

应用 RT-qPCR 技术定量检测湖泊水 体中蓝藻方法的比较

彭宇科 岳冬梅 武俊 肖琳* 杨柳燕

(污染控制与资源化国家重点实验室 南京大学环境学院 江苏 南京 210046)

摘要: 利用 RT-qPCR 技术建立了对湖泊水体中的微囊藻和蓝藻的 SYBR Green I 荧光定量 PCR 检测方法, 在所建立的方法中, 对以微囊藻藻蓝蛋白基因、蓝藻 16S rRNA 基因、微囊藻 16S rRNA 基因分别作为 RT-qPCR 检测的目的基因所得结果进行了比较, 并对实验室培养的微囊藻和太湖的环境样品进行了检测。结果表明, 用藻蓝蛋白基因作为检测目的基因, 以 *M. aeruginosa* PCC 7806 基因组 DNA 作为标准品的测定方法与显微镜计数的结果有较好的相关性和一致性, 并具有简便、快速、特异性高的特点, 可以满足检测的要求。

关键词: 太湖, 蓝藻, 微囊藻, 实时荧光定量 PCR, SYBR Green I

Comparison of RT-qPCR approaches for quantification of cyanobacteria in Lake Taihu

PENG Yu-Ke YUE Dong-Mei WU Jun XIAO Lin* YANG Liu-Yan

(State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, School of the Environment, Nanjing University, Nanjing, Jiangsu 210046, China)

Abstract: In the study, four methods used for quantification of cyanobacteria and *Microcystis* by SYBR Green I real-time quantitative PCR (RT-qPCR) were established based on the target genes, including the 16S rRNA gene of cyanobacteria, the phycocyanin and the 16S rRNA gene of *Microcystis*. Then the cultured *M. aeruginosa* and the environmental samples of Lake Taihu were evaluated by the established methods. Comparison between the new approaches and microscope counting indicated that RT-qPCR analysis could meet the requirement of algae bloom quantification and it was convenient, rapid and specific.

Keywords: Lake Taihu, Cyanobacteria, *Microcystis*, Real-time quantitative PCR, SYBR Green I

蓝藻是淡水生态系统中的常见藻类, 在富营养化的淡水湖泊中常常形成优势种群, 尤其是在夏秋季节, 容易呈现暴发之势, 对水环境安全造成严重危害。对自然水体中蓝藻的生长情况进行快速有效的检测, 有利于对蓝藻水华暴发进行早期预警, 目前已成为研究的热点。

对藻类的现存量测定的方法主要有显微镜计数法、比浊法、库尔特计数法、流式细胞仪计数法、测定光合色素含量(叶绿素 a、藻蓝素等)和利用一些基于光合色素的检测设备(PAM)以及卫星遥感等^[1-4]。显微镜计数法虽然直观, 但耗时费力, 效率较低下, 计数结果受藻类自身的生理特性、水中悬浮颗粒物以及操作者的人为影响较大。而其它检测方法相对快速简便, 但大多对待测样品的预处理和仪器也提出了更高的要求, 复杂环境样品中含有的悬浮颗粒物、藻类的群体状态等都对这些方法的检测结果有很大影响。此外, 更重要的是这些方法对藻类的定性程度不高, 很难对藻类种属进行进一步区分。

实时荧光定量 PCR 技术是近年来发展起来的一种核酸定量技术, 具有灵敏度高、特异性高、重复性好、定量准确等优点, 已成为核酸检测的重要工具, 利用该技术对环境中的藻类的检测已有一些相关报道。Foulds 等建立了定量 PCR 方法, 对含微囊藻毒素合成酶基因 *mcy A* 的产毒铜绿微囊藻进行了检测^[5]; Kurmayer 和 Kutzenberger 运用 TaqMan 探针法以藻蓝蛋白操纵子基因和微囊藻毒素合成酶基因 *mcy B* 作为研究的目的基因, 对德国的 Wannsee 湖中的微囊藻以及产毒微囊藻的数量进行了检测, 发现产毒微囊藻与微囊藻总数比值在 1%~38% 的范围之间^[6]。Rinta-Kanto 用定量 PCR 方法, 以 16S rRNA 为目的基因, 对美国 Erie 湖西面的 17 个采样点水华期间的微囊藻数进行了检测, 其数量在 2×10^3 ~ 4×10^8 个/L 之间^[7]。与传统方法相比, 荧光定量 PCR 技术具有诸多优点, 如耗时较短, 无需显微镜观察, 定性定量可同时进行, 结果重复性较好, 定量动力学范围较宽等。

