

小硅藻光合作用脂¹³C 稳定同位素定量标记分析

宗春光¹ 李 双^{1,2} 徐继林^{*1} 李艳荣¹ 钟莺莺²
俞雪钧² 周成旭¹ 严小军¹

¹(宁波大学应用海洋生物技术教育部重点实验室, 宁波 315211) ²(宁波市出入境检验检疫局, 宁波 315000)

摘 要 以小硅藻(*Nitzschia closterium* f. *minutissima*) 作为研究对象, 利用超高压液相色谱联用四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱技术, 研究了处于平台期的小硅藻中的光合作用脂被¹³C 标记的程度和速度。结果显示: 在平台期¹³C 人工标记的 10 天内, 所有 4 类光合作用脂均被¹³C 明显标记, 其中二酰甘油双半乳糖脂(DG-DG)、磷脂酰甘油(PG)、二酰甘油硫代糖脂(SQDG)被¹³C 标记的总量, 从刚进入平台期到平台期第 8 天逐渐增加, 此后出现下降趋势, 在第 8 天分别达到最大值(173 ± 24) ng/mg, (473 ± 41) ng/mg 及(1224 ± 21) ng/mg, 标记率分别达到 56.3%, 38.4% 和 62.6%; 而二酰甘油单半乳糖脂(MGDG)被¹³C 标记的总量在整个平台期呈现持续上升趋势, 并在第 10 天达到(956 ± 51) ng/mg, 标记率为 87.3%。可见, 不同脂质在藻体内合成的先后时间有差别, 为了清晰地了解生物摄食过程中对微藻中特定脂类的同化机理, 需要藻体内被¹³C 标记的每类脂质含量的最大化, 针对 DGDG、PG、SQDG, 应选取标记了 8 天的微藻来投喂生物, 而针对 MGDG, 则应选取标记了 10 天的微藻投喂生物。

关键词 小硅藻; ¹³C 稳定同位素; 静电场轨道阱高分辨质谱; 定量标记

1 引 言

微藻作为海洋生态系统的初级生产者, 在海洋生物圈的能量流动和物质循环中发挥着极其重要的作用^[1]。有些微藻营养丰富, 富含多种不饱和脂肪酸如 EPA、DHA 等^[2,3], 许多研究表明微藻是许多养殖生物特别是养殖贝类的优质饵料^[4]。而微藻对养殖贝类的营养价值跟蛋白质、碳水化合物关系不大, 主要体现在其脂类组成上^[5]。与其它生物脂比较, 微藻叶绿体的类囊体膜上有独特的脂类成分, 其主要是单半乳糖甘油二酯(MGDG), 双半乳糖甘油二酯(DGDG), 硫代异鼠李糖甘油二酯(SQDG)和磷脂(PG), 这些统称为光合作用脂^[6]。研究表明, 不同微藻脂类组成不同, 从而对养殖生物可能表现出不同的营养价值^[7]。已有许多有关生物对微藻脂类的同化效果的研究报道^[4,8], 但这些研究大多是针对微藻中脂肪酸、甾醇组成, 有关生物对微藻中光合作用脂同化的研究报道还很少见。

对代谢途径研究, 同位素示踪被认为是最明晰的技术手段。早在上世纪 70 年代, 就有学者利用¹⁴C 放射性同位素示踪研究脂类物质在海洋桡足类中的代谢^[9]。而与放射性同位素相比, ¹³C 稳定同位素标记技术灵敏稳定, 可用于长时间的示踪实验, 又由于没有放射性同位素¹⁴C 辐射的损伤, 不会对所观测的过程带来扰动, 近年来, 该技术已经广泛应用于揭示物质在食物网中的循环路径和探究消费者之间的营养关系研究^[10-12], 但这些研究大多是通过同位素比例质谱检测生物体内标记物同位素总量的变化, 无法对特定脂类的同位素标记物进行跟踪监测。高分辨液相色谱-质谱联用技术则可以通过多级质谱手段分析每一类脂上的同位素标记特性, 近年来研究表明, 稳定同位素示踪结合高分辨液质技术可以跟踪生物体内相关脂类合成代谢的变化, 比如 Li 等^[13]在含有被¹³C 标记棕榈酸的细胞培养液中培养动物细胞, 通过静电场轨道阱高分辨质谱(Orbitrap-MS)技术探讨了动物细胞内磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酰肌醇(PI)和磷脂酰甘油(PG)等脂质分子之间的转化规律, 而 Elizabeth 等在缺氮条件下用无机¹³C 对微藻脂类标记, 通过高分辨质谱技术发现藻体内约 60% 的三酰甘油(TAG)是从头

2016-05-06 收稿; 2016-09-08 接受

本文系国家自然科学基金(No. 31172448); 教育部博士点基金优先发展领域项目(No. 20133305130001); 浙江自然科学基金项目(No. LY15C190004); 宁波市科技攻关项目(No. 2014C10005); 浙江海洋技术创新团队项目(No. 2012R10029); 宁波市海洋藻类技术创新团队项目(No. 2011B81007); 国家质检总局科研计划项目(No. 2015IK182)

* E-mail: xujilin@nbu.edu.cn

合成的而非藻体内其它成分转化而来,且磷脂酰胆碱(PC)的极性头部来自甜菜碱脂(DGTS)的转化^[14]。

因此,也可通过对微藻进行¹³C 稳定同位素标记后投喂生物的方法,跟踪生物对不同脂类的同化以探究生物体对微藻中不同光合作用脂的代谢机理,这就需要首先考察微藻中不同脂类被¹³C 稳定同位素标记的速度和程度。本实验以小硅藻(*Nitzschia closterium f. minutissima*)为研究对象,利用¹³C 稳定同位素和超高压液相色谱联用四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱技术,建立了小硅藻平台期光合作用脂被¹³C 稳定同位素人工标记方法,为探究生物对微藻脂类生物标记物的同化及对微藻体内脂质的富集提供了明晰的技术手段。

