



## 论文

# 荧光原位杂交技术和流式细胞仪用于环境样品中产毒及非产毒微囊藻的定量监测

甘南琴, 黄群, 郑凌凌, 宋立荣\*

中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072

\* 联系人, E-mail: lrsong@ihb.ac.cn

收稿日期: 2009-10-10; 接受日期: 2009-11-17

国家重点基础研究发展计划(批准号: 2008CB418000)、国家自然科学基金(批准号: 20407017)、国家自然科学基金-云南省联合基金(批准号: U0833604)和中国科学院重大交叉项目(批准号: KZCX1-YW-14-1)资助

**摘要** 全球范围内, 高频次、大范围暴发的蓝藻水华对淡水水体环境造成严重影响. 微囊藻因其在生长特别是衰亡过程中向水体释放微囊藻毒素而威胁人类健康. 因此, 分析其产毒株及非产毒株在环境样品中的组成, 建立产毒蓝藻的预报及评价体系显得极为重要. 本文采用荧光原位杂交技术结合流式细胞技术实现对环境样品中产毒藻株的鉴别与定量. 针对目标基因 *mcyA* 设计的、以地高辛标记的双链 DNA 探针可有效应用于产毒微囊藻 FACHB 905 和 PCC7806 的鉴别. 分别对来自滇池、太湖和关桥的 11 个样品进行分析显示, 该方法与传统的形态学鉴定及 PCR 方法有较好的匹配. 荧光原位杂交技术与流式细胞相结合可有效鉴别产毒与非产毒微囊藻, 尤其可以对野外样品中产毒与非产毒藻株进行简便、可视化地鉴别, 从而达到对产毒微囊藻水华早期预警的目的.

**关键词**蓝藻水华  
产毒微囊藻  
荧光原位杂交技术  
流式细胞术

随着经济的快速发展等诸多因素, 藻类水华已成为全球淡水湖泊面临的严重问题. 有毒蓝藻水华对人类健康及地表水生态质量造成威胁. 各种蓝藻毒素中, 肝毒素较神经毒素等更为常见, 其在微囊藻 (*Microcystis*)、鱼腥藻 (*Anabaena*) 和浮颤藻 (*Planktothrix*) 等蓝藻中均有发现. 在中国, 最常见的优势种是微囊藻, 其产生的微囊藻毒素为环肽肝毒素. 有毒蓝藻水华引起的中毒事件已有报道<sup>[1,2]</sup>. 微囊藻毒素在淡水湖泊中的广泛存在、急性毒性及促肿瘤等特性迫切要求建立快速预测有毒蓝藻水华的有效方法.

目前测定微囊藻毒素的方法有多种<sup>[3]</sup>, 但用于定量鉴别野外样品中产毒、非产毒微囊藻的方法却鲜有

报道. 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS) 可有效应用于单群体中微囊藻毒素的鉴别并能提供有毒蓝藻水华的早期预警, 但该仪器价格十分昂贵不能满足高频次的监测<sup>[4]</sup>. 聚合酶链式反应 (PCR) 已成功应用于微囊藻毒素合成基因丛 *mcy* 的检测, 同时能够区分实验室培养和野外样品中有毒株及无毒株<sup>[5-7]</sup>. 此外, 定量 PCR 技术 (QRT-PCR) 也已应用于微囊藻和颤藻的鉴别<sup>[8-10]</sup>. Ingmar 等人<sup>[11]</sup> 成功地将 rRNA ITS-DGGE (rRNA-internal transcribed spacer denaturing gradient gel electrophoresis) 用于湖泊中产毒、非产毒微囊藻群体的鉴定.

在众多的分析微生物的分子生态学方法中, 原

英文版见: Gan N Q, Huang Q, Zheng L L, et al. Quantitative assessment of toxic and nontoxic *Microcystis* colonies in natural environments using fluorescence in situ hybridization and flow cytometry. *Sci China Life Sci*, 2010, 53: doi: 10.1007/s11427-010-0074-8

位杂交(ISH)及荧光原位杂交(FISH)技术已广泛应用于复杂体系中微生物的监测<sup>[12,13]</sup>。目前, ISH 和 FISH 技术已成功用于蓝藻(Cyanobacteria)、原绿球藻(*Prochlorococcus*)和微小型真核藻(Picoeukaryotes)的研究<sup>[14-16]</sup>。而近年来, 流式细胞术(FCM)因可以快速、准确地检测小颗粒物质, 从而存在潜在定性及定量检测环境中微生物种群的功能而倍受关注<sup>[17]</sup>。尽管 ISH 和 FISH 技术在复杂的微生物群落中适合蓝藻的定量检测, 但仍需对一些新的技术进行尝试, 它们与 FCM 相结合可用于高通量分析。

本文采用荧光原位杂交技术结合流式细胞技术, 实现对环境样品中产毒藻株的鉴别与定量。首先, 以实验室培养的已知产毒株和非产毒株, 评估 FISH 鉴别产毒株和非产毒株的能力; 其次, 测试实验室培养样品及野外样品以解决样品收集及杂交过程中细胞丢失的问题; 最后, FISH 和 FCM 相结合用于评估湖泊中产毒微囊藻含量, 选取的湖泊有: 滇池(昆明), 太湖(无锡)和官桥池塘(武汉)。该方法可准确解决自然环境中哪些微囊藻产毒及产毒量的问题。