太湖是我国蓝藻富营养化最为严重的淡水湖,

以微囊藻水华最为常见, 因此对微囊藻等蓝藻的定量方法进行深入研究具有很强的针对性。采用 SYBR Green I 作为荧光染料的定量 PCR, 通用性好, 成本相对较低, 通过熔解曲线分析可以指示产物的熔点性质, 识别扩增产物和引物二聚体, 区分非特异性扩增。本实验以微囊藻藻蓝蛋白、蓝藻 16S rRNA、微囊藻 16S rRNA 基因为研究的目的基因, 建立了 SYBR Green I 荧光定量 PCR 检测方法, 对实验室纯培养的微囊藻和太湖的环境样品进行了检测。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 室内培养藻种与培养方法: 3 株铜绿微囊藻 (*M. aeruginosa* PCC 7806、*M. aeruginosa* FACHB-469、和 *M. aeruginosa* FACHB-905) 购自中科院水生生物研究所藻种库, 在光照培养箱中用 BG11 培养基于 25 °C 进行培养。

1.1.2 环境样品: 分别于 2009 年 5 月、8 月、11 月、2010 年 1 月至太湖采集 N1 (31°18'5.80"N 119°58'3.40"E)、N2 (31°16'30.20"N 120°3'59.90"E)、N4 (31°27'59.52"N 120°10'43.96"E)、S2 (30°58'14.37"N 120°8'16.40"E) 4 个点表层水样。水样采集后立即带回实验室处理。

1.2 方 法

1.2.1 藻密度的测定和基因组 DNA 的提取: 采用显微镜计数法对纯培养的微囊藻和环境样品中的蓝藻进行计数, 另取 20 mL 纯培养藻液和 200 mL 环境样品用 0.22 μm 滤膜进行过滤, 收集藻体用于 DNA 提取以及后续实验。DNA 提取方法参照文献 [8] 进行。

1.2.2 检测方法、目的基因和引物: 根据待测目的基因与定量标准品选取的不同, 采用 4 种方法(I、II、III、IV) 分别对蓝藻和微囊藻进行定量检测。检测的目的基因及其引物: 本实验选取微囊藻特异性藻蓝蛋白操纵子基因(Phycocyanin operon, PC)、微囊藻特异性 16S rRNA 基因以及蓝藻特异性 16S rRNA 基因作为定量检测的目的基因。针对各个目的基因所设计的引物见表 1。

表 1 检测方法、目的基因及引物
Table 1 Method, target gene and primers

方法 Method	标准品 Standard	目的基因 Target gene	引物 Primer	序列 Sequence (5'→3')	片段长度 Length (bp)	参考 Reference
I	Plasmid DNA	Phycocyanin operon	125F 234R	GGAGTACCAGGAGCTTCCGT ATTAAGCACTGCAATCGCC	110	This paper
II	<i>M. aeruginosa</i> PCC 7806 genomic DNA	Phycocyanin operon	125F 234R	GGAGTACCAGGAGCTTCCGT ATTAAGCACTGCAATCGCC	110	This paper
III	<i>M. aeruginosa</i> PCC 7806 genomic DNA	<i>Microcystis</i> 16S rRNA	Micr 184F Micr 431R	GCCGCRAGGTGAAAMCTAA AATCCAAARACCTTCCTCCC	250	[10]
IV	<i>M. aeruginosa</i> PCC 7806 genomic DNA	Cyanobacteria 16S rRNA	Cyan 108F Cyan 377R	ACGGGTGAGTAACRCGTRA CCATGGCGGAAAATTCCCC	230	[7]

在建立使用 SYBR Green I 作为定量检测方法的同时, 针对微囊藻 16S rRNA 基因用 TaqMan 探针法^[7]对结果进行了对比验证(探针 Micr 228F: FAM-AAGAGCTTGCGTCTGATTAGCTAGT-BHQ-1)。

