}$ 59'50.82"—122 $^{\circ}$ 6'14.22" E。设置调查站位 14 个, 其中大洋山、小洋山沿岸各 5 个, 航道 4 个。2013 年 7 月在长江口崇明岛北支海域采样, 调查范围 31 $^{\circ}$ 37'46.14"—31 $^{\circ}$ 37'0.48" N、121 $^{\circ}$ 46'37.98"—121 $^{\circ}$ 50'43.98" E。自上游至下游设置调查站位 3 个, 调查站位靠近贝类养殖场及崇明东滩自然保护区一侧。2013 年 6 月在东海枸杞岛海域采样, 调查范围 30 $^{\circ}$ 42'35.07"—30 $^{\circ}$ 42'0.42" N、122 $^{\circ}$ 45'46.85"—122 $^{\circ}$ 46'50.78" E。设置调查站位 5 个, 采样环境包括海藻场、沙地、岩礁、贻贝场、泥地。本研究中洋山港、崇明岛北支海域属于近岸浑水区(120.5 $^{\circ}$ –122.5 $^{\circ}$ E), 水体透明度低^[20]; 枸杞岛海域属于近岸过度区(122.5 $^{\circ}$ –123.5 $^{\circ}$ E), 水体透明度较高^[20]。

2 结果与分析

2.1 阴性对照

2.1.1 滤膜: 使用 1 000 \times 放大倍率, 分别以蓝色/

绿色、绿色/红色、紫外/蓝色 3 种激发滤镜/阻断滤镜组合, 对空白 Anodisc Al_2O_3 滤膜进行观察。结果显示, 在 3 种激发光(图 2A-C)和显微镜明场下(图 2D)均可见某种非特异性光斑, 它们大多数近似圆形, 直径约为 5–20 μm , 远大于病毒类似物颗粒或常见的原核生物。这表明, 空白的 Anodisc Al_2O_3 滤膜本身带有某些可被激发的杂质。

2.1.2 空白对照: 以等体积的无菌超纯水代替海水样品, 制片后进行观察。除上述的非特异性亮斑外, 未观察到大小、形状类似于病毒颗粒或其它微生物的亮斑或亮点。这表明, 整个体系中不存在影响准确计数的干扰物质。

2.2 噬菌体阳性样品与实验样品中病毒类似物的相比对照

在 1 000 \times 放大倍率、蓝色激发滤镜/绿色阻断滤镜下观察噬菌体及实验组样品滤膜。结果显示, 噬菌体为亮度均等、针孔状细小、无明显形状的亮点(图 3A)。实验样品中遍布大小、形状不一的绿色亮点或亮斑, 包括与噬菌体类似的病毒类似物颗粒(图 3B 实线箭头所示)及较大、有明显轮廓及形状的细菌(图 3B 虚线箭头所示)。

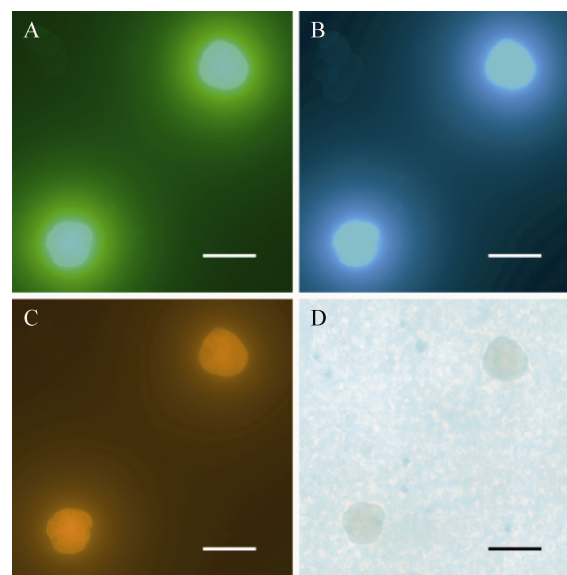


图 2 Anodisc Al_2O_3 滤膜表面的非特异性荧光斑点
Figure 2 Nonspecific fluorescence of the Anodisc Al_2O_3 filter

注: A: 蓝色激发滤镜/绿色阻断滤镜; B: 紫外激发滤镜/蓝色阻断滤镜; C: 绿色激发滤镜/红色阻断滤镜; D: 明场。标尺长度为 20 μm 。

Note: A: Blue excitation filter/Green blocking filter; B: Ultraviolet excitation filter/Blue blocking filter; C: Green excitation filter/Red blocking filter; D: Light field. Scale bar 20 μm .

