

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2018.06.034

快速高通量测定三角褐指藻油脂含量

曹素娟, 柳科欢, 任玲萱, 侯兴国, 卿人韦, 兰利琼

(四川大学生命科学学院, 成都 610064)

摘要: 为了实现三角褐指藻细胞内油脂含量的快速高通量测定, 探索了尼罗红荧光染色法检测其油脂含量的检测条件. 采用96孔板并配合酶标仪考察三角褐指藻的预处理液的种类及其用量、染色液尼罗红的用量、染色温度、染色时间以及细胞浓度对荧光强度的影响, 确立最优染色条件, 并研究荧光强度与油脂含量之间的对应关系. 结果表明, TritonX-100终浓度为0.05%时, 通透效果最佳, 每100 μL 藻悬液中加3 μL 尼罗红染液(0.1 mg/mL), 温度40 $^{\circ}\text{C}$, 时间10 min, 细胞浓度低于 3×10^6 个/mL时, 荧光强度(y)与油脂含量(x)之间呈现良好的线性关系: $y = 927.37x + 15.913$, $R^2 = 0.9247$. 方法优化后, 90 min 即内可完成对96个样品的处理及分析, 极大提高了分析的通量.

关键词: 三角褐指藻; 高通量; 油脂含量; 尼罗红; 荧光染色

中图分类号: Q945 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2018)06-1331-06

Rapid determination of oil content in *Phaeodactylum tricornutum* by high-throughput method

CAO Su-Juan, LIU Ke-Huan, REN Ling-Xuan, HOU Xing-Guo, QING Ren-Wei, LAN Li-Qiong
(College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: In order to achieve the rapid high-throughput determination of intracellular lipid content of *phaeodactylum tricornutum*, the detection conditions were investigated by Nile red fluorescence staining. To establish the optimal dyeing conditions, the 96-well-plates and microplate reader were used to examine the various pretreatment solutions and their usage, the amount of Nile red, the dyeing temperature, time, and the effect of cell concentration on fluorescence intensity. And the relationship between fluorescence intensity and oil content was further investigated. The results showed that the optimal conditions for detection were as follows: the final concentration of TritonX-100 at 0.05%, 3 μL of Nile red dye solution (0.1 mg/mL) to 100 μL of algal suspension, temperature 40 $^{\circ}\text{C}$ and the time 10 min. There was a good linear relationship between the fluorescence intensity (y) and the oil content (x) of the algal cells in the range of 3×10^6 cells/mL, $y = 927.37x + 15.913$, $R^2 = 0.9247$. After optimization of the method, 96 samples can be processed and analyzed within 90 minutes, greatly improving the throughput of the analysis.

Keywords: *Phaeodactylum tricornutum*; High-throughput; Lipid content; Nile red; Fluorescence staining

收稿日期: 2017-11-02

基金项目: 国家自然科学基金(40976092); 四川省科技厅基金项目(2014JY0171)

作者简介: 曹素娟(1991-), 女, 山西晋中人, 硕士, 研究方向为微藻能源的开发利用. E-mail: 871405262@qq.com

通讯作者: 兰利琼. E-mail: lanlq@scu.edu.cn.

1 引言

近年来,由于化石燃料资源的日益枯竭,人类亟需找到替代品. 海洋微藻由于来源广泛、环境友好、可再生等优点吸引了越来越多人的关注. 目前生物柴油的来源主要有大豆、棕榈种子、菜籽油以及动物脂肪等^[1-3],但是这些仍然不能满足当前经济发展对生物柴油的需求,而且还存在与粮食作物竞争耕地的问题. 微藻具有生长周期短、可再生、不与粮食作物竞争耕地、生产的生物柴油绿色环保等特征,因此,利用微藻生产生物柴油日益受到关注. 尽管一些微藻如原始小球藻^[4]、鞘藻属^[5]、雨生红球藻^[6]、杜氏盐藻^[7]等可以高效地生产优质生物柴油. 但是微藻种类仍然非常有限. 如何从大量的微藻中快速高通量筛选出油脂含量高的藻种仍是一个亟需解决的问题. 目前,对油脂的定量测定主要采用的方法有 Bligh-Dyer 法^[8],简化重量法^[9],香草醛比色法^[10]等,这些方法均需要提前将藻液离心冻干、反复萃取、旋转蒸发等,不仅需要的藻量较大,过程繁琐耗时,并且提取过程中所用的有机溶剂对人体有很大的危害性. 为了解决上述问题,实现油脂含量的快速高通量测定,本研究利用 96 孔板作为反应器并配合荧光染料、酶标仪测定,90 min 内即可完成对 96 个样品的分析测定工作,极大地提高了分析的效率.

