

赤潮藻的分子生物学检测技术^①

陈国福^{②*} 张春云^{*} 王广策^{③**} 张宝玉^{**}

(^{*} 哈尔滨工业大学海洋学院 威海 264209)

(^{**} 中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

(^{***} 天津科技大学 天津 300222)

摘 要 综述了目前用于赤潮藻的分子生物学检测技术,这些技术总体分为 3 类,即基于核酸提取的检测技术、全细胞杂交技术和酶联免疫吸附分析技术(ELISA)。分子生物学检测技术能用于自然水样的种群分析、有害赤潮藻种的日常监控、赤潮藻孢囊的鉴别和对压舱水外来生物的检测等。今后研究的重点是如何将各种已建立的检测技术运用于实践,特别是如何提高检测的速度、灵敏度,并发明新的检测设备,实现检测自动化。

关键词 赤潮, 赤潮藻, 鉴定, 检测, 分子生物学

0 引 言

赤潮(red tide)也称红潮,通常是指由于一些海洋浮游生物(包括微藻、原生动物或细菌)在水体中过度繁殖或聚集而使海水变色的现象^[1]。近年来,赤潮特别是有毒藻华(harmful algal blooms, HABs)已成为一种全球性的自然灾害^[2]。HABs 在我国呈现出暴发次数增多、面积扩大、持续时间延长和危害加剧的趋势。因此,研究和预防赤潮是当前我国迫切需要进行的科研任务。认识和预防赤潮,首先最根本的是对赤潮藻种进行正确鉴定,并建立赤潮藻种的快速检测方法,对水环境进行有效监控。

赤潮藻一般属于微藻,个体较小,不易准确鉴别。传统的鉴定方法主要依靠形态特征,不仅要求在光镜下对藻细胞进行初步判断,而且常需借助电镜对显微结构进行深入观察,而电镜样品的制备相当繁琐。因此,微藻的鉴定费时、费力且价格昂贵。在对水环境进行监控时,传统的检测方法主要是对活的或固定的赤潮生物进行形态观察,耗时费力,特别是当有大量样品需要处理时,更显示出其局限性。另一方面,赤潮微藻的形态可塑性较大,易随水环境的不同而发生变化。因此,如果没有相当的分类学知识或经验,用传统的分类学方法也很难准确鉴定。

特别是由于有些赤潮藻种间形态差异小,不同分类学家有时会采用不同的分类学标准,使得某些微藻的分类变得更加复杂。此外,一些赤潮藻的不同地理株有不同的生物学特性,如亚历山大藻 *Alexandrium spp.*、拟菱形藻 *Pseudo-nitzschia spp.* 和赤潮异湾藻 *Heterosigma akashiwo* 等,有些地理株产毒,而另一些则不产毒,但从形态上很难将它们区分。上述问题均给赤潮生物的鉴定带来巨大挑战。

分子生物学技术的发展为赤潮生物的鉴定和检测提供了新思路,检测赤潮藻的各种分子生物学技术应运而生。分子生物学检测技术具有简单、快速、准确及专一性强的特点,这些技术的应用大大提高了赤潮检测的速度和效率。因而成为目前赤潮生物检测研究的热点,本文对这方面的研究进展进行较系统的综述。

1 基于核酸提取的检测技术

目前,基于核酸提取的检测技术主要是以 rDNA 基因转录单位为靶分子。特别是 SSU rDNA 和 LSU rDNA,它们均由保守区和高变区镶嵌而成,这就使得设计出各种分类水平的特异性探针或引物成为可能。

① 863 计划(2007AA09Z110)、国家自然科学基金(U0633006)、哈尔滨工业大学(威海)研究基金(HIT(WH)07)、哈尔滨工业大学科研创新基金(IMOQ29080006)和城市水资源与环境国家重点实验室开放课题(ES200802)资助项目。

② 男,1977 年生,博士,讲师;研究方向:赤潮藻分子生物学及海水养殖病害。

③ 通讯作者, E-mail: gewang@ms.qdio.ac.cn
(收稿日期:2007-12-25)

1.1 斑点杂交技术(dot blot hybridization assay)

斑点杂交是最早出现的一种固相杂交技术。杂交使用的靶核酸从赤潮藻中直接提取或通过 PCR 扩增获得,然后将单链核酸或将双链核酸变性成单链固定在尼龙膜或硝酸纤维素膜上,用标记的特异性探针进行杂交,杂交后进行显色反应。通常一定量的藻细胞对应一定量的核酸,而一定量的核酸有相应的斑点灰度值,则可通过斑点灰度值来反推藻细胞的量或浓度。如 Guillou 等^[3]通过设计特异性的引物来扩增 SSU rDNA,将获得的核酸进行斑点杂交,来研究一种属于与硅藻亲缘关系较近的新建立的纲的浮游藻类在太平洋和地中海的丰度;Simon^[4]用斑点杂交和荧光全细胞杂交来对分属绿藻纲、定鞭藻纲和 Pelagophyceae 3 个纲的浮游藻类进行鉴定;Metfies 等^[5]建立了一种以三明治杂交为基础的电化学检测技术用以检测 *A. ostenfeldii*,在该技术中作者运用斑点杂交技术验证了探针的特异性。

斑点杂交一般只作定性研究,检测赤潮藻的存在与否,其定量是半定量的。造成这种结果的主要原因如下:(1)不能均一地从各种藻细胞中分离到核酸,如从易碎而细胞裸露的赤潮异湾藻中提取 RNA 较易^[6],而从带甲板的亚历山大藻中提取 RNA 则较难^[7],故当用一种适合前者而不适合后者的方法提取核酸进行斑点杂交定量分析时就可能低估后者的数量,更或产生假阴性的结果;(2)rRNA 水平随藻细胞的生理状态而发生变化^[8],在不同生理状态下进行检测的结果差异性较大,没有重复性;(3)杂交只发生在杂交膜表面,部分核酸的表面没有暴露,限制了探针的结合位点数,特别是如果核酸提取物中有碎屑残留,这一问题更严重,这样得到的定量值必偏低;(4)在核酸的提取过程中由于有核酸丢失及核酸降解。

