

学校编码: 10384

密级_____

学 号: 20051302222

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

基于流式细胞分选技术的中国南海
原绿球藻分子生态学研究

Flow Cytometric Sorting Based Molecular Ecological Study
of *Prochlorococcus* in the South China Sea

王 丽

指导教师姓名: 焦念志教授

专业名称: 环境科学

论文提交日期: 2009年08月

论文答辩时间: 2009年09月

2009年09月

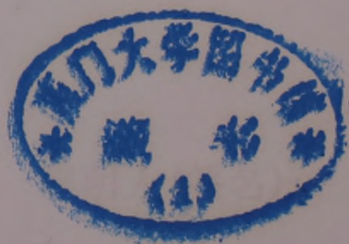
厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外，该学位论文为()课题(组)的研究成果，获得()课题(组)经费或实验室的资助，在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。)

声明人(签名): 王丽

2009年9月28日



厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文(包括纸质版和电子版)，允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

()1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于
年 月 日解密，解密后适用上述授权。

()2. 不保密，适用上述授权。

(请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。)

声明人(签名)： 王丽

2009年 9月 28日

基于流式细胞分选技术的中国南海原绿球藻分子生态学研究

摘要

海洋原绿球藻(*Prochlorococcus*) 是贫营养大洋的优势自养微型生物,可划分为光生理以及 16S rRNA 基因系统发育显著差异的两个基本生态型,即高光生态型(High light ecotype, HL)和低光生态型(Low light ecotype, LL)。在高光生态型内部有两个不同的亚类,低光生态型有四个亚类,但近年来研究发现还存在着未知的亚类,所以寻找未知亚类是改善原绿球藻定量研究以及加深了解其环境适应机制的必要途径。

流式细胞仪是研究超微型生物的重要工具,本论文与传统的膜过滤采样方法不同,利用流式细胞仪的分选功能获得原绿球藻浓缩样品,并采用简洁的冻融法提取 DNA,通过克隆文库以及变性梯度凝胶电泳法(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)对中国南海陆架区域近岸 A4 站位三个水层(2.2 m、50.7 m、75.2 m)以及菲律宾沿岸大洋站位 Z97 三个水层(5.0 m、30.9m、50.9 m)的分选样品进行了原绿球藻分子生态学研究。

克隆文库的系统发育分析表明:所研究海域的高光生态型原绿球藻以 HLII 为主;低光生态型四个已知亚类中除以纯培养株系 MIT9211 为代表的 LLIII(该论文中的序号)外其余三个已知亚类均有发现,同时还定义了一个新的 LL 型亚类 LLIV。在垂直分布上,与前人研究结果一致,HL 型与 LL 型在水柱中生态位的分离和表层混合层的深度密切相关。近岸与大洋站位之间的差异主要体现在 LL 型亚类的组成上。比较近岸 A4 站位 2.2 m、75.2 m 的膜样与同水层的分选样品所构建的克隆文库,我们发现膜样存在比较明显的非特异性扩增以及较高的聚球藻百分比含量,所以从扩增的准确性上来说,分选样相比膜样有很大的提高。在原绿球藻种群组成方面,两种采样方法的差异体现在两个层面:生态型亚类组成以及各亚类相对丰度(通过克隆文库计算得到),膜样品与分选样品结果的这种差异还需要加大采样量,才能够得到一个较为统一的结果。

本论文同时利用变性梯度凝胶电泳 DGGE 技术揭示了不同生境下的原绿球藻多样性。对上升流区断面 Z96、Z97、Z99 以及珠江口断面 A1、A4 的研究表明, DGGE 作为快速检测原绿球藻的种群研究中是行之有效的技术。

综上所述,流式细胞仪的分选样为海洋微型生物多样性的研究提供了一种新的思路,在克服了少量细胞量提取 DNA 的困难后,所建立起来的文库构建和 DGGE 的方法可有效地揭示出中国边缘海原绿球藻的多样性。研究中所发现的 LL 型新亚类对(定量)PCR 引物设计提供重要参考,本研究所展示的中国南海原绿球藻种群组成特征,对原绿球藻的环境适应机制以及全球分布有参考意义。

关键词: 原绿球藻 流式细胞仪分选技术 中国南海 生态型 16S rRNA 基因多样性

Flow Cytometric Sorting Based Molecular Ecological Study of *Prochlorococcus* in the South China Sea

Abstract

Prochlorococcus is the most abundant photosynthetic organism in the oligotrophic ocean. It can be divided into two basic ecotypes with distinct photophysiology and phylogenetically distinct 16S rRNA markers, the high light (HL) and low light (LL) ecotypes. Two ecologically distinct subclusters have been identified within the HL ecotype and at least four distinct genotypes within the LL. Recently, it was recognized that there are unknown genotypes of *Prochlorococcus* in addition to the six known. Searching for new genotypes can facilitate the design of new primers for diversity studies as well as further studies of adaptation mechanisms of *Prochlorococcus* in different environments.

