海洋微藻中脂质体含量的流式检测

Flow Cytometric Determination of Lipid Content in Marine Microalgae

钟春莲^{1, #}, 卢余盛^{1, #}, 贾力^{1, 2, *}, 陈建明^{1, *}

¹ 海洋药物研发中心, 海洋研究院, 闽江学院, 福州, 福建; ² 福建省肿瘤转移药物干预重点实验室, 化学学院, 福州大学, 福州, 福建

*通讯作者邮箱: jiali@fzu.edu.cn; chenjm@mju.edu.cn

#共同第一作者/同等贡献

引用格式: 钟春莲, 卢余盛, 贾力, 陈建明. (2019). 海洋微藻中脂质体含量的流式检测. *Bio-101* e1010350. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010350.

How to cite: Zhong, C. L., Lu, Y. S., Jia, L. and Chen, J. M. (2019). Flow Cytometric Determination of Lipid Content in Marine Microalgae. *Bio-101* e1010350. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010350. (in Chinese)

摘要: 微藻脂质体, 俗称微藻油, 其中富油微藻可作为一种新型的生物柴油来源, 对其有效的开发和利用可缓解全球石油供缺问题。本文采用尼罗红 (NR) 染料对微藻中油脂染色, 通过流式细胞仪检测荧光强度, 从而快速、准确的测定微藻中脂质体含量, 筛选富含脂质体的微藻, 即富油微藻。

关键词: 微藻脂质体, 尼罗红, 流式细胞术

材料与试剂

1. 70 μ m 细胞过滤器 (Beyogold, catalog number: FSTR040)
2. 流式管 (BD Falcon, catalog number: BD 352054)
3. 斜生栅藻 (*Scenedesmus obliquus*, JNU20)
4. 尼罗红 (Solarbio, catalog number: N8440)
5. PBS (pH = 7.2~7.4, Solarbio, catalog number: P1020)
6. DMSO (Solarbio, catalog number: D8370)
7. 硝酸钠
8. 磷酸氢二钾
9. 七水硫酸镁

10. 二水氯化钙
11. 柠檬酸
12. 柠檬酸铁铵
13. EDTA 二钠
14. 碳酸钠
15. 硼酸
16. 四水氯化锰
17. 七水硫酸锌
18. 二水钼酸钠
19. 五水硫酸铜
20. 六水硝酸钴
21. 盐酸
22. 氯仿
23. 尼罗红试剂 (见溶液配方)
24. BG-11 培养基 (见溶液配方)
25. 1,000× 微量元素 (见溶液配方)

仪器设备

1. 柱光生物反应器 ($\varphi 3\text{cm} \times 30\text{cm}$, 玻璃材质)
2. 微波炉 (美的, model: M1-211A)
3. 高压灭菌锅 (德国爱安姆高压灭菌器, model: L65)
4. 流式细胞仪 (美国 BD 公司, model: FACS AriaIII)
5. 低速离心机 (中科中佳科学仪器公司, model: LX-200)
6. 小型低温高速离心机 (德国 Eppendorf 公司, model: 5424R)
7. $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱 (中国海尔集团, model: DW-86L388)

实验步骤

1. 以斜生栅藻 (*Scenedesmus obliquus*, JNU20) 为实验样品, 培养于含 0.5 g/L NaNO_3 的 BG-11 基础培养基中 (张等, 2012)。

2. 取对数生长期 (增殖最快) 的微藻接种于柱光生物反应器中, 1% CO₂, 23 °C, 300 μmol photons/m²·s 持续光照 24 h (da Silva, Santos 等, 2009b)。
3. 取 2.5 ml 微藻液, 约含 2 × 10⁶ 微藻细胞, 微波炉预处理 40 s, 加入 1% 的二甲基亚砜 (DMSO), 75 μl 50 μg/ml NR (终浓度为 1.5 μg/ml), 40 °C 避光染色 5 min (da Silva, Reis 等, 2009a; Santos 等, 2010)。
4. 300 × g 室温离心 5 min, 弃上清。
5. 于微藻细胞沉淀中加入 4 ml PBS, 用移液枪吹打混匀, 300 × g 室温离心 5 min, 弃上清。
6. 用 2 ml PBS 将微藻细胞沉淀重悬, 洗涤, 300 × g 室温离心 5 min, 小心去除上清, 收集细胞沉淀。
7. 重复步骤 6, 将多余的荧光染料去除, 预留 200 μl 液体, 经 70 μm 滤膜过滤后流式细胞仪检测。
8. 在流式细胞仪上, 先用未染色的微藻细胞悬液设置检测参数 (NR 的激发波长 543 nm, 发射波长 598 nm, 荧光信号位于 FL3 通道), 调节阴性区域。上机检测至少获取 1 × 10⁵ 的阳性细胞做后续数据分析。

