

基于细胞组学技术提高胶球藻 C-169 中性脂染色的有效性

魏东, 李露

(华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

摘要: 本研究基于流式细胞仪、荧光酶标仪、激光共聚焦扫描显微镜等细胞组学分析技术, 系统研究了藻液细胞浓度、Nile Red 浓度、助溶剂种类和浓度, 以及染色温度、染色时间、振荡时间等对检测藻细胞中性脂相对含量(以平均荧光强度表示)的影响, 提高了胶球藻 C-169 中性脂染色的有效性。结果表明, Nile Red 荧光染色的最佳藻细胞浓度为 10^6 mL, 染料浓度在 0.05~0.2 $\mu\text{g/mL}$ 之间较适宜且不会产生过量的荧光干扰; 添加 15%~30% (V/V) 丙三醇能显著增强染料进入细胞的通透性; 25~40 $^{\circ}\text{C}$ 范围内胶球藻染色后的荧光强度较强但无显著差异 ($p>0.05$); 染色时间超过 10 min 及振荡时间超过 30 s 均未显著提高胶球藻 C-169 染色后的平均荧光强度。系统优化后的染色方法可从细胞水平上显著提高中性脂荧光检测的精确性, 同时为其他微藻采用这一荧光探针快速测定中性脂含量提供了快速有效方法。

关键词: 胶球藻 C-169; 细胞组学; 流式细胞术; Nile Red; 中性脂

文章编号: 1673-9078(2016)9-20-27

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.9.004

Improvement in the Effectiveness of Staining Neutral Lipids in *Coccomyxa subellipsoidea* C-169 by Cytomics Technologies

WEI Dong, LI Lu

(School of Food Sciences and Technology, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Using cytomics technologies, such as flow cytometry, fluorescence microplate reader, and confocal laser scanning microscope, the effects of algal cell concentration, Nile Red concentration, types and concentration of assistant solvents, staining temperature and time as well as shaking time on the relative content of neutral lipids in algal cells (expressed as average fluorescence intensity) were investigated. The effectiveness of staining neutral lipids in *Coccomyxa subellipsoidea* C-169 was improved. The results indicated that the optimal algal cell concentration for Nile Red fluorescence staining was 10^6 cells/mL, and the optimal dye concentration ranged from 0.05 to 0.2 $\mu\text{g/mL}$, which could avoid interference due to excessive fluorescence. The addition of 15~30% (V/V) glycerol could significantly improve the permeability of dye into the cells. Relatively high fluorescence intensity was detected at the staining temperatures ranging from 25 to 40 $^{\circ}\text{C}$, but no significant difference was found among them ($p>0.05$). The average fluorescence intensity of *Coccomyxa subellipsoidea* C-169 after staining was not significantly improved when the staining time was increased to over 10 min and the shaking time was increased to over 30 s. The systematically optimized staining procedure can significantly improve the accuracy of fluorescence detection of neutral lipids at the cellular level, and provides an effective method for rapid determination of the neutral lipid content in other microalgae using this fluorescence probe.

Key words: *Coccomyxa subellipsoidea* C-169; cytomics; flow cytometry; Nile Red; neutral lipid

微藻是世界上分布最广、种类变化最大的低等植物类群, 每年光合作用固定的二氧化碳占全球 CO_2 固定量的 50% 以上, 是能量转换和碳元素循环的重要载

收稿日期: 2015-07-24

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31370383); 国家 863 计划项目 (2013AA065802); 广东省海洋渔业科技与产业发展专项 (A201401C01); 广东省公益研究与能力建设项目 (2015A020216003)

作者简介: 魏东 (1966-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 工业生物技术

体^[1]。微藻具有光合作用效率高、生长周期短、环境适应能力强等特点, 某些富含油脂的品种其单位面积油脂产量可达陆生油料作物的 30 倍以上, 被认为是制备可再生清洁能源 (如生物柴油) 的理想原料, 具有广阔的发展前景^[2,3]。

高油脂含量是能源微藻的理想特质, 目前的油脂测定方法主要包括重力测定法、色谱法、荧光染色法等。重力法和色谱法需使用大量有机溶剂提取藻油, 毒性较大, 一次至少需要 10~15 mg 原料, 且须经干

燥处理,操作繁琐,低效耗时,安全性差,存在一定局限和误差。而荧光染色法则很好地克服了这一缺点,其灵敏度高,所需样品量小,不需抽提干燥,分析测定方法简单,可快速准确评估藻细胞内油脂含量。尼罗红(9-diethylamino-5H-benzo[a]phenoxazine-5-one, Nile Red)是亲脂性的恶嗪类荧光染料,可与脂类物质结合形成复合物,近年来广泛用于藻类中性脂含量的检测^[4]。

细胞组学是以流式细胞术、激光共聚焦显微镜、荧光酶标仪等技术为基础,借助灵敏、非侵害的荧光探针技术实现细胞水平的多参数多元化的综合分析,定性定量测定细胞的基础生物学信息。近年来,相关研究主要是针对一些不易染色的藻种,借助物理或化学等预处理方法,使更多的染料进入胞内,直接测定荧光信号强度反映藻细胞油脂含量^[5]。目前尚未有研究基于细胞组学分析技术,借助微孔板全方位高通量地研究染色过程中各因素对染色效果的影响,更少有研究运用流式细胞术、激光共聚焦等技术从细胞水平上确定荧光染料与胞内脂质的特异性结合程度及对细胞正常生理形态的影响。

