

水质细菌总数 FISH 检测技术的优化

汪 河^{1, 2}, 王 莉^{1, 2*}, 申慧彦^{1, 2}, 李卫华^{1, 2}

(1. 安徽建筑大学 环境与能源工程学院, 安徽 合肥 230601;
2. 环境污染控制与废弃物资源化利用安徽省重点实验室, 安徽 合肥 230601)

摘 要: 在水质卫生检测方面, FISH 具有检测快速、可检测指标多样、检出微生物数量准确等优势。但因其结果稳定性较差, 尚不能替代培养计数法成为标准方法。本研究从影响结果稳定性的细胞制片、蛋白酶 K 消化时间、探针浓度和杂交时间四个方面优化 FISH 技术。结果表明, 46 ℃、2 h 烘烤制片可明显减少因洗涤造成的细胞流失; 终浓度 10 μg/mL 的蛋白酶 K 经 37 ℃、2 min 消化可使样品得到较高的荧光信号且背景干扰少; 探针终浓度 5 ng/μL, 46 ℃、5 h 的条件下可促进寡核苷酸探针 EUB338 mix 与细菌细胞充分杂交。优化后的 FISH 定量结果较稳定, 三次实验的荧光细胞数量无明显差异 (P>0.05)。本研究为水质细菌总数检测的 FISH 法走向标准化提供了一定的技术基础。

关键词: 水质细菌总数; FISH 技术; 优化; 稳定性

中图分类号: R123.1

文献标识码: A

文章编号: 2095-8382 (2022) 01-046-05

Optimization of Fluorescence in Situ Hybridization (FISH) for the Total Bacterial Count in Water

WANG He^{1, 2}, WANG Li^{1, 2}, SHEN Huiyan^{1, 2}, LI Weihua^{1, 2}

(1. School of Environment and Energy Engineering, Anhui Jianzhu University, Hefei 230601, China;
2. Anhui Provincial Key Laboratory of Environmental Pollution Control and Resource Reuse, Hefei 230601, China)

Abstract: Fluorescence in Situ Hybridization (FISH) is a water testing technique with the advantages of rapid detection, various detectable indexes, and accurate detection of microbial quantities. However, its results are not stable enough to replace the counting method as a standard method. In this study, the FISH technique was optimized in four aspects, namely, cell sample preparation, proteinase K digestion time, probe concentration and hybridization time, which affect the stability of the results. The results showed that the washing-caused cell loss could be significantly reduced by baking the glass slides at 46 ℃ for 2 hours. The digestion of proteinase K at a final concentration of 10 μg/mL at 37 ℃ for 2 minutes could result in a high fluorescence signal with less background interference. The probe final concentration of 5 ng/μL at 46 ℃ for 5 hours could facilitate the hybridization of the oligonucleotide probe EUB338-mix and bacterial cells. The optimized FISH technique showed good stability, and there was no significant difference in the number of fluorescent cells among the three experiments (P>0.05). This study provides a technical basis for the standardization of FISH method for the detection of total bacterial count in water.

Keywords: total bacterial count in water; FISH technology; optimization; stability

收稿日期: 2021-08-25

基金项目: 国家自然科学基金项目 (51978003); 安徽省重点研发项目 (1704a0902006); 安徽省科技重大专项 (17030801028)

作者简介: 汪河 (1992-), 男, 硕士研究生, 研究方向为污水生物处理;

王莉 (1975-), 通讯作者, 女, 博士, 主要研究方向为污水生物处理污泥膨胀解析及控制, E-mail: wlyu1228@sina.com

水质卫生检测的标准方法,国内外主要采用培养计数法^[1]。这种方法虽具有易于标准化,结果可比性强的优点,但缺点也显而易见——耗时长(十几小时到几天不等),不能同时检测多种项目,且检测出的微生物数量由于培养手段的限制远远低于实际数量^[2-3]。鉴于此,一系列快速检测方法如高光谱技术^[4]、ATP 生物发光技术^[5]、流式细胞计数法^[6]和 MTT 法^[7]等不断开发出来。而分子生物学领域出现的荧光定量 PCR 法^[8]、原位杂交法^[9]、荧光原位杂交法^[10]等方法,则不仅实现了同时检测多种微生物指标的设想,而且大大突破了环境微生物数量的检测限度。