1.2 三明治杂交技术(sandwich hybridization assay, SHA)

SHA 可在一定程度上克服斑点杂交中出现的问题^[9,10]。这种技术用 2 个或更多的探针进行杂交,第一探针为捕获探针,它与固相支持物的表面结合,含有互补核酸链的藻类提取物与之形成杂交双链,将细胞碎片、未杂交的核酸和杂质洗尽,然后被捕获的核酸同带有荧光或化学发光基团标记的第二探针——检测探针进行杂交。只有靶核酸与捕获探针和检测探针均互补时,所谓的“三明治”才能形成。在洗尽游离的探针后,杂交子可直接或间接通过检测探针上的标记基团进行定量检测。

SHA 最先被用作拟菱形藻的鉴定和检测。Scholin 等^[9]首先建立了 SHA 检测自然水样中的澳大利亚拟菱形藻 *Pseudo-nitzschia australis*,检测的极限可满足对该种赤潮进行预警的要求,随后又进一步优化了 SHA 条件,并设计了一套半自动机械处理设备,大大增强了检测灵敏度和速度^[10];此外,作者还对 SHA 的检测可靠性进行了证明:杂交信号不因细胞生长阶段的不同而发生变化^[11]。Tyrrell 等^[12]建立了针孢藻的 SHA 检测法,并证实它比常规的镜检法和荧光原位杂交(fluorescent *in situ* hybridization, FISH)法更适宜检测和计数,作者还将 SHA 运用到野外检测中,发现该法适合对该藻的日常环境监测^[13]。

近年来,随着对检测的特异性、灵敏度、快速性、实用性、经济性和简便性要求的提高,出现了一些新的以 SHA 为基础的检测技术。Cai 等^[14]在 SHA 中整合了核酸保护分析技术(nuclease protection assay, NPA),即在进行 SHA 之前,用一个 NPA 探针先与靶核酸杂交,通过核酸酶消化未杂交的单链核酸,再将双链核酸变性以使靶核酸游离出来。该技术在对微小原甲藻 *Prorocentrum minimum* 和海洋原甲藻 *P. micans* 的检测中体现出特异性强、灵敏度高和重复性好的特点。Metfies 等^[5]建立了 *A. ostenfeldii* 的电化学检测技术,该技术以 SHA 为基础,用 DNA 生物传感器将杂交信号转变成电信号,使检测更灵敏、简单和快速。Ahn 等^[15]将光学纤维微量分析法(fiber-optic microarray)整合到 SHA 中,对芬迪亚历山大藻 *A. fundyense*、*A. ostenfeldii* 和澳大利亚拟菱形藻进行检测,该方法的特点即是捕获探针结合到微球体上,并将微球体整合到光学纤维上,杂交信号的强弱通过拍照用软件进行分析;该方法的检测时间只有 45min,检测极限达到 5 个细胞,并能同时对 3 种赤潮藻进行检测。

1.3 PCR 检测技术

PCR 是一种灵敏的分子检测技术。PCR 检测最重要的是要防止交叉污染和去除干扰反应的抑制因子,因此,通常在反应中要多设对照,特别是阳性对照以表明 PCR 体系的有效性,防止假阴性出现。此外,PCR 检测还需考虑 DNA 的提取方法,应确保能高效均一地从所有分析样品中获得 DNA,实现检测的有效性。

常规 PCR 主要是一种定性分析,即说明分析样品中有无目标赤潮藻,这种定性分析分为 2 种。一种是直接通过 PCR 检测特异性基因。如 Akase

等^[16]根据赤潮异湾藻的色素体 DNA 设计引物,不但能实现对该藻的特异性检测,还能将其不同种群区分开;Ki 和 Han^[17]建立的 PCR 检测技术能实现对甲藻单细胞的检测;Borneta 等^[18]运用简单重复序列 (ISSR) 设计特征性扩增标记的特异性序列 (SCAR) 实现对链状亚历山大藻 *A. catenella* 和拟柔弱拟菱形藻 *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* 的检测。另一种方法以 PCR 为基础,用探针与 PCR 产物进行分子杂交。Asai 等^[19]先对阿芬亚历山大藻 *A. affine* 的部分 LSU rDNA 进行 PCR 扩增,扩增后用 FITC 或生物素标记的探针进行杂交,杂交后用抗 FITC 标记或生物素的抗体与之交联,杂交信号通过共振检测器 (resonance detector) 检测;Asai 等^[20]先用 PCR 扩增赤潮异湾藻的 SSU rDNA,然后用特异性的带有检测标记的探针对 PCR 产物进行杂交,能实验对该藻的检测,虽然检测过程耗时较长,但 PCR 后得到检测结果只需 10min。

随着对检测要求的提高,特别是常规的定性 PCR 检测技术只停留在实验水平上,不能应用于实践,因此出现了一些半定量技术。如 Penna 和 Magnani^[21]根据亚历山大藻的 ITS 序列设计了特异性探针,先 PCR 获得扩增产物,并通过 Southern 杂交转印到杂交膜上,随后用放射性探针进行杂交,实现了亚历山大藻的半定量检测。又如 Goodwin 等^[22]PCR 获得短凯伦藻 *Karenia brevis* 的 LSU D1-D2 rDNA,并在酶标板中完成微量杂交分析,能大量地对自然水样中的多种赤潮生物同时检测。