胶球藻(*Coccomyxa subellipsoidea* C-169)是首个完成基因组测序的极地真核藻种,对极端环境耐受性高、细胞壁薄易于破壁提油,在氮饥饿培养下甘油三酯含量可占干重的57%以上,在2% CO₂补充下使用BBM培养基可积累大量中性脂,脂肪酸成分符合生物柴油的要求,被认为是生物柴油的极好原料^[6-7]。本研究以胶球藻C-169为材料,结合细胞组学分析技术,系统探究如何提高Nile Red荧光检测中性脂的有效性和测量结果的精确性,从细胞水平上探索中性脂染色的最优条件,建立更加快速准确的脂质含量测定方法体系。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

胶球藻C-169(NIES-2166)购于日本NIES藻种库。尼罗红(Nile Red)染料购于Sigma公司,二甲亚砜(DMSO)、甲醇、乙醇、丙酮、异丙醇及丙三醇等试剂均为国产分析纯。

FLUOstar OPTIMA多功能酶标仪购于德国BMG公司;C6 Accuri流式细胞仪购于美国BD公司;TCS SP5X激光共聚焦扫描显微镜购于德国Leica公司;K30干式恒温器购于海门其林贝尔仪器制造公司;MX100-4A微孔板振荡器购于杭州奥盛仪器有限公司。

1.2 藻株培养条件

实验采用摇瓶培养,将其置于CO₂培养箱中,光照强度设置为2350±150 lx,培养温度26℃,CO₂浓度为2%,振荡速率230 r/min,连续光照培养至稳定期,收集样品待测。

1.3 Nile Red 荧光染色分析技术平台

1.3.1 多功能酶标仪与 Nile Red 染料联用

取胶球藻C-169细胞悬浮液,混匀计数,蒸馏水稀释至一定浓度,加入Nile Red染料,在漩涡混合器上振荡,避光染色,置于Costar96孔板中,根据中性脂标准激发和发射特征的预扫描,用FLUOstar Optima多功能酶标仪在485 nm处波长激发,580 nm波长发射测定胶球藻C-169脂质的相对荧光强度。

1.3.2 流式细胞术与 Nile Red 染料联用

使用BD C6 Accuri流式细胞仪对胶球藻C-169的染色样品检测分析。在汞灯488 nm二极管激光下激发,收集FL2、FL3、FSC及SSC信号,每次计数30 μL细胞。FL2通道(575±40 nm)荧光强度与藻细胞内中性脂的含量正相关;FL3通道(>670 nm)荧光强度直接反应细胞内叶绿素a含量。前向散射光(FSC)信号强度则与藻细胞大小直径成正比,侧向散射光(SSC)强度反应细胞内颗粒结构的复杂程度^[8]。

1.3.3 激光共聚焦扫描显微镜测定藻细胞荧光特性

细胞样品经Nile Red染色后,在TCS SP5X激光共聚焦显微镜下用Argon激光下扫描,使用100倍油镜进行观察,扫描信号采集设置为560~615 nm,拍照时数码变焦为5倍,调节电压和分辨率,选择具有代表性的清晰细胞和信号最强的断层,使用软件LAS AF Lite定性观测细胞荧光强度,荧光强度反映细胞总脂含量。

1.4 Nile Red 荧光染色优化体系

1.4.1 细胞密度

为了确定藻细胞中性脂染色最佳细胞浓度,10⁵、10⁶和10⁷/mL三个细胞浓度被用于细胞染色。其中Nile Red浓度为0.1 μg/mL, DMSO浓度为20% (V/V),常温,振荡时间1 min,染色时间10 min。

1.4.2 Nile Red 染料浓度

使用不同的Nile Red染料浓度(0.05 μg/mL、0.1 μg/mL、0.2 μg/mL、0.4 μg/mL、0.8 μg/mL和1.6 μg/mL)对胶球藻C-169进行染色,确定最佳Nile Red染料浓度范围。其中丙三醇浓度20% (V/V),常温,振荡时

间 1 min, 染色时间 10 min。

1.4.3 助溶剂种类

使用不同的助溶剂对染色的藻细胞进行预处理, 助溶剂种类如下: 甲醇、乙醇、丙酮、DMSO、丙三醇、异丙醇。其中 Nile Red 浓度为 $0.1 \mu\text{g/mL}$, 助溶剂浓度 20% (V/V), 常温, 振荡时间 1 min, 染色时间 10 min。

1.4.4 助溶剂浓度

为确定助溶剂的最佳染色浓度范围, 设置丙三醇和 DMSO 不同的浓度梯度 (0%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%和 45% V/V) 对胶球藻 C-169 进行染色。其中, Nile Red 浓度为 $0.1 \mu\text{g/mL}$, 常温, 振荡时间 1 min, 染色时间 10 min。

1.4.5 染色温度

不同的染色温度 (10°C 、 20°C 、 25°C 、 30°C 、 35°C 、 40°C 、 50°C 、 60°C) 被用于评价胶球藻 C-169 的中性脂染色。其中, Nile Red 浓度为 $0.1 \mu\text{g/mL}$, 丙三醇浓度 20% (V/V), 振荡时间 1 min, 染色时间 10 min。