荧光原位杂交(Fluorescence In Situ Hybridization, FISH)是20世纪80年代初期在原有的放射性原位杂交技术的基础上发展起来的一种非放射性原位杂交技术^[9]。其原理是把非放射性的荧光信号基团标记在特异性碱基序列的核酸探针上,再用带有荧光标记的探针与固定在玻片或滤膜上的细胞中特定的核苷酸序列进行杂交,然后在荧光显微镜下对荧光信号进行辨别和摄像。目前,FISH技术已广泛应用于淡水、海洋、土壤和活性污泥的微生物数分布、丰度以及整个微生物群落组成、结构、多样性的观察^[11-14]。然而,在水质卫生检测方面却鲜少见报道。限制 FISH 技术应用的原因,很可能是因为该技术对实验条件要求高,杂质干扰、酶解条件不适、杂交条件不适、清洗脱落、荧光淬灭等都可能影响实验结果的稳定性^[15-16]。本研究以水质细菌总数为主要观察指标,对 FISH 技术的样品固定和杂交环节进行优化,旨在为 FISH 技术日后在水质卫生检测的成熟应用奠定一定的技术基础。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

主要仪器:净化工作台(苏州净化 SW-CJ-2D);恒温干燥箱(上海阳光 202-5SA);恒温生化培养箱。

蛋白酶 K 缓冲液(50 mL):1 mol/L Tris-HCl (pH7.2) 0.5 mL,0.5 mol/L EDTA 1 mL,5 mol/L NaCl 1 mL,10% SDS 2.5 mL,20 mg/mL 蛋白酶 K 25 μ L,44.98 mL ddH₂O。

杂交缓冲液(2 mL):5 mol/L NaCl 360 μ L,

1 mol/L Tris-HCl (pH7.2) 40 μ L,10% SDS 2 μ L,甲酰胺 800 μ L,798 μ L d H₂O。

洗脱液(50 mL):5 mol/L NaCl 560 μ L,1 mol/L Tris-HCl (pH7.2) 1 mL,0.5 mol/L EDTA 500 μ L,10% SDS 50 μ L,47.89 mL d H₂O。

1.2 样品的采集与固定

样品采集于安徽建筑大学校园内湖水。取水样 1 000 mL 0.45 μ m 滤膜过滤,5 mL 0.2 mol/L PBS (pH 7.2,灭菌)下清洗细菌。取 0.5 mL 清洗水样加入 0.5 mL 的冷冻乙醇固定,摇匀至 -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.3 FISH 过程及优化

实验中使用的探针为针对所有真细菌的 EUB338-mix (5' -GCWGCCWCCCGTAGGWT-3')^[17],探针在 5' 末端用氨甲香豆素乙酸(AMAC)染料标记。FISH 基本操作按 Nielsen^[18]等人的方法:将 10 μ L 固定过的水样置于预先用 0.1 mg/mL 多聚赖氨酸包埋的载玻片上,样品均匀摊开后干燥制片;蛋白酶 K 缓冲液处理,灭菌水清洗;载玻片依次在 50%、80% 和 100% (V/V%) 的乙醇溶液中各脱水 3 min,风干;杂交缓冲液和 EUB338-mix 探针混合后加至载玻片覆盖样品区域,载玻片放入湿盒置于恒温生化培养箱在 46 $^{\circ}$ C 杂交;48 $^{\circ}$ C 洗脱液中浸洗 20 min;灭菌水清洗,风干备检。