## 1 材料与方法

### 1.1 藻株与培养基

藻种相关信息见表 1。实验选用 3 株纯微囊藻藻株来自中国科学院水生生物研究所淡水藻种库(FACHB-collection, 武汉, 中国), 一株来自法国巴士

德藻种库(Pasteur Culture Collection, PCC, 法国)。各藻株在光强  $20 \mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ , 温度  $(25\pm 1)^\circ\text{C}$ , 光周期 12 h : 12 h 的 BG11 完全培养基中培养。

### 1.2 仪器与试剂

高效液相色谱仪(LC-10AS, 日本岛津), 96 孔酶标板(Costar, USA), 酶标仪(Bio-Rad 550, USA), 超声波细胞粉碎机(JY92-2D, 宁波), 荧光显微镜(NIKON, Eclipse E600, Japan), 流式细胞仪(Epics Altra, Coulter, Beckman, USA)。

单克隆抗体于本实验室研制<sup>[18]</sup>。高效 DNA 地高辛标记和检测试剂盒 I (DIG high prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I)及 FITC 标记抗地高辛 Fab 片段(Anti-Digoxigenin-Fluorescein (Fab fragments))均购自 Roche 公司(USA)。超纯水( $18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ , Millipore, Molsheim, France)。其他试剂均为色谱纯及分析纯。

### 1.3 样品采集及微囊藻形态特征分析

以浮游植物网( $20 \mu\text{m}$  孔径)采集 2007 年夏季湖泊藻样, 进行群体分离及形态特征分析, 发现其优势种为微囊藻(表 1)。部分样品以 5% 甲醛固定, 黑暗保存, 进一步检测其群体组成, 胶鞘特征, 其余样品用于原位杂交。

### 1.4 微囊藻毒素检测

高效液相色谱法: 流动相采用甲醇-磷酸盐缓冲液( $0.05 \text{ mol/L KH}_2\text{PO}_4$ 用 20% 磷酸调节 pH 至 3.0)按

表 1 藻种相关信息

编号	来源	采集时间	形态
<i>Microcystis aeruginosa</i> FACHB 905	滇池, 中国	-	单细胞
<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC7806	巴斯德研究所, 法国	-	单细胞
<i>Microcystis aeruginosa</i> FACHB469	-	-	单细胞
<i>Microcystis wesenbergii</i> FACHB 929	滇池, 中国	-	单细胞
Dianchi525	滇池, 昆明	2007-05-25	群体
Dianchi611	滇池, 昆明	2007-06-11	群体
Dianchi709	滇池, 昆明	2007-07-09	群体
Dianchi805	滇池, 昆明	2007-08-05	群体
Dianchi819	滇池, 昆明	2007-08-19	群体
Taihu708	太湖, 无锡	2007-07-08	群体
Taihu728	太湖, 无锡	2007-07-28	群体
Taihu806	太湖, 无锡	2007-08-06	群体
Taihu819	太湖, 无锡	2007-08-19	群体
Guanqiao713	官桥池塘, 武汉	2007-07-13	群体
Guanqiao822	官桥池塘, 武汉	2007-08-22	群体

60:40(体积比)混合, 流速 1 mL/min, 紫外检测波长 238 nm.

酶联免疫法(ELISA): 采用间接竞争酶联免疫吸附实验法<sup>[19]</sup>.

### 1.5 DNA 模板的制备

用于 PCR 扩增的特异引物由 Rantala 等人<sup>[20]</sup>设计: mcyA-Cd1F(5'-AAAATTTAAAGCCGTATCAAA-3'), mcyA-Cd1R(5'-AAAAGTGTTTTATTAGCGGCTCAT-3'). 非特异探针引物设计如下: Forward: 5'-TCCAGCAACACCAATAGGA-3'; Reverse: 5'-AGGTCGTTG TGGTTATCCT-3'. PCR 反应条件为: 94℃反应 30 s, 94℃变性 10 s, 56℃退火 30 s, 72℃延伸 1 min, 35 个循环, 72℃ 3 min, 4℃保存. PCR 产物用 PCR clean-up kit 进行纯化以清除过量的引物及核苷, 并以琼脂糖凝胶电泳进行分析. 260 nm 波长光吸收值定量检测 PCR 片段, 以这些片段作为地高辛标记的模板.

### 1.6 DNA 模板的随机引物地高辛标记

使用高效 DNA 地高辛标记和检测试剂盒 I 进行 PCR 片段的地高辛标记, 具体步骤如下: 1 μg PCR 产物与无菌双蒸水加入反应管中使终体积为 16 μL, DNA 在沸水中变性 10 min 后立即置于冰水浴中. 4 μL 变性 PCR 产物加入高效地高辛引物、混合并低速离心, 混合物在 37℃下反应 1 h, 65℃加热 10 min 终止反应. 标记的 DNA 片段-20℃保存.

### 1.7 细胞预处理

培养细胞: 将 1 mL 培养藻细胞(约  $1 \times 10^5$  个细胞)转移至 1.5 mL 离心管中. 野外样品: 群体细胞以超声波方法解聚成单细胞. 藻细胞以  $5000 \times g$  离心 3 min, 吸掉上清, 用 1 mL 缓冲液(pH 7.8)洗细胞 3 次, 然后用 2% 多聚甲醛和 0.5% 戊二醛(Sigma)固定细胞 1 h. 将固定的细胞涂于以 1% 多聚赖氨酸(Sigma)处理过 15 min 并晾干的盖玻片上, 细胞在 45℃下干燥 5 min 后以冰乙醇逐级脱水[50%, 60% 和 96%(体积比)], 每步 3 min. 空气干燥再以 30 μL 溶菌酶(终浓度为 0.25 g/mL) 37℃消化细胞壁 30 min. 蒸馏水淋洗后细胞再以乙醇逐级脱水.