1.4.6 染色时间

为了优化不同染色时间对测定藻细胞中性脂含量的影响, 1 min、5 min、10 min、15 min、30 min、60 min、90 min 和 120 min 被用于细胞染色效果评价。其中, Nile Red 浓度为 $0.1 \mu\text{g/mL}$, 丙三醇浓度 20% (V/V), 振荡时间 1 min, 染色时间 10 min。

1.4.7 振荡时间

不同的振荡时间 (0 s、15 s、30 s、60 s、120 s、180 s、240 s 和 300 s) 被用于评价胶球藻 C-169 的中性脂染色。其中, Nile Red 浓度为 $0.1 \mu\text{g/mL}$, 丙三醇浓度 20% (V/V), 振荡时间 1 min, 染色时间 10 min。

1.5 数据统计方法

利用 Microsoft Office Excel 2007 和 Origin 7.0 对数据进行处理分析, 分别采用单因素方差分析和成对数据 t-检验来分析实验数据的差异显著性。

2 结果与讨论

2.1 不同细胞浓度下对胶球藻 C-169 染色效果的影响

将藻液用蒸馏水分别稀释至大约 10^5 mL 、 10^6 mL 和 10^7 mL , 分别取 $800 \mu\text{L}$ 胶球藻悬液与 $190 \mu\text{L}$ DMSO 混合, 加入 $10 \mu\text{L}$ 浓度为 0.01 mg/mL 的 Nile Red 试剂在漩涡混合器上避光振荡染色, 使用流式细胞仪对染

色后胶球藻 C-169 计 100000 个细胞。由图 1 不同细胞浓度下经 Nile Red 染色后的散点图可知, 10^6 mL 浓度下细胞染色落在 UL 区(左上部分)的细胞占到 96.38%, 显著高于在 10^5 mL 浓度下 69.12% 和 10^7 mL 浓度下 14.26% 的比例。这可能是由于 10^5 mL 细胞浓度太小的情况下, 助溶剂 DMSO 破坏大量细胞膜结构导致细胞碎片增多, 前向散射角(FSC)荧光信号强度变低; 10^7 mL 细胞浓度过大, 溶液中细胞粘连聚团, 导致前向散射角(FSC)荧光信号强度增大; 而 10^6 mL 细胞浓度适宜, 流式图细胞形态特征正常, 故确定 Nile Red 荧光染色的最佳藻液细胞浓度是 10^6 mL 。

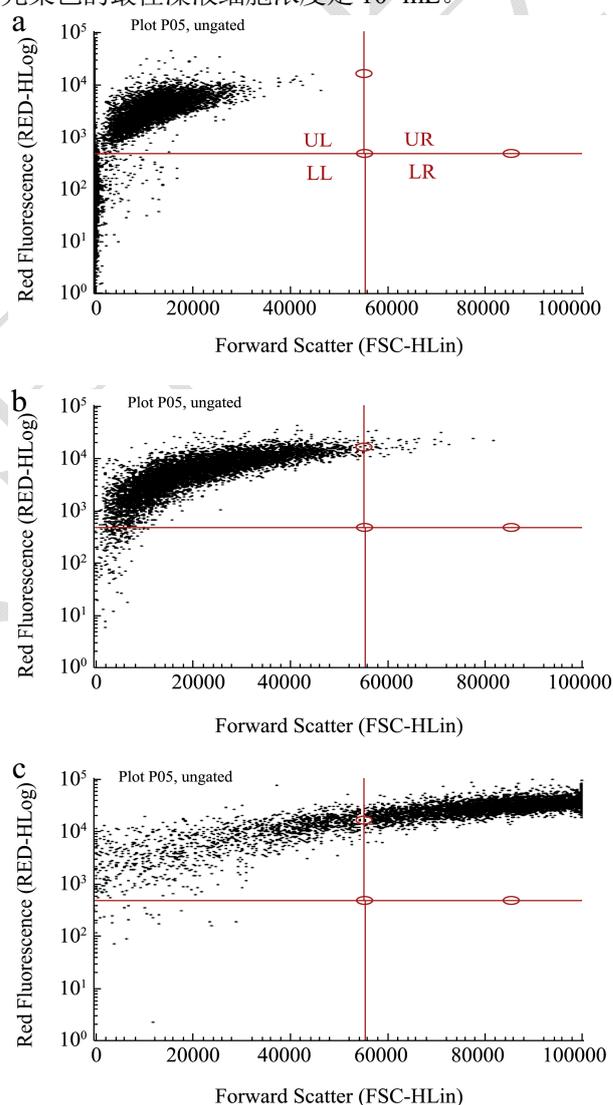


图 1 胶球藻 C-169 在不同细胞浓度下 Nile Red 染色后的流式图

Fig.1 Cytograms of *Coccomyxa subellipsoidea* C-169 at different cellular concentrations after Nile Red staining

