

液相色谱-串联质谱法定量分析莱茵衣藻1,3-二油酸-2-棕榈酸甘油三酯

鲁媛晨 李艳华 余丽华 韩丹翔 马海燕

ANALYSIS OF 1, 3-DIOLEOYL-2-PALMITOYLGLYCEROL OF *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* BY ULTRA-HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY-TANDEM TRIPLE QUADRUPOLE MASS SPECTROMETRY

LU Yuan-Chen, LI Yan-Hua, YU Li-Hua, HAN Dan-Xiang, MA Hai-Yan

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7541/2022.2021.098>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

集胞藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 脂质组的分析

ANALYSIS OF LIPIDOMES OF THE *SYNECHOCYSTIS* SP. PCC 6803 CELLS

水生生物学报. 2021, 45(2): 376–386 <https://doi.org/10.7541/2021.2019.254>

饲料添加 β -1,3-葡聚糖对凡纳滨对虾生长性能、血清代谢、免疫相关基因表达和抗亚硝酸氮应激能力的影响

EFFECTS OF DIETARY β -1,3-GLUCAN ON GROWTH PERFORMANCE, SERUM METABOLITE, IMMUNE-RELATED GENE EXPRESSION AND RESISTANCE TO NITRITE STRESS IN *LITOPENAEUS VANNAMEI*

水生生物学报. 2021, 45(3): 593–600 <https://doi.org/10.7541/2021.2020.047>

光径及氮浓度对缺刻缘绿藻生长、油脂和花生四烯酸积累的影响

EFFECTS OF LIGHT-PATHs AND NITROGEN CONCENTRATION ON THE GROWTH, TOTAL LIPIDS AND ARACHIDONIC ACID ACCUMULATION OF *PARIETOCHLORIS INCISA*

水生生物学报. 2019, 43(3): 654–663 <https://doi.org/10.7541/2019.078>

不同氮源及氮浓度对真眼点藻纲微藻生长及油脂积累的影响

EFFECTS OF DIFFERENT NITROGEN SOURCE AND CONCENTRATION SUPPLIES ON THE GROWTH AND LIPID ACCUMULATION OF EUSTGMATOPHYCEAN MICROALGAE

水生生物学报. 2017, 41(3): 677–691 <https://doi.org/10.7541/2017.86>

大亚湾水域并基拟菱形藻的种类鉴定和产毒特征分析

THE IDENTIFICATION OF *PSEUDO-NITZSCHIA DECIPIENS* FROM DAYA BAY AND ANALYSIS OF ITS DOMOIC ACID PRODUCTION

水生生物学报. 2017, 41(5): 1118–1125 <https://doi.org/10.7541/2017.140>

中国沿海新报道的三种产毒拟菱形藻

THREE NEW KINDS OF TOXIC *PSEUDO-NITZSCHIA* SPECIES DERIVED FROM CHINA'S COAST

水生生物学报. 2018, 42(5): 1057–1065 <https://doi.org/10.7541/2018.130>

doi: 10.7541/2022.2021.098

液相色谱-串联质谱法定量分析莱茵衣藻 1,3-二油酸-2-棕榈酸甘油三酯

鲁媛晨^{1,2} 李艳华¹ 余丽华³ 韩丹翔^{1,2} 马海燕¹

(1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 北京大学工学院藻类
生物技术创新实验室, 北京 100871)

摘要: 研究建立了基于超高效液相色谱串联三重四级杆质谱技术的1,3-二油酸-2-棕榈酸甘油三酯(1,3-Dioleoyl-2-palmitoylglycerol, OPO)分析方法。在正离子模式下, 以[876>577]为定量离子对, 通过多反应监测模式(Multiple Reaction Monitoring, MRM)扫描, 采用内标法对OPO进行定量分析。对缺氧胁迫条件下一株野生型莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)cc-5325及其半乳糖基水解酶基因敲降突变体M08的OPO进行了定量分析, 研究结果发现莱茵衣藻中OPO在缺氧胁迫期间显著积累, 且不同遗传背景的莱茵衣藻OPO积累量不同。在缺氧第1至第3天, M08的OPO含量相较于cc-5325分别提高了3.70、3.04和2.74倍, M08的OPO产量相较于cc-5325分别提高了1.13、1.53和1.33倍, 说明通过遗传改造莱茵衣藻的某些脂质代谢途径相关基因可以增加其OPO含量, 因此莱茵衣藻具有改造成商业化油脂新食品原料的潜在应用价值。研究建立的功能脂质OPO的定量分析方法对进一步研究不同遗传改造的莱茵衣藻中OPO结构脂的检测提供了技术支持和分析基础。