### 1.8 原位杂交

地高辛标记探针用于全细胞杂交的方法基于

Amann 等人<sup>[21]</sup>的相关描述. 经预处理干燥过的标本中加入 20 μL 杂交缓冲液[0.9 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 0.1% SDS(重量/体积)于 37℃培养 30 min. 然后加入 2 μL/片变性地高辛标记的探针(终浓度为 25 ng/mL). 杂交反应在 37℃反应 4 h 或过夜. 杂交反应结束后以洗液淋洗, 然后用 100 mL 封闭液 37℃封阻 30 min; 加入 20 μL 的抗体溶液 37℃反应 30 min, 用洗涤液在室温黑暗下洗涤 2 次, 每次 15 min. 以 20 mL 反应缓冲液平衡反应 2~5 min, 再加入 10 μL Anti-DIG-Fluorescein 黑暗中反应 3 h. TE 缓冲液终止反应, 指甲油封片. 荧光显微镜观察并照相.

### 1.9 流式细胞技术

用流式细胞术检测荧光原位杂交标记好的样品, 激发波长为 488 nm, 通过 530/30 nm(绿色荧光, FITC 标记)和 650 nm(红色荧光, 自发荧光)带通滤片检测荧光强度信号, 为使样品达到相近浓度, 样品以 PBS 稀释. FCM 图谱以 CYTOWIN 软件进行分析.

## 2 结果

### 2.1 探针设计及实验室培养纯藻株的应用

为建立原位鉴别有毒及无毒微囊藻藻株的方法, 设计合适的探针是必要的, 本实验设计的探针以微囊藻毒素合成基因 *mcy* 为目标. 基于应用范围及标记策略, 目前已有多种探针可用于原位杂交, 随机引物合成及切口平移法是目前应用最多的双链 DNA 片段标记的方法. 采用随机引物标记双链 DNA 为探针, 模拟实验室培养系统中有毒及无毒微囊藻藻株. 特异性探针及非特异性探针分别用于杂交实验, 以非特异性探针标记的藻株将显示红色自发荧光, 而以特异性探针标记的产毒微囊藻株将显示明亮的绿色荧光. 铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)FACHB905 和 PCC7806 作为阳性对照, 惠氏微囊藻(*Microcystis wesenbergii*)FACHB929 及铜绿微囊藻 FACHB469 作为阴性对照, 高效液相色谱(HPLC)及 ELISA 结果显示了上述微囊藻的产毒及非产毒特性(表 2).

图 1 显示了以特异性探针标记的产毒微囊藻 FACHB905 和 PCC7806 的明亮绿色荧光(图 1(A)和(B)), 及非产毒微囊藻 FACHB929 的自发红色荧光(图 1(C)).

## 2.2 FISH 用于野外样品中产毒及非产毒微囊藻藻株的鉴别

群体微囊藻源于滇池、太湖和关桥池塘, 样品采集时间大多集中于微囊藻为优势种季节, 即 2007 年 7~8 月, 微囊藻的优势种主要包括惠氏微囊藻、绿色微囊藻(*Microcystis viridis*)和铜绿微囊藻, 不同湖泊、

不同阶段优势种的比例有所差别(表 3). 其中除 Dianchi525 样品外, 滇池水华中藻类主要优势种为惠氏微囊藻和绿色微囊藻, 太湖水体中惠氏微囊藻为主要优势种, 其次为铜绿微囊藻. 图 2 显示了不同微囊藻的形态差异.

由于微囊藻常以群体形式存在<sup>[22,23]</sup>, 采用超声

表 2 毒素含量

藻种(毒素类型)	HPLC		ELISA	
	单位体积( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	细胞干重( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	单位体积( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	细胞干重( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )
<i>M. aeruginosa</i> FACHB 905				
MC-RR	4.73	2.45		
MC-LR	2.03	1.01		
总毒素	6.98	3.60	5.38	2.88
<i>M. aeruginosa</i> PCC7806				
MC-RR	3.75	0.54		
MC-YR	0.24	0.03		
MC-LR	11.06	2.13		
总毒素	14.92	2.67	18.96	3.40
<i>M. wesenbergii</i> FACHB 929	未检测到		未检测到	
<i>M. aeruginosa</i> FACHB 469	未检测到		未检测到	