定量标准品: 微囊藻藻蓝蛋白操纵子基因质粒标准品的制备方法(用于方法 I): 提取铜绿微囊藻 (*M. aeruginosa* PCC 7806) DNA, 用 PC-IGS 引物(正向 5'-GGCTGCTTGTTCACGCGACA-3', 反向 5'-CCAGTACCACCAGCAACTAA-3')对目的片段进行扩增^[9], 之后将 PCR 产物进行 TA 克隆, 获得大量大肠杆菌转化子并提取质粒, 再用限制性内切酶 *Ssp* I 将质粒线性化, 通过紫外分光光度法测量 DNA 浓度, 根据重组质粒的分子量将质量换算为拷贝数即得到定量标准品。

以基因组 DNA 作为标准品(用于方法 II、III、IV): 取实验室纯培养铜绿微囊藻 (*M. aeruginosa* PCC 7806)藻液 20 mL, 提取 DNA, 再按 10 倍梯度进行稀释即得标准品。同时另取 1 mL 用于显微镜计数(计数结果 4.90×10^7 个/mL)。

1.2.3 Real-Time PCR 检测条件: Real-Time PCR 反应体系体积为 20 μ L: SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (2 \times) 10.0 μ L, PCR 正向引物 0.4 μ L (10 μ mol/L), PCR 反向引物 0.4 μ L (10 μ mol/L), DNA 模板 2.0 μ L, 灭菌双蒸水 7.2 μ L。

PCR 反应条件: 微囊藻特异性藻蓝蛋白基因的扩增条件(方法 I、方法 II)为: 95 $^{\circ}$ C 10 min; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 10 s, 72 $^{\circ}$ C 12 s, 45 个循环; 循环结束后立即进行熔解曲线分析, 熔解曲线的程序为 72 $^{\circ}$ C 90 s,

之后从 72 $^{\circ}$ C 逐步升温到 95 $^{\circ}$ C, 每升高 1 $^{\circ}$ C 维持温度 5 s。微囊藻特异性 16S rRNA 和蓝藻特异性 16S rRNA 的扩增条件(方法 III、方法 IV)为: 95 $^{\circ}$ C 10 min; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 55 $^{\circ}$ C 10 s, 72 $^{\circ}$ C 15 s, 45 个循环; 熔解曲线的程序同上。每个样品均做 3 个平行样, 每次实验同时设置无模板阴性对照。标准曲线的绘制与检测结果的计算由软件 Rotor-Gene 6000 Series Software Version 1.7 完成。

2 结果与分析

2.1 产物特异性与定量标准曲线分析

针对 3 种待测目的基因, 以 *M. aeruginosa* PCC 7806 基因组 DNA 为模板进行扩增, 所得 PCR 产物经 3% 的琼脂糖凝胶电泳, 得到的电泳条带清晰, 无杂带, 与预期结果一致, 说明引物特异性较好。

用 SYBR Green I 作为实时定量 PCR 的荧光染料, 产物的特异性直接影响定量结果, 所以必需通过分析熔解曲线来确定是否有非特异性扩增产物。分析结果表明 4 种方法通过标准品检测得到的熔解曲线峰形单一, 产物特异性较好, 可用于定量分析。各个特异性扩增产物熔解温度(T_m 值)见表 2。

经多组试验, 质粒标准品初始模板浓度梯度设置为($1 \times 10^7 - 1 \times 10^2$) copies/ μ L (6 个浓度梯度, 每个梯度稀释 10 倍, 用于方法 I); 基因组 DNA 标准品初始模板浓度梯度设置为($4.9 \times 10^5 - 4.9 \times 10^0$) cells/ μ L (6 个浓度梯度, 用于方法 III、方法 IV, 方法 II 浓度梯度设置为($4.9 \times 10^5 - 4.9 \times 10^1$) cells/ μ L, 得到的标准曲线较为理想, R^2 在 0.99 以上。

将稀释后的标准品按照优化的条件进行定量 PCR 扩增, 反应完成后根据标准品的初始浓度, 利用仪器所配软件生成标准曲线(X 轴: 藻密度或 PC 基因拷贝浓度的对数值; Y 轴: 阈值循环数 C_t 值)。4 种定量所得的标准曲线参数如表 2 所示。

