

流式细胞术在农业领域的应用

周秀红¹, 孟澍雨²

(1. 安徽农业大学生物技术中心, 合肥 230036; 2. 安徽农业大学生命科学学院, 合肥 230036)

摘要: 流式细胞术是一种能够对群体细胞进行单细胞水平的多个参数同时快速定量分析和分选的技术, 其在农业领域的应用还有较大的发展空间。在动物研究中, 流式细胞术的应用较为广泛, 特别是在疫病检测、精子分选等方面。在植物研究中, 由于细胞壁的存在, 其应用一直受到限制。现有的研究主要包括倍型分析、DNA 含量测定、染色体的鉴定和分选等。流式细胞术在微生物方面的研究起步相对较晚, 在食品微生物中的应用仍然较为有限, 而在病原微生物检测方面相对成熟。未来, 流式细胞术与其他技术的结合将为农业领域的研究提供更为高效、便捷的工具、手段和平台。

关键词: 流式细胞术; 农业; 动物; 植物; 微生物

中图分类号: Q-331; S-03

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X(2017)03-0546-07

Application of flow cytometry in agriculture

ZHOU Xiuhong¹, MENG Shuyu²

(1. Biotechnology Center, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

2. School of Life Science, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract: Flow cytometry is a technology for cell rapid quantitative analysis and separation, which can carry out analyses, such as antigen analysis and genetic analysis to group cells at single-cell level. In agriculture, it still has large room for improvement. In animal husbandry, flow cytometry has already enjoyed a wide application, especially in disease detection and sperm separation. But it has been restricted in plants because of the plant cell wall. Existing research findings mainly include ploidy analysis, DNA testing, identification and separation of chromosome, etc. The application of flow cytometry in microbial research started relatively late, and its application in food microorganism has still been limited, but in terms of pathogenic microorganism detection, this technology is relatively mature. In the future, the combination of flow cytometry and other technology will provide more efficient and convenient tool for the research in agriculture.

Key words: flow cytometry; agriculture; zoology; botany; microbiology

流式细胞术(flow cytometry, FCM)是以流式细胞仪为工具, 对单细胞或其他生物粒子进行研究的新技术。FCM能对液流中排成单列微粒逐个进行快速定量分析和分选, 具有速度快、精度高和准确性好等优点, 成为当代最先进的细胞定量分析技术。

1 流式细胞仪工作原理及特点

流式细胞仪一般由包括样本和鞘液的液流系统、以激光为光源的光学系统、使被测细胞或其他粒子产生的光信号转为电信号的电子系统以及处理

数据的分析系统4部分构成^[1]。其主要原理为: 荧光染色后的单细胞悬浮液在液流压力作用下从样品管喷出, 被从鞘液管喷出的高压鞘液包裹着形成圆形束流, 进入流动室形成单细胞流, 被光学系统的光源激发后发出散射光信号和荧光信号, 电子系统通过光电转换功能实现对细胞测量, 最后, 分析系统将电子系统获取的检测信号转换成数字信号, 通过图表形式呈现出来^[1]。

FCM综合了电子学、光学、计算机科学、生物学和流体力学等技术, 能够在极短时间内高速分析

收稿日期: 2016-10-18

基金项目: 安徽省教育厅科研项目(KJ2017A150)资助。

作者简介: 周秀红, 博士研究生, 助理研究员。E-mail: swjszx86@ahau.edu.cn

上万个细胞, 并能从单细胞中同时测得多个理化性质及分子生物学性状和功能方面的参数。

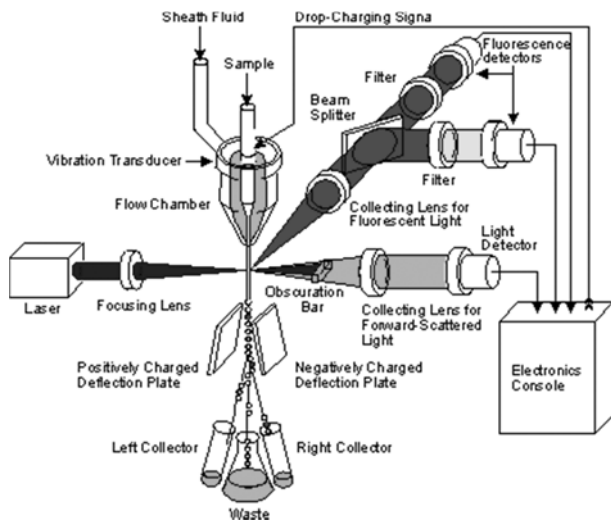


图 1 流式细胞仪工作原理图^[2]