随着 PCR 技术,特别是实时定量 PCR 技术的发展,越来越多的研究集中在对目标赤潮藻的定量检测上,并重视检测技术在环境样品检测中的应用。Bowers 等^[23]以实时 PCR (real-time PCR) 为基础,建立了 *Pfiesteria piscicida* 的定量检测技术,作者考察了在对环境样品进行检测时可能遇到的各种影响因素,并用形态相似种进行交叉反应实验分析检测的特异性,此外,还分别用固定保存和未保存的样品进行实验,结果表明该技术适于对环境水样中目标赤潮藻的定量检测。Tengs 等^[24]比较了多个 *Gymnodinium galatheanum* 株系的 SSU rDNA 和色素体 DNA 序列,发现后者较前者高变,并以此为依据设计了种特异性探针,建立了该藻的 real-time PCR 检测技术,该技术能高度特异性地对自然水样中的藻种进行检测,检测的最小极限得到 2.5 个细胞/ml 水样。Zhang 等^[25]建立了以线粒体细胞色素 b 为靶基因的定量检测 *P. piscicida* 的技术,作者称之为 time step PCR,

其检测极限能达到 0.2 个细胞/ml。Casper 等^[26]建立了以核酸序列为基础的 PCR 扩增 (nucleic acid sequence-based amplification, NASBA) 检测短凯伦藻的方法,该方法以 rbcL mRNA 为靶序列,灵敏、高效和快速,能定量的对水环境中的短凯伦藻进行检测。Galluzzi 等^[27]建立了以 real-time PCR 为基础的定量检测微小亚历山大藻 *A. minimum* 的方法,该方法适用于实验室样品和固定剂保存的水环境样品,并且由该方法得到的结果和用光镜计数得到的结果相当,说明该方法能对水环境中的该藻进行有效监控。除了上述建立的对赤潮藻细胞的定量检测技术外,有关赤潮藻孢囊的检测方法也有报道,如 Kamikawa 等^[28]建立了塔玛亚历山大藻 *A. tamarense* 孢囊的实时 PCR 的定量检测技术,该技术能将其与链状亚历山大藻孢囊区分开。

2 全细胞杂交技术

全细胞杂交 (whole cell hybridization) 是一种基于细胞核基因、表面抗原和细胞壁糖类物质等来标记藻细胞,以鉴定和检测赤潮藻的方法。它通常运用特异性标记的探针,如寡核酸探针、肽核酸探针、抗体或凝集素等,与整个藻细胞进行杂交,由于探针一般用荧光素标记,被探针标记的藻细胞可通过荧光显微镜观察。全细胞杂交技术具有如下特点:(1) 无需核酸的提取,能保证细胞的自然形态,观察直观;(2) 能精确定量,且能同时检测多种赤潮藻;(3) 方法简单、快速、容易掌握,所用的检测设备简单。因此,将全细胞杂交应用到赤潮藻的鉴定和检测中有广泛的前景。

2.1 寡核苷酸探针技术

寡核苷酸探针技术是在赤潮藻的全细胞杂交中应用的最为广泛的一种。寡核苷酸探针一般以 rRNA 基因为模板来设计,通常是先对目标赤潮藻的 rDNA 进行 PCR 扩增、测序和 BLASTn 分析,下载 GenBank 中的与之有最大相似性的序列,进行 Alignment 分析,找出种特异性区域设计探针。探针通常含 18~25 bp,用荧光素 FITC 标记,探针合成可委托相关生物公司完成。荧光素标记的探针与藻细胞中的互补核酸杂交对其定位,并发荧光,因此这种杂交又称为荧光原位杂交。

2.1.1 基于 LSU rDNA 的 FISH

该方法是目前赤潮藻检测中最为常用的一种方法。这种方法通常以 LSU D1-D2 区为探针设计区,

并以胞质 rRNA 为靶序列。由于细胞质中含有大量 rRNA,因此杂交后的藻细胞带有强烈的荧光信号,在荧光显微镜下极易观察。

早在 1996 年,Miller 和 Scholin^[29]就将 FISH 应用于拟菱形藻的检测,同年,Scholin 等^[9]又建立了澳大利亚拟菱形藻的 FISH 检测技术,但这些研究都停留在实验水平和定性阶段。随后建立的 FISH 技术主要是基于上述研究成果的发展,研究的重点则放在将 FISH 应用到自然水域样品的定量检测中。Scholin 等^[10]将 FISH 运用于对自然水域的澳大利亚拟菱形藻的检测,但由于检测过程中存在致使细胞遗失的操作,因此该技术实际上是半定量的。为了避免 FISH 中的细胞遗失,Miller 和 Scholin^[30]设计了一种过滤装置,大大简化了杂交步骤,能最大限度地检测到拟菱形藻,并且可一次对多个样品进行检测。考虑到在实际运用中,样品从采样地到检测地一般需要长距离的运输,因此在 FISH 之前需要对样品进行固定,或样品在 FISH 后不能及时观察,Miller 和 Scholin^[30]考察了各种固定剂对杂交信号稳定性的影响,发现以盐-乙醇为基础的溶液固定的拟菱形藻的杂交信号较强,且杂交信号能长期保持。

近年来,FISH 被广泛地应用于其它赤潮藻的检测。Sako 等^[31]建立了塔玛亚历山大藻和链状亚历山大藻的实验室检测技术,检测只需 1h,且检测率达到 70%~80%。Mikulski 等^[32]将 FISH 应用于短凯伦藻的检测,并对固定剂进行筛选,发现用含 10%福尔马林和改进的盐-乙醇溶液混合固定的藻细胞的杂交效果较好,藻细胞在 4℃存放 7 个月后仍保持较强的杂交信号。Kim 和 Sako^[33]分别针对 SSU 和 LSU rDNA 设计了 2 个探针对 *A. tamiyavanichii* 进行 FISH 检测,发现用 2 个标记的效果明显优于单个探针。Hosoi-tanabe 和 Sako^[34]建立了一种简单、快速的室外 FISH 检测技术,它能在 30 min 内完成对塔玛亚历山大藻和链状亚历山大藻的检测。

此外,考虑到 FISH 的适用性时,一些学者考察了杂交信号在细胞的整个生长周期中的变化情况^[31,33,35]。由于检测的自然样品中藻细胞处于不同的生长阶段或不同的生理周期,而靶分子 rRNA 的表达量随细胞生理状况的不同而发生变化,这可能会对杂交信号产生影响,并影响检测率,但这并不影响 FISH 的实际应用^[31,33,35]。