关键词: 1,3-二油酸-2-棕榈酸甘油三酯; 超高效液相色谱串联三重四级杆质谱; 缺氧胁迫; 积累; 莱茵衣藻

中图分类号: Q946.4

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2022)07-1052-08



1,3-二油酸-2-棕榈酸甘油三酯(1,3-Dioleoyl-2-palmitoylglycerol, OPO)是母乳脂肪中含量最丰富的甘油三酯(Triacylglycerol, TAG)^[1]。大量研究证明, TAG的立体化学结构即脂肪酸在甘油骨架上的分布会影响其吸收代谢^[2,3]。人乳中这种独特的sn-2位为棕榈酸(C16:0), sn-1/3位为油酸(C18:1)的甘油三酯在婴儿的成长期间起着重要的作用, 可以促进脂肪酸和钙质的有效吸收, 保证婴儿的能量摄入, 并且可以改善婴儿便秘, 增加婴儿骨骼强度^[4-7]。2008年, 中华人民共和国卫生部公告批准OPO可以作为营养强化剂应用于婴儿配方奶粉中^[8], 预计未来我国婴幼儿奶粉市场对OPO纯品的年需求量可达3.6—13×10⁷ kg。

然而, 目前国内市面上的商业化OPO大多依赖进口, 并且是由一步酸解反应或两步醇解酯化反应酶法合成的^[9]。酶催化的过程提高了工艺的成本和

复杂性, 价格与质量之间的矛盾限制了OPO的应用程度^[10]。因此亟待开发出可以规模化生产的天然OPO产品, 如寻找新的富含OPO的油脂来源以满足市场需求, 同时解决依赖进口的问题。

莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)是研究脂质代谢的模式生物, 在环境胁迫的条件下可以积累大量的TAG作为储存脂质^[11]。分析发现其总脂肪酸组成绝大部分为C16和C18脂肪酸^[12]。此前, 有研究者发现, 在缺氧胁迫条件下莱茵衣藻细胞中90%以上的TAG sn-2位是C16脂肪酸, 且60%以上为C16:0, 而sn-1/3位上C16:0和C18:1的占比也接近30%^[13]。在莱茵衣藻中存在两条TAG从头合成的肯尼迪途径, 分别定位于内质网和质体, 其中溶血性磷脂酸酰基转移酶(Lysophosphatidic acid Acyltransferase, LPAAT)是负责TAG中 sn-2位酰基化的酶。当在莱茵衣藻中过表达莱茵衣藻质体定

收稿日期: 2021-05-17; 修订日期: 2021-10-26

基金项目: 科技部国家重点研发计划(2018YFA0902500)资助 [Supported by the National Key R & D Program of China (2018YFA0902500)]

作者简介: 鲁媛晨(1997—), 女, 硕士研究生; 研究方向为微藻分子与细胞生物学。E-mail: luyc@ihb.ac.cn

通信作者: 马海燕, 女, 助理研究员; 研究方向为微藻油脂代谢。E-mail: haiyanma@ihb.ac.cn

位的CrLPAAT1时, *sn*-2棕榈酸酯的含量明显提高^[14]; 而内质网定位的CrLPAAT2也更加偏好C16:0-CoA作为供体^[15]。以上研究暗示莱茵衣藻中可能存在天然合成OPO的通路。

由于细胞内甘油三酯的组成非常复杂, 针对特定结构TAG的检测一直是研究的难点, 目前国内还未出台有关OPO的标准检测方法。现有的针对OPO的检测方法主要通过气相色谱、高效液相色谱和气相色谱-质谱联用等。其中气相色谱法和气相色谱-质谱联用法无法将OPO和它的同分异构体OOP完全分开^[16, 17]。银离子色谱柱液相色谱法虽然可以使TAG同分异构体受到不同的束缚力分离开, 但稳定性差, 柱子使用寿命短^[18]。而液相色谱-质谱联用具有更高的灵敏度和精确度, 且不需对样品进行前处理, 在特定TAG分析上更具优势。超高效液相色谱(Ultra-High Performance Liquid Chromatography, UPLC)可以极大地提高色谱分离能力并缩短分析时间; 质谱(Mass Spectrometer, MS)仅利用特征碎片离子就可以进行分子结构分析, 其中三重四级杆分析器(Triple Quadrupole System, TQS)是进行单一 m/z 扫描最灵敏的仪器^[19]; 电喷雾电离(ESI)离子源在脂质分析中早有应用, 技术成熟。UPLC与MS联用仪可以对藻油样品中的OPO进行高效分析。