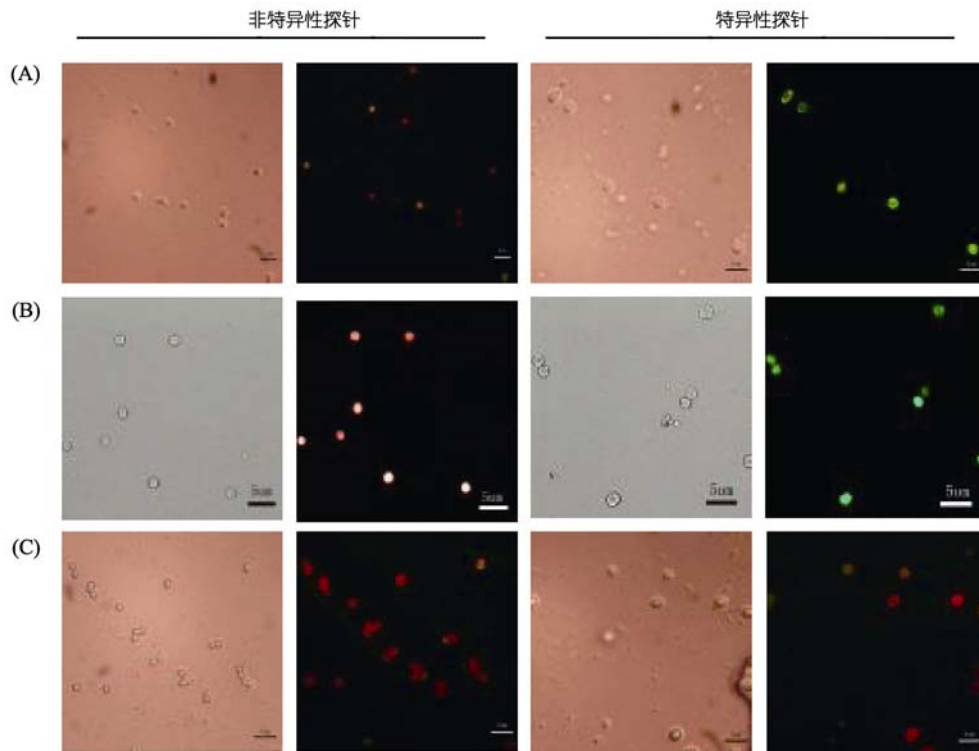


图 1 培养样品杂交后荧光图像

(A) 铜绿微囊藻 FACHB905; (B) 铜绿微囊藻 PCC7806; (C) 惠氏微囊藻 FACHB 929. 比例尺: 5  $\mu\text{m}$

表 3 滇池、太湖、官桥池塘样品中不同优势种群微囊藻比例

样品	惠氏微囊藻(%)	绿色微囊藻(%)	铜绿微囊藻(%)	其他(%)
Dianchi525	60	20	20	<1
Dianchi611	50	50	<1	<1
Dianchi709	50	50	<1	<1
Dianchi806	45	50	5	<1
Dianchi819	50	50	<1	<1
Taihu708	70	<1	30	<1
Taihu728	70	<1	30	<1
Taihu806	95	<1	5	<1
Taihu819	70	<1	20	10
Guanqiao713	80	<1	20	<1
Guanqiao822	50	<1	40	10

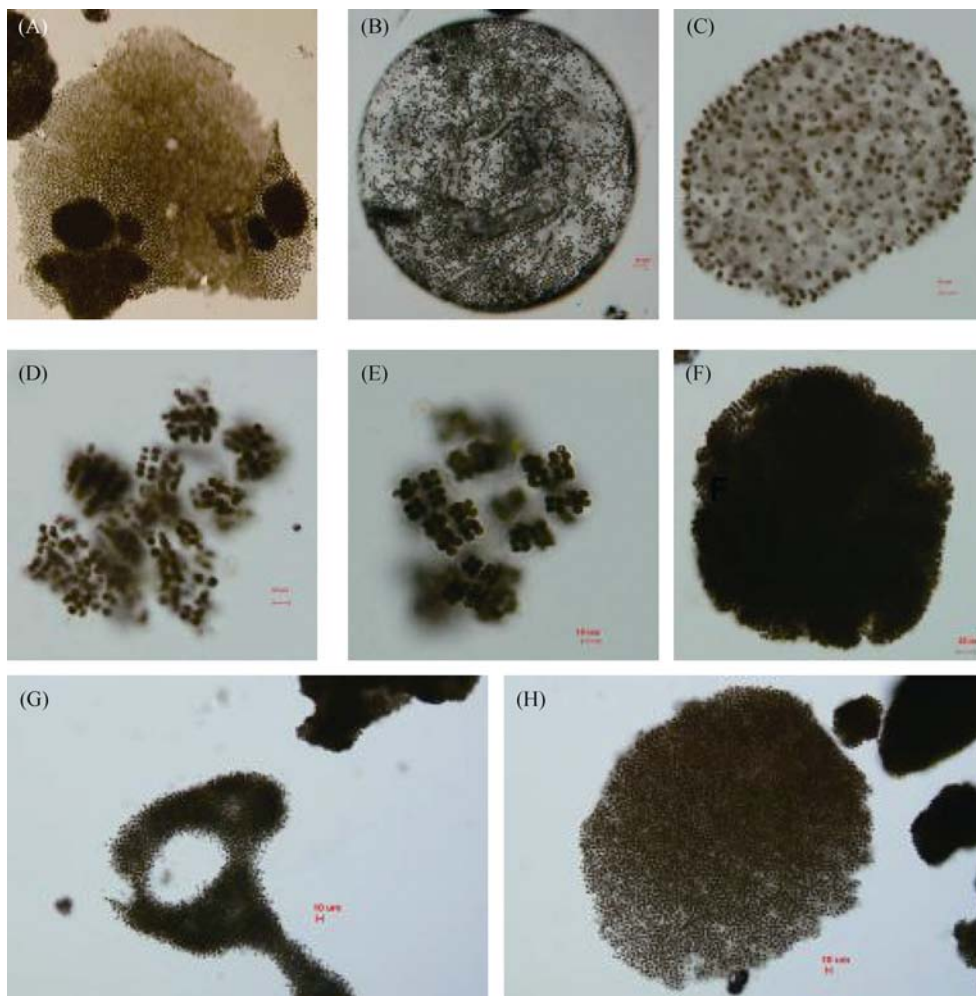


图 2 优势微囊藻形态特征

(A) 鱼害微囊藻(*Microcystis ichthyoblabe*)来自太湖; (B) 惠氏微囊藻来自太湖; (C) 史密斯微囊藻(*Microcystis smithii*)来自官桥池塘; (D) 绿色微囊藻来自官桥; (E) 绿色微囊藻来自滇池; (F) 水华微囊藻(*Microcystis flos-aquae*)来自太湖; (G) 铜绿微囊藻来自太湖; (H) 鱼害微囊藻来自官桥池塘。比例尺: 10  $\mu\text{m}$



方法将群体细胞解聚为单细胞. 图3显示了FISH标记滇池、太湖及关桥样品的结果, 对照及非特异性探针结果显示无交叉反应, 而特异性探针标记观察到象征性信号.