尼罗红(9-diethylamino-5H-benzo[a]phenoxazine-5-one)是一种脂溶性的疏水性染料,能够与细胞内的脂类物质结合,在特定的激发波长下发射出橘黄色的荧光,因此常被用于哺乳动物、细菌、酵母、藻类等的油脂定量分析^[11-13]. 经尼罗红染色的微藻细胞的荧光强度与细胞内油脂含量显著相关. 在定量分析中,尼罗红进入细胞与脂类结合以后,荧光强度的检测可以利用荧光分光光度计^[13]、酶标仪^[14]、流式细胞仪^[15]等仪器. 采用酶标仪检测经尼罗红染色后细胞的荧光强度的方法,具有灵敏度高、操作流程简单、所需要的样品量少、一次可检测的多个样品等特点,利于产油微藻的快速筛选. 目前尼罗红染色富油微藻面临的主要问题是有些微藻细胞壁较厚,细胞通透性较差,油脂定量不准确. 通常可以采用物理方法如微波^[16]、超声波^[17]、化学方法如二甲基亚砷^[14]或者 TritonX-100 等处理细胞,从而改善细胞的通透性.

三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornerutum*)是一种海洋硅藻,属于硅藻门,羽纹纲,褐指藻目,褐

指藻科,褐指藻属^[18],是海洋硅藻研究的模式藻种. 三角褐指藻在对数生长期结束后开始积累油脂,油脂积累量可占细胞干重的 20%~30%,应用前景非常广阔. 本文以三角褐指藻为研究对象,采用尼罗红荧光染色法,酶标仪检测,系统地优化染色条件,包括检测波长、预处理液的种类及其用量、尼罗红用量、细胞浓度、染色温度、染色时间、尼罗红用量等条件的优化,为微藻油脂的快速检测提供参考方法.

2 材料与方 法

2.1 材 料

三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornerutum*),编号为 MACC/B288,来自中国海洋大学藻种质库.

尼罗红(Nile red),购自索莱宝公司;丙酮、二甲基亚砷(DMSO)、TritonX-100、甲醇、乙醇、异丙醇等均为分析纯.

2.2 方 法

2.2.1 尼罗红母液的配制 取一定量的固体尼罗红溶于丙酮中,质量浓度为 0.1 mg/mL,2~8 ℃避光保存.

2.2.2 磷酸缓冲液(PBS)配方(pH 7.4) 称取 NaCl 8 g, KCl 0.2 g, Na₂HPO₄ 3.5814 g, KH₂PO₄ 0.272 g,溶于 900 mL 蒸馏水中,用 1 M 的盐酸调 pH 至 7.4,定容至 1 L,高压灭菌自然冷却后备用.

2.2.3 藻种培养 三角褐指藻采用常规方法培养,即高压灭菌的 f/2 培养基,培养温度(21±1) ℃,光照强度 2500 lx,光暗比为 12:12(h:h),接种浓度(1.5~3.0)×10⁵个/mL,每日摇动 3~4 次,并且随机调动三角瓶的位置使光照均匀,培养至对数生长期结束后开始取样.

2.2.4 三角褐指藻生长曲线 从接种日开始,于 0~10 d,取三角瓶中细胞,进行细胞计数(B204LEDR 生物显微镜),绘制三角褐指藻生长曲线图.

2.2.5 荧光光谱测定方法 取 96 孔板(WHBA-96 孔板),在同一孔中依次加入 80 μL 藻液、20 μL DMSO、2 μL 尼罗红溶液,40 ℃避光染色 10 min,采用全波长酶标仪检测(Thermo varioskans flash 全波长酶标仪),设置激发波长的范围为 450~560 nm,发射波波长范围为 510~720 nm. 根据荧光光谱的扫描结果来确定最大激发波长和发射波长.