注: a、b、c 分别代表藻液浓度为 10^5 mL 、 10^6 mL 和 10^7 mL 。

2.2 Nile Red 染料浓度对胶球藻 C-169 染色效

果的影响

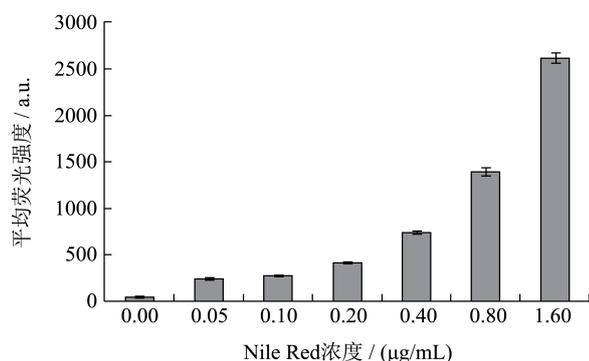
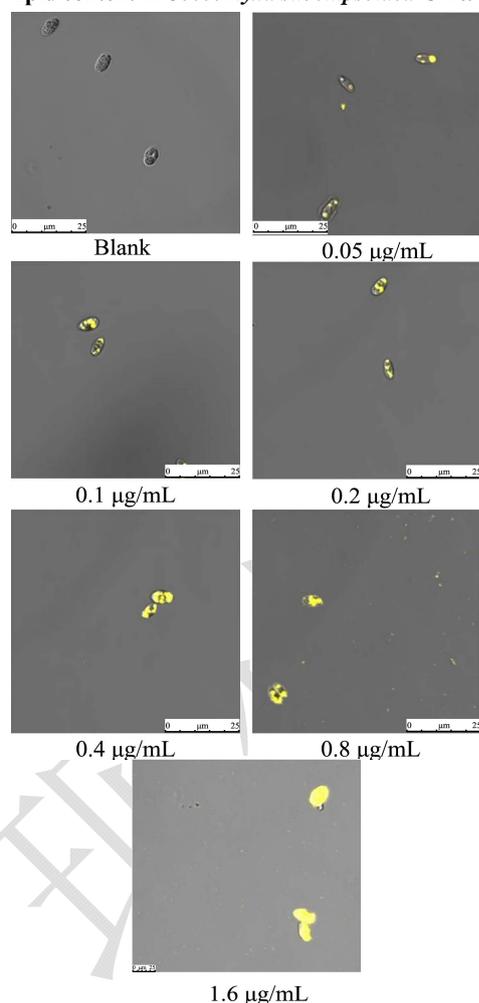


图2 不同 Nile Red 浓度对胶球藻 C-169 中性脂含量的影响

Fig.2 Effect of different Nile Red concentrations on the neutral lipid content in *Coccomyxa subellipsoidea* C-169图3 激光共聚焦下不同 Nile Red 浓度下胶球藻 C-169 的影响
Fig.3 Effect of different Nile Red concentration on *Coccomyxa subellipsoidea* C-169 under laser scanning confocal microscope

选择不同的 Nile Red 浓度梯度 (0~1.6 µg/mL) 对胶球藻 C-169 悬浮液染色, 通过荧光多功能酶标仪检测得图 2 可知, 随着 Nile Red 荧光染料浓度的增加, 藻细胞内脂质的荧光强度也逐渐增强。Nile Red 染料

在 0.05~0.2 µg/mL 浓度之间并无极显著的差异 ($p>0.05$), 但当尼罗红染料浓度大于 0.4 µg/mL 以上时, 胶球藻 C-169 的荧光强度显著增强, 尤其当 Nile Red 染料浓度为 1.6 µg/mL 时, 藻细胞的平均荧光强度高达 3374, 是 0.2 µg/mL Nile Red 染料染色条件下荧光强度的 4.5 倍。这可能是由于随着荧光染料浓度的增加, 细胞内中性脂与 Nile Red 发生特异性结合被充分染色, 也有可能是因为高浓度的荧光染料造成藻液具有很强的荧光本底, 干扰荧光多功能酶标仪对荧光信号的检测。

使用激光共聚焦显微镜观察不同 Nile Red 浓度下胶球藻 C-169 藻细胞的染色情况, 进一步探究增加染料浓度导致荧光信号升高的原因。由图 3 可知, 胶球藻 C-169 经 Nile Red 染色后, 在 488 nm 波长下被 Argon 激光激发, 在 650~710 nm 附近发射叶绿体产生的红色荧光, 在 560~615 nm 下发射中性脂产生橘黄色荧光。随着 Nile Red 染料浓度的增加, 细胞内中性脂的荧光信号也随之增强, 但也可以明显发现, 当尼罗红染料浓度大于 0.4 µg/mL 时, 图片出现了较强烈的荧光背景, 这说明高浓度的荧光染料将导致染色效果变差, 干扰流式细胞仪和荧光酶标仪等对藻细胞内中性脂真实含量的检测, 所以最终确定 Nile Red 的最佳染色浓度范围为 0.05~0.2 µg/mL。Chen 等曾研究发现, 小球藻 *C.vulgaris* 的尼罗红最佳染色浓度为 0.5 µg/mL^[9], 当 Nile Red 浓度大于 2 µg/mL 时, 藻细胞的荧光强度反而降低。本结果也与 Cooksey 对 *Navicula* sp.和 *Tropidoneis* sp.两类藻细胞的 Nile Red 染色最佳浓度相类似^[6]。

2.3 助溶剂种类对胶球藻 C-169 染色效果的影响

由于 Nile Red 染料是亲脂性荧光染料, 而染色过程则是以水溶液为媒介, 所以对大多数藻种来说, Nile Red 很难进入细胞与中性脂结合, 所以需要加入一些脂溶性的助溶剂破坏藻细胞壁及细胞膜的完整性, 促使 Nile Red 染料进入藻细胞与中性脂结合得到最大的荧光信号。图 4 比较了用不同助溶剂处理同样的藻细胞样品后得到的中性脂荧光强度, 从图中可以清晰的看出, 与不添加任何助溶剂的空白对照相比, DMSO 及丙三醇能较好改善藻细胞质膜的通透性, 显著促进 Nile Red 与中性脂的结合提高其染色效果, 尤其是丙三醇处理藻细胞后其荧光强度高达 793 a.u., 是空白对照的 8.4 倍。而丙酮处理后胶球藻 C-169 的平均荧光强度稍有增加, 甲醇乙醇等并没有增加藻细胞的荧光

