

Takayama pulchellum 原位增长率测定的研究

侯建军^{1, 2, 3, 4} 赖红艳^{1, 3} 雷红灵³ 黄邦钦²

(1. 华中农业大学水产学院, 武汉 430070; 2. 厦门大学近海海洋环境科学国家重点实验室, 厦门 361005;

3. 湖北民族学院 湖北省野生动植物保护与利用重点实验室, 恩施 445000; 4. 中国水产科学研究院

长江水产研究所, 农业部淡水鱼类种质资源与生物技术重点开放实验室, 荆州 434000)

摘要: 现今用于测定有害藻华生物原位增长率的方法很难在现场进行有效地应用, 因此我们尝试采用基于 rRNA、叶绿素和总蛋白质浓度的定量测定方法来估算其细胞增长率。本研究重点对 *Takayama pulchellum* 细胞株(TPXM)的 rRNA 含量和特定生长率的关系进行了探索。用荧光标记的肽核酸探针结合全细胞杂交方法, 结合流式细胞仪和专业图像分析软件对 *T. pulchellum* 单细胞水平的 rRNA 进行了定量检测。结果表明不同生长阶段的 *T. pulchellum* 单细胞 rRNA 水平与其相应的细胞特定生长率有较好的相关关系($R^2=0.7293$, $p<0.01$, $n=14$), 单细胞蛋白质含量、rRNA 水平与同步后的细胞周期变化情况也有较好的相关关系($R^2=0.6984$, $p<0.01$, $n=14$)。上述结果提示单细胞 rRNA 含量可作为指示细胞周期变化和细胞特定生长率的较好指标。

关键词: *Takayama pulchellum*; 肽核酸探针; rRNA; 流式细胞仪; 原位增长率

中图分类号: Q331 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2008)02-0141-07

自然环境中的藻华生物生长和繁殖速度各有差异, 细胞周期长短不同; 即便是同种细胞, 其生长周期也会存在差别。藻华种类在自然水体中的丰度是许多过程和因素综合作用的结果, 诸如水温、营养盐、浮游植物的种间竞争、浮游动物摄食等外在因素和细胞生长(细胞分裂)、沉降、病毒感染以及在不适环境下发生的细胞自溶等内在因素^[1]。为了更好地反映浮游藻类增殖与衰落的内在原因, 需要测量不依赖于细胞丰度和各种损失的特定生长率, 所以原位增长率的测定显示出重要的应用价值, 尤其是可以作为监测藻华动态的重要指标^[2-9]。测定浮游植物原位增长率用得较多的是细胞周期分析法, 如 McDuff 和 Chisholm^[7] 提出通过细胞周期分析估算浮游植物原位增长率的计算方法。McDuff, et al.^[7] 和 Vaulot^[8] 创建了有丝分裂指数法。DNA 含量也可用于准确地分析甲藻、硅藻^[2] 和原核微型浮游植物^[9] 的原位生长速率。细胞周期蛋白则是更有前景的细胞周期标志物, 如增殖细胞核抗原(PCNA)、细胞周

期蛋白 Cyclin 等^[3-5]。用肽核酸(PNA)探针检测 RNA 含量在藻华生物原位增长率测定的方法方面目前文献报道很少。我们拟以近年厦门海域多发的有害赤潮生物 *Takayama pulchellum* 为实验对象^[9], 用 PNA 探针技术检测 RNA 含量并同时测定与其特定生长率相关的指标, 从而评估该方法用于测定原位增长率的可能性。

1 材料与方法

1.1 实验用藻的培养及采样 实验用藻为分离自厦门海域典型的有害赤潮生物 *T. pulchellum*, 在 5000k 光强, L:D=12:12 的光周期和 22℃ 的温度下单种培养。培养藻用量为: 10L×3, 采用 f/2 培养基培养。每天上午 10 点取样品进行检测。

1.2 细胞计数方法及细胞特定生长率测定 库尔特计数法采用美国 Beckman 公司的 Multisizer™ 3 Coulter counter, 选 100 μ m 测定管^[10]。藻液中加入 1% 鲁格氏试剂固定后于 Zeiss Axioskop 多功能显微

收稿日期: 2007-04-17; 修订日期: 2008-01-05

基金项目: 国家重点基础研究发展规划 973 项目(编号: CEOHAB2001CB409704); 农业部淡水鱼类种质资源与生物技术重点实验室开放课题(编号: LFB20070611); 中国博士后基金项目(编号: 20060400854); 教育部博士点, 基金项目(编号: 20070504076)资助

作者简介: 侯建军(1966—), 男, 土家族, 湖北恩施人; 教授, 博士; 主要从事环境科学和分子生态学。E-mail: jjhou@mail.hzau.edu.cn

通讯作者: 黄邦钦, 教授, 博士; 主要从事浮游植物生态学研究。E-mail: bqhuang@xmu.edu.cn

镜下进行校正计数。细胞的比生长率(此处为特定生长率)计算公式为: $\mu=\ln(Nt/No)/t$, No 为起始密度, Nt 为时间 t 时的细胞密度^[11, 12]。