Figure 1 Working diagram of flow cytometer

2 FCM 在动物研究上的应用

2.1 性别控制

性别控制技术可以在精卵结合前决定胚胎性别、增加选种强度, 筛选优良品种, 加快动物育种过程, 对发展养殖业意义重大。

早期分离精子主要通过离心分离法、过滤分离法等物理方法完成^[3]。这些方法普遍存在着准确率低、分离速度慢及损伤精子等缺点, 难以满足现代畜禽业品种改良的需求。FCM 分选精子就是单个精子在激光照射下产生光散射信号和荧光信号, 前者反映其大小形态, 后者反映 DNA 含量。流式细胞仪电子系统会按照精子类型施加电荷, 使其偏转于不同的电极, 由此 x 和 y 精子被分离。宋林等^[4]对奶牛精子性别控制效果的研究表明, 使用性控鲜精、性控冻精进行人工输精, 育成牛受胎率有明显提高, 且在统计学上差异显著。王秀琴等^[5]用 FCM 对奶牛精子分选并对性控冻精所生产的 F₂ 代生长发育跟踪研究结果表明, 性控冻精对奶牛 F₂ 代生长发育无影响。

2.2 动物疫病检测

FCM 在动物疫病检测方面最早用于监控动物免疫状态, 后来扩展到监测机体感染程度、病理状态等, FCM 还可用于研究感染机制和机体应答机制等^[6-7]。

许多环境因素和感染性病原体都能引起畜禽免疫抑制, 及早检测是控制免疫抑制的最好方法。FCM 检测淋巴细胞和淋巴因子水平是免疫检测的

有效手段^[8], 并在外周血淋巴细胞亚群研究^[9-10]中取得了较好效果。FCM 分选特异性 T 细胞^[11]以及 T 细胞抗原受体谱系分析^[11]能够为相关疾病诊断与防控提供依据。

FCM 能够同时检测多种细胞表面抗原, 或同时测量膜、浆与核的抗原, 可以确定 T 细胞免疫表型, 从而监测机体免疫状态并指导治疗^[12]。同时, 作为细胞间信息传导的细胞因子异常表达也可以反映机体病理状态。而 FCM 与细胞内细胞因子染色技术结合可以有效地在单细胞水平上对其研究。利用微球流式芯片技术 CBA (cytometric bead array), FCM 还可捕获检测分泌型细胞因子, 其灵敏度优于传统的 ELISA 法, 并且可以多种细胞因子同时检测, 还能有效避免 ELISA 法的人工假象。

现在 FCM 已广泛用于各种细胞表面标志 (包括干细胞的特异细胞表面标志)、细胞因子以及淋巴细胞各亚群的定性定量研究^[9,12-13]。不仅能为临床治疗提供依据, 也能帮助制定有效的疾病防控措施。

2.3 水生动物研究

FCM 研究水生动物主要集中在包括对毛蚶、对虾和双壳贝类的血细胞分类研究中。

流式细胞仪是准确鉴定水生动物倍性的理想工具。徐钢春等^[14]用 FCM 测定了 223 尾龙池鲫红细胞核 DNA 含量, 揭示了龙池鲫是一种独特的由二倍体和三倍体组成的混合群体鲫类型。崔朝霞等^[15]将 FCM 用于蟹类多倍体诱导研究。丁君等^[16]运用 FCM 研究了九孔鲍 DNA 含量和细胞周期与不同器官的关系。利用不同的荧光标记可有效地研究细胞凝聚反应、呼吸爆发和吞噬作用等。Goedken 和 de Guise 等^[17]、Tu 等^[18]分别利用 FCM 研究了美洲牡蛎、丽文蛤和近江牡蛎等, 分析了吞噬活性与呼吸水平的关系。通过测定单个细胞的电阻、荧光值等 FCM 能将特定细胞从群体中分选出来, 以深入研究细胞形态、基因表达谱等特性等。FCM 已成功用于斑马鱼幼鱼造血细胞、原始性细胞及脊椎 CiA 中间神经元等细胞类型的分离。陈思杰等^[19]用 FCM 成功地分选了斑马鱼幼鱼脑部神经细胞。

3 FCM 在植物研究上的应用

FCM 研究植物是从单细胞浮游植物开始的, 这些植物细胞无粘连且其小于进样针直径, 不会造成进样口堵塞, 无需特殊处理就能直接检测。研究高等植物是在去除植物细胞壁的酶解法出现后才有突破。FCM 能够实现对细胞的体积和表面积测算、活性分析和表面分子检测等^[20]。