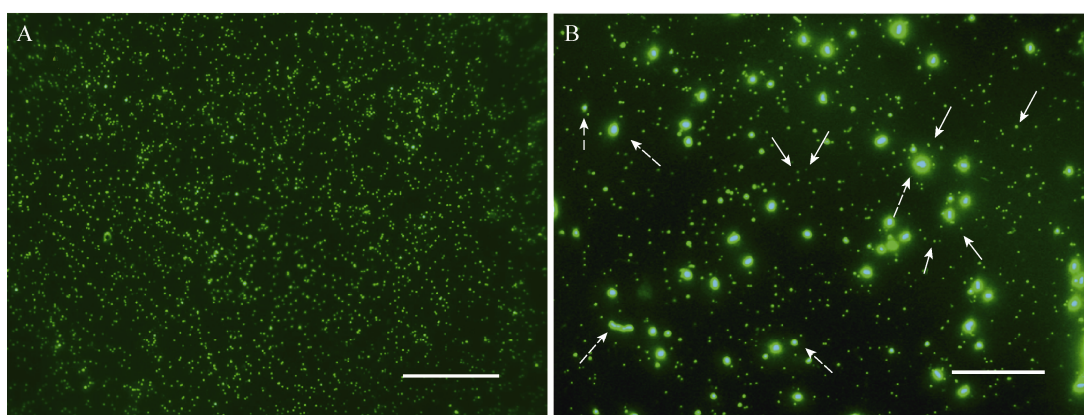


图 3 噬菌体阳性样品(A)及上海近海海水中病毒(B)的荧光计数照片

Figure 3 Epifluorescence micrographs of *E. coli* phages and marine viruses sampled from the coastal water of Shanghai

注: 图中实线箭头示病毒颗粒类似物, 虚线箭头示细菌。标尺长度为 20 μm 。

Note: Virus-like particles are indicated with solid arrows and bacteria are indicated with broken line arrows. Scale bar 20 μm .

2.3 样品固定时间的优化

4 份水样分别于固定后 0 (不固定)、10、30、60 min 取 1 mL 制片, 于 1 000×放大倍率、蓝色激发滤镜/绿色阻断滤镜下进行观察, 结果见图 4。不固定和固定时间为 10 min 时, 显微镜下无法观测到病毒类似物颗粒。固定时间为 30 min 时, 绝大部分病毒类似物颗粒可被观察到。当固定时间为 60 min 时, 病毒颗粒类似物数量无显著增加, 但更为清晰明亮, 满足快速计数的工作要求。

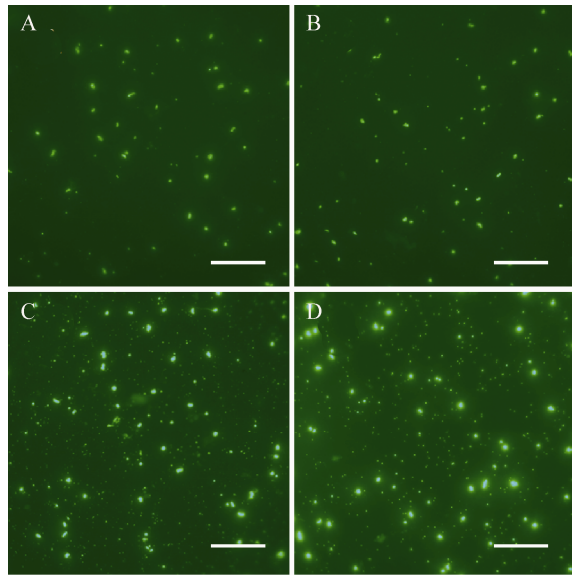


图 4 固定时间对海水样品的荧光染色影响

Figure 4 The effects of fixation time of marine water samples on the fluorescence staining

注: A: 不固定(0 min); B: 10 min; C: 30 min; D: 60 min. 标尺长度为 20 μm .

Note: A: Unfixed sample (0 min); B: 10 min; C: 30 min; D: 60 min. Scale bar 20 μm .