2.2.6 染色条件的探索 结合 Chen^[14]等的方法和本实验室的研究经验,初始的染色条件为:取 96 孔板,每孔分别加入用水、PBS、甲醇、乙醇、异丙

醇、丙酮、DMSO、0.1%的 TritonX-100 处理的三角褐指藻悬液 100 μL ,除对照组为水,试验组采用浓度均为 20%的透性化试剂^[20, 21],即各透性化试剂与藻液体积比为 20:80。此外,为排除干扰,不加藻液的背景荧光值也分别测定。按每 100 μL 处理液加 2 μL 尼罗红母液,每个处理 3 个重复,40 $^{\circ}\text{C}$ 避光染色 10 min,经酶标仪测定,实验结果为 3 个重复的平均值。采用单因素变量法,分别对每个参数进行优化。

2.2.7 油脂含量的测定方法 油脂的提取采用溶剂浸提法,取适量对数生长期结束后的三角褐指藻,分别稀释成 0.5×10^6 、 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 个/mL,分别取 50 mL 低温离心收集藻细胞,75 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥至恒重,将干燥的藻细胞移至研钵内充分研磨,然后将粉转至 4.5 mL 离心管内,并向离心管内加入 2 mL 石油醚:乙醚(2:1)进行抽提,在漩涡混匀器上振荡混匀,25 $^{\circ}\text{C}$ 浸提 5~10 h,每 30 min 振荡混匀一次,加入 1 mL 10%的 KOH 溶液,振荡混匀,离心取上清至另一已称重的 4.5 mL 离心管中,旋转真空干燥仪中 55 $^{\circ}\text{C}$ 烘干称重。

2.2.8 数据处理方法 所有测试都重复三次,数据统计分析采用 SPSS17.0 进行,采用均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm \text{SD}$)为表示方法,不同样品之间的差异采用单因素方差分析进行比较,以 $P < 0.05$ 为有显著性。

3 结果与分析

3.1 三角褐指藻生长

三角褐指藻在第 5 d 之前,后一天藻数目是前一天的约 2 倍,这是由于培养基中营养充足,藻的长势最佳(图 1)。第 0 d 到第 1 d 由于藻种在新环境中需要一个适应期,所以几乎不会生长(藻数目由 0.27×10^6 个/mL 上升至 0.31×10^6 个/mL),第 1 d 至第 2 d(藻数目由 0.31×10^6 个/mL 上升至 0.6×10^6 个/mL,接近 2 倍增加),第 2 d 至第 3 d(藻数目由 0.6×10^6 个/mL 上升至 1.6×10^6 个/mL 同样接近 2 倍),直到第 5 d 至第 6 d(藻数目由 5.67×10^6 个/mL 上升至 7.12×10^6 个/mL,增幅较小),往后几天藻数目增幅越来越小,第 5 d 之后由于营养逐渐缺乏造成藻的生长速率变慢,对数生长期结束,后续实验样本采用接种第 5 d 后的藻。

3.2 三角褐指藻尼罗红染色油脂的荧光光谱确定 对尼罗红染色后的三角褐指藻进行荧光光谱

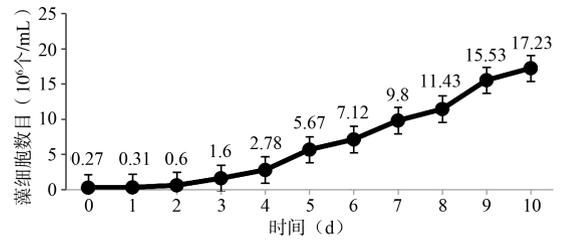


图 1 三角褐指藻生长曲线

Fig. 1 The growth curve of *Phaeodactylum tri-cornutum*

扫描,获得荧光光谱扫描图。结果显示,尼罗红染色后的油脂最大激发波长为 526 nm(图 2),最大发射波长为 597 nm(图 3)。尼罗红荧光染色法的最佳激发波长范围是 450~550 nm,而最佳发射波长范围是 540~605 nm^[19];而 Ren^[20]等的研究表明尼罗红染色法的最佳激发和发射波长分别为 530 nm 和 568 nm;Siegler *et al*^[21]的结果表明最适波长为 527 nm 和 590 nm。本文扫描波长的结果和前人的研究结果一致,这说明方法是可靠的。