3.1 基因组大小测定

基因组大小一般用 DNA 的 C 值表示, 是单倍体细胞中全套染色体 DNA 总量。C 值是真核细胞固有的独特属性, 是分类学、生态学和进化生物学等研究的基础参数^[21]。FCM 是高通量测定植物基因组大小的有效方法之一。1983 年, Galbraith 等^[22]通过 FCM 首次成功测定了 17 种植物细胞核 DNA 含量, 开创了 FCM 检测植物细胞核 DNA 含量的先河, 后来, Galbraith 等^[23]、Hare 和 Johnston^[24]提出的 FCM 检测 C 值的方法促进了植物学前所未有的发展。

3.2 倍型分析

倍型分析对研究植物分类和育种具有重要意义。传统的倍型分析法核型分析^[25]对取材时期和取材部位要求严格, 通常选取处于分裂中期的根尖细胞。而将 DNA 荧光染料与细胞内 DNA 碱基结合后, 通过 FCM 荧光强度测定其含量, 限制条件少, 操作简单。国内对大麦^[26]和玉米^[27]等植物的 FCM 细胞核倍型分型效果良好。吴鹏昊等^[27]用 FCM 研究单倍体二倍化的结果表明, 自然条件下体细胞加倍与生殖细胞加倍无明显相关, 雌雄蕊之间存在一定差异, 且雌蕊自然加倍率更高。张志珂等^[28]借助 FCM 进行了枇杷基因组测序材料的倍性鉴定。周历萍等^[29]通过优化过滤方法与 OTTO 提取液, 应用 FCM 对二倍体川九 1 号和八倍体红颊草莓进行了倍性检测。FCM 在植物优质种质资源鉴定、体外诱导多倍体等方面也有广泛应用^[30]。

3.3 原生质体研究

由于植物细胞具有细胞壁, FCM 研究植物依赖于对原生质体的研究或对细胞核的解离^[31]。FCM 通过检测与分选原生质体及其融合产物研究原生质体及其融合子之间的相关互作, 检测细胞膜表面抗原表达, 定位植物激素结合位点的空间分布^[32], 为作物遗传育种和品种改良奠定基础^[33-34]。刘继红等^[35]通过 FCM 研究了酸橙叶肉细胞原生质体和甜橙胚性愈伤组织原生质体的融合产物。

3.4 细胞信号传导研究

FCM 能进行细胞蛋白质表达测定、细胞信号传导分析, 鉴定细胞亚群, 研究细胞周期和凋亡等, 为植物抗病因子和抗逆因子表达和活性分析提供工具^[20, 36], 研究植物抗逆机理, 以进行逆境植物学和植物病理学的研究^[30, 37]。

3.5 存在问题

FCM 研究植物细胞时仍可能出现一些问题。样

品制备、染色等步骤的差异都会造成研究结果偏差^[38], 在测定具有核内多倍性植物以及具有渐进式局部核内再复制植物基因组大小时存在一定技术标准问题^[39-40], 没有普适的缓冲液为制作单细胞悬液造成一定困难^[29]。

4 FCM 在微生物研究上的应用

近年来, FCM 在农业领域的真菌、衣原体、支原体、立克次氏体、细菌和病毒及微生物群落的研究应用推广很快, 对超微藻类、原生动物和原生菌类研究报道也比较多。

4.1 真菌研究

有些真菌可以食用或药用, 有些则直接危害动植物和人类健康。

李秋实等^[41]用 FCM 测出了灵芝基因组大小, 结合高通量测序技术, 首次得到了全基因组测序数据。不仅为食用菌遗传学研究打下基础, 也为分子辅助育种和栽培技术创新提供了科学基础。

FCM 可以快速对酵母群体进行纯度测定^[42], 区分突变型酵母和野生型酵母^[43]。多维 FCM 还可以对扩散和非扩散状态的酵母细胞动力学进行研究^[44]。随着酵母表面展示技术的出现, 通过 FCM 检测酵母细胞进行蛋白质工程研究越来越常见, FCM 不仅可以检测酵母细胞表面蛋白质表达状况, 还可以对其进行进一步检测和分离。在抗原研究上, 其应用更为广泛^[45]。当抗体库被显示在酵母细胞上之后, FCM 可以检测抗体变异后的属性。这一技术在 HIV 外膜糖蛋白上的应用大大促进了新的疫苗免疫原的研究^[46]。

霉菌细胞呈长丝状体, 易堵塞流式细胞仪液流系统, 检测较困难, 故 FCM 对霉菌细胞的研究多检测其孢子体。柴阿丽等^[47]采用 FDA-PI 双荧光复染法通过 FCM 检测了茄病镰刀菌样本孢子的死亡率, 并与孢子萌发法检测结果比较, 结果两者检测一致, 而 FCM 检测的时间则大幅度缩减。