1.3 叶绿素测定 叶绿素 a 及营养盐的测定:将水样用 Whatman GF/F (0.25mm) 滤膜过滤, 过滤海水为 200—300mL, 过滤过程中加数滴饱和碳酸镁溶液。滤膜置于铝箔袋内, -20°C 速冻黑暗保存。加 5mL 90% 丙酮于 -20°C 避光萃取 24h, 用 RF-5301PC 荧光分光光度计测定其浓度^[13]。

1.4 总蛋白质提取及测定 离心收集 300mL 的藻液, 加入 0.5mL 的 $1\times$ Laemmli buffer, -80°C 保存或冰浴中超声破碎, 破碎前先用蒸馏水清洗探头, 再用 10% 的 SDS 清洗, 破碎 10s, 3 次。破碎后镜检。16000r/min, 6°C 离心 15min。上清液即可用来进行总蛋白质测定。蛋白质定量采用 Amersham Plus One™ 2-D 试剂盒进行, 在 40min 内以 480nm 波长进行比色测量。

1.5 RNA 含量的测定 RNA 含量测定采用 PNA 探针并结合流式细胞仪和 Q-image 公司的 Simple PCI 专业图像分析软件系统进行荧光强度的定量分析。选用的阳性 PNA 探针为: PNAIP28S01, 目标序列为 28S rRNA, 探针序列组成为 ATGCCATCTCAAGA, 分子量为 4428.85, 为 *T. pulchellum* 的特异性探针; 阴性探针为: PNA BacUni-I, 靶序列为 16S rRNA, 序列构成为 CTGCCTCCCGTAGGA, 分子量为 4688.15, 探针对细菌具有特异性; 探针均用 FAM 标记, 其来源及设计见 Hou, et al.^[9]、Litaker, et al.^[13]、Chen, et al.^[14]。探针检测样品的处理方法: 将样品用 1% 的多聚甲醛固定, 用乙醇(80%)脱色后, 将样品分为两组, 一组加入 1% RNAase (Sigma), 另一组无 RNAase, 37°C 下保温 30min。然后分别用阳性探针和阴性探针进行全细胞荧光原位杂交, 每个样品重复 3 次。PNA 探针的原位杂交方法根据文献报道进行优化^[9, 13]。流式细胞仪检测方法见参考文献[14], Simple PCI 专业图像荧光定量分析方法用 Q-image 公司的 Simple PCI 专业图像分析软件系统结合 SPSS for Windows 10.0 进行统计分析。RNA 定量用荧光强度相对大小来计算, 公式为: $\text{RNA}=(Fp-Fn)-\text{RNase}-(Fp-Fn)+\text{RNase}$ 。其中 Fp 为阳性探针杂交后检测到的荧光强度, Fn 为阴性探针杂交后检测到的荧光强度。下标“ $-\text{RNase}$ ”为无 RNase 存在时杂交的荧光强度, 下标“ $+\text{RNase}$ ”为加入 RNase 后杂交的荧光强度^[13]。

1.6 细胞周期同步化及细胞周期检测 取指数生长期的细胞采用暗环境同步化处理 60h 以上, 然后

重新置于原先的光照条件下培养(5000lx 光强, $L:D=12:12$ 的光周期, 22°C)。在正常光照周期的 24h 内, 每 2h 取样一次, 5% 的戊二醛(W/V)固定, 液氮快速冷冻。细胞周期测定及处理方法: 细胞在 37°C 快速解冻, 再用 PBS 进行洗涤, 离心 7000r/min, 5min, 80% 乙醇脱色处理 1h 以上, 加入 1% 的 RNAase (Sigma) 37°C 下保温 30min 后, 再加入碘化丙啶(PI) ($50\mu\text{g}/\text{mL}$) 染色, 37°C 保温 10min, 用流式细胞仪检测细胞周期分布^[19]。

1.7 数据分析及作图 数据处理采用 MS Excel 2002、SPSS (SPSS 11.0, 2001) 和 SigmaPlot 8.0 等软件进行统计分析及作图。

2 结果及分析

2.1 细胞密度和细胞特定生长率的变化

对 *T. pulchellum* 进行了为期 15d 的培养, 细胞生长情况(图 1)。在 15d 培养期间, *T. pulchellum* 细胞数量基本保持增长态势。第 1 至第 4 天内缓慢增长; 而到第 4 至第 6 天内, 细胞进入指数式增长, 密度上升快速; 第 13 天内, 细胞持续增长, 然后过渡到第 13 至第 15 天的平稳增长。其特定生长率变化情况: 接种后第 1 至第 4 天, 细胞特定生长率下降; 在第 4 至第 6 天其特定生长率显著增加直到最高值; 从第 6 天到第 15 天培养结束, 细胞特定生长率逐渐下降, 从细胞密度上则表现出缓慢增长趋势。