本研究首先建立了基于超高效液相色谱串联三重四级杆质谱(UPLC-MS/MS)的OPO分析方法, 并对缺氮胁迫条件下一株野生型莱茵衣藻cc-5325及其半乳糖基水解酶基因敲降突变体M08的OPO进行了定量分析, 为进一步研究莱茵衣藻中OPO的生物合成提供了技术支持, 也为产业化OPO生产提供了思路 and 方向。

1 材料与方法

1.1 莱茵衣藻藻种与培养方法

莱茵衣藻*C. reinhardtii* cc-5325(*cw15 mt⁺*)和莱茵衣藻半乳糖基水解酶(Galactosyl Hydrolase, CrGH)基因插入突变株LMJ.RY0402.088610均购自美国明尼苏达大学衣藻资源中心(*Chlamydomonas* Resource Center, <https://www.chlamycollection.org/>)。为方便描述, 上述藻株分别简称为cc-5325和M08。*Crgh*基因插入突变株M08的外源基因插入位点位于该基因内含子, 且在缺氮条件下, CrGH蛋白表达水平显著降低^[20]。

从TAP固体平板上挑取单藻落接种于20 mL新鲜TAP液体培养基中, 在光照强度40 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、温度25℃和转速140 r/min下培养至对数生长期。

以起始浓度 2.0×10^5 cells/mL转接至200 mL TAP液体培养基培养, 3d后更换为缺氮培养条件。以1000×g离心力离心藻液5min收集藻细胞, 用缺氮TAP培养基清洗藻泥1次, 重复离心后重悬藻泥至对应体积的缺氮TAP培养基中, 在同样条件下继续培养3d。从更换缺氮培养基开始, 每天取样进行细胞计数、干重测量、定量PCR检测及OPO含量分析。本实验设置3个生物学平行。

1.2 生长曲线和生物质测定

每天固定时刻取藻液1 mL, 添加鲁哥氏碘液(终浓度1%)固定藻细胞。使用血球计数板在普通光学显微镜下计数, 计算藻细胞密度。每份样品计数4—6次并计算平均值。

藻细胞的干重测定参考Yin等^[21]的105℃恒重法。在测定细胞干重前, 将玻璃微纤维滤膜(Whatman GF/C膜)编号, 于105℃过夜烘干, 置于真空干燥容器中冷却, 称量记录膜重 M_1 。每天固定时刻取藻液 $V=10$ mL, 使用GF/C膜抽滤去除培养基并用1 mol/L碳酸氢铵溶液清洗藻细胞1次。抽滤后的GF/C膜移至105℃过夜干燥, 次日置于真空干燥容器中冷却, 称量带有烘干藻细胞的滤膜并记录总重 M_2 , 计算藻细胞生物量 $\text{DW}(\text{g/mL})=(M_2-M_1)/V$ 。

1.3 实验试剂和标准品

三氯甲烷(色谱级)、乙酸铵(质谱级)和甲酸(质谱级)购自美国Sigma-Aldrich公司; 甲醇(质谱级)、乙腈(质谱级)和异丙醇(质谱级)购自德国Merck公司。色谱级试剂用于总脂提取, 质谱级试剂用于液质联用仪分析。

外标标准品OPO和内标标准品十七烷酸甘油三酯(C17:0/C17:0/C17:0)标准品均购自美国Sigma-Aldrich公司。

1.4 莱茵衣藻*Crgh*基因转录水平检测

RNA提取方法参照TransZol Up Plus RNA Kit试剂盒(ER501-01, TransGen Biotech)说明书。cDNA合成参照TransScript[®] All-in-One First-Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR试剂盒(AT341-01, TransGen Biotech)说明书。

采用相对定量法检测*Crgh*基因的转录水平, 内参基因选择 α -Tubulin。荧光定量使用的*Crgh*引物和内参基因引物为: *Crgh*-F 5'-ACTGGTGGGG CATCAACTACTAC-3'/*Crgh*-R 5'-GTCTCAGTGA TGTACATGGGAATG-3'; α -Tubulin-F 5'-CTCGCT TCGCTTTGACGGTG-3'/ α -Tubulin-R 5'-CGTGG TACGCCTTCTCGGC-3'。

qPCR扩增体系包括5 μL 2 × ChamQ Universal SYBR qPCR Green Master Mix(Q711, Vazyme),

10 $\mu\text{mol/L}$ 引物各 0.2 μL , 100 ng 稀释后的 cDNA 模板, 加入 ddH₂O 至反应体系为 10 μL 。qPCR 反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$, 600s; 95 $^{\circ}\text{C}$, 15s; 60 $^{\circ}\text{C}$, 30s; 72 $^{\circ}\text{C}$, 30s; 40 cycles; 95 $^{\circ}\text{C}$, 60s; 40 $^{\circ}\text{C}$, 60s; 65 $^{\circ}\text{C}$, 1s; 97 $^{\circ}\text{C}$, 1s; 37 $^{\circ}\text{C}$, 30s。