2 实验部分

2.1 仪器和试剂

UltiMate3000 超高压液相色谱分析系统, Q-Exactive 四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱仪, Hypersile Gold C₁₈ 色谱柱(100mm × 2.1 mm, 1.9 μm), Thermo Scientific Xcaliber 数据分析系统(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);超纯水系统(法国 Millipore 公司)。

稳定同位素内标(Glycerol 2-¹³C, 16:2-16:0) MGDG、(Glycerol 2-¹³C, 16:1-16:3) DGDG、(Glycerol 2-¹³C, 18:0-18:1) PG 和(Glycerol 2-¹³C, 16:0 ~ 18:1) SQDG(美国 Avanti Polar Lipids 公司);预实验中这 4 个脂质分子在小硅藻中均未检测到。甲酸(色谱纯,美国 Sigma-Aldrich 公司);NaH¹²CO₃ 和 NaH¹³CO₃ (¹³C 原子数分数 99%,美国 Sigma 公司);仪器外标校正液(美国 Sigma-Aldrich 公司);其它试剂均为色谱纯(美国 Tedia 公司)。

2.2 实验方法

小硅藻种由宁波大学海洋生物实验室藻种室提供,海水经过砂滤后经棉花粗滤,再用 0.45 μm 醋酸纤维滤膜过滤后加热煮沸灭菌,培养液采用 NMB₃ 培养液(KNO₃ 100 mg/L、KH₂PO₄ 10 mg/L、Fe-citrate · 5H₂O 3 mg/L、VB₁ 6 μg/L、VB₁₂ 0.05 μg/L)。初始接种量为 6 × 10⁵ cell/mL,培养温度为 (20 ± 2) °C,光照强度的范围为 3000 ~ 4000 Lux,光暗周期 12 h : 12 h,每天摇动 3 次;采用血球计数板每天计数,在硅藻生长进入平台期时,将藻液分装到 30 个 1000 mL 锥形瓶中,每瓶 600 mL 藻液,并分成 2 大组,每组 15 瓶。第一大组分 A, B, C, D, E 5 个小组,每组做个 3 平行;第二大组分 A₁, B₁, C₁, D₁, E₁ 5 个小组,每组做个 3 平行。因空气中含有¹²CO₂,为了提高¹³C 的标记效率,将每瓶分别充 N₂ 30 min,排净瓶内剩余¹²CO₂,然后,第一大组每瓶分别添加 0.6 g NaH¹³CO₃ (¹³C 原子数分数 99%,美国 Sigma 公司)进行¹³C 人工标记;第二大组每瓶分别添加 0.6 g NaH¹²CO₃ 作为对照组。藻液摇匀后,将所有的锥形瓶密封,为防止密封效果不佳,持续缓慢通入 N₂ 以维持瓶内低¹²CO₂ 环境。每隔 2 天收藻 1 次,第 1 次收 A 和 A₁ 组,第二次收 B 和 B₁ 组,以此类推,连续收藻 5 次,将收获的藻液在 5000 r/min 的条件下高速离心获取藻泥,并用超纯水洗 3 次以去除藻体表残留的 NaH¹³CO₃ 和 NaH¹²CO₃,藻样 -80 °C 条件下冷冻干燥后备用。然后称取 30 mg 藻粉,加入 1:1 氯仿/甲醇混合液(V/V)提取总脂,氮气吹干,离心过滤后用甲醇复溶后对总脂进行液相色谱-质谱分析。

2.3 LC-MS 分析

色谱条件:使用 UltiMate3000 液相色谱仪,通过 Hypersile Gold C₁₈ 色谱柱进行分离,柱温 45 °C。流动相 A 为甲醇-水(1:2, V/V),并添加 0.01% LiCl 作为助离子化电解质;流动相 B 为甲醇-异丙醇溶液(1:3, V/V),并添加 0.1% CHOOH 作为助离子化电解质。洗脱梯度为:0 ~ 3 min, 90% ~ 50% A; 3 ~ 10 min, 50% ~ 0% A; 10 ~ 20 min, 0% A; 20 ~ 20.1 min, 0% ~ 90% A; 20.1 ~ 25 min, 90% A。流速为 0.2 mL/min,进样量为 10 μL,样品进样分析前经 0.2 μm 滤膜过滤(美国 Millipore 公司)。

质谱条件:采用 Q-Exactive 四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱仪,全扫描正/负离子模式下(质量范围: *m/z* 100 ~ 1300) 调节分辨率为 50000,自动增益控制(AGC)目标值 10e⁶;采用加热电喷雾电离源(ESI),喷雾电压为 3200 V,离子传输管温度为 280 °C,鞘气压(N₂) 35 arb,辅助气压(N₂) 15 arb,气化室

温度 350℃; 串联二级质谱选择高能量碰撞, 碰撞电压 70 ~ 90 V 不等。仪器使用前用外标液进行校正, 在正离子模式下校正范围为 m/z 138 ~ 1822, 主要成分为 Caffeine、MRFA peptide (Met-Arg-Phe-Ala) 和 Ultramark 1621 (mixture, fluorinated phosphazines); 负离子模式下校正范围为 m/z 265 ~ 1880, 主要成分为 Sodium dodecyl sulfate、Sodium taurocholate 和 Ultramark 1621 (mixture, fluorinated phosphazines)。

2.4 数据处理和定量计算方法

通过 Thermo Scientific Xcaliber 软件进行数据分析, 在正/负离子模式下, 根据各种脂类在二级质谱 (MS/MS) 条件下的特征片段和保留时间进行定性分析。

通过计算 ^{13}C 标记的目标脂类与相应的内标峰面积的比值, 得到半定量结果 (ng/mg 藻粉)。然后通过加和形式得到每类脂的总标记量, 进而计算每类脂的标记率 (被 ^{13}C 标记上脂分子的量与总量之比)。