2.2 体系可靠性验证

体系可靠性验证的检测结果 C_t 值、标准差和变异系数见表 3。4 种方法所得的每个稀释度

的 C_t 值均比较稳定, 变异系数在 2% 以下, 重复性较好。

2.3 纯培养样品检测

取实验室纯培养的 3 株微囊藻进行检测。1、2、3 号样品分别为 *M. aeruginosa* PCC 7806、*M. aeruginosa* FACHB-469、*M. aeruginosa* FACHB-905, 按照上述方法, 每个藻种取 3 个平行样进行 DNA 提取、检测, 结果见表 4。

表 2 4 种方法的标准曲线参数
Table 2 Standard curve parameters of the methods

方法 Method	扩增效率 Coefficient	斜率 Slope	Y 轴截距 Y-Intercept	决定系数 R^2	产物溶解温度 T_m ($^{\circ}\text{C}$)
I	1.07	-3.166	33.570	0.997	84.8
II	1.05	-3.206	34.863	0.990	85.0
III	0.90	-3.574	28.683	0.997	89.0
IV	0.96	-3.428	29.697	0.999	88.0

表 3 4 种方法 C_t 值的变异系数及标准偏差
Table 3 Coefficient of variation and standard deviation of C_t in the methods

方法 Method		显微镜计数(细胞数/mL) Microscopic counting (cell number/mL)				
		1.11×10^7	1.11×10^6	1.11×10^5	1.11×10^4	1.11×10^3
I	C_t 均值 Mean	18.14	21.87	24.51	27.60	28.60
	C_t 标准偏差 s	0.22	0.24	0.39	0.42	0.11
	变异系数 CV (%)	1.21	1.10	1.59	1.52	0.38
II	C_t 均值 Mean	19.53	23.15	25.56	27.42	28.65
	C_t 标准偏差 s	0.06	0.19	0.31	0.47	0.12
	变异系数 CV (%)	0.31	0.82	1.21	1.71	0.42
III	C_t 均值 Mean	11.7	15.34	19.06	22.02	25.02
	C_t 标准偏差 s	0.07	0.18	0.22	0.34	0.44
	变异系数 CV (%)	0.60	1.17	1.15	1.54	1.76
IV	C_t 均值 Mean	13.76	16.97	20.69	23.93	26.40
	C_t 标准偏差 s	0.02	0.11	0.31	0.29	0.32
	变异系数 CV (%)	0.14	0.65	1.50	1.21	1.22

表 4 4 种方法及 TaqMan 探针法对纯培养样品检测结果
Table 4 Results of the pure culture sample detection by the four methods and TaqMan probe

样品 Sample	显微镜计数 Microscopic counting ($\times 10^6$ cells/mL)	方法 I Method I PC 拷贝数 PC copies ($\times 10^6$ cells/mL)	方法 II Method II 微囊藻细胞数 <i>Microcystis</i> ($\times 10^6$ cells/mL)	方法 III Method III 微囊藻细胞数 <i>Microcystis</i> ($\times 10^6$ cells/mL)	方法 IV Method IV 蓝藻细胞数 Cyanobacteria ($\times 10^6$ cells/mL)	TaqMan 探针法 TaqMan probe 微囊藻细胞数 <i>Microcystis</i> ($\times 10^6$ cells/mL)
1	12.1	18.9 \pm 0.16	13.8 \pm 0.09	12.0 \pm 0.04	9.79 \pm 0.60	11.5 \pm 0.12
2	12.7	17.3 \pm 0.14	13.5 \pm 0.12	13.4 \pm 0.06	9.72 \pm 0.58	11.4 \pm 0.12
3	4.03	5.57 \pm 0.16	3.51 \pm 0.15	3.76 \pm 0.48	2.39 \pm 0.16	2.62 \pm 0.16

方法 II、III、IV 测得的结果均为细胞数, *M. aeruginosa* FACHB-469 与 *M. aeruginosa* FACHB-905 仅在用方法 IV 检测时与显微镜计数存在显著性差异($P < 0.05$)。方法 II、III 检测结果与显微镜计数结果和 TaqMan 探针检测结果相一致, 说明方法 II、III 对微囊藻检测的准确性较好。