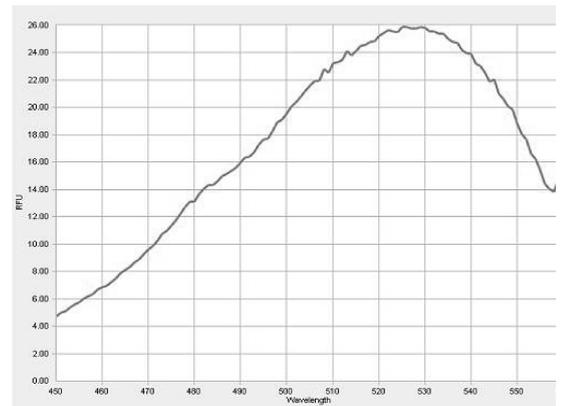


图 2 最大激发波长扫描图谱图

Fig. 2 Maximum excitation wavelength scanning map

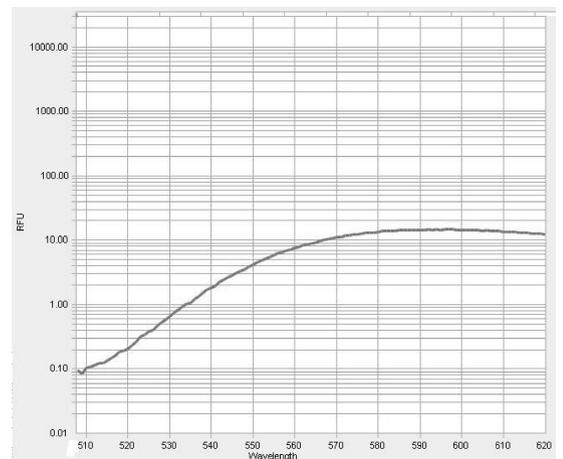


图 3 最大发射波长扫描图谱

Fig. 3 Maximum emission wavelength scanning map

3.3 染色条件的优化

3.3.1 不同有机溶剂预处理对染色的影响 实验在藻细胞浓度为 5×10^6 个/mL、 $2 \mu\text{L}$ 尼罗红母液、

40°C 避光染色 10 min 条件下考察体积分数为 20% 的不同有机溶剂预处理对荧光强度的影响, 结果见图 4a.