3 结果与讨论

3.1 细胞生长时期对小硅藻生物量的影响

细胞生长时期对小硅藻生物量的影响结果见图 1。由图 1 可见, 培养约 3 ~ 9 天属于对数期, 10 ~ 20 天属于平台期, 从 21 天开始进入衰败期。为了确保在平台期对细胞内的脂类进行 ^{13}C 标记, 本实验选取了第 10 天分别向实验组和对照组中添加含有 ^{13}C 和 ^{12}C 的 NaHCO_3 。

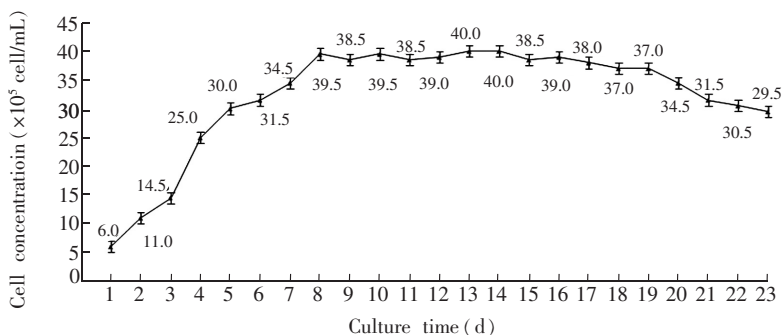


图 1 小硅藻生长曲线

Fig. 1 Growth curve of *Nitzschia closterium* f. *minutissima*

3.2 平台期被 ^{13}C 标记上的光合作用脂的定性与定量分析结果

3.2.1 平台期被 ^{13}C 标记上的光合作用脂的定性分析结果 大量研究表明^[15~17], 微藻在平台期由于 N 和 P 等营养盐缺乏, 将会有更多光合固定的碳进入脂中, 故选择此时加入含有 ^{13}C 的无机盐, 微藻会利用培养液中的 ^{13}C 和从头合成脂类, 从而实现对微藻中光合作用脂的 ^{13}C 稳定同位素标记。对平台期添加 ^{12}C 和 ^{13}C 两组样品分析发现: 被 ^{13}C 标记上的脂类与同种利用 ^{12}C 合成的脂类相比, 在相同的保留时间, 在一级质谱上会出现一簇同位素峰^[14]。从两组样品中都检测出了所有的四类光合作用脂, 即单半乳糖甘油二酯 (MGDG)、双半乳糖甘油二酯 (DGDG)、硫代异鼠李糖甘油二酯 (SQDG)、磷脂酰甘油 (PG) (表 1), 且这些脂均被 ^{13}C 明显标记 (图 2), 阴影部分代表被 ^{13}C 标记的结果。另外, 这 4 类极性脂在二级质谱谱图中均有各自的特征片段 (图 3)。

3.2.2 平台期被 ^{13}C 标记上光合作用脂的定量分析结果 参考已建立的脂类分析方法^[18~21], 由图 3 可知, 在正离子模式下, MGDG 的特征离子片段为 $[\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_6\text{Li}]^+$ 其精确离子 m/z 227. 1098, 其极性头部含有 9 个 C, 可能会有 1 ~ 9C 被 ^{13}C 标记上, 出现相应的特征片段 m/z 228. 1133, 229. 1148, 230. 1109, 231. 1139, 232. 1268, 233. 1299, 234. 1230, 235. 1367 和 236. 1401; 而 DGDG 的特征片段 $[\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_{11}\text{Li}]^+$, 且 $m/z=389. 1628$, 其极性头部有 15C, 可能有 1 ~ 15C 被 ^{13}C 标记, 出现相应的特征片段 m/z 390. 1670, 391. 1701, 392. 1745, 393. 1664, 394. 1695, 395. 1732, 396. 1769, 397. 1825, 398. 1854, 399. 1884, 400. 1941, 401. 1978, 402. 2008, 403. 2036 和 404. 2119。在负离子模式下, SQDG 的特征片段为 $[\text{C}_6\text{H}_9\text{O}_7\text{S}]^-$ 且 $m/z=225. 0065$, 极性头部的 6C, 可能会有 1 ~ 6C 被 ^{13}C 标记上, 出现相应的特征

表 1 硅藻中检测出的光合作用脂
Table 1 Photosynthesis lipids detected in diatom

Monogalactosyl diacylglycerol (MGDG) 脂肪酸链 (sn-1/sn-2) Fatty acid chain (sn-1/sn-2)	Digalactosyl diacylglycerol (DGDG) 脂肪酸链 (sn-1/sn-2) Fatty acid chain (sn-1/sn-2)	Sulfoquinovosyl diacylglycerol (SQDG) 脂肪酸链 (sn-1/sn-2) Fatty acid chain (sn-1/sn-2)	Phosphatidylglycerol (PG) 脂肪酸链 (sn-1/sn-2) Fatty acid chain (sn-1/sn-2)
16 : 3-16 : 3	20 : 5-16 : 2	16 : 3-16 : 2	16 : 1-16 : 0
16 : 3-16 : 2	16 : 2-16 : 1	14 : 0-14 : 1	18 : 1-18 : 1
20 : 5-16 : 3	16 : 1-16 : 1	14 : 0-14 : 0	20 : 5-16 : 1
14 : 0-20 : 5	20 : 5-16 : 1	14 : 0-16 : 2	20 : 5-16 : 0
16 : 2-16 : 2	16 : 1-16 : 0	14 : 0-20 : 5	22 : 6-16 : 1
20 : 5-16 : 2	16 : 2-16 : 2	16 : 1-16 : 1	
14 : 1-16 : 0	20 : 5-16 : 0	16 : 0-20 : 5	
16 : 2-16 : 1		16 : 0-16 : 1	
20 : 5-16 : 1		18 : 1-16 : 1	
14 : 0-16 : 1		18 : 1-18 : 0	
16 : 1-16 : 1		16 : 1-20 : 5	
20 : 5-16 : 0		16 : 1-20 : 4	
16 : 0-16 : 1		14 : 0-16 : 1	

注：添加¹²C 和添加¹³C 的两组硅藻样品中均检测到上述所有脂类 (All kinds of lipids above were detected in the two diatom samples added with ¹²C or ¹³C)