2.4 样品保存时间对计数准确性的影响

从 500 mL 的采样瓶中取 1 mL 水样, 荧光观察病毒计数为 8.12×10^6 VLPs/mL。水样于 4 °C、避光环境保存两周后, 重复上述工作, 计数结果为 5.22×10^6 VLPs/mL。对两次所得数据进行比较分析发现, 两周内病毒类似物颗粒约有 30% 的损失。

2.5 装片保存时间对计数的影响

取同一水样制作两张装片, 分别于当日和

-20 °C 下避光保存 1 周后观察, 结果如图 5 所示。随着时间的延长, 病毒类似物颗粒荧光暗淡, 难以计数(图 5B)。可见装片不适宜在 -20 °C 避光条件下长期保存。

2.6 支持膜对计数的影响

同一水样, 在制片过程中不放置支持膜, 其它步骤与标准方法相同, 染色观察结果如图 6 所示。无支持膜, 病毒类似物颗粒成团状聚集, 分布极为不均(图 6A), 无法计数。有支持膜的情况下, 病毒颗粒类似物均匀分布(图 6B)。显然, 支持膜决定了滤膜是否可用于病毒颗粒的观察和准确计数。

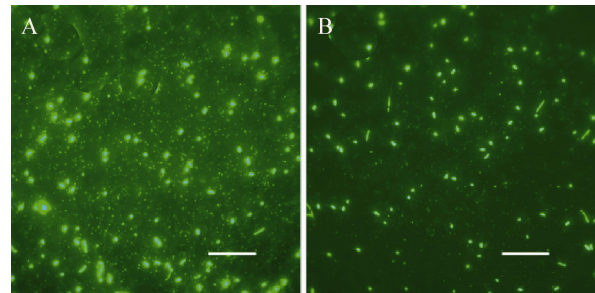


图 5 装片保存时间对计数的影响

Figure 5 The effects of the storage time of sample slides on the enumeration

注: A: 制作完成后当天观察; B: -20 °C 避光保存一周后观察. 标尺长度为 20 μm .

Note: A: Observation on the day of the preparation of sample slide; B: One week storage in the dark at -20 °C. Scale bar 20 μm .

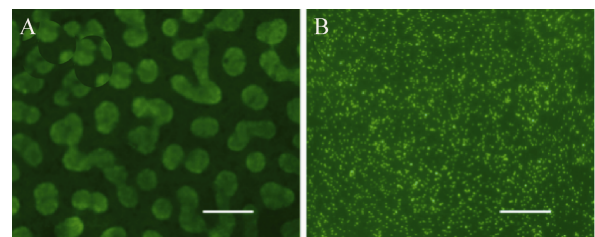


图 6 支持膜对荧光染色计数效果的影响

Figure 6 The effects of cushion filter on the enumeration

注: A: 无支持膜; B: 有支持膜. 标尺长度为 20 μm .

Note: A: Without cushion filter; B: With cushion filter. Scale bar 20 μm .

2.7 上海近海病毒计数

洋山港海域冬季(11月)的海洋病毒数量为 $(10.50-7.78) \times 10^6$ VPLs/mL, 平均 $(8.44 \pm 1.02) \times 10^6$ VPLs/mL。最高值出现在大洋山3号站位($30^{\circ}36'4.32''\text{N}$, $122^{\circ}3'4.50''\text{E}$), 最低值出现在大洋山5号站位($30^{\circ}35'43.74''\text{N}$, $122^{\circ}5'22.26''\text{E}$)。从总体上看, 洋山港海域冬季各个调查站位海洋病毒丰度较为平均, 没有明显的差异, 数量级大致处于 10^6 。洋山港海域夏季(5月)的海洋病毒数量为 $(1.37-0.88) \times 10^7$ VPLs/mL, 平均 $(1.10 \pm 0.15) \times 10^7$ VPLs/mL。最高值出现在大洋山5号站位($30^{\circ}35'43.74''\text{N}$, $122^{\circ}5'22.26''\text{E}$), 最低值出现在小洋山5号站位($30^{\circ}36'10.92''\text{N}$, $122^{\circ}5'53.82''\text{E}$)。从水平分布来看, 各点差异不大, 大约处于 10^7 数量级, 海洋病毒丰度略有大洋山沿岸>航道>小洋山沿岸的趋势。从季节分布来看, 洋山港夏季海洋病毒数量高出冬季约一个数量级。