Flow cytometry (FCM) is a useful tool in picophytoplankton study. FCM sorting approach was applied to the present study to obtain population samples of *Prochlorococcus*, which was different from the classical sampling method by filtering and compact freeze-thawed method to extract DNA. FCM sorted samples from two depth profiles (the vertical layers 2.2 m, 50.7 m, 75.2 m of shelf region station A4 and 5.0 m, 30.9 m, 50.9 m of ocean station Z97) in the South China Sea (SCS) were examined by clone library and DGGE methods.

The phylogenetic analysis of the clone libraries indicated that HLII was the dominant HL genotype among all the samples of SCS. For the LL ecotypes three are known subclusters, another one coded as LLIII is closely related to a type strain MIT9211, and the LLIV is identified as a new lineage. Being consistent with previous studies, the partition of HL and LL populations through the vertical column was influenced by SML (Surface Mixed Layer). Between the two sites, the main population difference is found among the subclusters of LL ecotypes. At the same time, we compared the clone libraries of filtered samples from station A4 layer 2.2 m and 75.2

m with the flow cytometric sorted samples from the same layers. Filtered samples had more non-specific amplification in PCR and higher *Synechococcus* clone percentage than the sorted samples, so the sorted samples improved in the veracity of amplifying. Moreover, filtered and sorted samples also showed different results in the genotypes composing and relative richness of the genotypes (as seen from the clone library statistics). The rarefaction curves indicated that more consistent results from the two sampling methods could be achieved only by enlarging the sampling quantity.

To sum up, FCM sorting technique combined with molecular approaches is testified to be promising. The new subcluster of LL ecotype found in this study provided rich information for the design of probes in Q-PCR. The obtained abundant sequences from the marginal sea will be useful for a better understanding of the adaption mechanisms of *Prochlorococcus* to diverse environments.

Key Words: *Prochlorococcus*; flow cytometric sorting techniques; the South China Sea; ecotypes; 16S rRNA gene diversity

目 录

摘要	I
ABSTRACT	III
第一章 前言	1
1.1 原绿球藻的研究概述	1
1.1.1 原绿球藻的生态学意义	2
1.1.2 原绿球藻的研究方法	4
1.1.3 中国海的研究概况	12
1.2 流式细胞仪的分选功能	13
1.2.1 流式细胞仪的相关概念	13
1.2.2 流式细胞仪分选原理	15
1.2.3 流式细胞的分选功能在实验研究中的应用	15
1.3 本论文的研究目的与框架	16
第二章 材料与方 法	17
2.1 材料	17
2.1.1 主要实验用品及仪器	17
2.1.2 引物	20
2.1.3 序列分析工具和软件	21
2.2 方法	21
2.2.1 流式细胞仪的分选	21
2.2.2 环境膜样品 DNA 的提取	24
2.2.3 16S rRNA 基因克隆文库的构建	25
2.2.4 DGGE 电泳的步骤	27
2.2.5 测序与系统发育分析	32
第三章 分选样品	34
3.1 分选样品实验方法的建立	34
3.1.1 分选样品的收集浓缩	34
3.1.2 提取 DNA 的方法	35
3.1.3 分选样品的实验方法总结	36
3.2 野外分选样品的分析	36

3.2.1 样品的采集.....	36
3.2.2 分选样品克隆文库的构建.....	40
3.2.3 Z97 剖面与 A4 剖面站位克隆文库的比较.....	40
3.2.4 陆架区 A4 站位克隆文库分析.....	44
3.2.5 上升流 Z97 站位克隆文库分析.....	46
3.2.6 本小节讨论.....	48
3.3 分选样品与膜样的结果比较.....	50
3.3.1 膜样克隆文库的构建.....	50
3.3.2 膜样克隆文库与分选样文库 Blast 结果比较.....	51
3.3.3 膜样克隆文库与分选样文库序列分析.....	52
3.3.4 本小节讨论.....	54
3.4 结论.....	56
第四章 DGGE 揭示不同海域环境的原绿球藻种群结构.....	58
4.1 方法与原理.....	58
4.1.1 DGGE 的原理.....	58
4.1.2 DGGE 的试验步骤.....	58
4.2 上升流区 Z 断面的结果分析.....	59
4.3 陆架区 A 断面的结果分析.....	60
4.4 讨论.....	61
4.5 结论.....	63
第五章 结论和展望.....	65
5.1 结论.....	65
5.2 创新点.....	67
5.3 展望.....	67
参考文献.....	68
附 录.....	73
致 谢.....	75