1.5 总脂提取

总脂提取参考 Yoon 等^[22]和 Guo 等^[23]的方法并在此基础上改进, 在收获的藻泥中加入 4 mL 甲醇: 氯仿: 甲酸(20:10:1, v/v/v), 室温下剧烈振荡 1h; 加入 2 mL 的 0.2 mol/L H₃PO₄ 与 1 mol/L KCl 混合溶液, 室温下剧烈振荡 5min; 1000 $\times$ g 离心力离心 10min 后, 用巴斯德玻璃吸管吸取下层有机层转移至新的玻璃样品瓶中; 另外吸取 1 mL 氯仿加至提取管中, 重复前两步操作萃取出残留的油脂; 氮气吹除有机溶剂, 藻油冻存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.6 标准溶液配制和标准曲线建立

将 OPO 标准品和 C17:0 甘油三酯标准品分别用氯仿溶解, 配制成终浓度为 2 mg/mL 的 OPO 标准溶液和 20 $\mu\text{g/mL}$ 的 C17:0 甘油三酯标准溶液, 保存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

定量吸取 2 mg/mL 的 OPO 标准溶液, 用氯仿: 甲醇(1:1, v/v) 溶液稀释成质量浓度为 500 $\mu\text{g/mL}$ 的 OPO 溶液, 然后由高至低逐级稀释得到质量浓度梯度为 250、125、62.5、31.25、15.625 和 7.8125 $\mu\text{g/mL}$ 的 OPO 系列标准工作液。每个浓度梯度的 OPO 标准工作液取 195 μL 并各加入 5 μL 20 $\mu\text{g/mL}$ 的 C17:0 甘油三酯, 使内标质量浓度为 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 。绘制 OPO 峰面积/内标物峰面积——OPO 浓度/内标物浓度的曲线, 计算内标标准曲线方程及相关系数。

1.7 藻油样品前处理

将提取的藻油复溶于氯仿: 甲醇(1:1, v/v) 溶液中, 每 10 mg 藻生物质对应 1 mL 氯仿: 甲醇溶液; 经孔径 0.22 μm 的有机相针式过滤器过滤; 取 195 μL 藻油滤液, 加入 5 μL 20 $\mu\text{g/mL}$ 的 C17:0 内标溶液, 充分振荡混匀后进行 UPLC-MS/MS 分析。

1.8 UPLC-MS/MS 法定量分析 OPO

仪器采用 ACQUITY 超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司)串联三重四级杆质谱(美国 Waters 公司)。向 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 OPO 标准溶液加入 10 mmol/L 乙酸铵, 以 10 $\mu\text{L/min}$ 流速直接进样于质谱的 ESI 源, 在正离子模式下, 对 OPO 的母离子 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ (m/z 876.80) 进行子离子扫描。高纯氮气作为雾化和干燥气体, 流速为 600 L/h, 去溶剂温度为 300 $^{\circ}\text{C}$ 。毛细管电压和锥孔电压分别为 3000 和 40 V, 碰撞能量 20 V。

色谱条件参考 Li 等^[24]的方法并在此基础上改

进。色谱分离采用 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.7 μm , 美国 Waters 公司); 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$; 进样量为 1 μL ; 流速为 0.2 mL/min; 流动相: A 相为甲醇: 乙腈: 水(19:19:2, v/v/v), B 相为异丙醇, 两者皆含有 0.1% 的甲酸和 10 mmol/L 的乙酸铵。梯度洗脱程序见表 1。

质谱检测的离子源为电喷雾离子源(Electrospray Ionization, ESI), 在正离子模式下, 采用多反应监测(Multiple Reaction Monitoring, MRM)模式, 以高纯氮气作为雾化和干燥气体, 流速为 800 L/h, 去溶剂温度为 450 $^{\circ}\text{C}$ 。毛细管电压和锥孔电压分别为 3000 和 40 V, 碰撞能量 20 V。

1.9 数据统计

采用 MassLynx V 4.1 软件(Waters)进行数据采集和分析, 采用 Microsoft Excel 2010 软件进行数据处理和图表制作, 实验结果以算术平均值 $\pm$ 平均绝对偏差表示, 采用 Student's *t*-test 对组间数据进行比较, $P<0.05$ 时, 认为差异显著。