崇明岛北支海域夏季(7月)的海洋病毒数量为 $(1.74 \pm 0.02) \times 10^7$ VPLs/mL。3个调查站位中, 处于中间的2号站位病毒数量(1.76×10^7 VPLs/mL)稍高于两侧的调查站位。总体来看, 病毒丰度自上游至下游无明显差异, 各调查站位病毒数量大约处于 10^7 数量级。

枸杞岛海域夏季(6月)的海洋病毒数量为 $(1.25-1.85) \times 10^7$ VPLs/mL, 平均 $(1.60 \pm 0.22) \times 10^7$ VPLs/mL。最高值出现在3号站位(泥地), 最低值出现在1号站位(岩礁)。从调查站位环境来看, 枸杞岛海域各调查站位海洋病毒丰度较为平均, 没有极为明显的差异, 数量级大致处于 10^7 。各点海洋病毒数量依次略有泥地>沙地~贻贝场>藻场>岩礁的趋势。

从水平分布来看, 上海近海海域夏季海洋病毒丰度高低依次为: 崇明岛北支>枸杞岛>洋山港。

3 讨论

3.1 荧光显微计数法的优化

(1) 阳性对照。荧光计数法的应用在一定程度上依赖于研究人员经验的积累。不同实验室判断病

毒颗粒类似物的标准不同, 对最终的计数结果可能会造成一定干扰。对此, Suttle等曾提出通过建立统一标准品的思路保障荧光计数的精确度^[15]。本文以*E. coli*噬菌体为阳性对照, 比对分析水样中的病毒颗粒及荧光计数方法的可靠性。据此, $1000\times$ 放大倍数下, 针孔状细小、无明显形状的亮点应视为病毒类似物颗粒, 较大、有明显轮廓或形状的亮斑代表着细菌等原核生物。考虑到海洋病毒的数量往往是细菌的10倍^[2,18], 即使将少数细菌误计为病毒类似物颗粒, 其误差也小到可被忽略。因此, 为了便于计数, 我们统一将难以判断的中等大小亮点按病毒类似物颗粒进行计数。

(2) 固定时间。我们发现样品固定时间往往决定荧光染色的成败。而不同品牌的试剂质量上的确存在差异, 并可能由此导致计数结果的偏差。在本文的实验条件下, 60 min而非10 min^[2]的固定时间是获得理想染色效果的保障。

(3) 海水样品的保存。早先许多基于荧光染色法计数病毒的工作, 往往会将样品固定数天、数周甚至数年后再次染色制片。然而Wen等发现, 固定后的病毒颗粒随保存时间的延长, 数量会有较大损失^[17]。Patel等提出, 病毒类似物颗粒的损失速率与容器的容积存在相关性, 建议使用50 mL以上的容器, 4 h内完成计数工作^[2]。显然, 样品的保存方法和时间关系到荧光计数的准确性。本研究参照Patel等的思路, 采用了500 mL的容器, 明显减缓了样品中病毒颗粒的损失速率。值得注意的是, 尽管液氮保藏方法在设备、成本及安全性等方面有一定的局限性, 但如果计数工作无法在4 h内完成, 我们建议采样时将样品在液氮中冷冻后保存于 -86°C 超低温冰箱中^[17]。

(4) 显微装片的保存。实验中我们发现, 显微装片在避光的普通低温冰箱中保存一周便无法用于计数观察, 这与Patel等建议可将装片置于 -20°C 下长期保存的观点不符^[2]。鉴于国外文献中多采用无霜冰箱保存装片, 造成这一现象的原因与装片在冰箱中结霜可能有较大的关系。因此, 我们

建议在制作装片后尽快观察、计数,以保证数据的准确性。

(5) 支持膜对染色效果的影响。病毒类似物颗粒在膜上分布均匀与否是影响计数准确性的另一重要因素。无支持膜的一组滤膜上病毒类似物颗粒成团状聚集,无法计数。反之,病毒颗粒类似物均匀分布。由此可见,支持膜不但具有保护置于其上的 Anodisc Al_2O_3 滤膜免于碎裂、变形的作用,而且还是样品中病毒类似物颗粒在滤膜上均匀分布的关键因素。