FCM 还能用于霉菌次生代谢物霉菌毒素的毒性作用机理研究。Föllmann 等^[48]通过分析细胞凋亡情况研究了霉菌毒素橘霉素及其次生代谢产物的毒性。姜交龙等^[49]为了使用 FCM 研究内生真菌 Y18 代谢物对大肠杆菌细胞膜和细胞蛋白质的影响, 制备了杜仲抑菌内生真菌 Y18 代谢物溶液并将培养好的大肠杆菌液加入到其中培养, 然后用 PI 对大肠杆菌染色后用 FCM 检测, 发现 Y18 代谢物破坏了细胞膜的完整性。

4.2 支原体、衣原体和立克次体研究

支原体、衣原体和立克次体均能引发动植物和人类的某些疾病,甚至能导致人畜死亡。FCM 能够对于这类原核生物感染的初期尚不表现临床症状时进行早期检测。通过染色处理,FCM 很容易对这些原核生物细胞的种类、数量、结构识别和定量,FCM 用于对这些原核生物的致病机理的研究也多有报道。杜海霞等^[50]通过 FCM 检测了黏附猪肺炎支原体的数目,从而反映出猪肺炎支原体黏附因子 P216 表达蛋白的黏附活性。高利萍等^[51]利用 FCM 对鸡毒支原体 S6 株 P25 蛋白粘附特性进行了研究。

4.3 细菌研究

4.3.1 药敏试验和抗生素后效应检测 药敏检测和异质性研究是 FCM 在病原微生物检测领域的首要应用方面,另外,FCM 也常用于抗生素后效应(APE)的检测。付亮等^[52]同时用 NCCLS 推荐的确证试验和 FCM 两种方法进行两种药物的敏感性检测,结果发现,FCM 与传统方法检测结果具有一致性,更客观、快速且便于自动化。李伟毅等^[53]通过 FCM 对红霉素毒性及后效应检测结果表明,红霉素对非高效降解菌 GY2B 产生的后效应明显,诱发菌株 GY2B 启动 DNA 修复机制,细胞 DNA 含量变化显著。

4.3.2 细菌数量及种类分析 FCM 可以快速精确地标记出各种动植物内生细菌^[54]、病原细菌^[55]和生物防护细菌^[56]等不同菌种的类型,测算其数量^[57],区分死菌和活菌^[58],检测细菌细胞结构,测定生存能力^[59]等。Füchslin 等^[60]发现了一种通过 FCM 在水样中快速检测嗜肺军团杆菌的方法。Moragues 等^[61]通过 FCM 对小林姬鼠(*Apodemus sylvaticus*)和小鼠(*Mus musculus*)的肠道菌群进行了 G⁺快速计数和亚群检测。Abzazou 等^[62]利用 FCM 对延时曝气活性污泥中的细菌细胞总数进行了评估,Trigui 等^[63]对 Sfax 盐场的异养原核生物进行了分析。

相对于常规方法,FCM 无需增菌培养就能对动植物细菌直接进行检测,所以可以检测活的非可培养状态(Viable but non-culture, VBNC)细菌,更适合用于复杂环境、复杂基质中的微生物群落的研究。

4.3.3 筛选细菌突变株 FCM 在筛选细菌诱导突变株、研究细菌致病和细菌防护的机理方面具有明显优势。Hytönen 等^[64]利用 FCM 分析了脓链球菌的突变株。沈新迁等^[56]以水稻叶面附生菌短小芽孢杆菌 DX01 菌株为对象,通过构建 Tn5 转座载体将带有绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)

表达标签的 T-DNA 导入 DX01 基因组中实现胞内转座突变;再将 EGFP 基因通过 Tn5 转座突变随机插入到 DX01 菌株基因组上,获得了遗传稳定的 GFP 标记突变株;采用 FCM 检测结合荧光显微镜观察对 1 467 株 Tn5-*egfp* 随机插入突变株的 GFP 表达定量分析,最终获得 8 株荧光表达较强的突变株,为揭示短小芽孢杆菌的抑菌机制奠定了一定基础。Putrinš 等^[65]通过 FCM 证明了 ColRS 信号系统和 TtgABC 泵参与调节了恶臭假单胞菌(*P. putida*)的苯酚耐受性。

4.3.4 筛选展示抗体 为筛选猪圆环病毒 II 型(Porcine circovirus type 2, PCV2)抗原优势区域,徐文娟等^[66]将缺少 N 端核定位信号的 Cap 蛋白基因分成 7 个连续重叠的 DNA 片段分别克隆于细菌展示载体 APEx 中,IPTG 诱导重组蛋白片段表达于细菌内膜外侧制备成原生质球,经兔抗 PCV2b Cap 蛋白抗体和羊抗兔 IgG-FITC 孵育后,用 FCM 检测得到各片段和抗 PCV2 Cap 蛋白多克隆抗体的结合能力,快速筛选了 PCV2b Cap 蛋白上的抗原表位以及优势抗原区域。