染色效果。有研究发现,添加丙三醇和 DMSO 不仅能显著提高 *Nannochloropsis* sp. 中性脂染色的有效性,而且使用丙三醇染色后的藻细胞活性并无降低,可以继续生长^[10]。

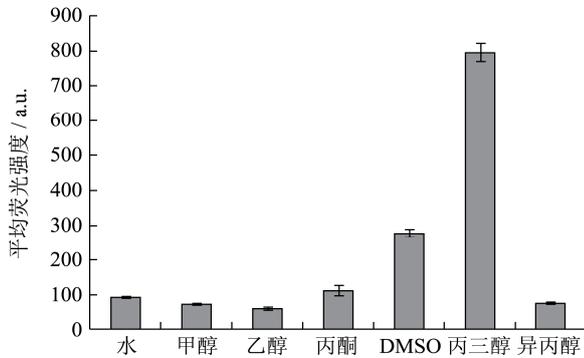


图4 不同助溶剂种类对胶球藻 C-169 中性脂含量的影响

Fig.4 Effect of different types of assistant solvents on the neutral lipid content in *Coccomyxa subellipsoidea* C-169

2.4 助溶剂浓度对胶球藻 C-169 染色效果的影响

优化 DMSO 浓度及丙三醇浓度对胶球藻 C-169 染色的效果得图 5, 从中可以看出, 所有经丙三醇处理后的藻细胞荧光强度均显著高于未被处理的样品, 随着丙三醇浓度的增加藻细胞中性脂的平均荧光强度呈现先上升后下降的趋势, 丙三醇浓度在 15%~30% (V/V) 时胶球藻 C-169 的荧光强度达到最高 689 a.u., 是未添加丙三醇荧光强度的 7 倍以上。同样, 胶球藻 C-169 的 Nile Red 染色荧光强度也随着 DMSO 浓度增加而增加, 并在染色液中 DMSO 浓度为 20% (V/V) 时达到最大值 (最大荧光强度为 115 a.u.), 超过 20% (V/V) 后随着 DMSO 浓度的继续增强藻细胞的荧光信号强度反而下降。Simonetti 等和 Chen 等之前均报道了在添加 DMSO 作用下, 能增加染料的渗透性, 使 Nile Red 荧光染料广泛分布于人体皮肤细胞表面, Chen 的研究也得出了添加 25% (V/V) 浓度的 DMSO 能使 *C. vulgaris* 得到最高的荧光强度^[9,11]。

从图 6 可以看出在染色液中添加丙三醇浓度会明显改变藻液 FSC 通道和 SSC 通道的平均荧光强度, 即细胞本身的形态特征, 尤其是当丙三醇浓度大于 40% (V/V) 时, 细胞在“门”R1 内的细胞数显著下降。随着丙三醇浓度的增加, FSC 通道的平均荧光强度(与细胞大小成正相关)随之增加, 而 SSC 通道的平均荧光强度(与细胞复杂程度成正相关)不断降低。这是由于丙三醇破坏了细胞膜的通透性, 使 Nile Red 荧光染料更容易进入细胞, 细胞体积增大使 FSC 通道荧光

强度升高, 同时也促进细胞内部结构的均一性, 使细胞内的复杂度降低, SSC 通道的荧光强度降低。

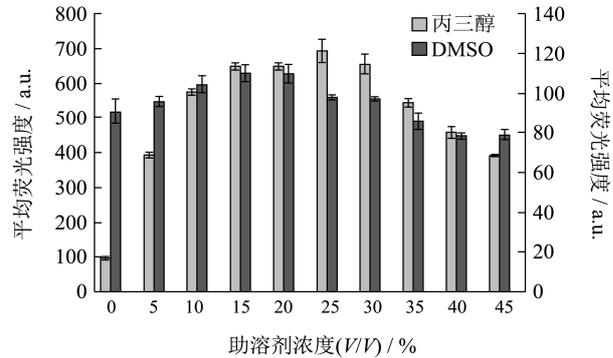
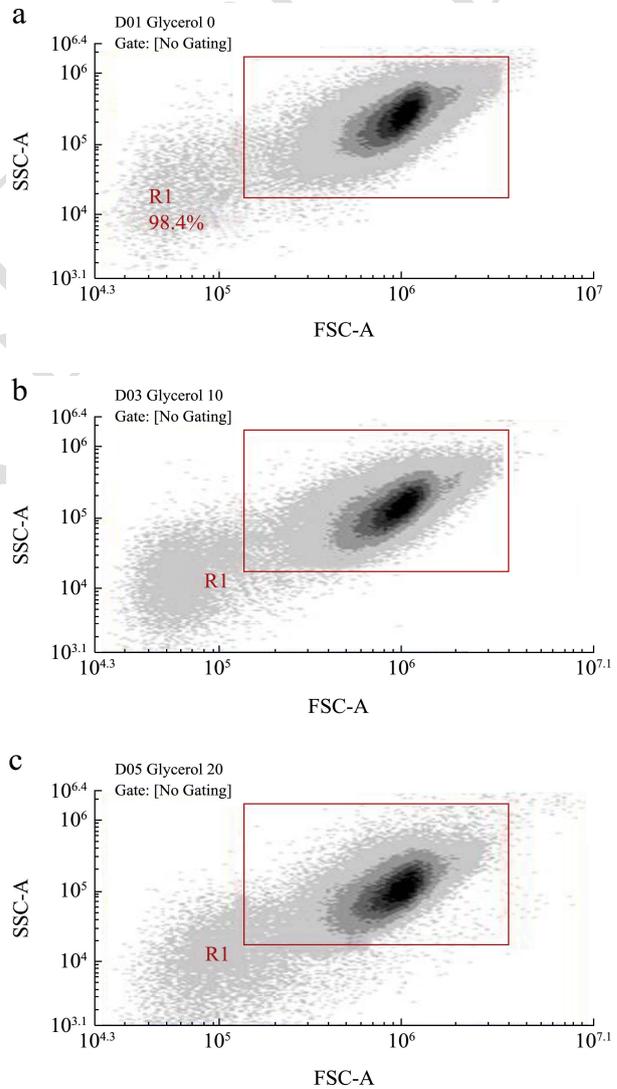