3.2 荧光计数法中的注意事项

为了增加不同实验室间数据的可比性,一方面,我们在反复实验的基础上发现,只要严格控制实验条件,基于本方法获得的数据的重现性很好;另一方面,我们归纳出该方法的注意事项,便于读者参考。

(1) 人为误差。不同实验室间,工作人员的经验积累程度、判断病毒颗粒类似物的标准以及实验的具体步骤不同,可能是导致数据偏差的重要因素。

(2) 荧光染料及其他化学试剂。目前国际上多篇文章采用了荧光计数病毒的方法^[2-3,15,21],本文中所用的 SYBR Green I 核酸染料是目前使用较为广泛的荧光染料之一,其绿色荧光明亮而持久。同系列的 SYBR Gold 核酸染料由于其黄色荧光与海水中自体荧光物质的荧光波长较为接近,故未在本研究中采用。其它荧光染料,如 DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindole)^[21],应用于病毒染色存在荧光较低、猝灭时间较短等缺点^[22]。之后出现的 Yo-Pro-1 染料可提供明亮而持久的荧光,但其染色时间过长,并且需使用剧毒的化学物质^[22],故未被本研究所采用。

此外,本研究中还涉及到很多试剂,但不同厂家的化学试剂性能有所差别,从而引起计数结果的偏差。国际上已有的文章对试剂部分虽有详细的描述,但原装进口试剂价格昂贵、购买不便。对此,我们以国产试剂为基础对相关条件进行了探索,对

多个条件进行了优化,获得了令人满意的结果,并总结出相关试剂的厂家、型号、配制和保存方法等数据及注意事项。

(3) 仪器性能也是值得注意的因素。例如,荧光染料受金属卤素灯激发产生的荧光信号强度往往高于汞灯,使得在汞灯下较为模糊的颗粒可以被清晰地观察到,提高了准确度。另外,作为本实验核心仪器的显微镜、目镜网格尺及其它精密仪器在出厂前均应经过校正。

(4) 实验用水。几乎所有的试剂都是在溶液中起反应,所以保证实验用水的质量合格至关重要,但这一点却在具体工作中常常被忽视。我们认为,注意纯水仪的正确操作、实验前更新实验用水等细节往往是实验数据稳定的保证。此外,很多文章中要求使用经 $0.02\ \mu\text{m}$ 孔径过滤后灭菌的海水作为实验用水^[2-3,15,21],但此种做法在应用于河口水样等本身理化因子变动较大的海水样本时,显然有违设计初衷。对此我们尝试采用超纯水经 $0.22\ \mu\text{m}$ 孔径针头式过滤器过滤后高压灭菌,将所得无菌超水用于实验。经检验完全符合实验要求,节省了时间并保证了实验的稳定性。

(5) 实验具体参数不同也可能是导致数据差异的原因之一。例如,过膜的样品体积及方法在不同文献中往往存在差别^[2-3,15,21]。本文对具体细节进行了探索,建立的方法不但可以减小样品的损失,同时还能保证病毒颗粒均匀地分布于整张滤膜上,便于计数。另外,计数工作虽然可以由电脑自动完成,但相机、目镜的焦距往往存在微小偏差,加之软件具体参数设置不同,可能对结果造成偏差。