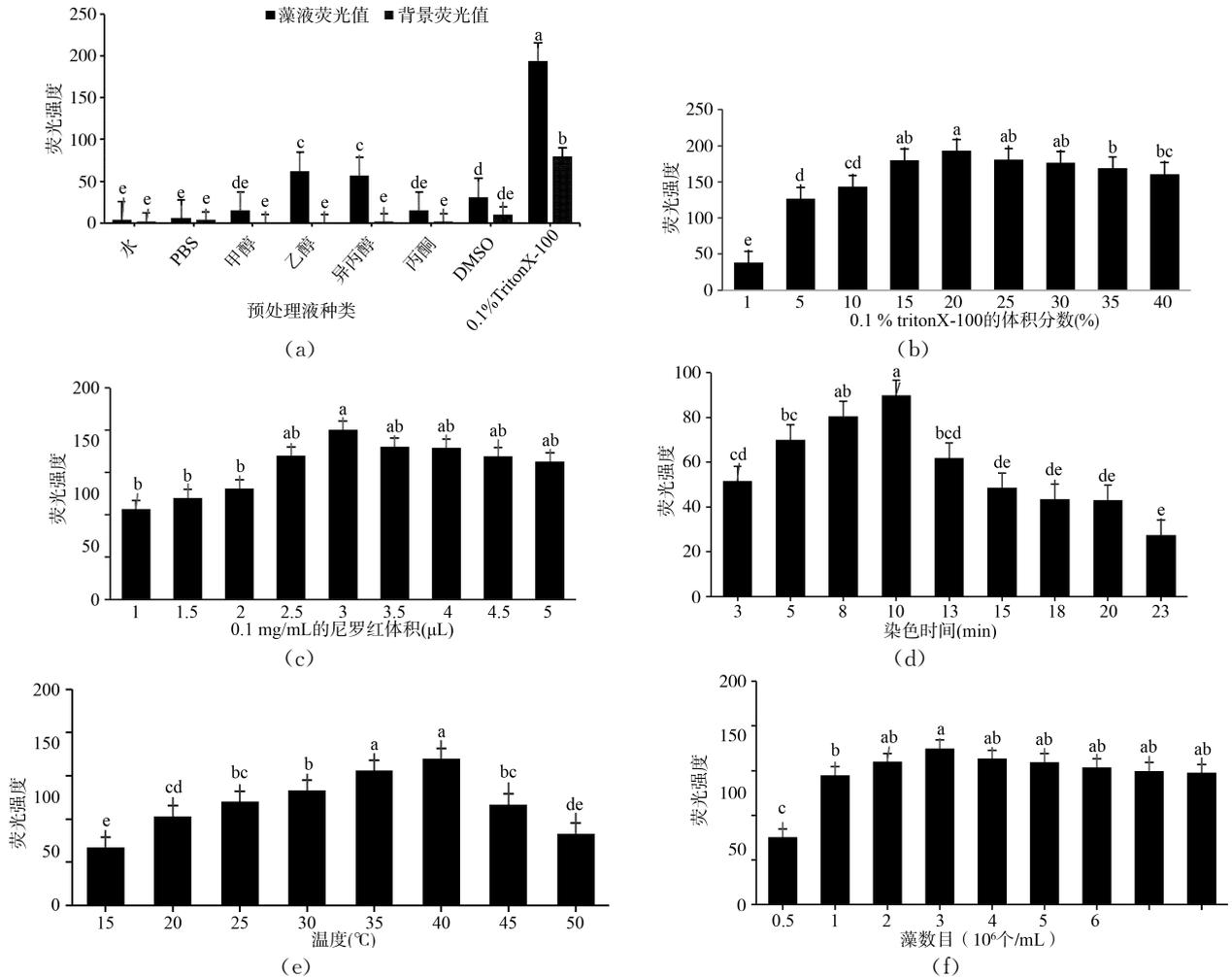


图 4 三角褐指藻尼罗红染色法条件优化

(a)注:对照组为水,试验组采用浓度均为 20%,不同字母表示差异显著($P < 0.05$);(b)~(f)注:不同字母表示差异显著($P < 0.05$);不同字母表示差异显著($P < 0.05$)

Fig. 4 Optimization of Nile red dyeing method for *Phaeodactylum tricornutum*
Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$)

以水为对照,体积在藻液中占比均为 20% 的不同透化试剂处理,检测荧光强度. 由图 4a 可知,与水和 PBS 相比,甲醇、丙酮处理的藻细胞荧光强度增加不明显,乙醇、异丙醇和 DMSO 处理的藻细胞荧光强度增加较明显,而荧光强度增加最明显的是 0.1% TritonX-100 处理过的藻细胞. 因此选择 20% 的 TritonX-100(质量分数 0.1%)作为藻细胞预处理液.

3.3.2 0.1% 的 TritonX-100 体积分数对染色的影响 实验在藻细胞浓度为 5×10^6 个/mL、 $2 \mu\text{L}$ 尼罗红母液、 40°C 避光染色 10 min 条件下考察不同体积分数 0.1% TritonX-100 对荧光强度的影响,

结果见图 4b.

结果显示,0.1% TritonX-100 体积分数从 1% ~ 20%,荧光强度依次升高,20% 达到最大值(图 4b). 低浓度的预处理液渗透性弱,因此在一定浓度范围内,随着预处理液浓度增大荧光强度也增大;20% ~ 40% 范围内,由于较高浓度的 TritonX-100 会对藻细胞产生毒性,因此荧光强度逐渐降低. 整体而言,20% 的荧光强度最大,1% 的最小. 因此,0.1% TritonX-100 最适体积分数为 20%.

3.3.3 不同浓度尼罗红对染色的影响 实验在藻细胞浓度为 5×10^6 个/mL、0.1% TritonX-100 体积分数为 20%, 40°C 避光染色 10 min 条件下考察

不同体积尼罗红母液对荧光强度的影响,结果见图4c.

结果显示,0.1 mg/mL 尼罗红丙酮溶液体积为0.5~3 μL 时,荧光强度依次增大,3 μL 时达到最大值,当尼罗红丙酮溶液体积超过3 μL 时,由于高浓度尼罗红对藻细胞有一定的毒害性,荧光强度逐渐变小(图4c).因此,优选尼罗红用量3 μL 为最适用量.

3.3.4 染色时间对染色的影响 实验在藻细胞浓度为 5×10^6 个/mL、3 μL 尼罗红母液、0.1% TritonX-100体积分数为20%,40 $^{\circ}\text{C}$ 避光染色10 min条件下考察不同染色时间对荧光强度的影响,结果见图4d.

由图4d可知,当染色时间为3~10 min时,荧光强度依次增大,10 min时荧光强度达到最大;10~30 min,而随着时间的增加荧光逐渐淬灭,荧光值逐渐变小.因此,仍优选10 min为最佳染色时间.