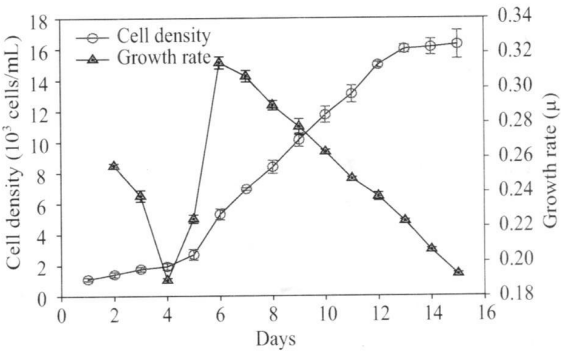


图1 *Takayama pulchellum* 的细胞密度和特定生长率
Fig. 1 Cell density and specific growth rate of *Takayama pulchellum*

2.2 细胞特定生长率与单细胞叶绿素含量和总蛋白质含量变化关系

T. pulchellum 的单细胞叶绿素在培养的第 2 天出现增长, 在后续培养过程中其单细胞叶绿素整体上出现缓慢下降趋势, 其间略有波动性增长情况出现。当特定生长率显著下降时, 单细胞叶绿素也呈现显著下降; 而在特定生长率增加时, 其单细胞叶绿素含量相对稳定; 随后特定生长率持续下降时, 单细胞

胞叶绿素波动性下降,变化规律不明显(图 2)。单细胞蛋白质含量在细胞接种后第 1 至第 2 天时间内出现增长,然后随着特定生长率增加而迅速下降;在特定生长率持续下降期间,其单细胞蛋白质含量表现出缓慢下降趋势(图 3)。

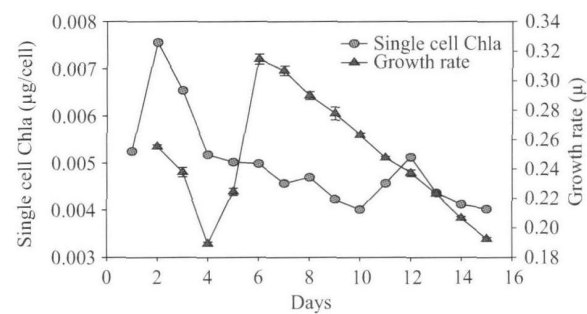


图2 *Takayama pulchellum* 的单细胞叶绿素浓度和特定生长率的变化
Fig. 2 Variation of unicellular chlorophyll a concentration and specific growth rate of *Takayama pulchellum*

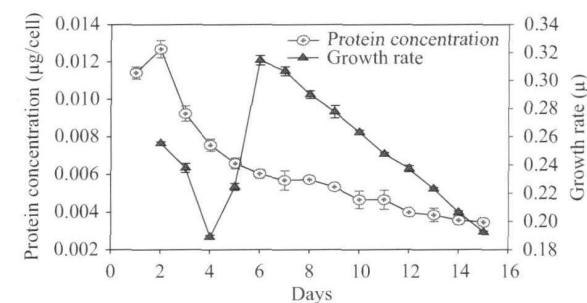


图3 *Takayama pulchellum* 单细胞蛋白质浓度和特定生长率的变化
Fig. 3 Variation of unicellular protein concentration and specific growth rate of *Takayama pulchellum*

2.3 细胞特定生长率与单细胞 rRNA 含量的关系

用 PNA 探针检测单细胞 rRNA 含量的效果(图 4)。从图 4A 中可见,阴性探针对照组藻细胞在荧光显微镜下仅有微弱的黄色或橙黄色自发荧光;图 4B 显示,用 RNA 酶处理后再用特异性的 PNA 探针检测,细胞中仅见微弱的绿色荧光,可能是探针和极少量剩余的 rRNA 或 DNA 相结合呈现的微弱荧光;而未加 RNA 酶处理的图 4C 则表明,特异的 PNA 探针和细胞中未降解的大量 rRNA 杂交结合,呈现出探针明亮的绿色荧光。表明用特异的 PNA 探针检测 rRNA 含量的效果很好,用公式 $RNA = (Fp - Fn) - RNase - (Fp - Fn) + RNase$ 计算 RNA 含量较为可靠。图 5 显示,特定生长率较低时(< 0.25),单细胞 rRNA 含量在一定范围内维持相对稳定;在特定生长率处于 0.25 与 0.29 之间时,其单细胞 rRNA 含量增加,而在较高的特定生长率时(> 0.29),其单细胞 rRNA 含量却降低。从图 6 可以看出,在不同生长时期,单细胞 rRNA 含量与特定生长率之间拟合的情况较好,变化规律较为一致。回归分析表明,两种测定 rRNA 的方法均与特定生长率之间均呈现出较好的相关关系。其中 FCM 测定的 rRNA 含量与特定生长率之间的相关系数为 $R^2 = 0.7293$, $p < 0.01$ ($n = 14$)。