在以下几个方面对 FISH 过程进行优化:自然干燥 5 h 和 46 $^{\circ}$ C 烘烤制片(2 h、5 h);蛋白酶 K 消化时间(2 min、5 min、10 min);探针终浓度(2.5 ng/ μ L、5 ng/ μ L、10 ng/ μ L);杂交时间(2 h、5 h、10 h)。

1.4 镜检和计数

样品通过荧光显微镜观察,AMAC 标记的 FISH 信号通过紫外激发模块观察。所有数码照片都在 40 $\times$ 的物镜下拍摄。每个 FISH 条件样品准备 3 张杂化载玻片,每张载玻片随机拍摄 20 张照片。每张照片中发荧光的细胞数通过 Image-Pro Plus 6.0 中的手动计数功能计数。

2 结果与分析

2.1 制片方式对细菌数量的影响

制片方式对细菌细胞数量的影响实验,截止在杂交步骤前。由材料与方法 1.3 可知,FISH 过程的蛋白酶 K 消化和杂交后洗涤环节都需要清洗,而

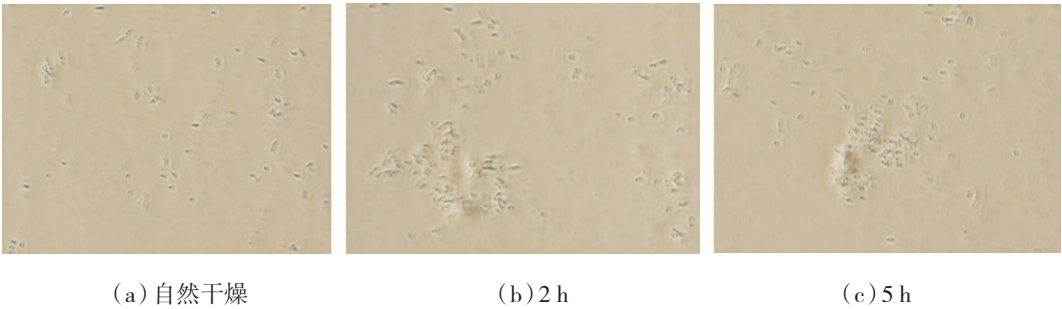


图 1 不同制片方式下的细菌数量图片

清洗或多或少会引起粘附在载玻片上的细胞掉片。有效增加细胞粘附力的做法通常是用明胶、多聚赖氨酸等粘附剂预先包埋载玻片^[11-14]。除此之外,有人发现将粘附有样品的载玻片 37-60 ℃适当烘烤也能一定程度地减少细胞掉片^[12-13,19]。本实验观察了自然干燥制片和 46 ℃ 2 h、5 h)烘烤制片对载玻片细胞粘附力的影响。图 1 可见,和自然干燥组(a)相比,46 ℃烘烤对增加载玻片细胞粘力有一定的促进作用,(b)和(c)细胞数量明显多于(a)。但烘烤时间延长至 5 h 并不能明显减少洗涤过程中的细胞流失,(b)和(c)细胞数量无明显差异。因此下面实验制片采用 46 ℃ 2 h 烤片。

2.2 蛋白酶 K 消化时间对杂交结果的影响

蛋白酶 K 消化在 FISH 中具有消化包围靶 DNA 蛋白质的作用,以增加探针与靶核酸结合的机会,提高杂交信号。但蛋白酶 K 的浓度过高、消化时间过长或孵育温度过高时,都会对细胞结构有一定的破坏,影响细胞的完整性或导致细胞脱落,从而影响杂交结果。根据前人的经验^[13,16,20],终浓度 10 μg/mL 温度 37 ℃ 分别是 FISH 检测中消化细菌靶 DNA 蛋白质较佳的浓度和温度条件,而消化时间则需要根据样品去实际摸索。