### 2.3 流式细胞检测

首先对实验室培养的已知产毒特性的藻株进行研究, 测试FISH与流式细胞术相结合检测有毒及无毒微囊藻的可行性. 选择两株产毒藻株(*M. aeruginosa* PCC7806, *M. aeruginosa* FACHB 905)和两株非产毒株(*M. aeruginosa* FACHB 469, *M. wesenbergii* FACHB 929), 将产毒株与非产毒株按1:1混合(即 *M. aeruginosa* PCC7806: *M. aeruginosa* FACHB 469=1:1, *M.*

*aeruginosa* FACHB 905: *M. wesenbergii* FACHB 929=1:1), 然后以FISH与流式细胞术相结合检测产毒比例, 结果产毒比例分别为46.42%和45.69%, 接近50%.

接着进行野外样品中产毒微囊藻的检测, 来自滇池、太湖、关桥池塘的样品以特异性探针进行杂交, 阳性信号(绿色荧光)显示了高于阴性对照6~56倍的信号强度(图4), 这种特异、非特异荧光比例达到6~56倍的差异足以区分阳性及阴性信号, 也就是说这种信号的差别足以区分有毒及无毒微囊藻藻株. 表4清楚地显示了不同样品来源的微囊藻产毒情况.

上述结果表明, FISH及流式细胞术相结合能有效地鉴别实验室培养及野外样品中产毒及非产毒微囊藻.

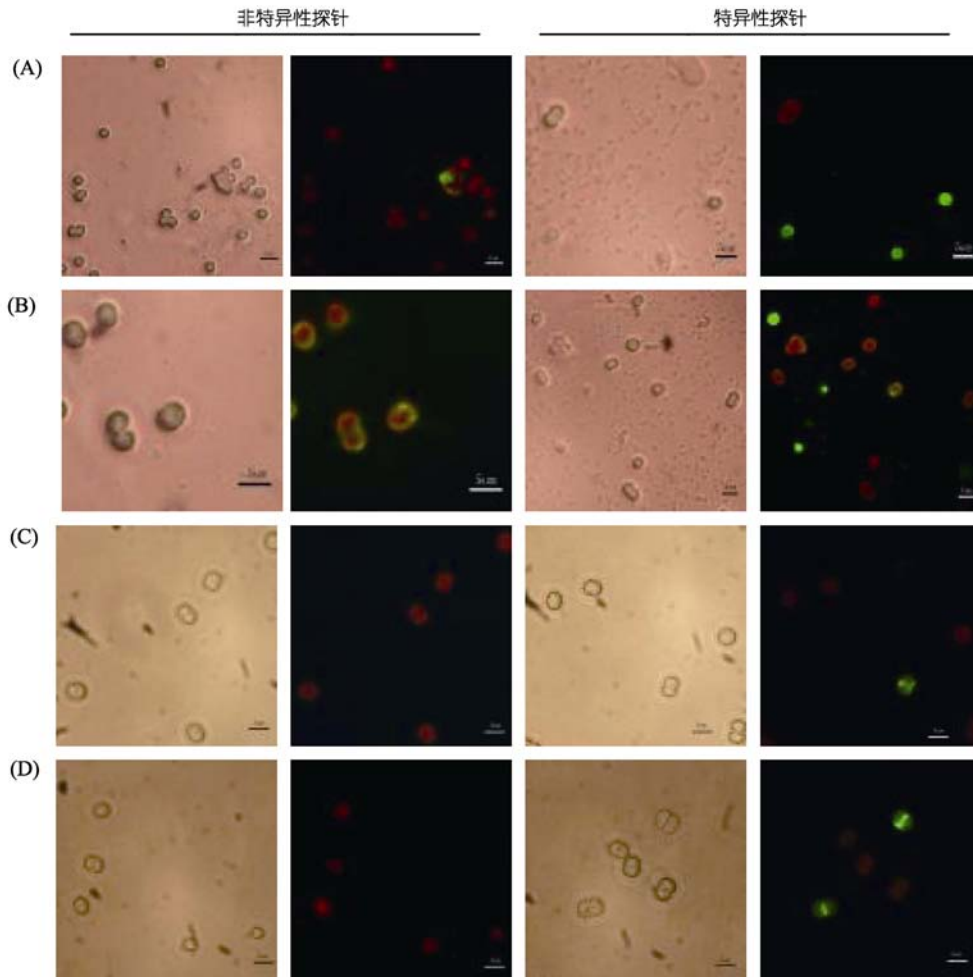


图3 野外样品杂交后荧光图像

(A) Dianchi819; (B) Taihu819; (C) Quanjiao822; (D) Dianchi806. 比例尺: 5 μm

### 3 讨论

迄今, 国内外检测 MCYSTs 的方法已有多种, 包括小鼠生物体法、高效液相色谱法(HPLC)、液-质联用法(HPLC-MS)、薄层层析法(TLC)、毛细管电泳法(CE)、酶联免疫法(ELISA)、蛋白磷酸酶抑制-PP1/PP2A 法, 以及以产毒基因为基础的产微囊藻毒素藻