2.4 *T. pulchellum* 的细胞周期分析

同步化后对 *T. pulchellum* FCM 图谱荧光信号强度分析表明,S 期大约出现在 10h 左右。根据不同细胞周期 *T. pulchellum* 单细胞 rRNA 含量和总蛋白含量的变化情况,也可建立 rRNA 含量和各细胞周期之间对应的定量关系。

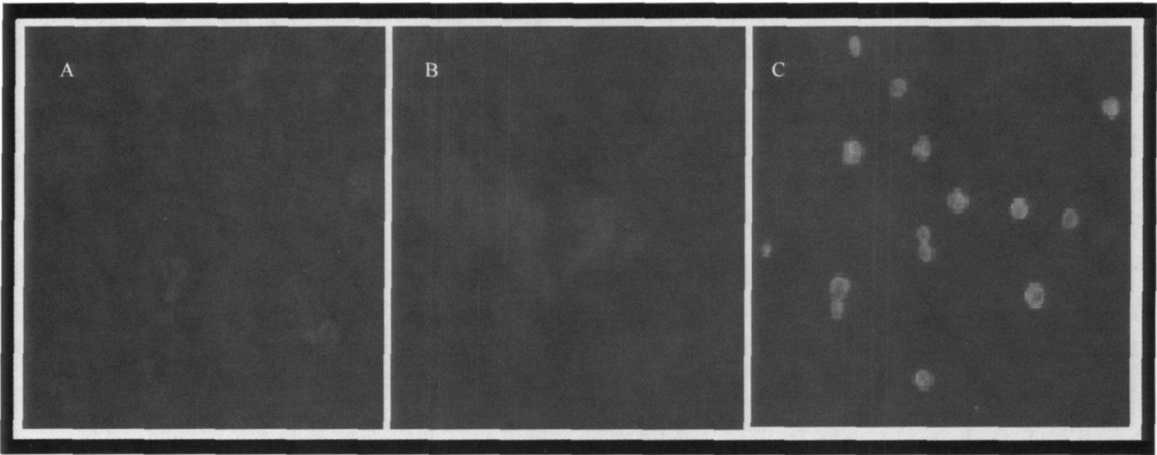


图 4 荧光标记的 PNA 阳性、阴性探针及 RNA 酶处理杂交后 *Takayama* 荧光显微镜照片
Fig. 4 Epifluorescence micrographs of *Takayama pulchellum* treated with RNase and hybridized with FAM-conjugated positive probe (specificity) and negative probe
A. 阴性探针组; B RNase 处理后阳性探针杂交组; C. 无 RNase 阳性探针处理组
A. negative probe group (control group); B with RNase and hybridized with FAM-conjugated positive probe group; C. without RNase and hybridized with FAM-conjugated positive probe group

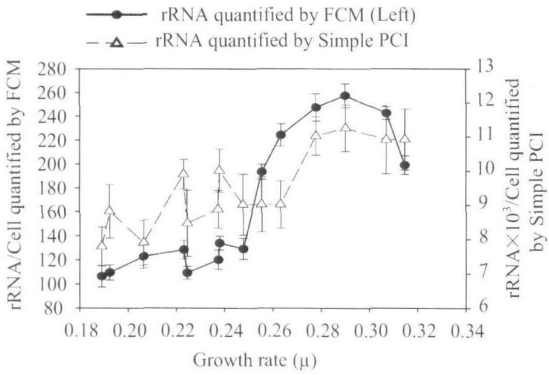


图 5 流式细胞仪和 Simple PCI 测定的单细胞 RNA 含量对特定生长率的变化

Fig. 5 Variation of cellular rRNA (as quantified by FCM and Simple PCI) with specific growth rate in *Takayama pulchellum*

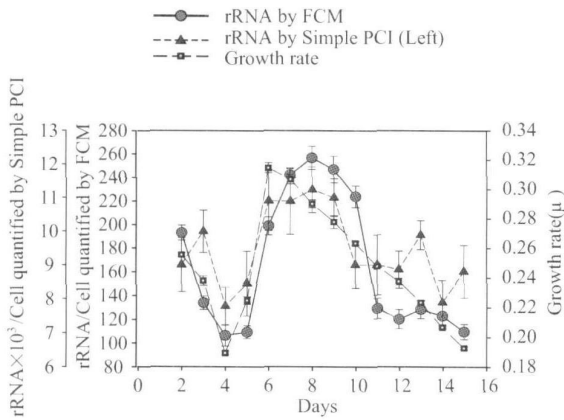


图 6 流式细胞仪和 Simple PCI 检测的 *Takayama pulchellum* 单细胞 RNA 含量与特定生长率之间的关系

Fig. 6 Relationships between cellular rRNA (as quantified by FCM and Simple PCI) and specific growth rate in *Takayama pulchellum*