2.4 环境样品的检测

对太湖 N1、N2、N4、S2 四点采集的水样分别用以上 4 种方法进行检测, 检测结果分析如下所述。

方法 I: 将检测得到的微囊藻 PC 基因拷贝数对显微镜计数得到的微囊藻细胞数做图(图 1), 经相关性检验, 两者在 0.05 水平上显著相关, 其线性回归方程为: $y = -1.09 + 1.12x$ ($R^2 = 0.40$, $n = 15$, $P < 0.05$; 其中, 方程中的 y 表示的是 RT-qPCR 的检测结果取以 10 为底的对数, x 表示的是显微镜计数法所得的结果取以 10 为底的对数, 下同)。表明方法 I 的测定结果(PC 基因拷贝数)能够在一定程度上反映环境中微囊藻的数量, 但两者相关性不强, 需要更多的实验数据加以验证。

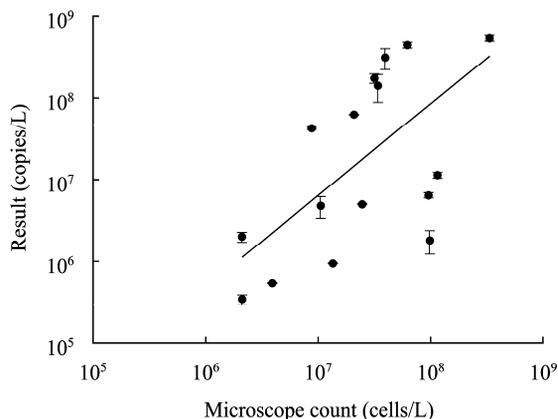


图 1 方法 I 检测结果与显微镜计数结果的相关性
Fig. 1 Relativity between the result of method I and microscope counting

方法 II、III: 将检测结果微囊藻细胞密度对显微镜计数所得的微囊藻细胞密度做图(图 2)。2 种方法检测结果与显微镜计数结果在 0.01 水平上都显著相关。方法 II 的检测结果与显微镜计数结果的线性回归方程为: $y = -1.58 + 1.23x$ ($R^2 = 0.73$, $n = 15$, $P < 0.01$), 方法 III 的检测结果与显微镜计数结果的线性回归方程为: $y = -1.09 + 1.09x$ ($R^2 = 0.62$, $n = 15$, $P < 0.01$)。对结果应用 Wilcoxon 符号秩和检验, 结果显示, 方法 II 检测结果与显微镜计数结果无显著性差异($t = -0.909$, $P = 0.363$), 而方法 III 的检测结果与显微镜计数结果差异显著($t = -2.613$, $P < 0.01$)。因此, 从对环境样品的检测结果来看, 方法 II 的结果与显微镜计数结果更相符合。

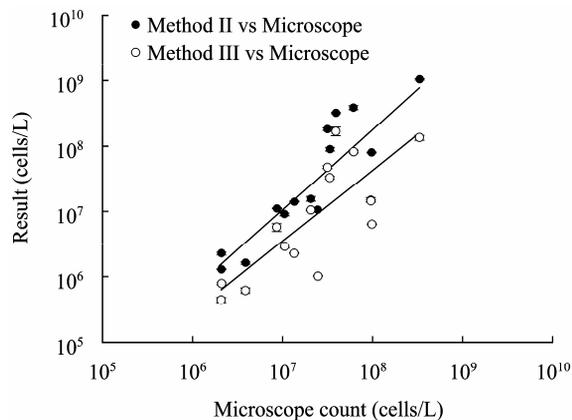


图 2 方法 II、III 检测结果与显微镜计数结果的相关性
Fig. 2 Relativity between the results of method II, method III and the result of microscope counting respectively

方法 IV: 将检测结果蓝藻细胞密度对显微镜计数得到的蓝藻细胞密度做图(图 3), 经相关性检验, 两者在 0.01 水平上显著相关, 其线性回归方程为: $y = 2.20 + 0.82x$ ($R^2 = 0.74$, $n = 15$, $P < 0.01$)。对结果应用

Wilcoxon 符号秩和检验, 结果显示, 方法 IV 对于蓝藻的检测结果高于显微镜计数结果 ($t=-3.408$, $P<0.01$)。说明在对环境样品进行检测时, 方法 IV 的结果与显微镜计数结果存在差异。