CONTENTS

CHINESE ABSTRACT	I
ABSTRACT	III
PART 1 PREFACE	1
1.1 REVIEW OF <i>PROCHLOROCOCCUS</i>	1
1.1.1 Ecological significance of <i>Prochlorococcus</i>	2
1.1.2 Research methods of <i>Prochlorococcus</i>	4
1.1.3 Research on China Sea.....	12
1.2 THE SORTING FUCTION OF FLOW CYTOMETRY	13
1.2.1 Related concepts of flow cytometry	13
1.2.2 Principle of flow cytometric sorting	15
1.2.3 Application of flow cytometric sorting	15
1.3 RESEARCH PURPOSE AND DESIGN OF THIS THESIS	16
PART 2 MATERIALS AND METHODS	17
2.1 MATERIALS	17
2.1.1 Experimental supplies and instruments	17
2.1.2 Primers	20
2.1.4 Tools and software of Phylogenetic analysis	21
2.2 METHODS	21
2.2.1 Flow cytometric sorting	21
2.2.2 DNA extraction of environmental filtered samples	24
2.2.3 Construction of <i>Prochlorococcus</i> 16S rRNA gene libraries	25
2.2.4 Steps of DGGE.....	27
2.2.5 Sequence and phylogenetic analysis	32
PART 3 FLOW CYTOMETRIC SORTED SAMPLES	34
3.1 EXPERIMENTAL ESTABLISHMENT ON SORTED SAMPLES	34
3.1.1 Concentration of sorted samples	34
3.1.2 Method of DNA extraction.....	35
3.1.3 Summary protocol for indoor DNA extraction	36
3.2 ANALYSIS OF SORTED SAMPLES.....	36
3.2.1 Sampling	36
3.2.2 Construction of clone libraries	40

3.2.3 Comparing of Z97 and A4 clone libraries	40
3.2.4 Clone libraries ananalysis of Shelf station A4 vertical layers.....	44
3.2.5 Clone libraries ananalysis of upwelling station Z97 vertical layers.....	46
3.2.6 Discussion	48
3.3 COMPARING OF SORTED SAMPLES AND FILTERED SAMPLE	50
3.3.1 Construction of clone libraries with filtered samples.....	50
3.3.2 Blast results of clone sequences from sorted samples and filtered sample	51
3.3.3 Sequences analysis	52
3.3.4 Discussion	54
3.4 CONCLUSION	56
PART 4 COMMUNITY STRUCTURE OF PROCHLOROCOCCUS	
IN DIFFERENT ENVIRONMENTS WITH DGGE METHOD	58
4.1 METHODS	58
4.1.1 Principle of DGGE.....	58
4.1.2 Experimental steps of DGGE.....	58
4.2 ANALYSIS OF UPWELLING STATION Z97.....	59
4.3 ANALYSIS OF SHELF STATION A4.....	60
4.4 DISCUSSION	61
4.5 CONCLUSION	63
PART 5 CONCLUSIONS AND PERSPECTIVES.....	65
5.1 CONCLUSIONS	65
5.2 INNOVATIONS.....	67
5.3 PERSPECTIVES.....	67
REFERENCE	68
APPENDIX	73
ACKNOWLEDGEMENT	75

第一章 前言

1.1 原绿球藻的研究概述

海洋原绿球藻(*Prochlorococcus marinus*) 是单细胞的原核光能自养生物, 属于真细菌界蓝藻门原绿藻目(*Prochlorales*), 该目有三个属: 原绿藻、原绿丝蓝藻和原绿球藻, 它们均含有叶绿素 *a* 和叶绿素 *b*, 不含藻胆蛋白, 明显区别于聚球藻(*Synechococcus*)等蓝细菌, 但它们的 5S 和 16S rRNA 基因序列信息显示了与蓝细菌的密切相关性, 是一类在进化上具有特殊意义的物种。