图5 DMSO 及丙三醇浓度对胶球藻 C-169 中性脂含量的影响

Fig.5 Effect of different concentrations of DMSO and glycerol on the neutral lipid content in *Coccomyxa subellipsoidea* C-169



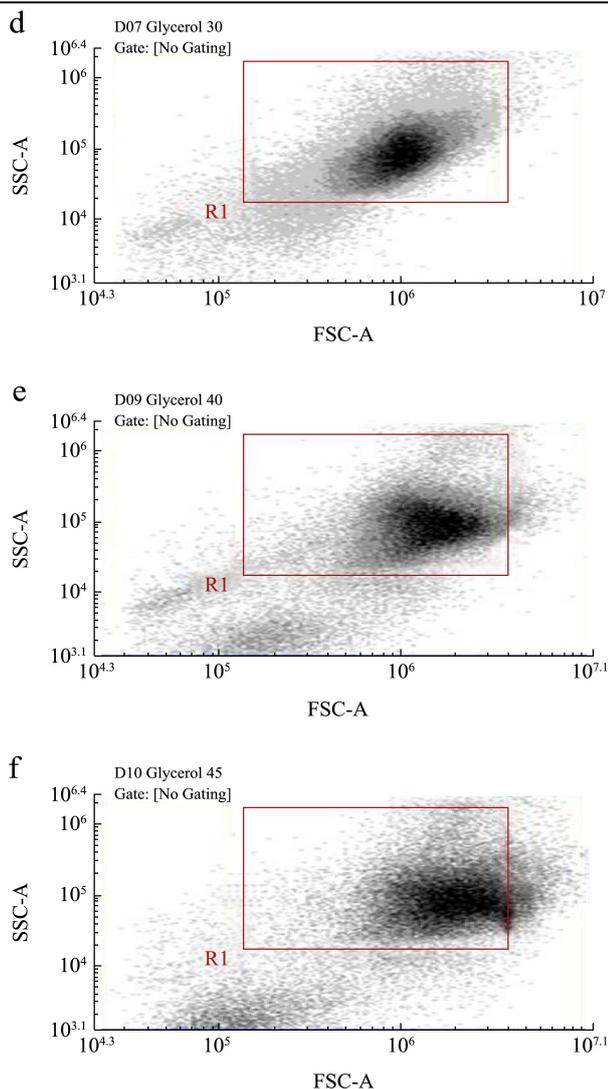


图6 丙三醇浓度对胶球藻 C-169 形态特征的影响

Fig.6 Effect of glycerol concentration on the cellular morphology of *Coccomyxa subellipsoidea* C-169

注: a、b、c、d、e 和 f 分别代表丙三醇浓度为 0%、10%、20%、30%、40%和 45%。

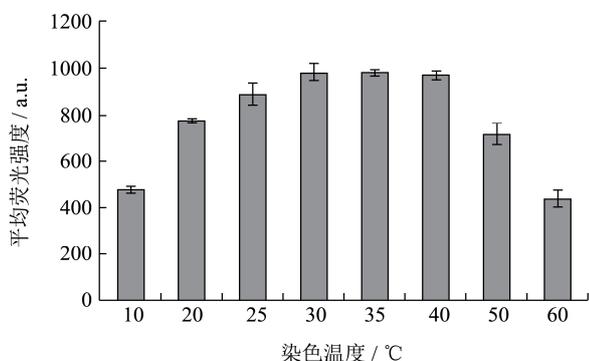


图7 温度对胶球藻 C-169 中性脂含量的影响

Fig.7 Effect of temperature on the neutral lipid content in *Coccomyxa subellipsoidea* C-169

2.5 染色温度对胶球藻 C-169 染色效果的影响

图7显示了染色过程中温度对胶球藻 C-169 荧光强度的影响,从图中可以看出随着温度的不断升高,藻细胞的平均荧光强度也不断升高,升温有助于提高胶球藻 C-169 的荧光染色效果,并在 35 °C 时染色效果达到最好(最高平均荧光强度为 978 a.u.)。在 25~40 °C 温度范围内胶球藻的荧光强度无显著差异 ($p>0.05$),当温度大于 40 °C 时,藻细胞的平均荧光强度显著减少 ($p<0.05$),这与 Deye 等和 Chen 等的研究结果是一致的。因此胶球藻 C-169 最适宜的染色温度是 25~40 °C^[9,12]。