2.1.2 基于 ITS 的 FISH

如前所述,基于 LSU rDNA 的 FISH 是以胞质 rRNA 为靶分子,而 rRNA 分子充斥于整个细胞基

质,因此探针标记后整个细胞呈现荧光。由于自然样品存在着多种生物和有机碎屑,在进行 FISH 检测时,它们大多数有自发荧光,这必然干扰对目标赤潮藻的检测,特别是当目标赤潮藻个体较小时,更难将其与周围的自发荧光物质分开。基于 ITS 的 FISH 能在一定程度上解决这一难题。该方法是以细胞核 rDNA 为标记对象,在杂交时通过热变性将双链 DNA 变成单链,继而与探针杂交。由于标记的是细胞核,在其周围有胞质作为背景,因此在荧光显微镜下易于将目标藻细胞和周围的杂质区分开。

有关该方法的报道较少,而且研究也只处于实验阶段。Adachi 等^[36]报道了应用此技术对塔玛亚历山大藻和链状亚历山大藻进行检测,但在随后的报道中作者对这一方法进行了评论,认为细胞核的杂交信号较弱,很难运用于实践^[31]。张宝玉等^[37]的研究结果似乎也证明了上述观点,作者以 ITS 为靶序列,对东海原甲藻 *P. donghaiense* 进行 FISH,虽然在细胞顶端可见绿色荧光,但根据其提供的杂交图片,可知荧光也较弱。

2.2 肽核酸(peptide nucleic acid, PNA)探针技术

PNA 探针技术是另一种检测赤潮藻的全细胞 FISH 技术。PNA 是一种新人工信息分子,它不带电荷,类似于肽链骨架结构并携带有核酸碱基,它的主链骨架为 N-(2-氨基乙基)-甘氨酸通过酰胺键反复连接而成的长链,侧链核酸碱基利用亚甲羰酰键与主链骨架相连^[38]。PNA 独特的分子结构决定了它较寡核苷酸探针的一些应用优势:(1)PNA 是一种人工合成的 DNA 类似物,能够靠碱基堆积力形成 Watson-Crick 碱基对,这种碱基对的形成是由它的 4 种单体首尾相连形成的链状结构^[38],4 种单体分别携带有 ATGC 4 种碱基,且均能与 RNA 和 DNA 特异结合形成杂交分子 PNA/DNA 或 PNA/RNA,且这种杂交的结合力及特异性比相应的 DNA 与 DNA 结合要高^[39];(2)PNA 分子骨架不含戊糖和磷酸基,故呈电中性,这种特征赋予其许多 DNA 探针所不具有的性质,如高灵敏度、高特异性、非盐依赖性和高稳定性等^[39];(3)从热动力学角度看,PNA/DNA 杂交分子的 T_m 值较相同序列的 DNA/DNA 双链高,这就使得 PNA 在杂交检测过程中的灵敏度较 DNA 要高得多^[38]。

PNA 探针仍然存在一些不足,如价格昂贵、易产生假阳性等限制了其广泛应用。目前,大部分工作还处于实验阶段,将 PNA 探针应用于赤潮藻检测的公开报道较少。美国学者 Connell 等采用半自动的

SHA, 研究比较了双标记的 PNA 探针和相应的双标记 DNA 探针以及三标记 DNA 探针检测亚历山大藻的效果, 表明前者的检测效果明显优于后二者^[40]。国内侯建军等^[41]应用 PNA 探针对纤小裸甲藻 *Takayama pulchellum* 进行检测, 表明 PNA 探针的杂交条件容易控制, 其疏水性致使其有较高的通透率, 易于进入细胞, 杂交时间短, 30 min 即可获得理想的杂交效果。

2.3 免疫荧光探针技术

免疫荧光探针技术即利用抗体包括单克隆抗体 (monoclonal antibodies, MAbs) 和多克隆抗体 (polyclonal antibodies, PAbs) 来识别藻细胞表面的蛋白, 特异性抗体标记靶细胞后, 用免疫荧光法和相关抗原抗体反应可视化的方法来进行观察^[42-44]。免疫荧光探针技术的关键在于特异性抗体的研制, 一般抗体制备包括如下几个步骤: (1) 分离、纯化并培养目标赤潮藻; (2) 细胞特异性表面蛋白的分离与纯化; (3) 用纯化的蛋白、整体细胞或细胞破碎物免疫动物; (4) 抗体的分离与纯化。

MAbs 和 PAbs 已被用作于多种有毒赤潮藻的鉴定或检测。Anderson 等^[45]制备了一种针对引发褐色赤潮的金藻——*Aureococcus anophagefferens* 的特异性 PAb, 并且该抗体被用于研究 *A. anophagefferens* 在美国东北海岸的分布情况^[46]。Bates 等^[47]制备了多种 PAbs 用以识别尖刺拟菱形藻 *Pseudonitzschia pungens* 的有毒株和无毒株。抗体也被应用于有毒甲藻的鉴定与识别。Nagasaki 等^[48]制备了一种抗血清, 它能对分离自日本海的 9 株米氏裸甲藻 *Gymnodinium mikimotoi* 进行标记; Vrieling 等^[49]制备的抗血清能与分离自西欧的金黄环沟藻 *Gyrodinium aureolum* 的细胞表面发生抗原抗体反应。此外, MAbs 也被运用于原甲藻^[50,51]、有毒亚历山大藻^[35,52-54]、*P. piscicida*^[55]、锥状斯氏藻 *Scrippsiella trochoidea*^[56] 和针孢藻^[51]等的鉴定。