FCM 检测体积较小的细菌的生化特性虽然存在一定的困难^[67],但随着结合染料技术的发展,核酸染色可以使单个细胞获得明亮的荧光,这一问题也得到了在一定程度上解决^[68]。

4.4 病毒检测

4.4.1 检测病毒物理性质 FCM 能够有效地区分病毒的数量、大小和类型等。马丽丽等^[69]利用荧光染料 SYBR Green I 对病毒核酸物质染色,结合 FCM 对饮用水和污水水样病毒含量进行了检测比较,实现了水样病毒含量的快速测定。

4.4.2 检测病毒的感染效率 李田田等^[70]利用逆转录病毒载体感染原代巨噬细胞探索逆转录病毒载体感染规律时,为精确定量逆转录病毒的感染效率,通过 FCM 检测了巨噬细胞中绿色荧光蛋白(GFP)阳性率,分选得到巨噬细胞中的 GFP 阳性细胞,精确测算了逆转录病毒的感染效率,研究了巨噬细胞感染逆转录病毒对细胞免疫应答的影响。Joedicke 等^[71]进行了逆转录病毒感染期间 T 细胞表型和激活状态的研究。

4.4.3 计算病毒滴度 通过检测病毒抗原确定受感染阳性细胞的数量计算病毒滴度,已广泛用于传染性胰脏坏死病毒^[72]、狂犬病毒^[73]等的病毒滴度测定。王津津等^[74]用 FCM 检测了感染后不同时间点、不同病毒接种量的受感染阳性细胞数,进而计算出病毒滴度,建立了 FCM 快速检测鲤春病毒血症病

毒滴度的方法。

5 结语

目前,FCM在农业领域的动植物和微生物中的应用已从细胞计数、细胞周期分析和流式核型分析等发展到染色体分选、染色体文库构建^[75]和表面展示技术等。生态农业和农产品加工、有机食品工业的快速发展都得益于FCM的快速检测和分析功能^[76]。虽然FCM在农业领域的应用落后于医学领域,但随着新荧光材料、荧光标记技术的进步,特别是生物芯片技术与FCM有机结合的流式细胞术液相芯片技术几乎可以检测任何分子相互作用^[77]。流式细胞仪功能不断完善、新型荧光染料开发及单克隆抗体技术的发展等,必将促进FCM在农业领域的应用不断拓宽、加深。

参考文献:

- [1] 贾永蕊. 流式细胞术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2009: 4-29.
- [2] Centre of Plant Structural and Functional Genomics of the Institute of Experimental Botany As Cr .Flow cytometry [EB/OL] <http://olomouc.ueb.cas.cz/book/export/html/18>
- [3] 赵玲玲. 动物种群性比失调及其影响因素[J]. 畜牧与饲料科学, 2014, 35(5): 80-81.
- [4] 宋林, 徐辉, 王扎根, 等. 流式细胞仪分离奶牛精子性控效果的试验研究[J]. 现代农业科技, 2011(10): 322-323.
- [5] 王秀琴, 马吉峰, 王建东, 等. 奶牛 X 性别控制冻精对 F₂ 代生长发育的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2015(2): 32-32.
- [6] 李忠秋, 刘春龙, 孙金艳, 等. 冷应激对东北野猪成纤维细胞周期和凋亡的影响[J]. 东北农业大学学报, 2015, 46(6): 73-78.
- [7] 刘晓霞, 马海梅, 朱明, 等. 细粒棘球蚴 egG1Y162 疫苗对小鼠免疫应答的研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2013, 29(3): 226-231.
- [8] 孙佩龙, 马明妍, 巴彩凤. 感染猪附红细胞体小鼠 CD58、CD59、CD2 分子的相关性分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2016, 11(1): 13-16.
- [9] 张昆丽, 谢芝勋, 黄莉, 等. 禽呼肠病毒感染对 SPF 鸡外周血 T 细胞亚型变化和细胞因子转录的影响[J]. 动物医学进展, 2015, 36 (1): 1-4.
- [10] 张柳, 冯霞, 靳野, 等. 猪免疫口蹄疫灭活疫苗后外周血细胞亚群变化的研究[J]. 中国畜牧兽医, 2016, 43(4): 1012-1016.
- [11] 付朋飞, 潘鑫龙, 乔涵, 等. 表达猪细小病毒 VP2 蛋白的重组猪伪狂犬病毒在小鼠体内的免疫反应[J]. 病毒学报, 2016, 32(2): 195-202.
- [12] 任超, 刘贤勇, 崔丽. 禽 TCR 谱系分析的研究进展[J]. 天津农学院学报, 2014, 21(3): 44-48.
- [13] 关心, 陆智祥, 杨同华. 肿瘤干细胞的生物学特性及其研究进展[J]. 生命科学, 2014, 26(2): 194-200.
- [14] 徐钢春, 殷文健, 顾若波, 等. 龙池鲫 DNA 含量、倍性分析及其形态学特征研究[J]. 淡水渔业, 2015, 45(3): 9-13.
- [15] 崔朝霞, 相建海, 周岭华. 中华绒螯蟹四倍体诱导研究[J]. 高技术通讯, 2002, 12(12): 97-102.
- [16] 丁君, 常亚青, 邢荣莲, 等. 九孔鲍不同器官 DNA 相对含量与细胞周期的分析[J]. 大连海洋大学学报, 2003, 18(3): 200-203.
- [17] GOEDKEN M, DE GUISE S. Flow cytometry as a tool to quantify oyster defence mechanisms[J]. Fish Shellfish Immun, 2004, 16(4): 539-552.
- [18] TU C Y, HUNG S W, TSOU L T, et al. Simultaneous flow cytometric assessment for cellular types and phagocytic abilities of the haemocytes of the hard clam, *Meretrix lusoria*[J]. Fish Shellfish Immun, 2007, 23(1): 16-23.
- [19] 陈思杰, 张贺飞, 张翠珍, 等. 荧光激活细胞分选转基因标记斑马鱼神经元[J]. 生物技术通报, 2013, 32(11): 112-116.
- [20] 林峰, 吴林根, 徐莉, 等. 流式细胞术在植物细胞检测中的主要问题及对策[J]. 实验室科学, 2015, 18(2): 66-68.
- [21] LOUREIRO J, TRÁVNÍČEK P, RAUCHOVÁ J, et al. The use of flow cytometry in the biosystematics, ecology and population biology of homoploid plants[J]. Preslia, 2010, 82(1): 3-21.
- [22] GALBRAITH D W, HARKINS K R, MADDOX J M, et al. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues[J]. Science, 1983, 220(4601): 1049-1051.
- [23] GALBRAITH D W, LAMBERT G M, MACAS J, et al. Analysis of nuclear DNA content and ploidy in higher plants[J]. Curr Protoc Cytom, 2001, 7(6): 1-22.
- [24] HARE E E, JOHNSTON J S. Genome size determination using flow cytometry of propidium iodide-stained nuclei[J]. Methods Mol Biol, 2011, 772: 460-488.
- [25] 丁鸿, 邱东萍, 陈少雄. 植物染色体标本的制备和染色体核型分析研究进展[J]. 南方农业学报, 2012, 43(12): 1958-1962.
- [26] 何婷, 郭桂梅, 陆瑞菊, 等. 大麦小孢子来源单倍体试管苗扩繁中的倍性检测[J]. 植物生理学报, 2015, 51 (12): 2270-2274.
- [27] 吴鹏昊, 任姣姣, 田小龙, 等. 玉米单倍体自然二倍化研究[J]. 中国农业大学学报, 2016, 21(1): 1-7.
- [28] 张志珂, 王永清, 林顺权, 等. 借助细胞流式仪进行枇杷基因组测序材料的倍性鉴定[J]. 果树学报, 2012, 29(3): 498-504.
- [29] 周历萍, 王淑珍, 阮松林, 等. 草莓流式细胞检测提取方法的优化[J]. 浙江农业学报, 2015, 27(11): 2024-2028.
- [30] 胡瑞阳, 段红静, 林华忠, 等. 杉木多倍体变异苗诱导及倍性鉴定[J]. 核农学报, 2016, 30(8): 1491-1497.
- [31] 田新民, 周香艳, 弓娜. 流式细胞术在植物学研究中的应用—检测植物核 DNA 含量和倍性水平[J]. 中国农学通报, 2011, 27(9): 21-27.
- [32] YAMAZAKI D, YOSHIDA S, ASAMI T, et al. Visualiza-