株的分子鉴别法等. 有关产毒蓝藻的鉴别, 常规形态学方法已基本失效. 1996 年, Meissner 等人<sup>[5]</sup>首次利用聚合酶链式反应(PCR)方法鉴别产毒和非产毒微囊藻, 目前已成功应用于不同类型样品产毒微囊藻与非产毒微囊藻的鉴别, 其可简单、快速、准确地检测 2000 个细胞/mL 水样. 该方法根据毒素合成酶 *mcy* 基因丛设计引物, 特异性地扩增产毒微囊藻的基

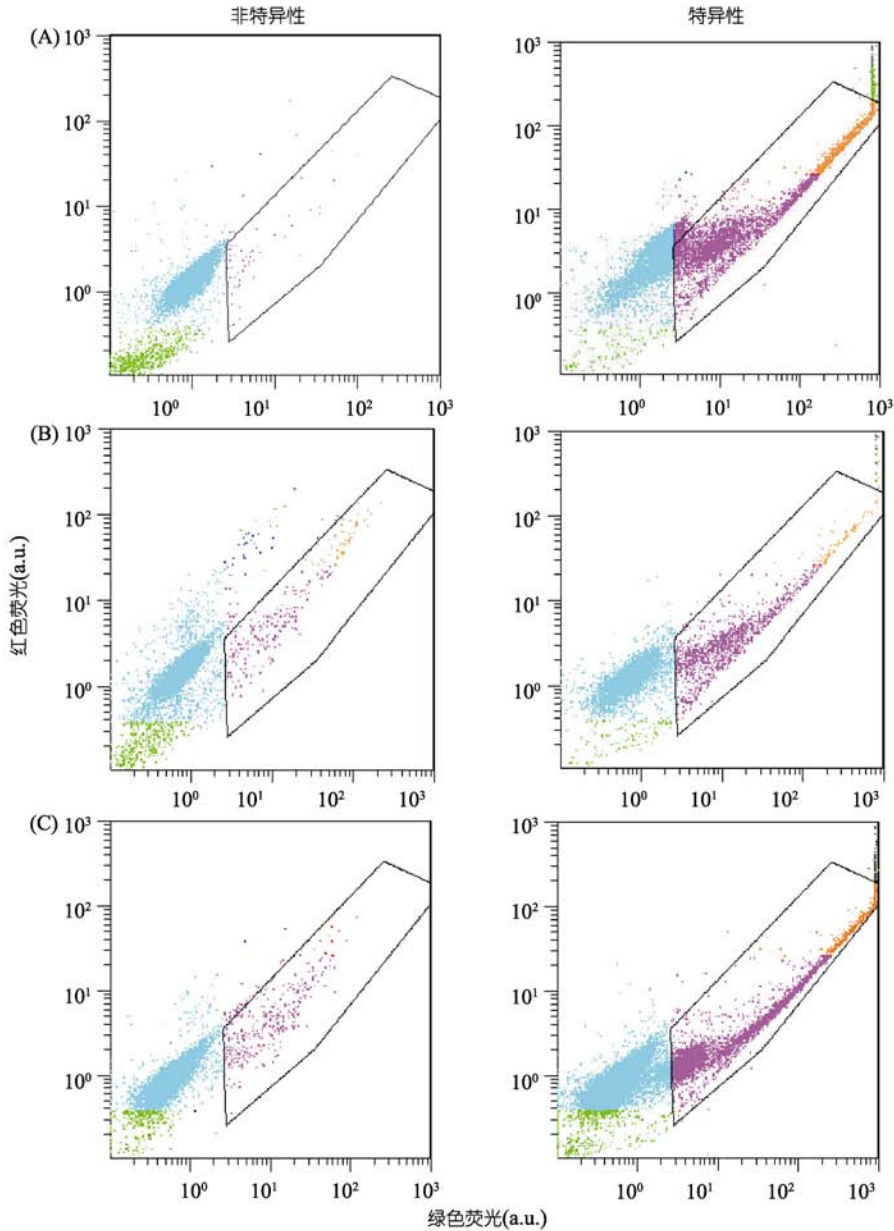


图 4 野外样品杂交后经流式细胞检测效果  
(A) Dianchi709; (B) Dianchi806; (C) Taihu708

因片段. 研究发现, 铜绿微囊藻和绿色微囊藻多表现为产毒特性, 而惠氏微囊藻、挪氏微囊藻(*Microcystis novaceckii*)及鱼害微囊藻多表现为非产毒特性<sup>[24-26]</sup>.

但也有研究发现, 在少数微囊藻株中虽检测到 *mcy* 基因阳性, 但并未检测到微囊藻毒素<sup>[27,28]</sup>. 即使在相同的条件下, 不同藻株产毒量差别也较大, 另外环境因子如营养盐浓度、光照、温度等也可能影响细胞内微囊藻毒素的含量. 因此了解藻华暴发早期产毒微囊藻的组成及比例具有重要意义. 原位杂交及荧光原位杂交技术已被成功应用于蓝藻、原绿球藻及微小型真核藻等<sup>[14-16]</sup>. 针对有毒及无毒株的鉴别, 免疫荧光分析已成功应用于 *Pseudonitzschia pungens*<sup>[29]</sup> 和 *Prymnesium parvum*<sup>[30]</sup>. 但尚未见有关产毒与非产毒微囊藻鉴别的相关报道. 本文采用 FISH 标记方法鉴别有毒及无毒微囊藻株, 该方法具有以下优势: (1) 克服了交叉反应的问题; (2) 可快速、准确区分野外样品中产毒及非产毒微囊藻; (3) 可视化加以鉴别.