(6) 样品的保存方法也是保证计数工作准确性的重要因素,对此上文已有讨论,此处不再赘述。

在对荧光显微计数法实验步骤探索的过程中,我们积累了一定的经验,结合已发表的文献资料,我们将常见问题及其解决方法整理如表 1 所示,供研究人员参考。

表 1 常见问题及解决方法
Table 1 Frequently asked questions and solutions

出现的问题 Problem	可能原因 Possible reason	解决方法 Solution
空白对照中观察到亮斑 Fluorescence of control filter	超纯水受污染	重新制作超纯水并配制其他相关试剂
	滤杯未清洗干净	仔细清洗滤杯后再次做空白对照观察
	滤膜本身存在非特异性荧光斑点	在 100×物镜下观察亮斑大小，如有明显的形状、轮廓，能轻易与病毒类似物颗粒区分，则无需理会，否则更换另一批次的滤膜
荧光信号很快猝灭 Rapid fading of the fluorescence	防褪色液已被氧化	观察工作浓度的防褪色液颜色，如颜色较深、发紫，重新配制
	染色前滤膜未完全干燥	延长抽滤时间及染色前的干燥时间，并仔细观察，确保整张滤膜均一、无水迹并具有一定的光泽
	样品固定时间不当	不同厂家药品间存在一定的差异，重新探索固定时间
在视野中观察到漂浮或流动的病毒类似物颗粒 Floating of virus-like particles	染色前滤膜未完全干燥	延长染色前、后的干燥时间，并仔细观察，确保整张滤膜均一、无水迹并具有一定的光泽
	荧光显微镜使用市售普通镜油或无荧光镜油被污染	更换镜油，观察前应事先清洁物镜，并避免不同品牌镜油混用或污染的问题
视野中背景过亮，计数困难 Strong background fluorescence	水体中杂质过多	尝试澄清样品或稀释样品后染色观察
	样品固定不充分	不同厂家药品间存在一定的差异，重新探索固定时间
未观察到病毒类似物颗粒 Absence of virus-like particles	滤膜上有裂隙	在显微镜下仔细观察，如发现裂痕可断定为此类情况。操作时尽量注意，减小抽滤压力并避免弯曲或直接接触滤膜表面

3.3 荧光计数法的应用

基于本文的方法对上海近海海域表层海水中的病毒进行了计数，每个样本 10 个视野中计数的总和均大于 200，计数结果可信^[2]。根据相关文献报道，海洋表层海水中的病毒数量一般约为 10⁷ VPLs/mL，在贫养海域可能会降低到 10⁶ VPLs/mL^[23-25]。本文中所涉及的夏季调查站位与多数海域的病毒数量相一致，而从季节分布来看，洋山港冬季海洋病毒的数量则较低，这可能是因为冬季气温下降，病毒宿主生物的的增殖受限，从而导致病毒数量下降。

属于近岸过度区的枸杞岛海域海洋病毒平均值高于属于近岸浑水区的洋山港海域，与前人的调查结果一致^[20]。然而，从整体上来看，海洋病毒最高值却出现在属于近岸浑水区的崇明岛北支流域。这样的结果，一方面可能与崇明东滩湿地自然

保护区及其附近海域良好的环境有关；另一方面，人类的影响，如附近的渔业生产，可能为该海域提供了丰富的营养物质，进而导致水体中病毒处于较高水平，除此之外，河口受潮汐和咸水、淡水混合的影响，其盐度、温度和其他理化因子的迅速变化可能利于病毒裂解释放，使得该海域病毒丰度较高^[26-27]。

结合以往的研究结果^[20]不难看出，上海近海海域由于海水透明度较低，不利于蓝细菌及浮游植物繁殖，从而在整体上出现海洋病毒丰度近岸小于远海的分布特点。然而，由于人类活动或当地环境自身特点的影响，个别地点的海洋病毒丰度会出现例外的情况。

本文中的方法稍作修改，便可对如细菌、真菌等其它材料进行计数和观察。目前，我们已将这一方法成功应用于中华绒螯蟹肠道细菌、西藏开菲尔

粒菌群、土壤细菌噬菌体等的计数工作中,均获得较为理想的结果(未发表)。

3.4 小结

SYBR Green I 荧光计数法是一种经济、简便、快捷、可靠的病毒计数方法,并可用于其他样品中微生物的计数和观察。在本研究中,我们尝试着将现有的方法进行优化,建立了适用于国内实验室条件的合理方法。反复实验表明,如果严格按照本文的方法开展工作,可以获得重复性较强且可靠的实验数据。