- tion of abscisic acid-perception sites on the plasma membrane of stomatal guard cells[J]. *Plant J*, 2003, 35(1): 129-139.
- [33] 赵宁, 冯建灿, 叶霞, 等. 枣组织培养及相关生物技术研究进展[J]. *果树学报*, 2015, 32(6): 1241-1252.
- [34] 付春华, 郭文武, 邓秀新. 用流式细胞仪和 RAPD 快速鉴定柑橘体细胞杂种[J]. *华中科技大学学报(自然科学版)*, 2005, 33(10): 102-105.
- [35] 刘继红, 徐小勇, 邓秀新. 柑橘体细胞杂种及其核质遗传研究进展[J]. *农业生物技术学报*, 2004, 12(3): 237-246.
- [36] 刘新星, 霍转转, 云慧, 等. 流式细胞术在细菌快速检测中的应用[J]. *微生物学通报*, 2014, 41(1): 161-168.
- [37] 焦旭雯, 赵树进. 流式细胞术在高等植物研究中的应用[J]. *热带亚热带植物学报*, 2006, 14(4): 354-358.
- [38] 汪琛颖. 流式细胞术测定银叶真蕨(*Bryum argenteum* Hedw.) 基因组大小[J]. *分子植物育种*, 2016, 14(4): 858-863.
- [39] TRÁVNÍČEK P, PONERT J, URFUS T, et al. Challenges of flow-cytometric estimation of nuclear genome size in orchids, a plant group with both whole-genome and progressively partial endoreplication[J]. *Cytom Part A*, 2015, 87(10): 958-966.
- [40] KRON P. Endopolyploidy, genome size, and flow cytometry[J]. *Cytom Part A*, 2015, 87(10): 887-889.
- [41] 李秋实, 徐江, 朱英杰, 等. 基于流式细胞技术的灵芝基因组大小估测[J]. *菌物学报*, 2013, 32(5): 899-906.
- [42] HUTTER K J, EIPEL H E, HETTWER H. Rapid determination of the purity of yeast cultures by flow cytometry[J]. *Appl Microbiol Biot*, 1978, 5(2): 109-112.
- [43] SKOWRONEK P, KRUMMECK G, HAFERKAMP O, et al. Flow cytometry as a tool to discriminate respiratory-competent and respiratory-deficient yeast cells[J]. *Curr Genet*, 1990, 18(3): 265-267.
- [44] MÜLLER S, HUTTER K J, BLEY T, et al. Dynamics of yeast cell states during proliferation and non proliferation periods in a brewing reactor monitored by multidimensional flow cytometry[J]. *Bioproc Biosyst Eng*, 1997, 17(5): 287-293.
- [45] FELDHAUS M, SIEGEL R. Flow cytometric screening of yeast surface display libraries[J]. *Methods Mol Biol*, 2004, 263: 311-332.
- [46] GRIMM S, ACKERMAN M. Yeast surface display of HIV Env protein variants for the discovery of novel vaccine immunogens[J]. *Retrovirology*, 2012, 9(S2): P326.
- [47] 柴阿丽, 韩云, 武军, 等. 基于 FDA-PI 双荧光复染法的茄病镰刀菌孢子活性检测[J]. *中国农业科学*, 2015, 48(14): 2757-2766.
- [48] FÖLLMANN W, BEHM C, DEGEN G H. Toxicity of the mycotoxin citrinin and its metabolite dihydrocitrinone and of mixtures of citrinin and ochratoxin A in vitro[J]. *Arch Toxicol*, 2014, 88(5): 1097-1107.
- [49] 姜交龙, 张涛, 江波, 等. 杜仲内生真菌代谢产物对大肠杆菌的作用机理研究[J]. *食品工业科技*, 2012, 33(23): 110-113.
- [50] 杜海霞, 刘茂军, 冯志新, 等. 猪肺炎支原体 P216 基因片段的表达及黏附活性研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2012, 43(8): 1324-1329.
- [51] 高利萍, 李媛, 周长平, 等. 鸡毒支原体 S6 株 P25 蛋白粘附特性的研究[J]. *中国预防兽医学报*, 2016, 38(2): 105-110.
- [52] 付亮, 龙军, 袁小澎. 流式细胞术快速检测产超广谱 β -内酰胺酶细菌的研究[J]. *广东医学*, 2011, 32(4): 416-418.
- [53] 李祎毅, 杨琛, 郭楚玲, 等. 红霉素对菲降解菌 GY2B 的毒性及抗生素后效应[J]. *环境工程学报*, 2014, 8(3): 1221-1228.
- [54] 徐亚军. 植物内生菌资源多样性研究进展[J]. *广东农业科学*, 2011, 38(24): 149-152.
- [55] 刘学敏, 孟玉芹. 植物病原细菌检测和细菌病害诊断方法[J]. *菌物研究*, 2009, 7(3/4): 211-217.
- [56] 沈新迁, 刘通, 胡晓璐, 等. 短小芽孢杆菌转座突变株的 GFP 标记及在水稻上的定殖[J]. *中国农业科学*, 2012, 45(24): 5024-5031.
- [57] HAMMES F, EGLI T. Cytometric methods for measuring bacteria in water: advantages, pitfalls and applications[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 397(3): 1083-1095.
- [58] KRAMER M, OBERMAJER N, MATIJAŠIĆ B B, et al. Quantification of live and dead probiotic bacteria in lyophilised product by real-time PCR and by flow cytometry[J]. *Appl Microbiol Biot*, 2009, 84(6): 1137-1147.
- [59] CHITARRA L G, VAN DEN BULK R W. The application of flow cytometry and fluorescent probe technology for detection and assessment of viability of plant pathogenic bacteria[J]. *Eur J Plant Pathol*, 2003, 109(5): 407-417.
- [60] FÜCHSLIN H P, KÖTZSCH S, KESERUE H A, et al. Rapid and quantitative detection of *Legionella pneumophila* applying immunomagnetic separation and flow cytometry[J]. *Cytom Part A*, 2010, 77(3): 264-274.
- [61] MORAGUES M, COMAS-RIU J, VIVES-REGO J. Rapid G^+ count and subpopulation assessment of the intestinal bacteria in *Apodemus sylvaticus* and *Mus musculus* by flow cytometry[J]. *Folia Microbiol*, 2004, 49(5): 587-590.
- [62] ABZAZOU T, SALVADÓ H, BRUGUERA-CASAMADA C, et al. Assessment of total bacterial cells in extended aeration activated sludge plants using flow cytometry as a microbial monitoring tool[J]. *Environ Sci Pollut R*, 2015, 22(15): 11446-11455.
- [63] TRIGUI H, MASMOUDI S, BROCHIER-ARMANET C, et al. Characterization of heterotrophic prokaryote subgroups in the Sfax coastal solar salterns by combining flow cytometry cell sorting and phylogenetic analysis[J]. *Extremophiles*, 2011, 15(3): 347-358.
- [64] HYTÖNEN J, HAATAJA S, FINNE J. Use of flow cytometry for the adhesion analysis of *Streptococcus pyogenes* mutant strains to epithelial cells: investigation of the possible role of surface pullulanase and cysteine protease, and the transcriptional regulator Rgg[J]. *Bmc Microbiol*, 2006, 6(1): 18.
- [65] PUTRINŠ M, ILVES H, LILJE L, et al. The impact of ColRS two-component system and TtgABC efflux pump on phenol tolerance of *Pseudomonas putida* becomes evi-