流式细胞术是快速鉴定水环境中细菌数目的有效方法, 通过单细胞或微粒产生的散射光和发射荧光强度从而对细胞或亚细胞进行快速定量测定和分

析<sup>[31]</sup>. 本文选取流式细胞术检测产毒微囊藻与非产毒微囊藻的数量及比例, 利用未标记上的微囊藻的自发红色荧光与标记上的微囊藻发出的绿色荧光可以明显地在流式细胞仪上加以鉴别, 方法简单、明了(图 3). 如样品 Dianchi819 和 Tianhu819 在荧光显微镜下显示阳性结果分别为 60%和 33%(图 3(A)和(B)), 而流式细胞术显示阳性结果分别为 41.28%和 20.65%(表 4), 可能原因是有些细胞聚集, 采用流式细胞检测时只能记录为一个细胞, 而用荧光显微镜计数时则记录的是两个细胞(图 3(C)和(D)).

比较表 3 和 4, FISH 及流式细胞术相结合检测样品 Dianchi819, Taihu728, Taihu819, 结果显示产毒微囊藻比例分别为 41.28%, 30.85%, 20.65%, 而根据不同形态特性及 PCR 结果显示, 样品 Dianchi819, Taihu728, Taihu819 产毒微囊藻比例分别为 50%, 30%和 20%, 两种方法结果吻合. 样品 Dianchi525 和 Dianchi611 则有差别, 可能存在两种原因: 一是这两个样品中的绿色微囊藻有部分不产毒, 二是在进行间接免疫荧光标记时藻类自发红色荧光背景较强掩盖了绿色荧光强度.

表 4 FISH 与 FCM 相结合检测实验室培养及野外样品中产毒及非产毒微囊藻含量

样品	流式细胞术数据(细胞/mL)			非产毒比例(%)	产毒比例(%)
	发绿色荧光细胞数 <sup>a)</sup>	发红色荧光细胞数 <sup>a)</sup>	总细胞数		
<i>M.a.</i> PCC7806	41376	598	42074	1.42	98.34
<i>M.a.</i> FACHB 905	39633	479	40212	1.19	98.56
<i>M.a.</i> FACHB469	510	20775	24285	85.54	2.10
<i>M.w.</i> FACHB 929	736	20634	24370	84.66	3.02
<i>M.a.</i> PCC7806 and <i>M.a.</i> FACHB 469 <sup>b)</sup>	9433	10087	20320	49.64	46.42
<i>M.a.</i> FACHB905 and <i>M.w.</i> FACHB929 <sup>c)</sup>	11271	12397	24668	50.25	45.69
Dianchi525	11608	55594	68202	81.51	17.02
Dianchi611	7911	13254	22165	59.79	35.69
Dianchi709	3165	16521	20686	79.86	15.30
Dianchi806	3078	16401	20479	80.08	15.03
Dianchi819	9150	12015	22165	54.2	41.28
Taihu708	12905	48437	62342	77.69	20.70
Taihu728	20830	45690	67520	67.66	30.85
Taihu806	2577	18114	21691	83.5	11.88
Taihu819	13098	49330	63428	77.77	20.65
Guanqiao713	11785	55415	68200	81.25	17.28
Guanqiao822	17729	42300	61029	69.31	29.05

a) 鉴别后发荧光数量; b) 50% *M.a.* PCC7806 和 50% *M.a.* FACHB 469; c) 50% *M.a.* FACHB 905 和 50% *M.w.* FACHB 929



总之, 免疫原位杂交与流式细胞术相结合的方法是进行产毒微囊藻与非产毒微囊藻的定量检测的有效方法, 该方法对野外样品中产毒微囊藻百分率进行预计, 对产毒微囊藻水华的暴发也可起到早期预警的作用。