此外, 需要指出的是同胞质 rRNA, 细胞的表面抗原也可能随藻细胞生理状态的不同而有或多或少的变化, 造成抗体标记信号的减弱, 这可能影响流式细胞仪对标记细胞的检测。尽管 Vrieling 等^[44]发现 2 种旋沟藻 (*G. aureolum* 和 *G. nagasakiense*) 细胞的抗原位点数量除了在细胞衰亡后期有明显的减少外, 在其余生长阶段没有明显变化, 但这可能是一个异常情况; Anderson 等^[35]的研究结果很好地说明了这一点, 作者发现在不同生理状况下, 与寡核苷酸探针标记相比, MAb 标记更不稳定, 因此建议手工检

测与流式细胞仪检测相结合来确定最终结果。

2.4 凝集素作为探针的检测技术

凝集素是一类非免疫源性的糖结合蛋白或糖蛋白, 它可以特异性地与单糖或寡糖非共价地结合^[57]。凝集素与糖结合的特性被应用于微生物的分类, 而凝集素与微生物的相互作用被用于细菌和原生生物的定型研究^[58]。

Fritz^[59]首先将凝集素作为探针来研究海洋浮游生物, 同年, Costas 等^[60]报道了用种特异性或株特异性的凝集素能将单细胞藻类不同的种或株系加以鉴别。凝集素能用于有毒赤潮藻的检测, 如 Costas 和 Rodas^[61]把凝集素探针用于鉴别有毒和无毒的甲藻, 并初步表明有甲板的种类较无甲板有更多糖原决定簇, 因而有更多的凝集素结合位点; Rhodes^[62]用凝集素对分离自新西兰沿岸水域的有潜在毒性的拟菱形藻进行了鉴定。

3 酶联免疫吸附分析技术

目前, 用于赤潮藻检测的酶联免疫吸附分析技术 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 主要包括 2 种。其中一种与 PCR 偶联, 即所谓的 PCR-ELISA。这种方法是将特异性引物的 5' 端用生物素标记, 用 PCR 扩增靶基因, 其中 PCR 产物用 DIG 标记, 然后将 PCR 产物加入抗生物素蛋白包被的酶标板, 由于发生抗原抗体反应, PCR 产物吸附在酶标板上, 用碱性磷酸酶标记的抗 DIG 抗体与之反应, 最后加入显色底物显色, 则可以根据显色的深浅来反推检测样品中的藻细胞浓度。Penna 和 Magnani^[21]建立了 PCR-ELISA 检测技术, 对实验室培养和自然海水样品中的塔玛亚历山大藻进行了检测, 尽管该方法是半定量的, 但其最低检测极限可以得到 3 个细胞, 说明它具有较高的灵敏度。Caron 等^[63]报道了将 ELISA 用于 *A. anophagefferens* 检测的另一种方法, 该方法的关键同运用抗体探针进行全细胞杂交一样, 需要制备特异性的抗体, 它以整个细胞作为考察对象, 将其对酶标板进行标记, 然后用特异性的抗体进行 ELISA 分析。Xin 等^[64]也报道了抗体的 2 种 ELISA 应用方式: (1) 斑点免疫分析法, 即将藻细胞过滤于杂交膜 (硝酸纤维素膜) 上, 用抗体进行 ELISA 分析, 最后根据显色斑点的灰度值推算藻细胞含量; (2) 竞争性 ELISA (competitive ELISA, cELISA), 即用藻细胞裂解碎片对酶标板进行包被, 再分别加入完整的藻细胞和多克隆抗体进行 cELISA 分析。

4 分子生物学检测的辅助设备

要将分子生物学检测技术应用于 HABs 的日常监测中,不管检测是在实验室还是在野外进行,都必须致力于简单、快速、易操作和性价比、自动化较高的辅助设备的开发。目前,许多实验室都在这方面做了一些相关工作。Scholin 等^[10]开发了一种便携式的自动化工作站,它的原理是应用 SHA 来检测拟菱形藻等相关有毒赤潮藻。Miller 和 Scholin^[30]制备了一种简易过滤装置,该装置可以直接将多个检测品同时进行 FISH 检测。Metfies 等^[5]也运用了一种 DNA 生物传感器,加速了 SHA 对赤潮藻的检测。一些实验室还开发了一些图像采集和分析软件,用于如斑点杂交中的斑点灰度的计算和 FISH 分析中的荧光标记细胞的计数等^[7]。此外,流式细胞仪也被用于分子生物学方法的检测中,如全细胞杂交检测等^[31,35]。

5 分子生物学检测技术的应用

5.1 种群分析

种群分析对于认识和了解赤潮意义重大,通过对一个地区的种群动力学和物理参数,如温度、盐度和营养盐水平等分析,可以建模来预测该地区是否有暴发赤潮的可能。运用分子生物学检测方法,特别是全细胞荧光探针技术,可以方便地进行种群分析。由于可以设计不同的分类水平,包括生物界、种及株系水平的特异性探针,在种群分析中,将各个探针分别用不同的荧光基团进行标记,在一次杂交检测中,将多个探针同时加入杂交体系,则可方便地借助检测设备将不同荧光探针标记的生物区分开。

5.2 有害赤潮藻种的监控

要防治赤潮,就要对易引发赤潮的藻种进行周或日监测。这种监测在赤潮高发区(特别是水产养殖区)尤为重要,水产养殖者可以在赤潮暴发前采取相应的措施将损失降为最小。对有毒赤潮的监测,一般可以通过高效液相色谱对毒素进行检测,通过毒素含量的高低对赤潮藻浓度进行估计。这种方法虽然快速,但费用较高,不适于日常监测。分子生物学方法较之有速度更快,费用更低的特点,在赤潮藻的日常监控中具有更大的应用价值。

5.3 赤潮藻孢囊的鉴别

浮游植物孢囊具有较少的形态特征,一般很难

将其与相关种的孢囊区分开。因此,孢囊的生物学鉴定一般需要待其孵化成营养细胞才能完成,而孢囊是某些赤潮突发的成因,因此常规的方法可能导致对赤潮预防的不及时。分子生物学检测法可以不考虑孢囊的细胞形态,如 PCR 检测法和 FISH 检测法等均可完成对孢囊的快速检测。