3.3.5 不同染色温度对荧光强度的影响 实验在藻细胞浓度为 5×10^6 个/mL、3 μL 尼罗红母液、0.1% TritonX-100体积分数为20%,40 $^{\circ}\text{C}$ 避光染色10 min条件下考察不同染色温度对荧光强度的影响,结果见图4e.

由图4e可知,当染色温度在20~40 $^{\circ}\text{C}$ 时,荧光强度逐渐变大,40 $^{\circ}\text{C}$ 时荧光强度达到最大,当染色温度为40~60 $^{\circ}\text{C}$ 时,由于高温影响了藻细胞活性,荧光值变小.因此,后续实验仍选40 $^{\circ}\text{C}$ 时为最佳染色温度.

3.3.6 不同浓度藻细胞对荧光强度的影响 实验在藻细胞浓度为 5×10^6 个/mL、3 μL 尼罗红母液、0.1% TritonX-100体积分数为20%,40 $^{\circ}\text{C}$ 避光染色10 min条件下考察不同藻细胞浓度对荧光强度的影响,结果见图4f.

由图4f可知,当藻细洗吧胞个数为 $1 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$ 个/mL时,荧光强度逐渐增大,当藻密度为 3×10^6 个/mL时,荧光强度达到最大,当藻密度大于 3×10^6 个/mL时,由于藻互相遮盖,造成染色不均匀,荧光强度逐渐降低.因此,优选藻密度为 3×10^6 个/mL时为最佳藻细胞浓度.

3.4 藻液油脂含量与荧光强度的相关性分析

为了建立三角褐指藻的油脂含量与荧光强度之间的相关关系,分别采用上述优选的尼罗红染色法和溶剂浸提法,测定了在藻细胞浓度不同、藻液体积相同的条件下藻的荧光强度和油脂含量,对荧光强度(y)和油脂含量(x)之间进行回归分析,结果

见图5.

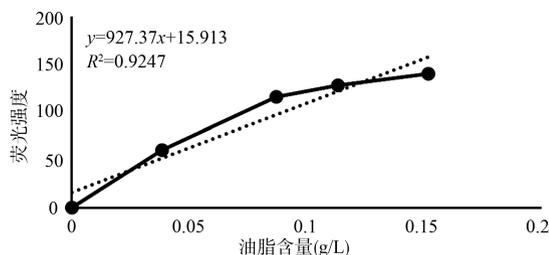


图5 藻液油脂含量与荧光强度的相关性分析

Fig. 5 Correlative analysis of oil content and fluorescence intensity of algae

由图5可以看出,当荧光强度为0~140,细胞浓度为 0.5×10^6 、 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 个/mL时,其相关性较好,回归方程为 $y = 927.37x + 15.913$, $R^2 = 0.9247$,说明其相关性较好.因此,可以利用尼罗红染色法快速检测三角褐指藻内油脂的含量.

4 讨论

尼罗红染色法为测定微藻细胞内油脂含量提供了一种便捷的方法,该方法最大的优势是高通量.但是由于藻细胞外面的一层厚而坚硬的细胞壁,为油脂含量的测定带来了困扰,不经透性化试剂处理可能会导致油脂定量误差.并且其他染色条件也影响检测效果,如染液浓度、藻细胞浓度、染色时间和温度等,因此优化各种染色条件对建立一种快速准确高效的方法具有重要价值.经过透性化试剂处理,三角褐指藻荧光值在处理前后有了较大改变,其中其中20%体积比的TritonX-100(质量分数0.1%)的处理效果最佳.推测透性化试剂,尤其是TritonX-100,改变了三角褐指藻细胞壁和细胞膜的通透性,提高了尼罗红对油脂的染色效果.对其他影响如染液浓度、藻细胞浓度、染色时间和温度也进行了优化,极大地提高了染色灵敏度和准确度.

综上,本研究采用96孔板高通量方法,尼罗红荧光染色,酶标仪快速检测,对染色条件进行了优化,建立了一种准确、快速高效、高通量的尼罗红荧光染色检测三角褐指藻油脂含量的方法,为进一步三角褐指藻的研究打下良好的基础,为其他微藻油脂的快速检测提供了参考方法.

参考文献:

- [1] Felizardo P, Correia M J, Raposo I, *et al.* Production of biodiesel from waste frying oils[J]. Waste Manag, 2006, 26: 487.