2.6 染色时间对胶球藻 C-169 染色效果的影响

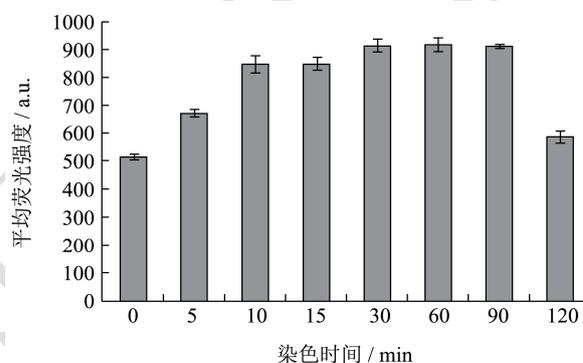


图8 染色时间对胶球藻 C-169 中性脂含量的影响

Fig.8 Effect of staining time on the neutral lipid content in *Coccomyxa subellipsoidea* C-169

为了探究 Nile Red 染色的荧光信号随时间衰减特性,实验设计了染色时间对胶球藻 C-169 染色情况变化的研究,从图8可以看出,染色时间小于 10 min 时, Nile Red 不能有效地进入藻细胞与中性脂结合,无法达到最大的平均荧光信号强度,当染色超过 30 min 时,荧光强度达到最高为 912 a.u.。但是值得注意的是,染色时间超过 10 min 后胶球藻 C-169 的荧光强度并无显著性的升高 ($p>0.05$)。并且研究发现 Nile Red 荧光染料具有较好的光稳定性,持续发射荧光信号长达 90 min,90 min 后荧光信号才会出现显著性的减弱 ($p<0.05$)。Chen 等发现在 15%、20%和 25% (V/V) DMSO 浓度条件下小球藻细胞悬浮液的最佳染色时间均为 10 min。也有研究发现 *Nannochloropsis*-丙三醇体系的最佳染色时间是 5 min, *Nannochloropsis*-DMSO 体系的最佳染色时间是 10 min^[10]。本结果与 Cooksy 等和 Esley 等的报道相一致,超过特定时间 Nile Red 荧光染料的信号会发生衰减^[5,6]。

2.7 振荡时间对胶球藻 C-169 染色效果的影响

由于 Nile red 染料本身是疏水性化学试剂,不易渗透到被亲水性环境包围的藻细胞内,一般需添加助溶剂后剧烈振荡,促使 Nile red 染料穿透藻细胞壁和生物膜与细胞内中性脂结合。从图 9 显示振荡可以显著提高藻细胞的荧光染色效果。振荡时间 15 s 时藻细胞的相对荧光强度时达到 719 a.u.,是未振荡时的 3.18 倍,并且从流式图中显示振荡并未显著改变胶球藻 C-169 的细胞形态。振荡时间超过 30 s 胶球藻 C-169 的相对荧光强度继续增加,进一步延长振荡时间达 300 s,胶球藻 C-169 的平均荧光强度并没有显著增加 ($p>0.05$)。这与 Huang 等的研究结果一致,短时间振荡就能有效促进荧光染料进入藻细胞与中性脂结合^[13]。所以,胶球藻 C-169 染色的最佳振荡时间为 30 s 以上。

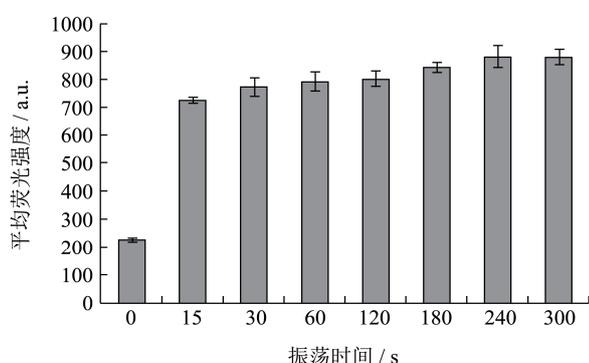


图 9 振荡时间对胶球藻 C-169 中性脂含量的影响

Fig.9 Effect of shaking time on the neutral lipid content in *Coccomyxa subellipsoidea* C-169

2.8 优化的 Nile Red 荧光染色体系与未优化时比较

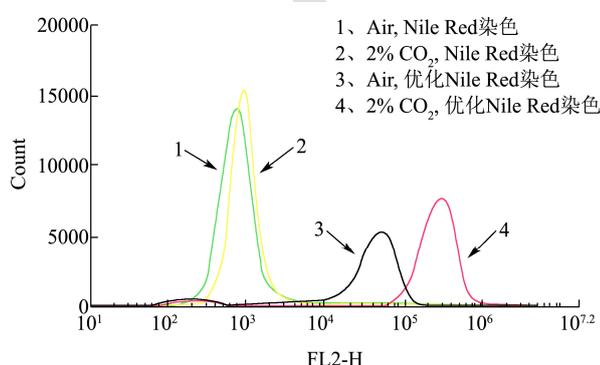


图 10 优化 Nile Red 染色对胶球藻 C-169 中性脂含量的影响

Fig.10 Effect of modified nile red staining method on the neutral lipid content in *Coccomyxa subellipsoidea* C-169