2 结果

2.1 建立基于 UPLC-MS/MS 的 OPO 分析方法

在正离子模式下, 对 OPO 标品溶液直接进样进行全扫描, 得到其准分子离子为 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, 即母离子质荷比 m/z 为 876。对 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ (m/z 876) 进行子离子扫描, 如图 1 所示, 碎片离子 m/z 577.24 $[\text{M}+\text{NH}_4-299]^+$ 和 m/z 603.28 $[\text{M}+\text{NH}_4-273]^+$ 分别为中性丢失 299($\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2+\text{NH}_3$) 和中性丢失 273($\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2+\text{NH}_3$) 的碎片, 根据质荷比推算所丢失的碎片分别是 *sn*-1 或 *sn*-3 位上的油酸酰基和 *sn*-2 位上的棕榈酸酰基相关碎片。碎片离子 m/z 313.18 $[\text{R}_2\text{CO}+74]^+$ 和 m/z 339.08 $[\text{R}_x\text{CO}+74]^+$ ($x=1, 3$) 分别为丢失了 *sn*-1, 3 位酰基和 *sn*-1, 2 或 *sn*-2, 3 位酰基的碎片。碎片离子 m/z 264.99 $[\text{R}_2\text{CO}]^+$ ($x=1, 3$) 和 m/z 239.02 $[\text{R}_2\text{CO}]^+$ 分别为油酸酰基和棕榈酸酰基相关碎片。

根据 OPO 的子离子扫描图谱, 本研究选择了其中相对丰度最高的子离子 m/z 577.24 及其母离子

表 1 UPLC 梯度洗脱条件

Tab. 1 Gradient elution conditions of UPLC

时间 Time (min)	流动相 A Mobile phase A (%)	流动相 B Mobile phase B (%)
0.0	80.0	20.0
1.0	80.0	20.0
35.0	20.0	80.0
40.0	20.0	80.0
45.0	80.0	20.0
50.0	80.0	20.0

m/z 876.44作为OPO的MRM定量离子对。考虑到色谱的分离效率和样品中离子化效率,流动相中添加0.1%的甲酸和10 mmol/L的乙酸铵以获得理想的分离度、保留时间和峰型。在优化的质谱和色谱条件下,以MRM模式检测OPO标品的总离子流色谱图如图2所示,保留时间为21.25min,保留时间窗口为0.6min。

2.2 OPO标准曲线方程

根据已知浓度的OPO标品溶液建立标准曲线。对1.5中的系列梯度标准溶液进行超高效液相色谱-串联质谱测定,以OPO的浓度/内标物浓度为横坐标(X , $\mu\text{g/mL}$),标准品OPO与内标C17:0的峰面积之比为纵坐标(Y),进行线性回归分析,得到OPO的标准曲线方程为: $Y=0.0083X+0.2248$ (相关系数 $R^2=0.991$),如图3所示,结果显示OPO在7—250 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内线性关系良好,相关系数 R^2 大于0.99,表明该方法有较高的灵敏度和准确度,因此可采用此方法对样品中的OPO进行定量分析。