- [2] And M G K, Dalai A K. Waste cooking oil an economical source for biodiesel: a review [J]. *Ind Eng Chem Res*, 2006, 45: 2901.
- [3] Song D, Fu J, Shi D. Exploitation of oil-bearing microalgae for biodiesel [J]. *J Biotechnol*, 2008, 24: 341.
- [4] Miao X, Wu Q. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil [J]. *Bioresour Technol*, 2006, 97: 841.
- [5] Sharif Hossain A B M, Salleh A, Boyce A N, *et al.* Biodiesel fuel production from algae as renewable energy [J]. *Prep Biochem Biotech*, 2008, 49: 250.
- [6] Razon L F, Tan R R. Net energy analysis of the production of biodiesel and biogas from the microalgae: *Haematococcus pluvialis*, and *Nannochloropsis* [J]. *Applied Energy*, 2011, 88: 3507.
- [7] Tang H, Abunasser N, Garcia M E D, *et al.* Potential of microalgae oil from *Dunaliella tertiolecta* as a feedstock for biodiesel [J]. *Applied Energy*, 2011, 88: 3324.
- [8] Bligh E G, Dyer W J. A rapid method of total lipid extraction and purification [J]. *Can J Biochem Physiol*, 1959, 37: 911.
- [9] 丛峰, 孙雪, 徐年军. 几种小球藻油脂含量检测方法的比较及优化[J]. *宁波大学学报: 理工版*, 2012, 25: 20.
- [10] Ahlgren G, Merino L. Lipid analysis of freshwater microalgae: a method study [J]. *Arch Hydrobiol*, 1991, 121: 295.
- [11] Genicot G, Leroy J L, Soom A V, *et al.* The use of a fluorescent dye, Nile red, to evaluate the lipid content of single mammalian oocytes [J]. *Theriogenology*, 2005, 63: 1181.
- [12] Kimura K, Yamaoka M, Kamisaka Y. Rapid estimation of lipids in oleaginous fungi and yeasts using Nile red fluorescence [J]. *J Microbiol Methods*, 2004, 56: 331.
- [13] Bertozzini E, Galluzzi L, Penna A, *et al.* Application of the standard addition method for the absolute quantification of neutral lipids in microalgae using Nile red [J]. *J Microbiol Methods*, 2011, 87: 17.
- [14] Chen W, Zhang C, Song L, *et al.* A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae [J]. *J Microbiol Methods*, 2009, 77: 41.
- [15] Silva T L D, Santos C A, Reis A. Multi-parameter flow cytometry as a tool to monitor heterotrophic microalgal batch fermentations for oil production towards biodiesel [J]. *Biotechnol Bioproc E*, 2009, 14: 330.
- [16] Chen W, Sommerfeld M, Hu Q, *et al.* Microwave-assisted Nile red method for *in vitro* quantification of neutral lipids in microalgae [J]. *Bioresour Technol*, 2011, 102: 135.
- [17] 刘新颖, 汪志平, 于金鑫, 等. 布朗葡萄藻脂质含量的荧光光谱检测方法的改进[J]. *生物工程学报*, 2013, 29: 382.
- [18] 郭婷, 代易颖, 陈孔翔, 等. 同源重组敲除三角褐指藻基因的研究[J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2017, 54: 173.
- [19] Alemánava G S, Cuellarbermudez S P, Cuaresma M, *et al.* How to use Nile Red, a selective fluorescent stain for microalgal neutral lipids [J]. *J Microbiol Methods*, 2016, 128: 74.
- [20] Ren H Y, Liu B F, Kong F, *et al.* Improved Nile red staining of *Scenedesmus* sp. by combining ultrasonic treatment and three-dimensional excitation emission matrix fluorescence spectroscopy [J]. *Algal Res*, 2015, 7: 11.
- [21] Siegler H D L H, Ayidzoe W, Ben-Zvi A, *et al.* Improving the reliability of fluorescence-based neutral lipid content measurements in microalgal cultures [J]. *Algal Res*, 2012, 1: 176.

引用本文格式:

中文: 曹素娟, 柳科欢, 任玲莹, 等. 快速高通量测定三角褐指藻油脂含量[J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2018, 55: 1331.

英文: Cao S J, Liu K H, Ren L X, *et al.* Rapid determination of oil content in *Phaeodacylum tricorutum* by high-throughput method [J]. *J Sichuan Univ: Nat Sci Ed*, 2018, 55: 1331.