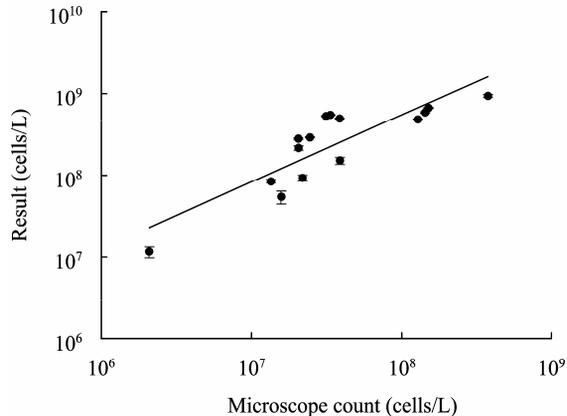


图3 方法 IV 检测结果与显微镜计数结果的相关性
Fig. 3 Relativity between the result of method IV detection and microscope counting

3 讨论

本实验针对微囊藻、蓝藻建立了 4 种 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测方法, 应用这些方法对纯培养和环境样品进行了检测, 并将结果与传统的显微镜计数方法进行了比较。

实时荧光定量 PCR 技术实现了从传统 PCR 的定性检测到定量检测的飞跃, 该技术具有灵敏度高、精确度高、检测范围宽、重复性好等特点。它在环境监测领域里的运用也越来越多, 通过它可以实现对某些细菌或者某种功能基因进行定量检测^[11-13]。将其运用在水华蓝藻的检测可以为水华蓝藻监测和研究水华发生问题提供方便快捷的检测途径。

本研究以 SYBR Green I 作为检测的荧光染料, 通用性好, 方法简便, 成本较低。用这种方法对藻类进行检测也有相关的报道^[14-15], 其成败的关键在于反应特异性, 当反应中出现非特异性扩增时, 荧光染料与非特异双链 DNA 结合, 就会产生干扰信号, 使结果产生偏差, 而本实验所用 3 对引物的 PCR 产物标准曲线检测范围内溶解曲线均为单一峰, 且扩

增片段长度与目的片段大小一致, 特异性较好。尽管如此, 在实验中发现对于低于标准曲线的最低浓度的样品溶解曲线的峰有时会在低于 80 °C 时出现, 并且对于无模板的阴性对照也会再出现类似的单峰, 推断主要是由于 PCR 体系模板数量过低时出现了非特异性扩增, 但对于较高浓度的模板无此现象, 所以检测结果仍然是可信的。

研究中采用了两种标准品作为检测标准品。方法 I 使用的是含目的基因的重组质粒, 其余 3 种方法使用的是基因组 DNA。以重组质粒作为检测标准品, 由于质粒分子量较小, 体系较均一, 进行 PCR 反应效率较高, 适用于样品中基因拷贝数的检测。比较方法 I、II 的标准曲线, 发现对于相同的目的基因, 用质粒做标准品, 标准曲线线性更好, 特别标准品在稀释至较低浓度时偏差较小, 使得对低浓度样品的定量更加准确, 但从结果表示的意义来看, 以拷贝数表示的结果不如细胞数直接。以 *M. aeruginosa* PCC 7806 基因组 DNA 作为标准品是以细胞数代替基因的拷贝数来表示检测结果, 由于样品中不同藻种每个细胞所含基因的拷贝数可能会不同, 所以检测结果得到的细胞数表示的是相当于 *M. aeruginosa* PCC 7806 的细胞数, 是一个相对的值。

从 4 种方法的标准曲线来分析, 对于理想的标准曲线, 扩增效率应为 1, 与此对应的斜率是 -3.32, 实际最佳的扩增效率在 0.9-1.05 即可。几种方法的标准曲线确定系数 R^2 都能达到 0.99 以上, 说明标准曲线线性较好, 结果可信度高。相比之下, 方法 II 和方法 III、IV 都是用基因组 DNA 作为标准品, 但方法 III、IV 标准曲线的定量范围更低一些。分析原因, 可能与 PC 基因和 16S rRNA 基因在细胞内的拷贝数有关, 同样的标准品中所含两种基因的拷贝数是不同的, PC 基因在微囊藻细胞中是低拷贝的(从完成基因组测序的 *M. aeruginosa* NIES-843 中找到 PC 基因只有 2 个拷贝), 而 16S rRNA 是多拷贝基因, 所以用基因组 DNA 作为定量标准品, 稀释到比较低的浓度时 PC 基因的检测灵敏度就不如 16S rRNA 基因。所以就检测限来说, 以 16S rRNA 作为检测目的基因, 其每个 PCR 反应检测限(定量范围最低可达