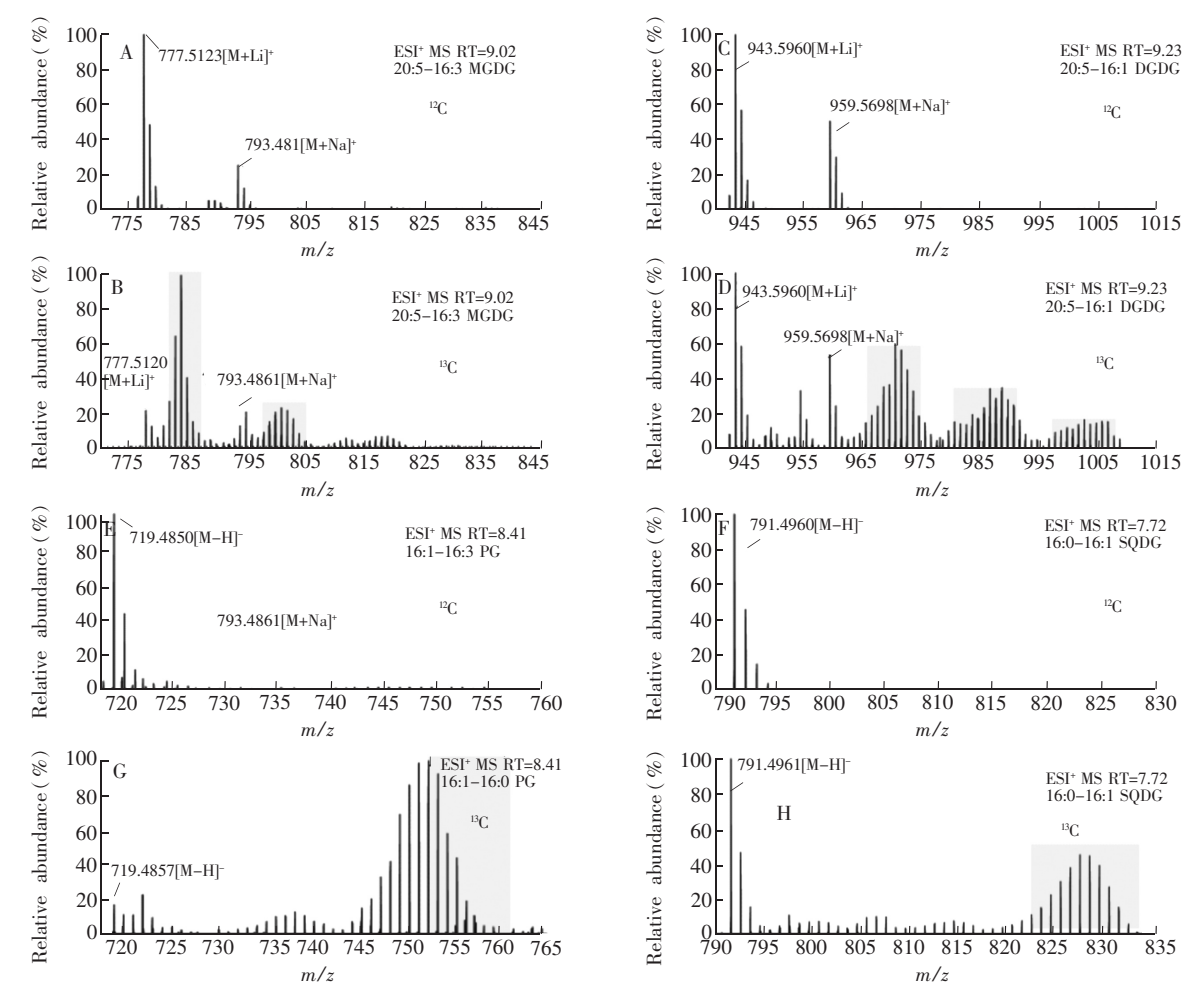


图 2 4 类光合作用脂被¹³C 稳定同位素标记的一级质谱图
Fig.2 First stage mass spectra of four photosynthesis lipids labeled with ¹³C stable isotope

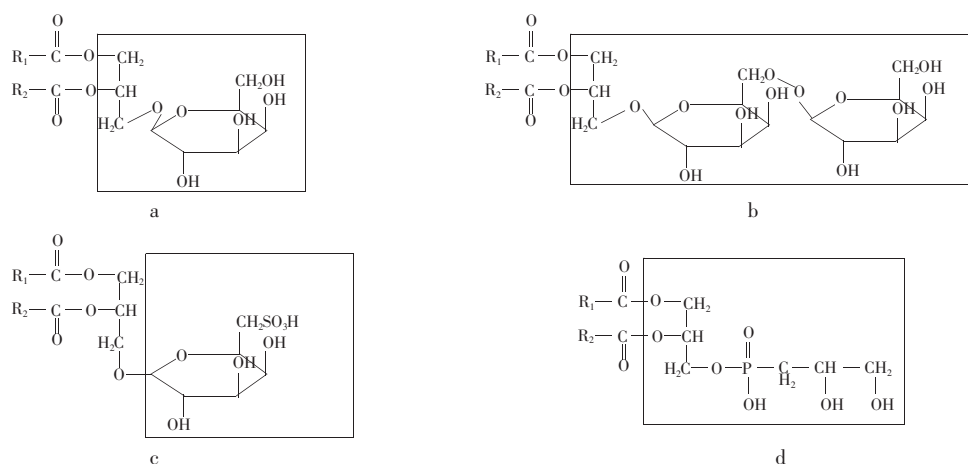


图 3 4 类脂的分子式及二级质谱下的特征片段

Fig. 3 Molecular formulas and characteristic fragments under tandem mass spectrometry of four lipids

a. Molecular formula of MGDG and its characteristic fragment, $[C_9H_{16}O_6Li]^+$, with a singly mass-to-charge ratio of 227.1098; b. Molecular formula of DGDG and its characteristic fragment, $[C_{15}H_{26}O_{11}Li]^+$, with a singly mass-to-charge ratio of 389.1628; c. Molecular formula of SQDG and its characteristic fragment, $[C_6H_9O_7S]^-$, with a singly mass-to-charge ratio of 225.0065; d. Molecular formula of PG and its characteristic fragment, $[C_3H_8O_6P]^-$ with a singly mass-to-charge ratio of 171.0056.