由图 2 和表 1 可知,水中细菌总数的 FISH 检测应设蛋白酶 K 消化环节,和未用蛋白酶 K 消化组(26±0.83)比,其他各组的荧光细胞数(>70)均明显增加(和 0 min 组相比,2 min 和 5 min 组均 P<0.001,10 min 组 P<0.05)。蛋白酶 K 消化时间控制在 5 min 内较合适,继续消化会大大减少荧光信号。2 min(b)和 5 min(c)消化组荧光信号数(128±5.66 和 135±3.27)没有明显差异(P>0.05),而当温度延长至 10 min(d)时,荧光信号数量大大减少(72±1.62)(和 5 min 组相比,P<0.01)。下

面的实验蛋白酶 K 消化时间统一采用 2 min。

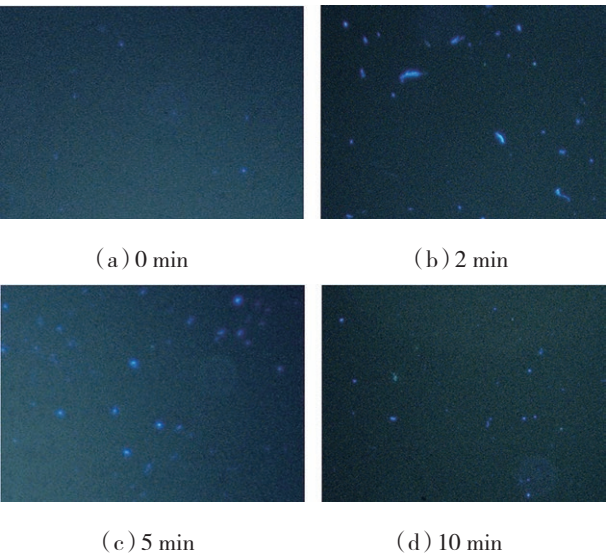


图 2 不同蛋白酶 K 消化时间下的细菌 FISH 图片

表 1 不同蛋白酶 K 消化时间下的荧光细胞数量

时间 (min)	荧光细胞数 *
0	26 ± 0.83
2	128 ± 5.66 ^d
5	135 ± 3.27 ^{da}
10	72 ± 1.62 ^{bcc}

注:照片的荧光细胞平均数,下同
显著性差异比较,为下一组依次跟上一组相比,下同
(a)和相应的对照组比,无显著差异,P>0.05,下同
(b)和相应的对照组比,有显著差异,P<0.05,下同
(c)和相应的对照组比,有显著差异,P<0.01,下同
(d)和相应的对照组比,有极其显著差异,P<0.001,下同

2.3 探针终浓度对杂交结果的影响

FISH 检测中,一般来说,探针浓度越大,杂交率会越高。但探针浓度过高会造成背景染色过高,探针浓度过低又会导致荧光信号的不足。根据国内外多数研究人员^[12-14,18,21]的经验,当探针终浓

度为 5 ng/μL 左右时,FISH 检测可以得到较佳的信噪比,我们的实验证实了相关研究的结果,图 3 显示,随探针浓度增加,杂交信号越高。表 1 可见,当探针浓度从 2.5 ng/μL 增加至 10 ng/μL 时,样品的荧光细胞数量也从 61 ± 2.12 增加至 232 ± 11.02 (和 2.5 ng/μL 组相比,5 ng/μL 组 $P < 0.01$,10 ng/μL 组 $P < 0.001$)。但需要注意的是,10 ng/μL 下的杂交背景稍高,因此,下面的实验探针杂交终浓度采用 5 ng/μL。

表 2 不同探针浓度下的荧光细胞数量

浓度 (ng/μL)	荧光细胞数 *
2.5	61 ± 2.12
5	174 ± 18.17 ^c
10	232 ± 11.02 ^{ab}

2.4 杂交时间对杂交结果的影响

杂交时间对杂交也有较大的影响。时间过短会造成杂交不完全,而过长则会增加非特异性杂交。据前人的经验表明,杂交时间因探针及样品的不同而不同,有的探针时间短至 1-2 h^[11,14,22],