结果与分析

Montero 等通过 NR 对微藻 *T. suecica* 中油脂染色, 实现分选油脂含量高的微藻群。如图 1 所示, 野生型微藻 *T. suecica* 其油脂含量较低, 通过 NR 荧光强度显示, 利用 NR 荧光强度进行分选, 经第一次分选后, 油脂含量高的 *T. suecica* 的比例增多, 分选后的微藻继续培养至第 28 天再经第二次分选, 得到的大部分微藻中都含有大量油脂。散点图和直方图都显示经分选后微藻 *T. suecica* 中油脂的含量 (Montero 等, 2011)。

图 1. 通过尼罗红 NR 对微藻 *T. suecica* 中油脂染色, 筛选富含高油脂的微藻群体. 取 2.5 ml 微藻液, 经微波处理, NR 染色, 流式分选高油脂含量的微藻群. 横坐标代表 NR 荧光强度, 纵坐标代表微藻自发叶绿素荧光强度; 上图为散点图, 下图为直方图显示 NR 荧光强度 (Montero 等, 2011)。

失败经验

1. DMSO 浓度大于 5% 易导致荧光猝灭, 1% 的比例能促进染料的染色效果。
2. 染色温度不宜过高, 过高导致荧光猝灭。

溶液配方

1. 尼罗红试剂

取适量尼罗红粉末溶于甲醇溶液中, 配成 50 $\mu\text{g/ml}$ 的储存液

2. BG-11 培养基 (张等, 2012)

取硝酸钠 (0.5 g)、磷酸氢二钾 (0.04 g)、七水硫酸镁 (0.075 g)、二水氯化钙 (0.036 g)、柠檬酸 (0.006 g)、柠檬酸铁铵 (0.006 g)、EDTA 二钠 (0.001 g)、碳酸钠 (0.02 g) 溶解于 1 L 去离子水, 加入 1 ml 1,000 $\times$ 微量元素溶液

调节 pH 至 7.5, 121 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 15 min, 灭菌后 pH 约为 7.1, 室温下储存

3. 1,000 $\times$ 微量元素

取硼酸 (2.86 g)、四水氯化锰 (1.81 g)、七水硫酸锌 (0.222 g)、二水钼酸钠 (0.39 g)、五水硫酸铜 (0.079 g)、六水硝酸钴 (0.0494 g) 按照顺序逐一溶于 1 L 去离子水中, 用 1 mol/L 盐酸调节 pH 至 7.2

121 °C 灭菌 15 min, 冷却后加入几滴氯仿, 于室温下储存

致谢

本工作的顺利开展得益于国家自然科学基金项目 (资助号: 81703555, 81773063, U1505225 和 81273548)、国家重点基础研究发展计划 (973 计划) 项目 (资助号: 2015CB931804)、中国大洋专项课题 (资助号: DY135-2-13)、福建省科技厅平台项目 (资助号: 2018N2001)、教育厅平台项目和中国博士后科学基金 (资助号: 2017M620268) 的经费支持。

参考文献

1. 张敬键, 吕雪娟, 李爱芬, 万凌琳, 吴洪, 尹顺吉, 张成武. (2012). [微藻细胞油脂含量的快速检测方法](#). 中国生物工程杂志, 32(1): 64-72.
2. da Silva, T. L., Reis, A., Medeiros, R., Oliveira, A. C. and Gouveia, L. (2009a). [Oil production towards biofuel from autotrophic microalgae semicontinuous cultivations monitorized by flow cytometry](#). *Appl Biochem Biotechnol* 159(2): 568-578.
3. da Silva, T. L., Santos, C. A. and Reis, A. (2009b) [Multi-parameter flow cytometry as a tool to monitor heterotrophic microalgal batch fermentations for oil production towards biodiesel](#). *Biotechnol Bioproc* 14:330.
4. Montero, M. F., Aristizábal, M. and Reina, G. G. (2011). [Isolation of high-lipid content strains of the marine microalga *Tetraselmis suecica* for biodiesel production by flow cytometry and single-cell sorting](#). *J Appl Phycol* 23(6): 1053-1057.
5. Santos, C. A., Ferreira, M. E., da Silva, T. L., Gouveia, L., Novais, J. M. and Reis, A. (2011). [A symbiotic gas exchange between bioreactors enhances microalgal biomass and lipid productivities: taking advantage of complementary nutritional modes](#). *J Ind Microbiol Biotechnol* 38(8): 909-917.