片段 m/z 226.0095, 227.0126, 228.0170, 229.0196, 230.0235 和 231.0267; PG 形成特征片段 $[C_3H_8O_6P]^-$ 且 $m/z=171.0056$, 极性头部含有 3C, 1~3C 可能被 ^{13}C 标记上, 出现相应的特征片段如 m/z 172.0089, 173.0124 和 174.0155。另外研究发现 MGDG, DGDG, SQDG 和 PG 的生物合成途径: 都是先合成二酰甘油骨架后, 在相应酶的作用下, 再将整个极性头部添加上去^[22~25]。故可以认为在这 4 类极性脂中, 脂肪酸链优先于极性头部从头合成。因此, 可以通过极性脂的特征片段, 对被 ^{13}C 明显标记上的各类 SQDG, PG, MGMG 和 DGDG 进行定量分析。

在各类脂类化合物中, 具有相同特征片段的物质非常多, 就需要对检测到的离子准确定性。由于仪器的分辨率高达 50000, 所以根据碎片离子的精确质量就可以获得该离子可能的元素组成, 再结合保留时间, 就可以确定同一保留时间的离子是否为质量数相差 1D 的同一种物质, 从而实现对 ^{13}C 同位素标记物的定量分析。以 16:0-16:1SQDG 为例(图 4), 在负离子模式下, 提取未标记样品的总离子流图(TIC)(图 4a), 并对保留时间 7.72 min、 m/z 791.4960(图 4b)的分子离子进行二级质谱分析(图 4c), 根据该物质产生的特征离子片段(m/z 225.0065)和中性丢失而产生的离子 $[M-H-R_1COOH]^-$ (m/z 537.2737)和 $[M-H-R_2COOH]^-$ (m/z 535.2731), 鉴定出该物质为 16:0~16:1SQDG, 再根据标记样品中的 TIC 图(图 5a)上对应的保留时间的质谱图(图 5b), 提出各被 ^{13}C 标记过的特征碎片的提取离子图(EIC)(图 6), 将 7 个峰面积相叠加即为标记组样品中合成的 16:0-16:1SQDG 量, 总量为 6.333×10^8 , 将提取离子 m/z 226.0095, 227.0126, 228.0170, 229.0196, 230.0235 和 231.0267 的 6 个峰面积相叠加就是被 ^{13}C 标记上 16:1~16:0 SQDG 的量, 总量为 2.703×10^8 , 基于此可计算出该脂的标记率约为 42.7%。

3.3 平台期光合作用脂对 ^{13}C 标记的程度和速度

利用上述的定量方法, 将检测出的各个被 ^{13}C 标记上的 SQDG 分子的量叠加, 即为 SQDG 被标记上的总量, 这样可很方便计算出不同培养期 SQDG 标记量的变化(图 7)。同样也可以计算出另外 3 类光合作用脂标记量的变化(图 7)。从图 7 可见, 在整个平台期 DGDG、PG、SQDG 被 ^{13}C 标记的总量呈现出先上升后下降的趋势, 并在第 8 天达到最大值, 其含量分别为 (173 ± 24) ng/mg 藻粉、 (473 ± 41) ng/mg 藻粉及 (1224 ± 21) ng/mg 藻粉; 而 MGDG 被 ^{13}C 标记上的总量, 随时间的延长呈持续上升趋势, 并在第 10 天达到了 (956 ± 51) ng/mg 藻粉。

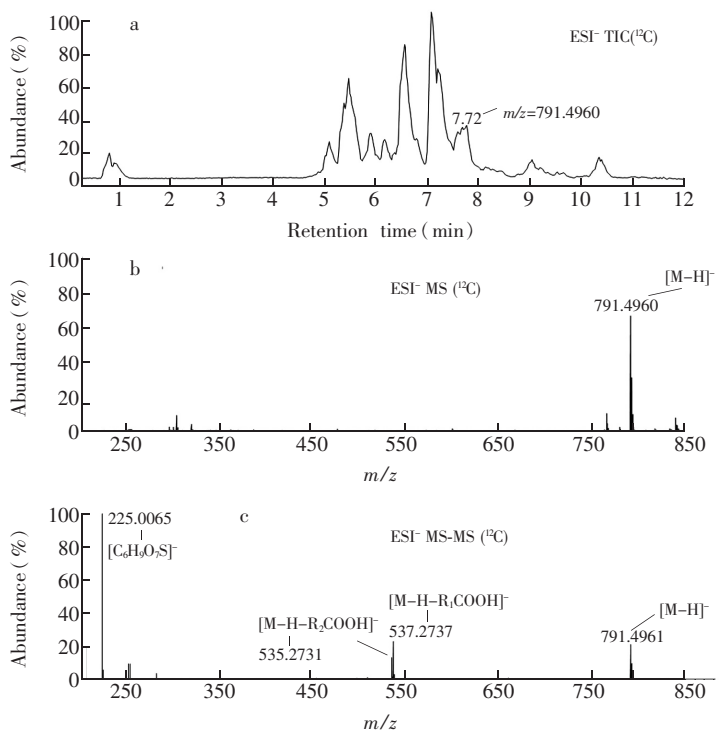


图 4 负离子模式下未标记样品中 16:0-16:1 SQDG 的鉴定结果
a, 总离子流图; b, RT=7.72, m/z 791.4960 的一级质谱图; c, m/z 791.4961 的二级质谱图。
Fig. 4 Identification result of 16:0-16:1 SQDG in negative ion mode of unlabeled sample
a, Total ion chromatogram; b, the first stage mass spectra of ion with m/z 791.4960 at 7.72 min;
c, the second stage mass spectra of ion with m/z 791.4961.