原绿球藻的个体极小, 直径在 0.5 至 0.8 μm 之间^[1], 是目前已知个体最小的光合自养生物。尽管原绿球藻非常小, 但广泛分布于热带、亚热带和温带大洋的整个真光层中, 并且数量巨大, 每毫升海水中含有大约 10^5 个细胞, 是迄今发现的丰度最高的产氧光能自养生物, 在海洋生态系统的光合作用、碳循环及食物链中扮演着举足轻重的角色。已有的生态学研究表明, 原绿球藻是低纬度大洋海区的重要初级生产者, 是叶绿素最大层的主要贡献者, 其生态学地位超过了曾被认为最重要的初级生产者——聚球藻。所以它在生源要素生物地球化学循环中的作用是不言而喻的: 作为生产者, 它将 DOC(Dissolved Organic Carbon)转化为 POC(Particulate Organic Carbon), 进而传递给原生动物、后生动物, 从而构成了微食物环, 完成海洋中溶解有机碳向颗粒有机碳的转变、由非沉降态向沉降态传递的重要机制, 对于生态系统生产力和上层向深层的碳输出具有重要意义。

此外, 原绿球藻是产氧光合生物, 依靠光系统(PhotoSystems, PS)I 和 II 这两个光合作用的反应中心产生能量, 并放出大量的氧气, 为地球大气层的氧气含量做出了重要贡献, 为许多生物的生存提供了重要保证。因此, 它作为开放性海洋中主要成员有很重要的生态意义。

随着大量分子生物学技术在海洋生态学领域中的应用, 原绿球藻的相关研究也取得了新的进展, 基于 16S rRNA 基因序列所划分的不同生态型是对原绿球藻环境适应机制的新认识, 高光生态型(High Light ecotype, HL 型)和低光生态型(Low Light ecotype, LL 型)是两个基本的大类^[2], 分别占据不同的水层, 和光照、营养盐等因素密切相关。它们内部还可以进一步划分出不同的亚类^[3-6], 研究原

绿球藻在自然海区的不同类型组成,有利于进一步了解该生物的环境适应机制。

1.1.1 原绿球藻的生态学意义

1.1.1.1 原绿球藻是目前已知的最小光合自养生物,为其在寡营养大洋海域生存提供了优势条件

通过显微镜或electron (coulter) size测量原绿球藻细胞大小,最佳的估计值是其长度在0.5~0.8 μm ,宽度在0.4~0.6 μm 范围内^[1]。尽管随着生长环境条件(如,深度不同引起的光照及压力变化)和营养条件的不同,细胞的大小会发生变化^[7],但是原绿球藻的体积已经是光合自养生物的理论最小值。它的小体积为其生存提供了至少三方面显著优势:首先,小体积细胞具有高的体表比,容易从环境中吸收营养,所以在寡营养的大洋海域仍然能很好的生存;其次,这样小的体积就不会阻挡邻近细胞的光照,有利于大量细胞共同生存于一个水层;再次,小体积的能量消耗低,所以即使在光照较弱的水层,也能够满足生长的能量需要。原绿球藻在进化中选择了最大限度的减小体积,例如,基因的缩减^[8]以及利用比蓝细菌中普遍存在的藻胆体蛋白节省空间的天线蛋白复合体^[9]等,这都为它在广阔的海洋中成为优势种提供了条件。

1.1.1.2 原绿球藻在海洋中的分布范围广、数量大

在南北纬 40° 之间的广阔海域均可检测到原绿球藻,随着纬度的升高,水温的下降,原绿球藻趋于消失。这主要是受温度的调控,通常当水温低于 15 °C 时,极少有原绿球藻存在^[10]。但在近岸海区以及真光层底部的情况则有所不同,有时当水温低至 14.3 °C 的情况下,仍可检测到大量原绿球藻的存在^[11]。在垂直分布上,它跨越了从表层到真光层底部近 200 m 的距离,虽然在水体中的垂直分布类型随地理位置、季节及水文条件的变化而不同,但有若干共同的规律。一般地,原绿球藻丰度峰值常随氮跃层变化而变化,并位于氮跃层之上的真光层底部,只有在高纬地区冬季海水分层不太明显或分层消失时,原绿球藻细胞数最大值才出现于表层和近表层^[12,13]。