2.5 不同细胞周期的细胞特定生长率与单细胞 rRNA 含量及总蛋白质含量的关系

在 G₁ 期和 S 期之间, 两种方法测定的单细胞 rRNA 含量和单细胞蛋白质含量均表现出明显增加的趋势(0—10h); 在 S 期至 G₂ 期(10—16h), 其单细胞 rRNA 含量和总蛋白质含量略有下降, 并在一定范围内维持相对稳定。G₂ 期开始时单细胞蛋白质含量和 rRNA 含量出现了小幅度的增加, 然后从 G₂/M 期开始直到 M 期结束, 其单细胞 rRNA 含量和总蛋白质含量明显下降; 但二者在 24h 后出现了短暂回升(图 7)。相关性分析表明, 单细胞蛋白质含量、单细胞 rRNA 含量与细胞周期变化之间呈现出较好的相关关系 $R^2=0.6984$ ($p<0.01$) ($n=14$)。结果提示单细胞 rRNA 含量的变化也可作为指示细胞周期

性变化的较好指标。

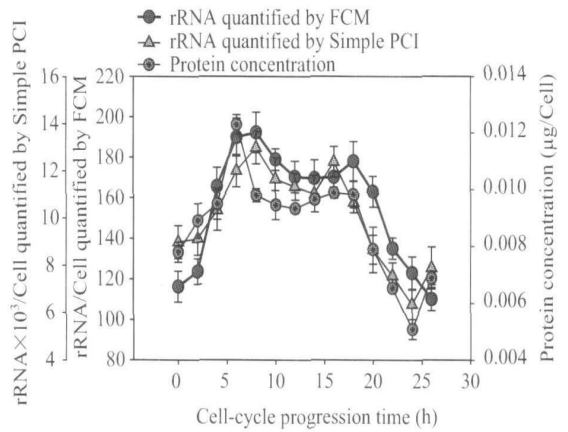


图 7 流式细胞仪和 Simple PCI 检测 *Takayama pulchellum* 单细胞 RNA 含量与单细胞蛋白质含量之间的关系

Fig. 7 Relationships between cellular rRNA (as quantified by FCM and Simple PCI) and cellular protein concentration in *Takayama pulchellum*

3 讨论

3.1 细胞生长和单细胞蛋白质及叶绿素含量关系

测定自然环境中浮游植物原位增长率有很多可选择的方法, 诸如测定与生长密切相关的生化成分和生物大分子等^[17]。有研究证明某些和生长密切相关的生化成分和细胞特定生长率之间呈现显著的相关关系^[18]。叶绿素和总蛋白质含量也是衡量浮游植物细胞生长的重要指标。就蛋白质来说, 细胞增长首先表现为蛋白质的合成和蛋白质含量的增长。而细胞周期蛋白(细胞周期相关蛋白质)更是衡量细胞原位增长率的可靠指标^[19]。本研究也表明, 在细胞周期中的第一个阶段(G₁期)是蛋白质合成旺盛期, 经过第二阶段(S 期)后的第三阶段(G₂期)也有蛋白质的合成^[3,4]。通过测定细胞周期蛋白质含量较高的细胞种群所占的百分比就可以很容易地对特定生长率进行估计。细胞周期蛋白的研究还有助于了解环境因子如何影响细胞周期的进程^[19]。本实验结果显示, 细胞生长过程中其总蛋白质含量随着培养时间的延长和细胞密度的增加, 其单细胞蛋白质含量在开始时短暂上升后便一直保持着下降趋势。笔者推测这种现象可能与细胞生长速度过快, 蛋白质合成供不应求有关。在指数增长期以后, 其单细胞蛋白质含量伴随着特定生长率下降而缓慢下降。同样也有研究表明, 蓝细菌的单细胞总蛋白质含量在低到中度细胞生长率情况下增加, 而在高生长率也降低^[20]。我们在细胞周期分析中检测单细胞

胞总蛋白质含量,其变化趋势和细胞周期的变化相关,且与 rRNA 含量表现出较好的相关关系。单细胞蛋白质含量变化结合 rRNA 含量的变化将能较好地解释细胞增殖速率问题。在赤潮生物的生长监测中,往往也选用简单、快速的叶绿素 *a* 来表征浮游植物的生物量^[21]。本研究中,单细胞叶绿素含量在最初表现为快速增长,然后随着特定增长率上升而显著下降。在随后的培养过程中,叶绿素一直保持着波动下降的趋势。这种情况也可解释为细胞生长、分裂过快,细胞较小,其叶绿素合成速度相对不足。