为了验证优化后胶球藻 C-169 的 Nile Red 荧光染色效果,实验同时设计了优化后与未优化两种染色方法对空气条件下培养的普通细胞和 2% CO₂ 条件下的

富油细胞中性脂荧光强度的比较。优化后的染色条件设置为:藻液细胞浓度为 10⁶ mL, Nile Red 浓度为 0.1 μg/mL, 丙三醇浓度为 20% (V/V), 常温, 振荡时间 1 min, 染色时间 10 min。从图 10 中可以看出,未优化时 Nile Red 染色荧光强度数量级大多在 10²~10³ 之间,优化后空气条件下培养的胶球藻 C-169 中性脂荧光强度数量级在 10⁴~10⁵ 之间,而 2% CO₂ 条件下的数量级在 10⁵~10⁶ 之间,优化后的藻细胞染色荧光强度显著增强,且通过染色条件优化富油细胞与普通细胞的中性脂荧光强度较优化前有显著性的区分 ($p<0.05$)。

3 结论

3.1 本研究以细胞壁较薄且完成基因组测序的胶球藻 C-169 为研究对象,通过 Nile Red 荧光染色技术与流式细胞术、激光共聚焦显微镜、荧光多功能酶标仪等细胞组学分析技术平台联用,从细胞水平上避免染料本身的荧光干扰及染色过程对细胞正常生理形态的影响,同时与 96 孔板联用快速高通量地探究了多种因素对胶球藻 C-169 荧光染色效果的影响,全面提高了荧光染色测定藻细胞中性脂含量的精确性。

3.2 通过流式细胞图可知,中性脂染色的最佳细胞浓度大致是 10⁶ mL,浓度太高或太低均会影响测定结果的准确性。通过激光共聚焦显微镜的图像可知, Nile Red 染料的最适浓度是 0.05~0.2 μg/mL,该染料浓度荧光背景较低,不会引起过多的荧光干扰。通过荧光多功能酶标仪及流式细胞仪联用,快速高通量分析了助溶剂种类和浓度、染色温度、染色时间、振荡时间等因素对荧光染色的影响,并通过验证得知优化后的荧光染色效果显著优于未优化,并能显著性区分富油细胞和普通细胞,这为其他藻种采用 Nile Red 荧光探针技术快速准确测定中性脂含量提供了方法学依据。

参考文献

- [1] Kim W, Park J M, Gim G H, et al. Optimization of culture conditions and comparison of biomass productivity of three green algae [J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2012, 35(1-2): 19-27
- [2] 黄和,郑洪立,高振.一种产生物柴油微藻的规模化收获方法及其装置:中国,CN101586078[P]2009
HUANG He, ZHENG Hong-li, GAO Zhen. A large-scale harvesting method and a device on the production of microalgae biodiesel: China, CN101586078 [P] 2009
- [3] Mata T M, Martins A A, Caetano N S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review [J].

- Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2010, 14(1): 217-232
- [4] Elsey D, Jameson D, Raleigh B, et al. Fluorescent measurement of microalgal neutral lipids [J]. Journal of Microbiological Methods, 2007, 68(3): 639-642
- [5] 王海英,符茹,黄宝祥.基于尼罗红荧光染色的小球藻脂质快速检测方法研究[J].中国油脂,2012,37(3):78-81
WANG Hai-ying, FU Ru, HUANG Bao-xiang. Rapid determination of lipid in chlorella based on nile red fluorescence. [J].China Oils and Fats, 2012, 37(3): 78-81
- [6] Msanne J, Xu D, Konda A R, et al. Metabolic and gene expression changes triggered by nitrogen deprivation in the photoautotrophically grown microalgae *chlamydomonas reinhardtii* and *coccomyxa* sp. C-169 [J]. Phytochemistry, 2012, 75: 50-59
- [7] 魏东,李露.补充 CO₂ 提高胶球藻 C-169 生物量和脂肪酸产率的研究[J].现代食品科技, 2014,4:34-39
WEI Dong, LI Lu. Enhanced yield of biomass and fatty acids from *coccomyxa subellipsoidea* c-169 by CO₂ supplement [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 4: 34-39
- [8] Nunez R. Flow cytometry principles and scientific applications cookbook [M]. Switzerland: Chemical Industry Press, 2005
- [9] Chen W, Zhang C, Song L, et al. A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae [J]. Journal of Microbiological Methods, 2009, 77(1): 41-47
- [10] Doan T Y, Obbard J P. Improved Nile Red staining of *nannochloropsis* sp. [J]. Journal of Applied Phycology, 2011, 23(5): 895-901
- [11] Simonetti O, Kempenaar J A, Ponc M, et al. Visualization of diffusion pathways across the stratum corneum of native and in-vitro-reconstructed epidermis by confocal laser scanning microscopy [J]. Archives of Dermatological Research, 1995, 287(5): 465-473
- [12] Deye J F, Berger T A, Anderson A G. Nile Red as a solvatochromic dye for measuring solvent strength in normal liquids and mixtures of normal liquids with supercritical and near critical fluids [J]. Analytical Chemistry, 1990, 62(6): 615-622
- [13] Huang G, Chen G, Chen F. Rapid screening method for lipid production in alga based on Nile red fluorescence [J]. Biomass and Bioenergy, 2009, 33(10): 1386-1392