2.3 莱茵衣藻cc-5325中OPO的检测

通过上述研究建立的UPLC-MS/MS法对缺氮胁迫条件下的莱茵衣藻cc-5325细胞总脂粗提取物中的OPO进行检测,根据提取离子流图中OPO峰强度

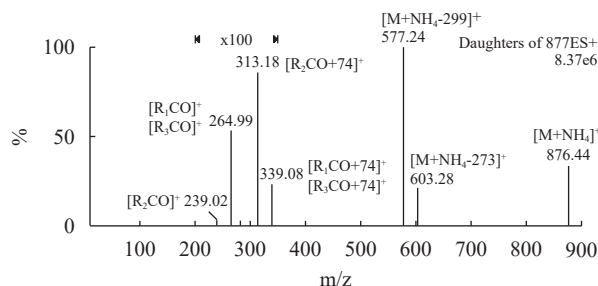


图1 OPO子离子扫描质谱图

Fig. 1 The product-ion scanning spectrum of the $[M + \text{NH}_4]^+$ ion of OPO

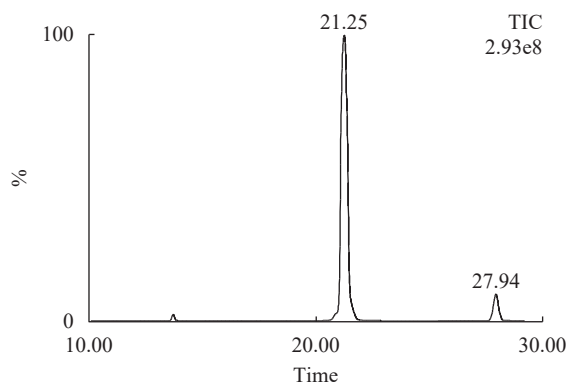


图2 OPO总离子流图

Fig. 2 Total ion chromatogram of OPO

可以判断cc-5325在缺氮条件下的OPO积累情况(图4)。结果显示,在正常培养条件下(N0),细胞内仅积累极少量的OPO(图4A),而在缺氮胁迫下(N1-N3)可以检测到OPO的特征离子峰,且峰强度远高于正常培养条件下OPO的峰强度,表明莱茵衣藻中的OPO在缺氮时大量积累。

2.4 莱茵衣藻野生型和Crgh突变株的性状表征

图5为遗传背景不同的莱茵衣藻野生型cc-5325和Crgh插入突变株M08的生长、生物质积累及Crgh基因表达性状表征。在正常培养条件下,M08的Crgh基因转录水平相较于野生型下调了85.6%,说明插入突变对M08的Crgh基因表达造成了影响(图5A),以上结果表明,突变株M08的Crgh基因在转录水平下调。

在缺氮胁迫条件下,莱茵衣藻细胞内会积累大量TAG。图5B和5C为野生型cc-5325和Crgh插入突变株M08在缺氮培养条件下的生长情况,结果显示,两者的生物量在缺氮培养期间持续积累,在缺氮第3天时达到最高,分别为0.60和0.38 mg/mL;两者的细胞密度在缺氮期间不再大幅变化,在缺氮第3天时分别保持在 0.85 和 1.41×10^5 cells/mL左右。整体来看,插入突变株M08的生物量在整个培养期间都低于cc-5325,而细胞密度却高于cc-5325,即cc-5325具有更高的单细胞干重。

2.5 莱茵衣藻野生型和Crgh突变株的OPO含量表征

通过前述研究建立的UPLC-MS/MS方法对cc-5325和M08缺氮条件下的OPO含量进行定量分析。结果如图6所示,在缺氮胁迫第1至第3天,野生型cc-5325的OPO含量分别为0.82%、1.05%和0.96%,突变株M08的OPO含量分别为3.84%、4.22%和3.59%,两者的OPO含量变化呈现出先升高后降低的趋势,都在缺氮第2天达到了最高。M08的OPO含量始终高于野生型cc-5325,且在缺氮的第

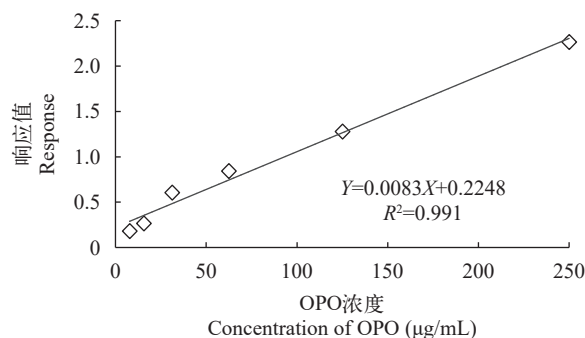


图3 OPO的标准曲线方程

Fig. 3 Standard curves of OPO

2和第3天达到了显著($P<0.05$), 相较于野生型cc-5325分别提高了3.70、3.04和2.74倍。在缺氮胁迫第1至第3天, cc-5325的OPO产量分别达到了3.76、5.25和5.90 $\mu\text{g/mL}$, M08的OPO产量分别达到了8.01、13.26和13.73 $\mu\text{g/mL}$, 两者的OPO产量都在缺氮第3天时达到了最高。插入突变株M08的OPO产量也在整个缺氮胁迫期间显著高于野生型cc-5325($P<0.05$), 相较于cc-5325分别提高了1.13、1.53和1.33倍。

3 讨论

3.1 UPLC-MS/MS法定量定性OPO

本文通过优化高效液相色谱以及质谱条件, 建立了适用于分析藻油中OPO含量的UPLC-MS/MS定量定性方法。结果表明, 该方法可以有效地鉴定和定量分析细胞中的OPO, 同时该方法也将适用于