到 4.9 个基因组/ μL) 低于 PC 基因的检测限(定量范围最低可达到 100 个 PC 基因/ μL 或者 49 个细胞/ μL)。而从实际应用来看, 用基因组 DNA 做标准品, 操作起来比较方便, 以细胞数表示检测结果意义也比较明确, 不少研究都采用了这种方式^[16-18]。此外, 要将样品转化成为能够用于检测的 DNA, 必需经过 DNA 提取这一步骤, 用质粒作为标准品, 检测结果反映的是被提取出的 DNA 中基因的含量, 与原本样品中的基因含量之间存在一个提取效率的差异。如果以细胞数作为标准, 样品与标准品之间经相同的 DNA 提取步骤, 从理论上可以在一定程度上减小或消除 DNA 提取步骤对结果的影响。另外一个重要的原因是扩增效率差异的问题, 质粒与基因组 DNA 在分子大小上存在较大差异, 所以用质粒作标准品对基因组 DNA 进行定量, 可能会产生由于扩增效率不同而引起的系统误差, 这样的误差可能是十分巨大的^[19]。

从检测结果来看, 如果以显微镜计数结果为标准, 对于纯培养样品, 方法 II、III 与显微镜计数结果较吻合, 方法 IV 对于微囊藻的检测与显微镜计数结果存在一定差异。而对于环境样品的检测, 只有方法 II 测得的微囊藻细胞数与显微镜计数结果较符合; 而方法 III 与方法 IV 分别测得的微囊藻细胞数和蓝藻细胞数与显微镜计数结果均存在一定差异。分析其差异产生的原因, 一方面可能是由自身的检测原理造成的, 因为方法 III、IV 是以微囊藻 16S rRNA 基因作为标准, 结果表示的是样品中检测到的基因相对于 *M. aeruginosa* PCC 7806 的细胞数, 而环境中的不同种属的蓝藻或微囊藻所含的 16S rRNA 拷贝数差异可能较大, 与细胞数之间的关系并不确定; 另一方面显微镜计数也存在一些干扰因素, 对于太湖这样的浅水性湖泊, 风浪比较大, 水中悬浮颗粒含量较高, 一些个体较小的蓝藻被夹在其中无法分辨, 导致计数结果偏低。方法 I 测得的 PC 基因拷贝数与显微镜计数结果也有一定相关性, 所以微囊藻 PC 基因拷贝数也可以作为一个指标来反映微囊藻的数量, 但其可靠性需要更多的实验加以验证。

4 结论

本文对几种 SYBR Green I 荧光定量 PCR 检测藻类的方法进行了研究比较, 结果表明用藻蓝蛋白基因作为检测目的基因, 以 *M. aeruginosa* PCC 7806 基因组 DNA 作为标准品的测定方法能够满足对水华蓝藻监测的要求, 为水华蓝藻生物量的准确监测, 对水华蓝藻进行原位生长的研究提供了基础和技术参考。

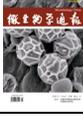
参考文献

- [1] Cullen JJ, Ciotti AM, Davis RF, et al. Optical detection and assessment of algal blooms[J]. *Limnology and Oceanography*, 1997, 42(5): 1223-1239.
- [2] Kutser T. Quantitative detection of chlorophyll in cyanobacterial blooms by satellite remote sensing[J]. *Limnology and Oceanography*, 2004, 49(6): 2179-2189.
- [3] Hu CM, Muller-Karger FE, Taylor C, et al. Red tide detection and tracing using MODIS fluorescence data: a regional example in SW Florida coastal waters[J]. *Remote Sensing of Environment*, 2005, 97(3): 311-321.
- [4] Schmitt-Jansen M, Altenburger R. Community-level microalgal toxicity assessment by multiwavelength-excitation PAM fluorometry[J]. *Aquatic Toxicology*, 2008, 86(1): 49-58.
- [5] Foulds IV, Granacki A, Xiao C, et al. Quantification of microcystin-producing cyanobacteria and *E. coli* in water by 5'-nuclease PCR[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2002, 93(5): 825-834.
- [6] Kurmayer R, Kutzenberger T. Application of Real-Time PCR for quantification of Microcystin genotypes in a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* sp.[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2003, 69(11): 6723-6730.
- [7] Rinta-Kanto JM, Ouellette AJA, Boyer GL, et al. Quantification of toxic *Microcystis* spp. during the 2003 and 2004 blooms in western Lake Erie using quantitative real-time PCR[J]. *Environmental Science & Technology*, 2005, 39(11): 4198-4205.
- [8] Kurmayer R, Christiansen G, Chorus I. The abundance of microcystin-producing genotypes correlates positively with colony size in *Microcystis* sp. and determines its microcystin net production in Lake Wannsee[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(2): 787-795.
- [9] Neilan BA, Jacobs D, Goodman AE. Genetic diversity and