## 参考文献

- 1 Ueno Y, Nagata S, Tsutsumi T, et al. Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sample in Haimen and Fusui, endemic areas of Primary Liver Cancer in China, by highly sensitive immunoassay. *Carcinogenesis*, 1996, 17: 1317—1321
- 2 Jochimsen E M, Carmichael W W, Jisi A. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *New Engl J Med*, 1998, 338: 873—878
- 3 Rapala J, Erkomaa K, Kukkonen J, et al. Detection of microcystins with 2protein phosphatase inhibition assay, high-performance liquid chromatography-UV detection and enzyme-linked immunosorbent assay comparison of methods. *Analytica Chimica Acta*, 2002, 466: 213—231
- 4 Kurmayer R, Dittmann E, Fastner J, et al. Diversity of microcystin genes within a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* spp. in Lake Wannsee(Berlin, Germany). *Microb Ecol*, 2002, 43: 107—118
- 5 Meissner K, Dittmann E, Börner T. Toxic and non-toxic strains of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* contain sequences homologous to peptide synthetase genes. *FEMS Microbiol Lett*, 1996, 135: 295—303
- 6 Pan H, Song L, Liu Y, et al. Detection of hepatotoxic *Microcystis* strains by PCR with intact cells from both culture and environmental samples. *Arch Microbiol*, 2002, 178: 421—427
- 7 Oberholster P J, Myburgh J G, Govender D, et al. Identification of toxigenic *Microcystis* strains after incidents of wild animal mortalities in Kruger National Park, South Africa. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2009, 72: 1177—1182
- 8 Vaitomaa J, Rantala A, Halinen K, et al. Quantitative real-time PCR for determination of microcystin synthetase e copy numbers for *Microcystis* and *Anabaena* in lakes. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69: 7289—7297
- 9 Kurmayer R, Kutzenberger T. Application of real-time PCR for quantification of microcystin genotypes in a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* sp. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69: 6723—6730
- 10 Ha J H, Hidaka T, Tsuno H. Quantification of toxic *Microcystis* and evaluation of its dominance ratio in blooms using real-time PCR. *Environ Sci Technol*, 2009, 43: 812—818
- 11 Ingmar J, Kardinaal W, Marion M, et al. Toxic and nontoxic *Microcystis* colonies in natural populations can be differentiated on the basis of rRNA gene internal transcribed spacer diversity. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70: 3979—3987
- 12 Franks A H, Harmsen H, Raangs G C, et al. Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent *in situ* hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64: 3336—3345
- 13 Manz W, Amann R, Ludwig W, et al. Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacteroides in the natural environment. *Microbiology*, 1996, 142: 1097—1106
- 14 Wilhelm S, Boris Z, Stella E, et al. In situ identification of cyanobacteria with Horseradish Peroxidase-labeled, rRNA-Targeted Oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65: 1259—1267
- 15 Nyree J W, Wilhelm A S, Nicholas J F, et al. Closely related *Prochlorococcus* genotypes show remarkably different depth distributions in two oceanic regions as revealed by *in situ* hybridization using 16S rRNA-targeted oligonucleotides. *Microbiology*, 2001, 147: 1731—1744
- 16 Isabelle C B, Fabrice N, Daniel V, et al. Quantitative assessment of Picoeukaryotes in the natural environment by using taxon-specific oligonucleotide probes in association with tyramide signal amplification-fluorescence *in situ* hybridization and flow cytometry. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69: 5519—5529
- 17 Sckar R, Fuchs B M, Amann R, et al. Flow sorting of marine bacterioplankton after fluorescence *in situ* hybridization. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70: 6210—6219
- 18 Lei L M, Wu Y S, Gan N Q, et al. An ELISA-like time-resolved fluorescence immunoassay for microcystin detection. *Clinica Chimica Acta*, 2004, 348: 177—180
- 19 Hu C L, Gan N Q, He Z K, et al. A novel chemiluminescent immunoassay for microcystin(MC) detection based on gold nanoparticles label and its application to MC analysis in aquatic environmental samples. *Int J Environ Anal Chem*, 2008, 88: 267—277
- 20 Rantala A, Fewer D P, Hisbergues M, et al. Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 568—573
- 21 Amann R I, Zarda B, David A S, et al. Identification of individual prokaryotic cells by using enzyme-labeled, rRNA-Targeted Oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol*, 1992, 58: 3007—3011
- 22 Asai R, McNiven S, Ikebukuro K, et al. Development of a fluorometric sensor for the measurement of phycobilin pigment and application to freshwater phytoplankton. *Field Anal Chem Technol*, 2000, 4: 53—61

- 23 Lyck S. Simultaneous changes in cell quotas of microcystin, chlorophyll *a*, protein and carbohydrate during different growth phases of a batch culture experiment with *Microcystis aeruginosa*. *J Plankton Res*, 2004, 26: 727—736
- 24 Kaya K, Watanabe M M. Microcystin composition of an axenic clonal strain of *Microcystis viridis* and *Microcystis viridis*-containing water-blooms in Japanese freshwaters. *J Appl Phycol*, 1990, 2: 173—178
- 25 Vasconcelos V M, Sivonen K, Evans W R, et al. Isolation and characterization of microcystins (heptapeptide hepatotoxins) from Portuguese strains of *Microcystis aeruginosa* Kutz. Emend Elenk Arch Hydrobiol, 1995, 134: 295—305
- 26 Otsuka S, Suda S, Li R, et al. Phylogenetic relationships between toxic and nontoxic strains of the genus *Microcystis* based on 16S to 23S internal transcribed spacer sequences. *FEMS Microbiol Lett*, 1999, 172: 15—21
- 27 Neilan B A, Dittmann E, Rouhiainen L, et al. Nonribosomal peptide synthesis and toxigenicity of cyanobacteria. *J Bacteriol*, 1999, 181: 4089—4097
- 28 Mikalsen B, Boison G, Skulberg O M, et al. Natural variation in the microcystin synthetase operon *mcyABC* and impact on microcystin production in *Microcystis* strains. *J Bacteriol*, 2003, 185: 2774—2785
- 29 Bates S S, Leger C, Keafer B A, et al. Discrimination between domoic-acid-producing and non-toxic forms of the diatom *Pseudonitzschia pungens* using immunofluorescence. *Mar Ecol Prog Ser*, 1993, 100: 185—195
- 30 West N J, Bacchieri R, Hansen G, et al. Rapid quantification of the toxic alga *Prymnesium parvum* in natural samples by use of a specific monoclonal antibody and solid-phase cytometry. *Appl Environ Microb*, 2006, 72: 860—868
- 31 Monfort P, Baleux B. Comparison of flow cytometry and epifluorescence microscopy for counting bacteria in aquatic ecosystems. *Cytometry*, 1992, 13: 188—192