3.2 细胞生长和单细胞 rRNA 含量变化的关系

rRNA 是衡量细胞特定增长率大小尤为有效的指标。一般来说单位核糖体的蛋白质合成效率变化不会很大,因此决定核糖体数量的单细胞 rRNA 含量就能充分反应细胞的蛋白质合成效率^[18]。核糖体这类生物大分子及其与蛋白质的比率可用来连续监测自然水体中浮游植物的特定增长率。Worden, *et al.*^[22] 采用基于 rRNA 测定的方法,评估了海洋中超微型的蓝细菌原位增长率。其依据的方法就是采用荧光标记的探针进行全细胞杂交并结合 FCM 进行检测,表明 rRNA 含量能很好地衡量细胞的生长率^[23]。对几株蓝细菌的检测结果表明,rRNA 这种生物大分子是指细胞生长率的很好指标^[24]。我们对 *T. pulchellum* 的研究结果也表明,单细胞 rRNA 含量与特定增长率之间表现出规律性的变化。即在特定增长率较低时,其 rRNA 含量在一定范围内保持相对稳定;而在中等特定增长率时,其单细胞 rRNA 含量随特定增长率增加而增加。在很高的特定增长率时,其 rRNA 含量却明显下降。低特定增长率时 rRNA 含量维持恒定的原因可能在于细胞中存在着多余的不具翻译功能的核糖体。高特定增长率下 rRNA 含量下降可能也与细胞体积或蛋白质浓度变化的影响有关^[23]。在这种情况下,rRNA/蛋白质(生物量)的比率将有助于说明其与比生长率的关系^[21]。因为单位核糖体的效率是相对稳定的,蛋白质合成与能组成核糖体单元的 rRNA 含量有关,故 rRNA/蛋白质的比率可以衡量蛋白质合成率。如果蛋白质转运正常有效,在稳定状态下蛋白质合成率应等于生长率^[18]。在我们的实验中,细胞周期中的第一个阶段(G₁期)是 rRNA 合成旺盛期,经过第二阶段(S期)后的第三阶段(G₂期)也有 rRNA 的合成。在不同的细胞周期阶段,*T. pulchellum* 单细胞 rRNA 含量、单细胞蛋白质质量含量与特定增长率的变化规

律较为一致,表明蛋白质、RNA 和细胞特定增长率密切相关^[18]。上述结果提示用 PNA 探针测定单细胞 rRNA 含量的方法是未来能够应用于测定环境中赤潮生物原位增长率的可选方法。

3.3 用肽核酸探针检测特定增长率的特点

PNA 与 DNA 或 rRNA 配对结合有着高度的特异性和很强的亲和力。PNA/DNA 杂交分子的性质很稳定,其结合常数也极高^[24]。从热力学角度看,PNA/DNA 杂交分子的 T_m 也比相同序列的 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。PNA 中性的骨架,决定了 PNA 探针的杂交有不依赖盐浓度变化的特性^[25]。这一重要性质决定了它在与 DNA 或 RNA 杂交过程中不仅可以省去提高盐浓度的操作,还可以运用降低杂交体系离子浓度来抑制非特异性的杂交以及靶序列自身复性对杂交灵敏度的影响^[26]。PNA 的高特异性、疏水性、高灵敏度的特点,检测信号强烈,加上杂交条件易于操作和控制,使其比 DNA 探针更容易和目标序列结合^[25],成为测定原位增长率的理想工具。但从目前的文献来看,尚没有研究采用基于 rRNA 检测的核酸探针或肽核酸探针对于赤潮生物原位增长率进行测定的报道。Worden, *et al.*^[19] 采用 PNA 探针结合荧光原位杂交的方法对单细胞蓝细菌原绿球藻(*Prochlorococcus*)和聚球藻(*Synechococcus*)的杂交条件和杂交效果进行了比较,PNA 探针的荧光信号强度是 DNA 探针的 5 倍。Worden, *et al.*^[22] 继续采用荧光标记的 PNA 探针结合 FCM 技术测定了原绿球藻和聚球藻的 rRNA 含量,表明该方法能够对这些海洋中重要初级生产量贡献者的原位生长率进行测定。本研究中,我们采用 PNA 探针检测了 *T. pulchellum* 的生长情况,结果表明 PNA 探针结合 FCM 能对不同生长时期中的细胞及不同细胞周期时相中细胞的生长情况进行较为可靠的检测,效果较好,表明 PNA 探针有望成为检测赤潮生物原位增长率的有效工具。

各种浮游植物类群如赤潮种类在自然水体中的丰度是由许多过程和因素综合作用的结果。为了更好地反映藻类增殖与衰落的内在原因,需要测量不依赖于细胞丰度和各种损失的特定增长率,所以原位增长率的测定显示出重要的应用价值,并可以作为监测赤潮和水华动态的重要指标。无论是基于 RNA 的定量检测,还是基于细胞周期蛋白(如 PCNA)测定的方法,抑或是其他特征性蛋白质等测定

技术,都是为了能更有效地对浮游植物原位增长率进行测定,从而为定量把握浮游植物种群变化提供有价值的信息。

参考文献:

- [1] Garcés E, Delgado M, Masó M. *In situ* growth rate and distribution of the ichthyotoxic dinoflagellate *Gyrodinium aureolum* Paulmier in an estuarine embayment (Alfacs Bay, NW Mediterranean Sea) [J]. *J Plankton Res*, 1999, **21**(10): 1977—1991
- [2] Chang J, Carpenter E J. Active growth of the oceanic dinoflagellate *Ceratium teres* in the Caribbean and Sargasso Seas estimated by cell cycle analysis [J]. *J Phycol*, 1994, **30**: 375—381
- [3] Lin S J, Chang J, Carpenter E J. Growth characteristics of phytoplankton determined by cell cycle proteins; PCNA immunostaining of *Dunaliella tertiolecta* (chlorophyceae) [J]. *J Phycol*, 1995, **31**: 388—395
- [4] Lin S J, Carpenter E J. Growth Characteristics of marine phytoplankton determined by cell cycle proteins; The cell cycle of *Ethmodiscus Rex* (Bacillariophyceae) in the southwestern North Atlantic Ocean and Caribbean Sea [J]. *J Phycol*, 1995, **31**: 778—785
- [5] Cheng L, Chuan S P, Hwang J C. Gene sequence and expression of an analog of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in the alga *Trachea chui* and detection of the encoded protein with anti-rat PCNA monoclonal antibody [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**: 4010—4014
- [6] Hou J J, Huang B Q, Chen J X. Methods of *in situ* growth rate measurement in phytoplankton [J]. *Chin High Tech Lett*, 2004, **14**: 408—412 [侯建军, 黄邦钦, 陈纪新. 浮游植物原位增长率测定方法. 高技术通讯, 2004, **14**: 408—412]
- [7] McDuff R E, Chisholm S W. The calculation of *in situ* growth rates of phytoplankton populations from fractions of cells undergoing mitosis; A clarification [J]. *Limnol Oceanogr*, 1982, **27**(4): 783—788
- [8] Vault D. Estimate of phytoplankton division rates by the mitotic index method; the *finax* approach revisited [J]. *Limnol Oceanogr*, 1992, **37**: 644—649
- [9] Hou J J, Huang B Q. Development of PNA probe technology on detection of *Takayama pulchellum* [A]. In: Ho K C, Lu S H, Wang Y, et al. (Eds.), Key research findings to harmful algal blooms in the South China Sea [C]. Proceedings of the 3rd international conference on the prevention and management of harmful algal blooms in the South China Sea (HABSCS2006), Hongkong 2006, 368—374
- [10] Hou J J, Huang B Q, Dai X H. Comparative study on cell count method of red tide microalgae. *Chin J Pub Health*, 2004, **20**(8): 907—908 [侯建军, 黄邦钦, 戴相辉. 赤海藻细胞计数方法的比较研究. 中国公共卫生, 2004, **20**(8): 907—908]
- [11] Yang Z, Kong F X, Shi X L et al. Effect of *Ceriodaphnia armatocul-ture* media filtrate on the morphological alteration and growth rate of *Microcystis aeruginosa* and *Scenedesmus obliquus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, **31**(2): 282—285 [杨州, 孔繁翔, 史小丽, 等. 角突网纹蚤培养滤液对铜绿微囊藻和栅藻形态及生长率的影响. 水生生物学报, 2007, **31**(2): 282—285]
- [12] Hou J J, Huang B Q, Cao Z R et al. Effects of nutrient-limitation on photopigments in *Thalassiosira weissflogii* and *Prorocentrum donghaiense* [J]. *J Integr Plant Biol*, 2007, **49**(5): 686—697
- [13] Litaker R W, Vandersea M W, Kibler S R. Life cycle of the heterotrophic dinoflagellate *Pfiesteria piscicida* (Dinophyceae) [J]. *J Phycol*, 2002, **38**(3): 442—463
- [14] Chen J X, Huang B Q, Jiao N Z. Fluorescent *in situ* hybridization with oligonucleotide probes to identify *Alexandrium tamarense* and genus *Alexandrium* [A]. In: Ho K C, Lu S H, Yu T S, et al. (Eds.), Recent advances in the prevention and management of harmful algal blooms in the South China Sea [C]. Proceedings of the international conference on the prevention and management of harmful algal blooms in the South China Sea (HABSCS2003), Hongkong 2003, 81—88
- [15] Worden A Z, Chisholm S W, Binder B J. *In situ* hybridization of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* (marine cyanobacteria) spp. with rRNA-targeted peptide nucleic acid probes [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**: 284—289
- [16] Hou J J, Huang B Q, Hu J, Lin L Z et al. 14 FITC-conjugated lectins as a tool for the recognition and differentiation of some harmful algae in Chinese coastal water [J]. *J Appl Phycol* (in press)
- [17] Fumas M J. *In situ* growth rates of marine phytoplankton; approaches to measurement: community and species growth rates [J]. *J Plankton Res*, 1990, **12**: 1117—1151
- [18] Bremer H and Dennis P P. Modulation of chemical composition and other parameters of the cell by growth rate [A]. In: Neidhardt F C (Eds.), In Chief. *Escherichia coli* and *Salmonella*; Cellular and Molecular Biology [C]. Washington D C: ASM Press, 1996, 1553—1569
- [19] Lin S, Carpenter E J, Chang J. Detection of p34cdc2 and cyclin B-like proteins in *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae) [J]. *Mar Biol*, 1996, **125**: 603—610
- [20] Parrott L M, Slater J H. The DNA, RNA and protein composition of the cyanobacterium *Anacystis nidulans* grown in light and carbon dioxide-limited chemostats [J]. *Arch Microbiol*, 1980, **127**: 53—58
- [21] Sieburth J M C, Smetacek V, Lenz J. Pelagic ecosystem structure, heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fraction [J]. *Limnol Oceanogr*, 1978, **23**: 1256—1263
- [22] Worden A Z, Binder B J. Growth regulation of rRNA content in *Prochlorococcus* and *Synechococcus* (marine cyanobacteria) measured by whole-cell hybridization of rRNA-targeted peptide nucleic acids [J]. *J Phycol*, 2003, **39**(3): 527—534
- [23] Binder B J, Liu Y C. Growth rate regulation of rRNA content of a marine *Synechococcus* (Cyanobacterium) strain [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**: 3346—3351
- [24] Zelphati O, Liang X, Hobart P. Human gene therapy: functionally and conformationally intact fluorescent plasmid DNA [J]. *Gene Chem*, 1999, **10**: 15—19
- [25] Hou J J, Huang B Q, Lai H Y. Application of peptide nucleic acid molecular probe in detection of harmful algal bloom species [J]. *Chin J Pub Health*, 2005, **21**(12): 1524—1526 [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]