有的探针需长至 6 h 甚至过夜^[20,23]。一般认为,寡核苷酸探针可在 6 h 以内和目标细胞完成杂交^[11,14,16,22]。图 4 和表 1 表明,5 h 是本实验比较合适的杂交时间,此时,寡核苷酸探针 EUB338-mix 能与细菌细胞充分地结合。和 5 h 相比,2 h 显然杂交尚未完成,荧光信号相对较低(5 h 250 ± 13.83;2 h 158 ± 8.51)(两组相比, $P < 0.01$)。而当时间延长至 10 h,荧光信号并未明显提高(10 h 273 ± 16.69)(和 5 h 组相比, $P > 0.05$)。

表 3 不同杂交时间下的荧光细胞数量

时间 (h)	荧光细胞数 *
2	158 ± 8.51
5	250 ± 13.83 ^c
10	273 ± 16.69 ^{ca}

2.5 条件优化后的 FISH 定量结果比较

表 4 显示了优化条件下(46 ℃ 2 h 制片,蛋白酶 K 消化时间 2 min,探针浓度 5 ng/μL,46 ℃ 杂交 5 h)的三次 FISH 检测结果。显然,三次实验检测出的荧光细胞数量无明显差异($P > 0.05$),分别为

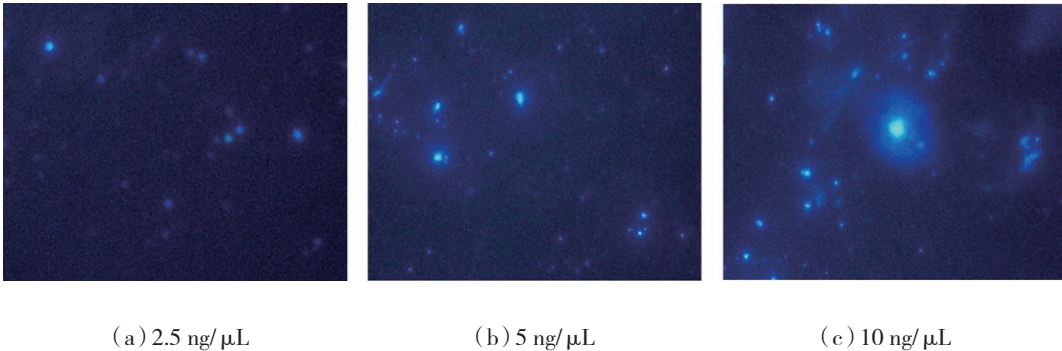


图 3 不同探针浓度下的细菌 FISH 图片

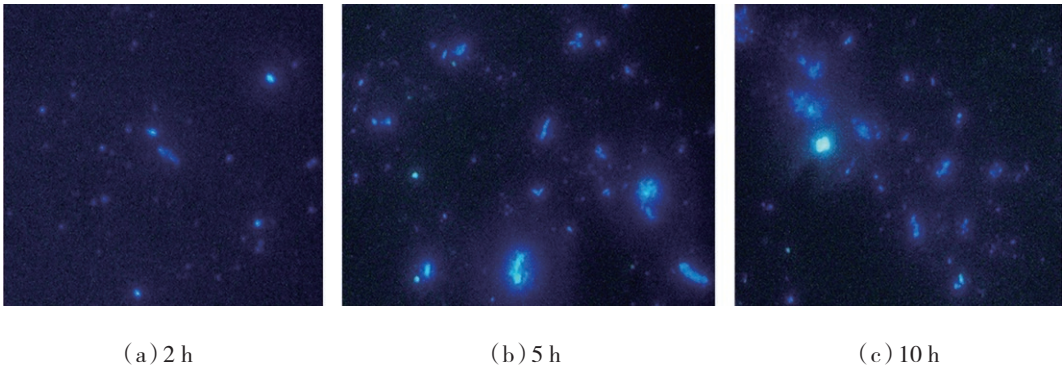


图 4 不同杂交时间下的总细菌 FISH 图片

267 ± 10.19、253 ± 5.62 和 272 ± 16.07。可见,优化后的 FISH 技术检测结果具有较高的稳定性,提示将 FISH 检测技术应用于水的卫生检测是可行的。