5.4 压舱水外来生物的检测

由于压舱水(ballast water)在生物的全球性扩散中扮演着重要角色,它已引起许多国家,特别是一些水产养殖大国的重视。一些赤潮藻在全球范围内的传播使得它成为某些地区的异源种,并引发赤潮给当地造成公共危害和环境破坏。因此,对压舱水进行生物检测是有必要的。但是常规的检测方法非常困难,并且耗时费力。分子生物学检测法较迅速,且结果可靠,可以应用到对压舱水生物的调研和日常检测中,以避免外来有害生物的危害。

6 结束语

尽管目前已报道的检测赤潮藻的分子生物学方法有多种,但总的来说大多数检测技术还处于实验室水平阶段,或处于中试阶段,只有少数已应用于实践。由于检测方法有多种,在实践中应该在了解各种方法的优缺点的基础上来选择适当的方法。首先应该根据实验需要提供的信息来选择相应的方法,比如 FISH 能揭示标记细胞的大小和形态,并能确定探针的特异性,而 SHA 只能提供目标藻有无的信息,在对室外样品进行检测时不能提供探针的特异性信息,因此后者必须广泛地用非目标藻进行交叉反应实验以确认探针的特异性。其次,应该根据不同的赤潮藻选择不同的方法,如甲藻由于含有甲板,经反复操作后细胞形态保持完整,适于全细胞杂交,而针孢藻细胞易于破碎,不适于全细胞杂交,而更适合于 PCR 检测。此外,应该根据其它要求选择相应的方法,如 PCR 法费时较长,但灵敏度高;抗体探针法灵敏度高,但抗体制备复杂,且细胞表面抗原易变影响检测;凝集素探针的筛选较为繁琐;NPA 探针价格昂贵等。

可以预见,随着分子生物学的发展,将会不断涌现出新的检测赤潮藻的分子生物学技术。今后研究的重点应该是如何将各种已建立和将要建立的检测技术运用于实践,特别是如何提高检测的速度、灵敏度,并发明新的检测设备,使检测自动化。

参考文献

- [1] 周名江, 朱明远. 我国近海有害赤潮发生的生态学、海洋学机制及预测防治研究进展. 地球科学进展, 2006, 21 (7): 673-679
- [2] Hallegraeff G M. Harmful algal blooms: a global overview. In: Manual on Harmful Marine Microalgae. United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization, Paris, 2003, 25-49
- [3] Guillou L, Der staay S-Y M-V, Herve C, et al. Diversity and abundance of holidophyceae (Heterokonta) in two oceanic regions. *Appl Environ Microb*, 1999, 65 (10): 4528-4536
- [4] Simon N, Campbell L, Örnölfssdóttir E, et al. Oligonucleotide probes for the identification of three algal groups by dot blot and fluorescent whole-cell hybridization. *Appl Environ Microb*, 2000, 47 (1): 76-84
- [5] Metfies K, Huljic S, Lange M, et al. Electrochemical detection of the toxic dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* with a DNA-biosensor. *Biosens Bioelectron*, 2005, 20: 1349-1357
- [6] Tyrrell J V. Molecular genetic analysis of toxic and non-toxic phytoplankton: [Unpublished MSc thesis]. Auckland: University of Auckland, New Zealand. 1994
- [7] Tyrrell J V, Bergquist P R, Saul D J, et al. Oligonucleotide probe technology as applied to the study. *New Zeal J Mar Fresh*, 1997, 31: 551-560
- [8] Lim E L, Amaral L A, Caron D A, et al. Application of rRNA-based probes for observing marine nanoplanktonic protests. *Appl Environ Microb*, 1993, 59: 1647-1655
- [9] Scholin C A, Buch K R, Britschgi T, et al. Identification of *Pseudo-nitzschia australis* (Bacillariophyceae) using rRNA-targeted probes in whole cell and sandwich hybridization formats. *Phycologia*, 1996, 35 (3): 190-197
- [10] Scholin C, Miller P E, Buck K, et al. Detection and quantification of *Pseudonitzschia australis* in cultured and natural populations using LSU rRNA-targeted probes. *Limnol Oceanogr*, 1997, 42: 1265-1272
- [11] Scholin C A, Marin R III, Miller P E, et al. DNA probes and a receptor-binding assay for detection of *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) species and domoic acid activity in cultured and natural samples. *J Phycol*, 1999, 35, 1356-1367
- [12] Tyrrell J V, Bergquist P R, Bergquist P L, et al. Detection and enumeration of *Heterosigma akashiwo* and *Fibrocapsa japonica* (Raphidophyceae) using rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Phycologia*, 2001, 40 (5): 457-467
- [13] Tyrrell J V, Connell L B, Scholin C A. Monitoring for *Heterosigma akashiwo* using a sandwich hybridization assay. *Harmful algae*, 2002, 1: 205-214
- [14] Cai Q S, Li R X, Zhen Y, et al. Detection of two *Prorocentrum* species using sandwich hybridization integrated with nucleic acid protection assay. *Harmful Algae*, 2006, 5 (3): 300-309
- [15] Ahn S, Kulis D M, Erdner D L, et al. Fiber-optic microarray for simultaneous detection of multiple harmful algal bloom species. *Appl Environ Microb*, 2006, 72 (9): 5742-5749
- [16] Akase S I, Yoshikawa T, Hayakawa N, et al. Molecular identification of red tide-causing microalga *Heterosigma akashiwo* strains based on their chloroplast DNA sequences. *Fisheries Sci*, 2004, 70: 1043-1050
- [17] Ki J S, Han M S. Sequence-based diagnostics and phylogenetic approach of uncultured freshwater dinoflagellate *Peridinium* (Dinophyceae) species, based on single-cell sequencing of rDNA. *J Appl Phycol*, 2005, 17: 147-153
- [18] Borneta B, Antoinea E, Francoisea S, et al. Development of sequence characterized amplified region markers from inter-simple sequence repeat fingerprints for the molecular detection of toxic phytoplankton *Alexandrium catenella* (Dinophyceae) and *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* (Bacillariophyceae) from French coastal waters. *J Phycol*, 2005, 41 (3): 704-711
- [19] Asai R, Nakanishi K, Nakamura C, et al. A polymerase chain reaction-based ribosomal DNA detection technique using a surface plasmon resonance detector for a red tide causing microalga, *Alexandrium affine*. *Phycol Res*, 2003, 51: 118-125
- [20] Asai R, Ootani K, Nomura Y, et al. PCR-based ribosomal DNA detection technique for microalga (*Heterosigma carterae*) causing red tide and its application to a biosensor using labeled probe. *Mar Biotechnol*, 2003, 5: 417-423
- [21] Penna A, Magnani M. A PCR immunoassay method for the detection of *Alexandrium* (Dinophyceae) species. *J Phycol*, 2000, 36: 1183-1186
- [22] Goodwin K D, Cotton S A, Scorzettic G, et al. A DNA hybridization assay to identify toxic dinoflagellates in coastal waters: detection of *Karenia brevis* in the Rookery Bay National Estuarine Research Reserve. *Harmful Algae*, 2005, 4: 411-422
- [23] Bowers H A, Tengs T, Glasgow H B, et al. Development of real-Time PCR assays for rapid detection of *Pfiesteria piscicida* and related dinoflagellates. *Appl Environ Microb*, 2000, 66 (11): 4641-4648
- [24] Tengs T, Bowers H A, Ziman A P, et al. Genetic polymorphism in *Gymnodinium galatheanum* chloroplast DNA sequences and development of a molecular detection assay. *Mol Ecol*, 2001, 10 (2): 5-15
- [25] Zhang H, Bhattacharya D, Lin S J. Phylogeny of dinoflagellates based on mitochondrial cytochrome b and nuclear small subunit rDNA sequence comparisons. *J Phycol*, 2005, 41:

411-420

- [26] Casper E T, Paul J H, Smith M C, et al. Detection and quantification of the red tide dinoflagellate *Karenia brevis* by real-time nucleic acid sequence-based amplification. *Appl Environ Microb*, 2004, 70 (8): 4727-4732
- [27] Galluzzi L, Penna A, Bertozzini E, et al. Development of a real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Alexandrium minutum* (a dinoflagellate). *Appl Environ Microb*, 2004, 70 (2): 1199-1206
- [28] Kamikawa R, Hosoi-tanabe S, Nagai S, et al. Development of a quantification assay for the cysts of the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* using real-time polymerase chain reaction. *Fisheries Sci*, 2005, 71: 987-991
- [29] Miller P E, Scholin C A. Identification of cultured *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) using species-specific LSU rRNA-targeted fluorescent probes. *J Phycol*, 1996, 32: 646-655
- [30] Miller P E, Scholin C A. Identification and enumeration of cultured and wild *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) using species-specific LSU rRNA-targeted fluorescent probes and filter-based whole cell hybridization. *J Phycol*, 1998, 34: 371-382
- [31] Sako Y, Hosoi-Tanabe S, Uchida A. Fluorescence in-situ hybridization using rRNA-targeted probes for simple and rapid identification of the toxic dinoflagellates *Alexandrium tamarense* and *A. catenella*. *J Phycol*, 2004, 40: 598-605
- [32] Mikulski C M, Morton S L, Doucette G J. Development and application of LSU rRNA probes for *Karenia brevis* in the Gulf of Mexico, USA. *Harmful Algae*, 2005, 4: 49-60
- [33] Kim C J, Sako Y. Molecular identification of toxic *Alexandrium tamiyawanichii* (Dinophyceae) using two DNA probes. *Harmful Algae*, 2005, 4: 984-991
- [34] Hosoi-Tanabe S, Sako Y. Development and application of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) method for simple and rapid identification of the toxic dinoflagellates *Alexandrium tamarense* and *A. catenella* in cultured and natural seawater. *Fisheries Sci*, 2006, 72: 77-82
- [35] Anderson D M, Kulis D M, Keafer B A, et al. Detection of the toxic dinoflagellate *Alexandrium fundyense* (Dinophyceae) with oligonucleotide and antibody probes: variability in labeling intensity with physiological condition. *J Phycol*, 1999, 35: 870-883
- [36] Adachi M, Sako Y, Ishida Y. Analysis of *Alexandrium* (Dinophyceae) species using sequences of the 5.8S ribosomal DNA and internal transcribed spacer regions. *J Phycol*, 1996, 32: 424-432
- [37] 张宝玉, 王广策, 齐雨藻等. 用荧光原位杂交 (FISH) 技术鉴定赤潮甲藻的研究. 高技术通讯, 2005, 15 (11): 101-105
- [38] Nielsen P E, Egholm M, Berg R H. Sequence selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine substituted polyamide. *Science*, 1991, 254 (5037): 1491-1500
- [39] Kim S K, Nielsen P E, Egholm M. Right handed trip lex formed between Peptide Nucleic Acids PNA-T8 and Poly (dA) shown by linear and circular dichroism spectrosc. *J Am Chem Soc*, 1993, 115: 6477-6481
- [40] 侯建军, 黄邦钦, 赖红艳. 肽核酸探针技术在赤潮生物检测中的应用. 中国公共卫生, 2005, 21 (12): 1524-1526
- [41] 侯建军, 黄邦钦. 用肽核酸探针技术检测微小裸甲藻的研究. 1998-2005 年中国海洋赤潮灾害分析研究. 第三届南中国海有害赤潮的防治与管理国际研讨会. 中国香港: 科学出版社, 2006, 368-373
- [42] Campbell L, Carpenter E J. Characterization of phycoerythrin-containing *Synechococcus* spp. by immunofluorescence. *J Plankton Res*, 1987, 9: 1167-1181
- [43] Shapiro L P, Campbell L, Haugen E M. Immunochemical recognition of phytoplankton species. *Mar Ecol Prog Ser*, 1989, 57: 219-224
- [44] Vrieling E G, van de Poll W H, Vriezekolk G, et al. Immuno-flow cytometric detection of the ichthyotoxic dinoflagellates *Gyrodinium aureolum* and *Gymnodinium nagasakiense*: independence of physiological state. *J Sea Res*, 1997, 37: 91-100
- [45] Anderson D M, Kulis D M, Cosper E M. Immunofluorescent detection of the brown tide organism *Aureococcus anophagefferens*. In: Novel Phytoplankton Blooms: Causes and Impacts of Recurrent Brown Tides and Other Unusual Blooms. New York: Springer-Verlag, 1989, 213-228
- [46] Anderson D M, Keafer B A, Kulis D M, et al. An immunofluorescent survey of the brown tide chrysophyte *Aureococcus anophagefferens* along the northeast coast of the United States. *J Plankton Res*, 1993, 15: 563-580
- [47] Bates S S, Leger C, Keafer B A, et al. Discrimination between domoic-acid-producing and nontoxic forms of the diatom *Pseudonitzschia pungens* using immunofluorescence. *Mar Ecol Prog Ser*, 1993, 100: 185-195
- [48] Nagasaki K, Uchida U, Ishida Y. A monoclonal antibody which recognizes the cell surface of red tide alga *Gymnodinium nagasakiense*. *Nippon Suisan Gakk*, 1991, 57: 1211-1214
- [49] Vrieling E G, Peperzak L, Gieskes W W C, et al. Detection of the ichthyotoxic dinoflagellate *Gyrodinium* (cf.) *aureolum* and morphologically related *Gymnodinium* species using monoclonal antibodies: a specific immunological tool. *Mar Ecology Prog Ser*, 1994, 103: 165-174