- phylogeny of toxic cyanobacteria determined by DNA polymorphisms within the phycocyanin locus[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(11): 3875-3883.
- [10] Neilan BA, Jacobs D, Del Dot T, et al. rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus *Microcystis*[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1997, 47(3): 693-697.
- [11] Tay STL, Hemond FH, Krumholz LR, et al. Population dynamics of two toluene degrading bacterial species in a contaminated stream[J]. Microbial Ecology, 2001, 41(2): 124-131.
- [12] Cummings DE, Snoeyenbos-West OL, Newby DT, et al. Diversity of geobacteraceae species inhabiting metal-polluted freshwater lake sediments ascertained by 16S rDNA analyses[J]. Microbial Ecology, 2003, 46(2): 257-269.
- [13] Harms G, Layton AC, Dionisi HM, et al. Real-time PCR quantification of nitrifying bacteria in a municipal wastewater treatment plant[J]. Environmental Science & Technology, 2003, 37(2): 343-351.
- [14] Tomiokai N, Nagai T, Kawasaki T, et al. Quantification of *Microcystis* in a eutrophic lake by simple DNA extraction and SYBR Green real-time PCR[J]. Microbes and Environments, 2008, 23(4): 306-312.
- [15] Ha JH, Hidaka T, Tsuno H. Quantification of toxic *Microcystis* and evaluation of its dominance ratio in blooms using real-time PCR[J]. Environmental Science & Technology, 2009, 43(3): 812-818.
- [16] Briand E, Gugger M, François JC, et al. Temporal variations in the dynamics of potentially microcystin-producing strains in a bloom-forming *Planktothrix agardhii* (cyanobacterium) population[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(12): 3839-3848.
- [17] Hotto AM, Satchwell MF, Berry DL, et al. Spatial and temporal diversity of microcystins and microcystin-producing genotypes in Oneida Lake, NY[J]. Harmful Algae, 2008, 7(5): 671-681.
- [18] Rinta-Kanto JM, Saxton MA, DeBruyn JM, et al. The diversity and distribution of toxigenic *Microcystis* spp. in present day and archived pelagic and sediment samples from Lake Erie[J]. Harmful Algae, 2009, 8(3): 385-394.
- [19] Guescini M, Sisti D, Rocchi MBL, et al. A new real-time PCR method to overcome significant quantitative inaccuracy due to slight amplification inhibition[J]. Bmc Bioinformatics, 2008, 9: 326-337.

征订启事

2011 年中科院微生物所期刊联合编辑部联合征订

	《微生物学报》月刊(每月 4 日出版), 单价 55.00 元, 全年定价 660 元。刊号: ISSN 0001-6209; CODEN WSHPA8。国内邮发代号: 2-504; 国外邮发代号: BM67。
	《生物工程学报》月刊(每月 25 日出版), 单价 65.00 元, 全年定价 780 元。刊号: ISSN 1000-3061; CODEN SGXUED。国内邮发代号: 82-13; 国外邮发代号: BM5608。
	《微生物学通报》月刊(每月 20 日出版), 单价 48.00 元, 年价 576 元。刊号: ISSN 0253-2654; CODEN WSWPDI。国内邮发代号: 2-817; 国外邮发代号: BM413。
	《菌物学报》双月刊(单月 15 日出版), 单价 80 元, 全年定价 480 元。刊号: ISSN 1672-6472; CODEN JXUUAЕ。国内邮发代号: 2-499; 国外邮发代号: Q723。
订阅	欢迎广大读者直接与本刊发行部联系订购, 我们将按期免费为您邮寄。
	汇款地址: (100101)北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中科院微生物所 B401
	收信人: 《 》编辑部; 电话: 010-64806142; E-mail: bjb@im.ac.cn
	请在附言处注明“订刊费”及所订期刊名称、年代、卷、期和数量。