表 4 优化条件下的 FISH 实验定量结果

实验次数	荧光细胞数 *
1	267 ± 10.19
2	253 ± 5.62 ^a
3	272 ± 16.07 ^{aa}

3 结论

本研究主要针对 FISH 在水质卫生检测中结果稳定性差的问题,在细胞制片、蛋白酶 K 消化时间、探针杂交浓度和杂交时间四个方面对 FISH 技术进行优化,得到如下结果:

(1) 细胞制片烘烤比自然干燥好,适度烘烤可一定程度减少 FISH 过程因洗涤造成的细菌细胞流失,46 ℃ 2 h 烘烤的合适条件。

(2) 水质细菌总数的 FISH 检测应设蛋白酶 K 消化环节,终浓度 10 μg/mL 的蛋白酶 K 37 ℃ 作用细菌细胞 2 min,可得到较佳的信噪比。

(3) 探针终浓度 5 ng/μL,46 ℃ 5 h,可使寡核苷酸探针 EUB338-mix 与细菌细胞充分地结合。

(4) 条件优化后的 FISH 定量结果稳定性较好,优化条件下 FISH 技术三次检测的荧光细胞数量无明显差异。本研究结果为 FISH 法日后在水质卫生检测的成熟应用奠定了一定的技术基础。

参考文献:

[1] 中华人民共和国卫生部,中国国家标准化管理委员会.生活饮用水标准检验方法 微生物指标:GB/T 5750.12—2006[S].北京:中国标准出版社,2007.

[2] Vives-Rego J,Lebaron P,Nebe-von Caron G.Current and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology[J].FEMS Microbiology Reviews,2000,24(4):429-448.

[3] 王婷婷,邓天龙,廖梦霞.水生细菌计数方法研究进展及展望[J].世界科技研究与发展,2008,30(2):138-142.

[4] Huang L,Zhao J W,Chen Q S,et al.Rapid detection of total viable count (TVC) in pork meat by hyperspectral imaging[J].Food Research International,2013,54(1):

821-828.

[5] Ngamsom B,Truyts A,Fourie L,et al.A microfluidic device for rapid screening of E. coli O157:H7 based on IFAST and ATP bioluminescence assay for water analysis[J].Chemistry - A European Journal,2017,23(52):12754-12757.

[6] Guler M T,Bilican I.Capacitive detection of single bacterium from drinking water with a detailed investigation of electrical flow cytometry[J].Sensors and Actuators A: Physical,2018,269:454-463.

[7] 周大祥,熊书,谢桂香.利用 MTT 建立一种快速检测青枯菌活菌的方法[J].生物学杂志,2019,36(1):103-106.

[8] Kim J,Lim J,Lee C.Quantitative real-time PCR approaches for microbial community studies in wastewater treatment systems:applications and considerations[J].Biotechnology Advances,2013,31(8):1358-1373.

[9] Bauman J G J,Wiegant J,Borst P,et al.A new method for fluorescence microscopical localization of specific DNA sequences by in situ hybridization of fluorochrome-labelled RNA[J].Experimental Cell Research,1980,128(2):485-490.

[10] Rohde A,Hammerl J A,Appel B,et al.Differential detection of pathogenic yersinia spp.by fluorescence in situ hybridization[J].Food Microbiology,2017,62:39-45.

[11] 王明义,袁晓燕,宋雪珍,等.荧光原位杂交法在检测硫酸盐还原菌中的应用[J].中国现代医学杂志,2008,18(3):302-304.

[12] Hasegawa Y,Welch J L M,Valm A M,et al.Imaging marine bacteria with unique 16S rRNA V6 sequences by fluorescence in situ hybridization and spectral analysis[J].Geomicrobiology Journal,2010,27(3):251-260.

[13] Schmidt H,Eickhorst T,Tippkötter R.Evaluation of tyramide solutions for an improved detection and enumeration of single microbial cells in soil by CARD-FISH[J].Journal of Microbiological Methods,2012,91(3):399-405.