尽管原绿球藻的主要栖息地是大洋贫营养海区,但在大陆架不发达且外海水可以侵入的近海环境也有发现。例如,地中海的 Rhone 河近海^[14]、日本的梭濑

湾^[15],甚至在大陆架发达的中国东海的长江口稀释区外^[16]也发现它的存在,只是数量上有所变化。

表 1-1 原绿球藻在世界各调查海区的丰度

Table 1-1 The abundance of *Prochlorococcus* in the typical world sea areas

海 区	原绿球藻的浓度(cell/mL)	文 献
北太平洋(ALOHA)	$1.4 \times 10^5 \sim 3.2 \times 10^5$	Campbell et al., 1993 ^[17] ; 1997 ^[18]
赤道太平洋($12^\circ\text{N} \sim 12^\circ\text{S}$, 140°W)	$1.6 \times 10^5 \sim 2.3 \times 10^5$	Landry et al., 1996 ^[19]
西赤道太平洋($20^\circ\text{S} \sim 7^\circ\text{N}$, 165°W)	$1 \times 10^5 \sim 5.4 \times 10^5$	Blanchot & Rodier, 1996 ^[20]
西太平洋	$8.5 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^5$	Zhang et al., 2008 ^[21]
东太平洋	$6.0 \times 10^4 \sim 7.0 \times 10^4$	Zhang et al., 2008 ^[21] ; Ma et al., 2008 ^[22]
中赤道太平洋(0°N , 140°W)	1.4×10^5 (平均)	Binder et al., 1996 ^[23]
太平洋 Suruga 湾	$5 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$	Shimada et al., 1996 ^[24]
日本 Bungo Channel	$10^3 \sim 10^4$	Hirosea et al., 2008 ^[25]
SEATS	$1.5 \times 10^5 \sim 2.8 \times 10^5$	Liu et al., 2007 ^[26]
中部太平洋($48^\circ\text{N} \sim 8^\circ\text{S}$, 175°W)	$10^4 \sim 10^5$	Suzuki et al., 1995 ^[27]
北大西洋中部	$0.8 \sim 1.2 \times 10^5$	Li, 1995 ^[28]
北大西洋, 马尾藻海	$3 \times 10^6 \sim 7 \times 10^6 / \text{mm}^2$ (200m 积分)	Olson et al., 1990 ^[12]
大西洋 northern oligotrophic gyre	$1.2 \times 10^5 (\pm 0.08)$	Heywood et al., 2006 ^[29]
大西洋 southern oligotrophic gyre,	$1.2 \times 10^5 (\pm 0.06)$	Heywood et al., 2006 ^[29]
地中海	1.9×10^4 (冬季平均)	Vaulot et al., 1990 ^[14]
西北印度洋	$6 \times 10^4 \sim 7 \times 10^5$	Campbell et al., 1998 ^[30]
红海 Aqaba 湾	1.6×10^5	Lindell & Post, 1995 ^[31]
中国东海	$10^3 \sim 10^5$	Jiao et al., 1998 ^[32] ; Jiao et al., 2001 ^[33] ; Yang & Jiao, 2002 ^[16] ; Jiao et al., 2005 ^[11]
中国南海	$10^4 \sim 10^5$	Jiao et al., 2002 ^[16] ; Yang & Jiao, 2002 ^[34]

■ 参照杨燕辉&焦念志, 2001^[35]添加近年研究, SEATS 表示 SouthEast Asian Time-Series。

表1-1列举了世界主要研究海域(包括近岸和远洋)原绿球藻的数量。一般来说,原绿球藻的丰度近岸低、大洋高,迄今为止,有记录的最高数量是阿拉伯海,约 7×10^5 cells/mL^[30]。

1.1.1.3 原绿球藻对寡营养海区初级生产力的贡献很大

随着“微食物环”的提出,以异养浮游细菌和微微型自养浮游生物(主要包

括原绿球藻、聚球藻、微微型光合真核生物)为起点的两个摄食途径引起了人们的重视。特别是在贫营养海域, 营养元素匮乏, 浮游植物不能大量繁殖, 微食物环在食物链起始阶段的作用远大于以浮游植物为起点的经典牧食食物链, 成为能量流动的主要渠道。有数据表明: 在贫营养海区, 原绿球藻能贡献21-43%的净初级生产力^[18, 36]。1994年在北太平洋ALOHA 站发现, 80%以上的原核生物碳量是由原绿球藻提供的; 1993年Georricke和Welsch-meyer在马尾藻海发现, 原绿球藻占叶绿素生物量的30%以上, 并提供25%以上的初级生产力; Binder等1996年得出结论, 在赤道太平洋中部, 原绿球藻占总光合生物量的27~41%^[37]; 在地中海, 约31%的叶绿素生物量由原绿球藻提供^[14]; Buck等1996年认为, 在亚热带北大西洋, 原绿球藻的碳生物量占总碳生物量的12%^[38]; 在西太平洋暖池原绿球藻生物量占超微型浮游植物的69%^[39]。