- [50] Vrieling E G, Gieskes W W C, Colijn F, et al. Immunochemical identification of toxic marine algae: first results with *Prorocentrum micans* as a model organism. In: Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 1993. 925-931
- [51] 向军俭, 凌钦婕, 吕颂辉等. 四种赤潮藻多克隆抗体的制备及特异性分析. 暨南大学学报(自然科学版), 2005, 26 (5): 700-704
- [52] Adachi M, Sako Y, Ishida Y, et al. Cross-reactivity of five monoclonal antibodies to various isolates of *Alexandrium* as determined by an indirect immunofluorescence method. *Nippon Suisan Gakka*, 1993, 59: 1807
- [53] Sako Y, Adachi M, Ishida Y. Preparation and characterization of monoclonal antibodies to *Alexandrium* species. In: Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 1993. 87-93
- [54] Chang F H, Garthwaite I, Anderson D M, et al. Immunofluorescent detection of a PSP-producing dinoflagellate *Alexandrium minimum*, from Bay of Plenty, New Zealand. *New Zeal J Mar Fresh*, 1999, 33: 533-543
- [55] Lin S, Feinstein T N, Zhang H, et al. Development of an immunofluorescence technique for detecting *Pfiesteria piscicida*. *Harmful Algae*, 2003, 2: 223-231
- [56] Okazaki K, Iwaoka T, Murakami N, et al. Production of monoclonal antibody against *Scrippsiella trochoidea* cysts and its application to analysis during cyst formation and enzyme-linked immunosorbent assay. *Bioscience Biotechnol Biochem*, 2001, 65: 470-473
- [57] Goldstein I J, Hughes R C, Monsigny M, et al. What should be called a lectin? *Nature*, 1980, 285: 66
- [58] Slinfkin M, Doyle R J. Lectins and their application to clinical microbiology. *Clinical Microbiology Review*, 1990, 3: 197-218
- [59] Fritz L. The use of cellular probes in studying marine phytoplankton. *Kor J Phycol*, 1992, 7: 319-324
- [60] Costas E, Gonzalez-Chavarri E, Aguilera A, et al. Use of lectins to recognize and differentiate unicellular algae. *Bot Mar*, 1993, 36: 1-4
- [61] Costas E, Lopez-Rodas V. Identification of marine Dinoflagellates using fluorescent lectins. *J Phycol*, 1994, 30: 987-990
- [62] Rhodes L L. Identification of potentially toxic *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) in New Zealand coastal waters, using lectins. *New Zeal J Mar Fresh*, 1998, 32: 537-544
- [63] Caron D A, Dennett M R, Moran D M, et al. Development and application of a monoclonal-antibody technique for counting *aureococcus anophagefferens*, an alga causing recurrent brown tides in the mid-atlantic united states. *Appl Environ Microb*, 2003, 69 (9): 5492-5502
- [64] Xin Z Y, Yu Z G, Wang T C, et al. Identification and quantification of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium* sp. with competitive enzyme-linked immunosorbent assay (cELISA). *Harmful Algae*, 2005, 4: 297-307

Advances in molecular detection techniques for red tide algae

Chen Guofu^{*}, Zhang Chunyun^{*}, Wang Guangce^{** ***}, Zhang Baoyu^{**}

(^{*} College of Oceanology, Harbin Institute of Technology, Weihai 264209)

(^{**} Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071)

(^{***} Tianjin University of Science Technology, Tianjin 300222)

Abstract

This paper reviews the molecular methods for detection of red tide-causing algal species, which outperform other kinds of approaches because of their advantages in simplicity, speediness, precision and specificity. The molecular techniques can be classified into three categories: the detection based on extraction of DNA, the whole cell hybridization, and the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Molecular methods can be extensively applied to many fields, including natural population analysis, daily monitoring of harmful algae, identifying spores and detecting ballast water. The future work should emphasize on how putting the established methods into practice, improving the detection rapidity and sensitivity, and inventing new detection instruments for detection automation.

Key words: red tide, red tide algae, identification, detection, molecular biology