[14] 夏岚,李遵龙,郑朋.荧光原位杂交法研究氧化沟内微生物群落分布特征[J].化工进展,2012,31(S2):203-207.

[15] 江冬瑞,王弦,吴强.荧光原位杂交技术操作的常见问题分析[J].临床与实验病理学杂志,2015,31(12):1426-1427.

[16] 陈瑛,任南琪,李永峰,等.微生物荧光原位杂交(FISH)实验技术[J].哈尔滨工业大学学报,2008,40(4):546-549,575.

[17] Amann R I,Binder B J,Olson R J,et al.Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations[J].Applied and

(下转第 85 页)

- [6] 徐顺. 基于社会认知理论的大学生数字公民素养影响因素及提升策略研究 [D]. 武汉:华中师范大学,2019.
- [7] 赵红丹,汤先萍. 内部人身份认知研究述评 [J]. 外国经济与管理,2015,37(4):56-65.
- [8] 韩静. 人力资源管理强度、组织支持感与员工创新行为的影响关系研究——基于自我效能感的调节作用 [D]. 上海:华东师范大学,2019.
- [9] 吴琴,张骁,李嘉,等. 领导亲社会倾向对员工组织公民行为影响的跨层次研究 [J]. 管理学报,2020,17(10):1470-1477.
- [10] 张一帆. 基于社会认同理论的网络趣缘社区运营研究 [D]. 湘潭:湘潭大学,2019.
- [11] Delmotte J, De Winne S, Sels L. Toward an assessment of perceived HRM system strength: scale development and validation [J]. The International Journal of Human Resource Management, 2012, 23(7):1481-1506.
- [12] 陈志霞. 知识员工组织支持感对工作绩效和离职倾向的影响 [D]. 武汉:华中科技大学,2006.
- [13] Xu Q, Zhao Y X, Xi M, et al. Impact of benevolent leadership on follower taking charge [J]. Chinese Management Studies, 2018, 12(4):741-755.
- [14] 刘智强,邓传军,廖建桥,等. 组织支持、地位认知与员工创新:雇佣多样性视角 [J]. 管理科学学报,2015,18(10):80-94.
- [15] Baron R M, Kenny D A. The moderator-mediator variable distinction in social psychological research: Conceptual, strategic, and statistical considerations [J]. Journal of Personality and Social Psychology, 1986, 51(6):1173-1182.
- [16] Preacher K J, Hayes A F. Asymptotic and resampling strategies for assessing and comparing indirect effects in multiple mediator models [J]. Behavior Research Methods, 2008, 40(3):879-891.
- (上接第 50 页)
- Environmental Microbiology, 1990, 56(6):1919-1925.
- [18] Nielsen P, Lemmer H, Daims H. FISH handbook of wastewater treatment: identification and quantification of microorganisms in activated sludge and biofilms by FISH [M]. London, UK: IWA Publishing, 2009, 74-84.
- [19] 聂英进,孙晓莹,张轶凡,等. 活性污泥样品荧光原位杂交实验方法研究 [J]. 四川环境,2011,30(4):5-8.
- [20] 孙明军,王萍,张喜悦,等. 荧光原位杂交在布鲁氏菌和牛结核分枝杆菌检测中的应用 [J]. 中国动物检疫,2019,36(9):69-73.
- [21] Karstrup C C, Agerholm J S, Jensen T K, et al. Presence and localization of bacteria in the bovine endometrium postpartum using fluorescence in situ hybridization [J]. Theriogenology, 2017, 92:167-175.
- [22] Li L, You Y Q, Pagilla K. Density-based separation of microbial functional groups in activated sludge [J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2020, 17(1):376.
- [23] 孔令娜,冯祎高,孙冰晓,等. 基于改进的多色荧光原位杂交技术的染色体分析 [J]. 中国农学通报,2020,36(12):97-103.