- dent only in growing bacteria[J]. *Bmc Microbiol*, 2010, 10(1): 110.
- [66] 徐文娟, 张瑛杰, 李青青, 等. 利用细菌展示技术系统地筛选猪圆环病毒 2 型衣壳蛋白的线性抗原区域[J]. *中国预防兽医学报*, 2016, 38(5): 398-402.
- [67] WU L, WANG S, SONG Y, et al. Applications and challenges for single-bacteria analysis by flow cytometry[J]. *Sci China Chem*, 2015, 59(1): 30-39.
- [68] CZECHOWSKA K, JOHNSON D R, VAN DER MEER J R. Use of flow cytometric methods for single-cell analysis in environmental microbiology[J]. *Curr Opin Microbiol*, 2008, 11(3): 205-212.
- [69] 马丽丽, 冯伟, 毛冠男, 等. 基于流式细胞法的各水处理工艺病毒含量变化评价[J]. *安全与环境学报*, 2013, 13(1): 19-22.
- [70] 李田田, 何丽, 石磊, 等. 逆转录病毒感染小鼠原代巨噬细胞的方法[J]. *安徽农业大学学报*, 2016, 43(4): 551-556.
- [71] JOEDICKE J J, DIETZE K K, ZELINSKY G, et al. The phenotype and activation status of regulatory T cells during Friend retrovirus infection[J]. *Virol Sin*, 2014, 29(1): 48-60.
- [72] RØNNESETH A, PETTERSEN E F, WERGELAND H I. Flow cytometry assay for intracellular detection of Infectious Pancreatic Necrosis virus (IPNV) in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) leucocytes[J]. *Fish Shellfish Immun*, 2012, 33(6): 1292-1302.
- [73] BORDIGNON J, FERREIRA S C P, CAPORALE G M M, et al. Flow cytometry assay for intracellular rabies virus detection[J]. *J Virol Methods*, 2002, 105(1): 181-186.
- [74] 王津津, 贾鹏, 史秀杰, 等. 流式细胞仪在快速测定鲤春病毒血症病毒滴度中的应用[J]. *中国动物检疫*, 2015, 32(9): 82-86.
- [75] JANDA J, ŠAFÁŘ J, KUBALÁKOVÁ M, et al. Advanced resources for plant genomics: a BAC library specific for the short arm of wheat chromosome 1B[J]. *Plant J*, 2006, 47(6): 977-986.
- [76] 张强. 农业仪器的研究与应用现状[J]. *农业工程*, 2012, 2(2): 40-45.
- [77] 张鑫, 赵鹏翔, 吕宝北, 等. 悬浮芯片系统的结构组成及应用进展[J]. *北京工业大学学报*, 2015, 41(12): 1810-1816.