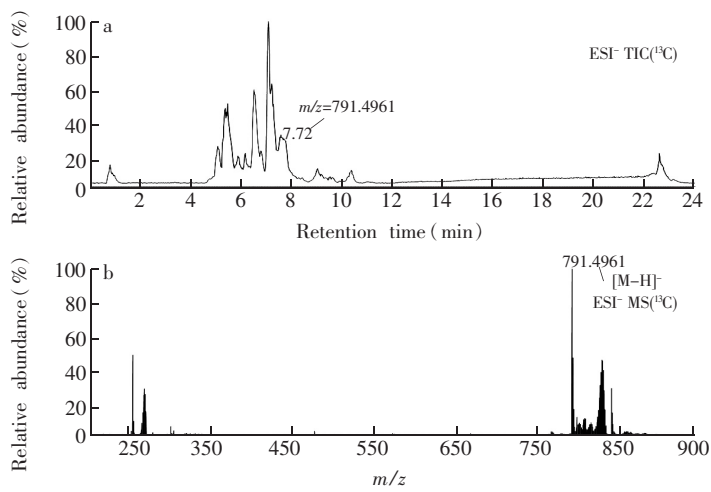


图 5 负离子模式下标记样品的总离子流图(a)和 RT=7.72 min 的一级质谱图(b)
Fig. 5 Total ion chromatogram of labeled samples in negative ion mode (a) and the first stage mass spectra at retention time of 7.72 min (b)

在碳源充足及细胞生理功能正常的条件下,硅藻可以通过细胞膜表面的载体蛋白直接把培养液中的 $\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$ 运输到细胞内,然后在碳酸酐酶的作用下转化为 $^{13}\text{CO}_2$ 供光合作用需求,最后大量转化为脂类^[26,27],因而被¹³C 标记上的所有光合作用脂的量持续上升。理论上,随着培养时间的延长,被¹³C 标记上的各类脂的含量应该增高,而后期¹³C 对光合作用脂标记的量却下降,可能与培养液中¹³C 的含量、脂类之间转化及细胞衰败等因素有关。另外发现从平台期第 4 ~ 8 天,在相同的时间点都满足 SQDG

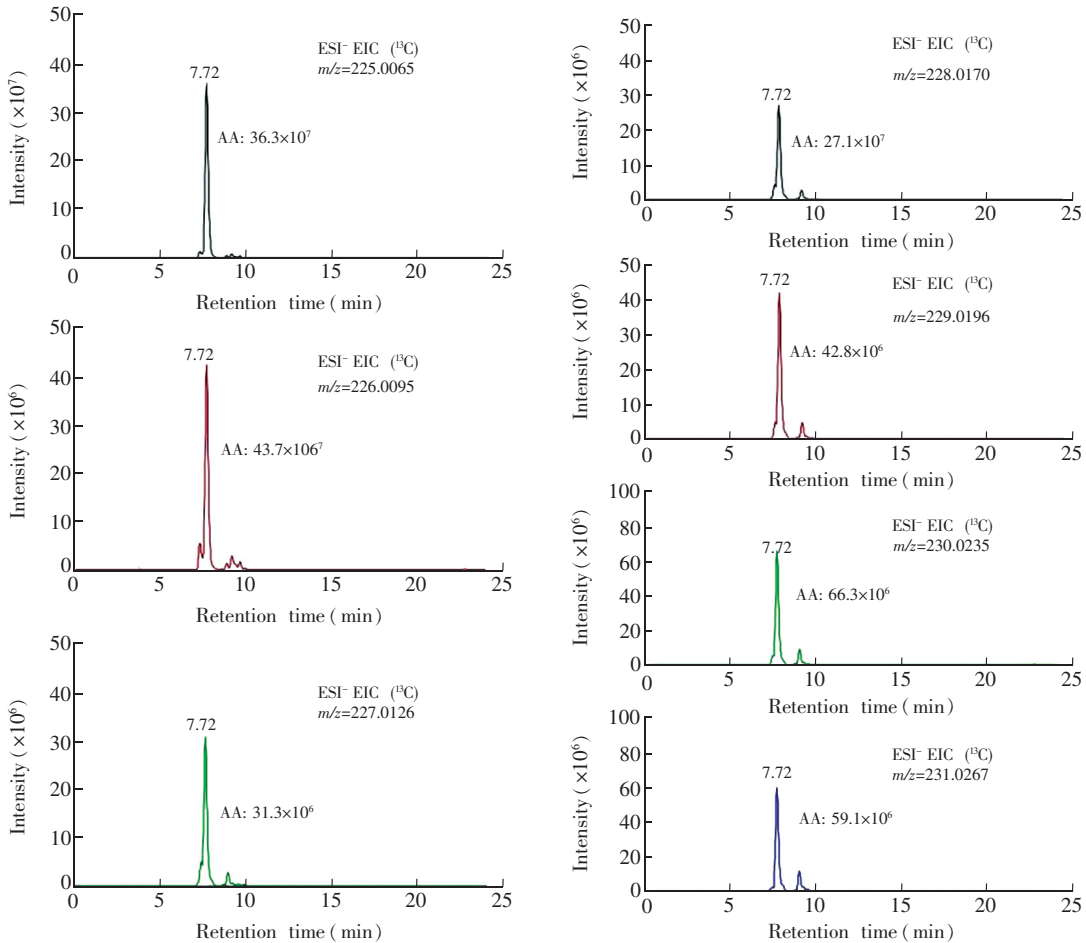


图 6 保留时间为 7.72 min 的 m/z 225.0065, 226.0095, 227.0126, 228.0170, 229.0196, 230.0235 和 231.0267 的提取离子图

Fig. 6 Extraction ion chromatogram of m/z 225.0065, 226.0095, 227.0126, 228.0170, 229.0196, 230.0235 and 231.0267 at retention time of 7.72 min