分析其他特定酰基组成的TAG。TAG是一种中性脂质, 一般的电离技术很难让TAG带电荷, 本研究采用的ESI离子源可以使TAG分子在离子对试剂的辅助下进行很好的电离^[25], 目前较常用的离子对试剂是金属锂化合物或钠盐, 形成母离子加合物 $[M + \text{Li}]^+$ 或者 $[M + \text{Na}]^+$, 但是金属离子会污染质谱系统从而导致检测器灵敏度降低。因此在本研究中, 选择了较理想的对质谱友好且易挥发的乙酸铵作为离子对试剂, 形成母离子加合物 $[M + \text{NH}_4]^+$, 同时添加0.1%的甲酸改善分离度、保留时间和峰型。在子离子模式中, 母离子 $[M + \text{NH}_4]^+$ 经过碰撞可分解产生 $[M + \text{NH}_4 - \text{RCOONH}_4]^+$ (DAG^+)和 $[\text{RCO}]^+$ 特征碎片离子, $[M + \text{NH}_4]^+$ 、 DAG^+ 和 $[\text{RCO}]^+$ 的信号对于TAG分子的定性和定量十分重要^[26]。本文中所建立的方法正是基于此原理, 在电子碰撞作用下, TAG会产生三种脂肪酸酰基碎片和三种 DAG^+ 特征碎片, 分别为 $[\text{R}_1\text{CO}]^+$ 、 $[\text{R}_2\text{CO}]^+$ 、 $[\text{R}_3\text{CO}]^+$ 和 sn-1,2-DAG^+ 、 sn-2,3-DAG^+ 、 sn-1,3-DAG^+ , 由于OPO的 sn-1/3 位上具有相同的脂肪酸组成, 所以OPO会产生两种脂肪酸酰基碎片和两种 DAG^+ 特征碎片。甘油骨架上断裂一个 sn-2 位脂肪酸所需要的能量要高于断裂一个 sn-1/3 位的脂肪酸, 因此 sn-1,2-DAG^+ 和 sn-2,3-DAG^+ 的比例要大于 sn-1,3-DAG^+ , 而 sn-2 脂肪酸所对应的 $[\text{R}_2\text{CO}]^+$ 碎片离子的丰度值更低, 通过这种方式可以判断TAG上脂肪酸链的组成和位置, 从而完成TAG的定性^[27]。UPLC-MS/MS方法不需要对样品进行衍生处理, 具有重复性好, 检测方便快捷, 精度高等优点。

本研究建立的方法对OPO标品进行了定性并建立了OPO的定量标准曲线(图1—3), 结果显示在5—250 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内OPO线性关系良好, 相关系数可以达到0.99以上, 表明本方法能够准确地对样品中的OPO含量进行定量。利用该方法对莱茵