1.1.2 原绿球藻的研究方法

1.1.2.1 基于流式细胞仪、显微镜、高效液相色谱法的生态调查研究

原绿球藻的发现历时十余年。最早观察到原绿球藻的是1979年Johnson和Sieburth^[40], 尽管他们发现这种新型的单细胞生物没有藻红素, 但受当时知识的限制, 他们将其错误地归类于聚球藻属, 并称之为“II型”聚球藻。其后, 1983年Gieskes和Kraay在亚热带大西洋发现了一种未知的叶绿素a衍生物, 后来证实这就是原绿球藻的特征色素——二乙烯基叶绿素(Divinylchlorophyll a, DV Chl a)^[41]。直到船载流式细胞仪的应用, 科学家们于1985年发现一种发弱红色荧光的细胞大量存在于大洋海区^[42], 这一现象才引起了足够的重视。之后, 1988年Chisholm等在对北大西洋和太平洋代表海区研究的基础上确定了这是一个未发现的新种^[43]。到目前, 已获取了原绿球藻自然生态学分布的大量调查数据, 并且BATS、HOTS等时间序列站, 月周期、年周期都有很多年的记录^[13, 18], 流式细胞仪已成为研究超微型生物的主要工具。

其次是表面荧光显微镜的方法, 但是由于原绿球藻的荧光微弱且易淬灭, 所以在Jochem于1995年用表面荧光显微镜调查阿拉伯海原绿球藻的自然分布时仅在50 m以下的样品才能被检测到^[44], 这是由于表层的原绿球藻种群较深层的叶绿素含量较低, 不易被显微镜检测到。焦念志等指出, 理论上原绿球藻在450-480 nm

下有最大吸收峰,可是如果在该波长下计数,原绿球藻荧光淬灭得很快,如果在 $546 \pm 12 \text{ nm}$ 则会淬灭得慢些,这为显微镜检测原绿球藻提供了一个新的视角^[45]。但总的说来,由于显微镜在检测上的难度,没有广泛的应用开来。

再次是利用原绿球藻的特征色素DV Chl *a*在普通Chl *a*中的含量,估算其丰度。HPLC(高效液相色谱法, High Performance Liquid Chromatography)是一种很有用的工具,随着色素分离方法的发展,特别是反相色谱的发展,色素的高效液相色谱分析在20世纪80年代获得了快速的发展,不但有了叶绿素准确的定量分析,而且这些HPLC方法允许从混合的浮游藻类种群中分离多达20种分类学上有用的类胡萝卜素。进入90年代后聚合 C_{18} 柱和单体 C_8 柱以及含吡啶的流动相的应用更是使可分离的色素种类数大大增加,一次运行可以分离超过50种色素(叶绿素、类胡萝卜素及它们的衍生物),二极管阵列检测器的广泛应用使得色素的鉴定更加方便和准确^[46]。

1.1.2.2 生理培养实验

1992年 Chisholm 等在分离、培养的基础上经过较系统的研究,根据电镜观察确认了原绿球藻为原核类,是一种原绿藻(*Prochlorophyte*),将其命名为 *Prochlorococcus marinus* ^[47]。自定名以后,在不同海区、不同水层均有分离到纯系,但是即使各种培养基的配方已经公开,原绿球藻的培养仍然是比较困难的。2007年 Moore 等关于原绿球藻培养的文章在培养方法的细节方面有更深入的描述,为分离培养提供很好的经验^[48]。目前已培养的株系主要存放在 PCC(Pasteur Culture Collection of axenic cyanobacterial strains)、RCC(The Roscoff Culture Collection)、CCMP(the Center for Culture of Marine Phytoplankton)、麻省理工大学(MIT)的 Chisholm 实验室,基于以上实验室的数据,绘制的原绿球藻纯系的地理分布见图 1-1 红点所示。可见其分布还是比较分散的,西太平洋的数据比较少,在我国周边海域可以尝试分离。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库