被¹³C 标记的总量>MGDG 被¹³C 标记的总量>PG 被¹³C 标记的总量>DGDG 被¹³C 标记的总量,在第 8 天被¹³C 标记 SQDG 约占有被¹³C 标记光合作用脂的比高达 43.4%,结果与某些硅藻中平台期 SQDG 的含量相似^[28]。Frentzen 等^[29]对微藻中磷脂 PG 研究发现,在不同的生长时期尽管脂酰基组成变化显著,但其含量相对稳定,而本实验中磷脂 PG 对¹³C 的标记量变化不大,与报道的结果相似。从图 8 中可知, DGDG, PG, SQDG 的标记率都在第 8 天达到最高,分别为 56.3%, 38.4% 和 62.6%,而 MGDG 的标记率在第 10 天达到了 87.3%。对比图 7 和图 8 可知,每类光合作用脂对¹³C 标记的量和相对应的标记率随培养时间的变化趋势相近,说明了实验结果的可靠性。Martin^[30]通过¹³C 将微藻中的脂类标记,再跟踪被¹³C 的标记脂肪酸链,研究了微藻与桡足类之间的同化关系,但被¹³C 被标记的脂肪酸链具体来自哪类脂未能鉴定。此外生物同化微藻体内的脂类主要以甘油酯为活性单元,而非游离的脂肪酸链。硅藻细胞内的 DGDG、MGDG、SQDG 都有典型的环型头部,理论上通过跟踪被¹³C 标记环形头部的转移来研究微藻和养殖生物之间的同化关系,更加直观、简单。不同脂质在藻体内合成的先后时间有差别,进而导致¹³C 标记情况的差异,为了清晰地了解生物摄食过程中对微藻中特定脂类的吸收、自身脂类的合成、转化、代谢等途径,我们首先要确定在哪个时期藻体内被¹³C 标记的每类脂质含量的最大化,在该时期投喂生物,进而追踪该类脂质在摄食动物体内的动态走向,为后期系统阐明微藻对生物脂类影响机制打下脂类营养学理论基础。因此,对平台期的小硅藻而言,被¹³C 标记的 DGDG、PG、SQDG 应选取第 8 天来投喂养殖生物,而被¹³C 标记的 MGDG 应选取第 10 天投喂养殖生物。

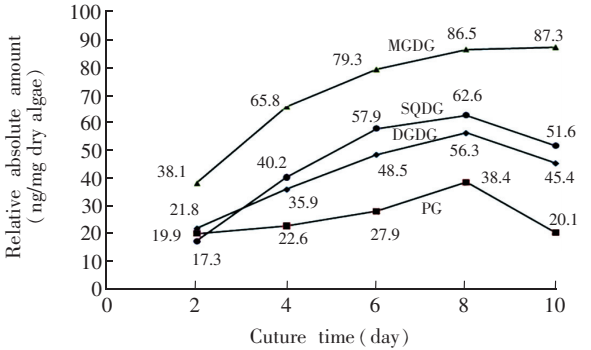
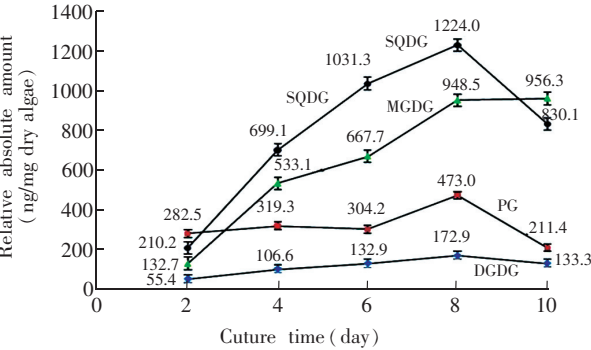


图 7 平台期光合作用脂被¹³C 标记量的变化
Fig.7 Change of ¹³C-labeled content of photosynthesis lipids on the stationary phase

图 8 平台期光合作用脂¹³C 标记率的变化
Fig.8 Change of ¹³C-labeled rate of photosynthesis lipids on the stationary phase

4 结 论

本研究将¹³C 稳定同位素示踪结合高分辨质谱技术,在精确到实际脂类分子结构和组成的组学水平上,通过高分辨液相色谱-质谱联用技术对每一类脂上的同位素标志特性进行分析,并利用二级质谱下脂质形成的特征分子离子,实现¹³C 标记脂质的定量分析,确定在哪个时期藻体内被¹³C 标记的每类脂质含量的最大化。在该时期投喂生物,进而追踪该类脂质在摄食动物体内的动态走向,为后期进一步研究生物脂类风味形成的分子机理打下脂类营养学理论基础。所以,针对 DGDG、PG、SQDG,应选取标记了 8 天的微藻来投喂生物;而如果针对 MGDG,应选取标记了 10 天的微藻投喂生物。

References

1 NI Xue-Wen. *Mar. Fish*, **2005**, 27(3): 251-255
倪学文. *海洋渔业*, **2005**, 27(3): 251-255

2 Dunstan G A, Vollman J K, Barrent S M, Leroi J M, Jeffrey S W. *Photochem*, **1993**, 35(1): 155-161

3 LI He-Fang, ZHOU Han-Qiu. *Oceanologia Limnologia Sinica*, **1999**, 30(1): 34-40
李荷芳, 周汉秋. *海洋与湖沼*, **1999**, 30(1): 34-40

4 Yang F, Chen S, Miao Z, Sheng Z, Xu J, Wan J, Ran Z, Zhou L, Zhou H, Zhou C, Yan X. *Aquac. Nutr.*, **2015**, 22(4): 846-856

5 Rivero-Rodríguez S, Beaumont A R, Lora-Vilchis M C. *Aquaculture*, **2007**, 263(1): 199-210

6 Xu J, Chen D, Yan X, Chen J, Zhou C. *Anal. Chim. Acta*, **2010**, 663(1): 60-68

7 Li S, Xu J, Chen J, Chen J J, Zhou C X, Yan X J. *Aquaculture*, **2014**, 428-429: 104-110

8 Xu J L, Zhou H B, Yan X J, Zhou C X, Zhu P, Ma B. *J. Agric. Food Chem.*, **2012**, 60(15): 3973-3980

9 Lee R F, Nevenzel J C, Paffenhffer G A, Benson A A. *Patton S. BBA*, **1970**, 202(2): 386-388

10 Roussel J M, Perrier C, Erkinaro J, Niemelä E, Cunjak R A, Huteau D and Riera P. *Global. Change. Biol.*, **2014**, 20(2): 523-530