致谢:感谢上海海洋大学薛俊增和章守宇老师在水样采集方面给予的指导和帮助。

参 考 文 献

- [1] Hobbie JE, Daley RJ, Jasper S. Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1977, 33(5): 1225-1228.
- [2] Patel A, Noble RT, Steele JA, et al. Virus and prokaryote enumeration from planktonic aquatic environments by epifluorescence microscopy with SYBR Green I[J]. *Nature Protocols*, 2007, 2(2): 269-276.
- [3] Noble RT, Fuhrman JA. Use of SYBR Green I for rapid epifluorescence counts of marine viruses and bacteria[J]. *Aquatic Microbial Ecology*, 1998, 14(2): 113-118.
- [4] Mg W, Ca S. Comparison of epifluorescence and transmission electron microscopy for counting viruses in natural marine waters[J]. *Aquatic Microbial Ecology*, 1997, 13(3): 225-232.
- [5] Brussaard CPD, Marie D, Bratbak G. Flow cytometric detection of viruses[J]. *Journal of Virological Methods*, 2000, 85(1/2): 175-182.
- [6] Marie D, Brussaard C, Thyrhaug R, et al. Enumeration of marine viruses in culture and natural samples by flow cytometry[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(1): 45-52.
- [7] Paul JH, Rose JB, Jiang SC, et al. Coliphage and indigenous phage in Mamala Bay, Oahu, Hawaii[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(1): 133-138.
- [8] Suttle CA. Community structure: viruses[A]// Hurst CJ, Knudsen GR, Mcinerney MJ, et al. *Manual of Environmental Microbiology*[M]. Washington D.C.: ASM Press, 1997: 272-277.
- [9] Ortmann AC, Lawrence JE, Suttle CA. Lysogeny and lytic viral production during a bloom of the *Cyanobacterium Synechococcus* spp.[J]. *Microbial Ecology*, 2002, 43(2): 225-231.
- [10] Bergh O, Borsheim KY, Bratbak G, et al. High abundance of viruses found in aquatic environments[J]. *Nature*, 1989, 340(6233): 467-468.
- [11] Danovaro R, Corinaldesi C, Dell'Anno A, et al. Marine viruses and global climate change[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2011, 35(6): 993-1034.
- [12] Rohwer F, Thurber RV. Viruses manipulate the marine environment[J]. *Nature*, 2009, 459(7244): 207-212.
- [13] Suttle CA. Viruses in the sea[J]. *Nature*, 2005, 437(7057): 356-361.
- [14] Weinbauer MG. Ecology of prokaryotic viruses[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2004, 28(2): 127-181.
- [15] Suttle CA, Fuhrman JA. Enumeration of virus particles in aquatic or sediment samples by epifluorescence microscopy[A]// Wilhelm SW, Weinbauer MG, Suttle CA. *Manual of Aquatic Viral Ecology*[M]. Waco TX: American Society of Limnology and Oceanography, 2010: 145-153.
- [16] Thurber RV, Haynes M, Breitbart M, et al. Laboratory procedures to generate viral metagenomes[J]. *Nature Protocols*, 2009, 4(4): 470-483.
- [17] Wen K, Ortmann AC, Suttle CA. Accurate estimation of viral abundance by epifluorescence microscopy[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(7): 3862-3867.
- [18] Suttle CA. Marine viruses-major players in the global ecosystem[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2007, 5(10): 801-812.
- [19] 周德庆. 微生物学实验教程[M]. 第2版. 北京: 高等教育出版社, 2006: 139-146.
- [20] 刘晶晶, 杜萍, 曾江宁, 等. 夏季长江口浮游细菌和浮游病毒的分布特征及环境制约因素[J]. *海洋学研究*, 2011(3): 118-124.
- [21] Hara S, Terauchi K, Koike I. Abundance of viruses in marine waters: assessment by epifluorescence and transmission electron microscopy[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, 57(9): 2731-2734.
- [22] Hennes PK, Suttle CA. Direct counts of viruses in natural waters and laboratory cultures by epifluorescence microscopy[J]. *American Society of Limnology and Oceanography*, 1995, 40(6): 1050-1055.
- [23] Fuhrman JA. Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects[J]. *Nature*, 1999, 399(6736): 541-548.
- [24] Wolf A, Zheng TL, Witzel K, et al. Impact of initial phage/host ratio and nutrient addition on coexistence in a phage-host system[J]. *Aquatic Microbial Ecology*, 2004, 35(2): 131-139.
- [25] 李娟, 黄健, 唐学玺. 病毒: 海洋生态动力学和疾病学研究的创新点[J]. *海洋湖沼通报*, 2005(2): 79-87.
- [26] Bettarel Y, Bouvier T, Agis M, et al. Viral distribution and life strategies in the Bach Dang Estuary, Vietnam[J]. *Microbial Ecology*, 2011, 62(1): 143-154.
- [27] Peter C, Michael EB. 海洋生物学[M]. 第6版. 茅云翔, 等译. 北京: 北京大学出版社, 2011: 259-284.