STUDY ON DETECTION OF *IN SITU* GROWTH RATE OF *TAKAYAMA PULCHELLUM*HOU Jian-Jun^{1, 2, 3, 4}, LAI Hong-Yan^{1, 3}, LEI Hong-Ling³ and HUANG Bang-Qin²

(1 College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070; 2 State Key Laboratory of Marine Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005; 3 Key Laboratory of Biologic Resources Protection and Utilization of Hubei Province (Hubei Institute for Nationalities), Enshi 445000

4 Key Laboratory of Freshwater Fish Germplasm Resources and Biotechnology (Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences), Jinzhou 434000)

Abstract: Harmful algal blooms are getting more and more serious problems in the water ecosystem in the world than before, for its blooming areas are expanding in many places, such as freshwater and coastal water. It is important to measure the *in situ* growth rate to understand the dynamics of harmful algal blooms in the field, because the temporal change of algal species abundance at a fixed point can be affected by many factors such as growth (cell division), grazing mortality caused by zooplankton, sedimentation, parasite or virus infections, autolysis due to unfavourable growth conditions, etc. Moreover, cell abundance is affected by concentration or dilution due to physical processes, such as physical advection and diffusion. The abundance of a certain phytoplankton species in natural systems is a result of a large array of processes. To investigate causal relationships behind algal bloom proliferation and decline, growth rate must be measured independently of cell abundance and different loss processes. There are several methods available for estimating phytoplankton growth. The usual technique to date makes use of specific cell cycle markers such as cellular DNA content or presence of cell cycle-related proteins. The combination of growth rate measured using cell cycle analysis and the net change in cell abundance measured by microscopy or flow cytometry can provide both growth and loss rates for the studied species. This approach has the potential to allow the separation of population changes directly caused by factors affecting HAB growth (cell division). The PNA (Peptide nucleic acid) probe is an artificial synthetic DNA analogs, in which the sugar phosphate backbone of the DNA helix is replaced with an unchanged structurally homomorphous pseudopeptide backbone. The synthetic backbone provides PNA probes with unique hybridization characteristics such as more rapid and stronger binding to complementary targets according to the Watson and Crick basepairing rules. *Takayama pulchellum* was the first recorded in Japan as an ichthyotoxic dinoflagellate. It was initially described as *Gymnodinium pulchellum*, but recently renamed as *T. pulchellum*. *T. pulchellum* formed HABs in America and Australia, causing large numbers of fish kills, and in the recent years it blooms occurred in Xiamen Bay. The specific growth rate estimated by PNA probe in this study to measure the *in situ* potential growth rate of *T. pulchellum* is very important.

Because currently available approaches for estimating harmful algal bloom species' growth rates can be difficult to apply in the field, we have been exploring the feasibility of using quantitative rRNA by peptide nucleic acid, chl *a* and protein concentration measurements as the basis for making such estimates. In this study, we examined the relationship between rRNA and growth rate of *T. pulchellum* strains (TPXM). Whole-cell hybridization with fluorescence labeled peptide nucleic acid (PNA) probe was used in conjunction with flow cytometry and the professional image analysis software to quantify rRNA on a per cell basis. The result showed that cellular rRNA levels in different growth periods were well correlated with its corresponding specific growth rates ($R^2=0.7293$, $p<0.01$, $n=14$); cellular protein concentration, cellular rRNA level and the cell cycle also presented good correlation ($R^2=0.6984$, $p<0.01$, $n=14$). All the results suggested that cellular rRNA level was a good indicator to analyze cell cycle and cell growth rate of *T. pulchellum*.

Key words: *Takayama pulchellum*; Peptide nucleic acid probe; RNA; Flow cytometry; *In situ* growth rate