11 Soto D X, Wassenaar L I, Hobson K A. *Functional. Ecol.*, **2013**, 27(2): 535-543

12 Reuss N S, Hamerlik L, Velle G, Michelsen A, Pedersen O, Brodersen K P. *Limnol. Oceanog-Meth.*, **2013**, 58(3): 440-444

13 Li J, Hoene M, Zhao X, Chen S, Wei H, Lin X, Zeng Z, Weigert C, Lehmann R, Xu G. *Anal. Chem.*, **2013**, 85(9): 4651-4657

14 Elizabeth H B, Nicholas B B, Damian C, Joseph L D, Anita B, Miguel F, Steven N B, Paul G F, Dismukes G C. *Bioenerg. Res.*, **2012**, 5(4): 876-885

15 XU Fang, CAI Zhao-Ling, CONG Wei, OUYANG Fan. *J. Chongqing Institute. Technol.*, **2005**, 19(1): 96-100
徐 芳, 蔡昭铃, 丛 威, 欧阳藩. *重庆工学院学报: 自然科学版*, **2005**, 19(1): 96-100

- 16 WEI Dong, ZHANG Xue-Cheng, SUI Zheng-Hong, XU Huai-Shu. *Mar. Sci.*, **2000**, 24(7): 46–50
魏东, 张学成, 隋正红, 徐怀恕. *海洋科学*, **2000**, 24(7): 46–50
- 17 TANG Ning, XING Rong-Lian, QIAN Zhen-Ming, WANG Chang-Hai. *J. Yantai University: Nat. Sci. Engineering Edition*, **2008**, 21(2): 105–109
汤宁, 邢荣莲, 钱振明, 王长海. *烟台大学学报: 自然科学与工程版*, **2008**, 21(2): 105–109
- 18 Xu J, Chen D, Yan X, Zhou C. *Anal. Chim. Acta*, **2010**, 663(1): 60–68
- 19 Yan X, Chen D, Xu J, Zhou C. *J. Appl. Phycol.*, **2011**, 23(2): 271–282
- 20 Li S, Xu J, Chen J, Zhou C. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2014**, 28(3): 245–255
- 21 Hsu F F, Turk J. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*, **1999**, 10(7): 587–599
- 22 Heinz E, Schmidt H, Hoch M, Jung K H, Binder H, Schmidt R. *J. Org. Chem.*, **1989**, 184(2): 445–453
- 23 Rawlyer A, Meylan-Bettex M, Siegenthaler P A. *Biochim. Biophys. Acta*, **1992**, 1104(2): 331–341
- 24 Benning C. *Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **1998**, 49(49): 53–75
- 25 Murphy D J, Woodrow I E. *Biochim. Biophys. Acta*, **1983**, 725(1): 104–112
- 26 Axelsson L, Ryberg H, Beer S. *Plant Cell Environ.*, **2006**, 18(4): 439–445
- 27 Elzenga J T M, Prins H B A, Stefels J. *Limnol. Oceanogr. -Meth.*, **2000**, 45(2): 372–380
- 28 Harwood J. L. *Membrane Lipids in Algae*. Berlin: Springer Netherlands, **1988**, 6: 53–64
- 29 Frentzen M. *Curr. Opin. Plant. Bio.*, **2004**, 7(3): 270–276.
- 30 Martin G, Carola A, G K. *J. Exp. Biol. Mar. Ecol.*, **2005**, 317(2): 109–125

¹³C Stable Isotope Labeled Quantitative Analysis of Photosynthesis Lipid in Diatom

ZONG Chun-Guang¹, LI Shuang^{1,2}, XU Ji-Lin^{*1}, LI Yan-Rong¹, ZHONG Ying-Ying²,
YU Xue-Yun², ZHOU Cheng-Xu¹, YAN Xiao-Jun¹

¹(Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

²(Ningbo Entry-Exit Inspection and Quarantine Office, Ningbo 315000, China)

Abstract The diatom *Nitzschia closterium f. minutissima* was selected as the object to study the ¹³C labeled extent and speed of photosynthesis lipids by ultra high pressure liquid chromatography coupled with quadrupole orbitrap high resolution mass spectrometry. The results showed that all four types of lipid were labeled clearly by ¹³C within 10 days in the stationary phase. The total labeled amount by ¹³C of digalactosyl diacylglycerol (DGDG), phosphatidylglycerol (PG) and sulfoquinovosyl diacylglycerol (SQDG) increased from entering the stationary phase to the eighth day, but declined later. And the total labeled amount of DGDG, PG and SQDG reached the maximum of (173±24) ng/mg, (473±41) ng/mg and (1224±21) ng/mg on the eighth day with the labeled rate of 56.3%, 38.4% and 62.6%, respectively. The total labeled amount by ¹³C of monogalactosyl diacylglycerol (MGDG) showed a continued upward trend during the 10 days, and reached (956±51) ng/mg on the tenth day, with marked rate of 87.3%. It was suggested that the synthesized time of different lipid was different. Therefore, for studying assimilation mechanism of microalgae lipids by marine organisms, the lipid content that labeled by ¹³C should reach the maximum. So if for DGDG, PG and SQDG, we should choose the diatom labeled 8 days by ¹³C to feed the marine organisms. Meanwhile if for MGDG, we should choose the diatom labeled 10 days by ¹³C to feed the marine organisms.

Keywords *Nitzschia closterium f. minutissima*; ¹³C stable isotope; Quadrupole orbitrap with high resolution mass spectrometry; Quantitative marker

(Received 6 May 2016; accepted 8 September 2016)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.31172448).