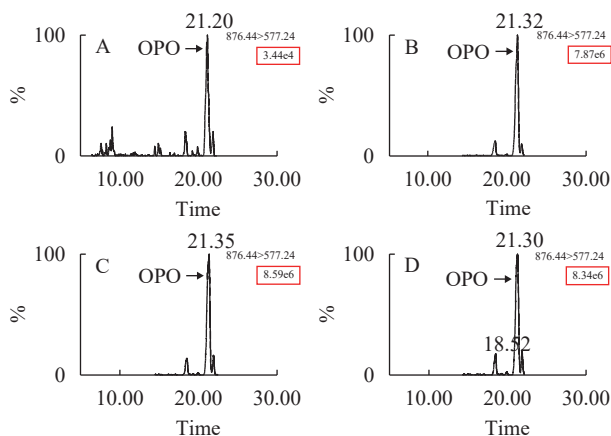


图4 MRM检测模式下特征离子扫描鉴定OPO

Fig. 4 Identification of OPO by characteristic ion scanning detected by MRM

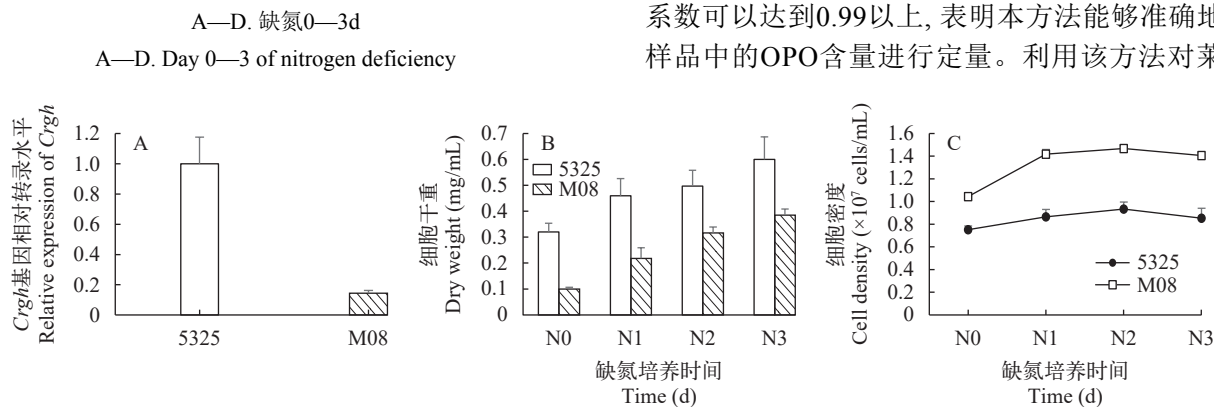


图5 莱茵衣藻野生型cc-5325和Crgh突变株M08的性状表征

Fig. 5 Characterization of wild-type cc-5325 and *Crgh* mutant strain M08

A. 正常培养条件下的Crgh基因转录水平; B. 缺氮培养时的细胞干重; C. 缺氮培养时的细胞密度

A. The expression level of *Crgh* gene under normal culture conditions; B. The dry weight under nitrogen deprived condition; C. The cell density under nitrogen deprived condition

衣藻野生型cc-5325中提取的藻油进行了分析,发现总离子流图的特征离子峰保留时间十分稳定(图4),表明本研究方法的重现性较好、稳定性和可靠性高。缺氮条件下的莱茵衣藻细胞中可以检测到天然OPO,外标法定量分析发现其含量可以达到干重的1.05%,这证实了莱茵衣藻作为OPO合成细胞工厂的应用潜力和商业化价值。该方法可以应用于研究不同遗传改造的莱茵衣藻OPO合成情况的动态变化,从而为进一步开发OPO新油脂来源提供方向。

3.2 不同遗传背景莱茵衣藻细胞内的OPO变化

莱茵衣藻在胁迫的环境条件下会积累大量的TAG,这个过程伴随着光合膜脂(类囊体膜和叶绿体膜上的脂质)的降解^[11]。不同遗传背景的莱茵衣藻在生长速率、碳流分配等方面存在着差异,TAG合成通路及其关联代谢途径的基因的突变极有可能影响OPO的含量。本研究选择了莱茵衣藻野生型cc-5325和Crgh缺陷突变株M08定量分析其细胞内的OPO合成情况,发现在由正常培养转换为缺氮培养的过程中,两株藻株的OPO含量都在初始阶段急剧增加,随后基本稳定,OPO产量在此过程中持续积累,而M08的OPO积累在缺氮条件下远高于野生型cc-5325。研究发现,在胁迫条件下,莱茵衣藻Crgh基因表达和蛋白水平均有上调,半乳糖基水解酶介导了光合膜脂向TAG的转化,由于Crgh的插入突变,M08的TAG积累会低于其野生型cc-5325^[20]。而本研究发现M08的OPO含量和产量均较其野生型cc-5325有显著提高,表明莱茵衣藻中OPO与总TAG的积累不是简单地正相关,其背后还有一些复杂的未知机制。Crgh在高等植物如拟南芥中的同源基因AtSFR2可以利用糖脂合成二脂酰基甘油(Diacylglycerol, DAG)^[28],DAG是肯尼迪途径中合

成TAG的前体产物。故推测Crgh在莱茵衣藻中也行使相同的功能,M08突变株中该基因的缺陷可能会导致缺氮条件下质体肯尼迪途径TAG合成的降低。OPO含量的升高可能是由于其合成主要由位于内质网的真核肯尼迪途径贡献。但该假说还需要进一步实验验证。

通过遗传改造莱茵衣藻油脂代谢途径的某些相关基因,如Crgh,的确会对莱茵衣藻细胞内sn-2棕榈酸酯如OPO的合成造成影响。此前,有研究者利用代谢工程手段对拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)种子的油脂代谢途径进行遗传操作,在种子中过表达偏好C16:0-CoA的欧洲油菜(*Brassica napus*)Bnlpaat1基因,随后敲降了拟南芥真核途径的原生Atlpaat2基因,并敲除了会使磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine, PC)和甘油二酯(Diacylglycerol, DAG)互变的磷脂酰胆碱:二酰基甘油胆碱磷酸转移酶(PC:DAG cholinephosphotransferase, PDCT)Atpdct基因,最终使得TAG中sn-2棕榈酸酯含量提高了20多倍^[29],这说明利用功能已知的靶基因去理性改造油脂代谢途径可以实现特定立体化学结构的TAG(sn-2棕榈酸酯)的大量积累,使其具有成为细胞工厂的潜力。莱茵衣藻质体来源的CrLPAAT1及内质网来源的CrLPAAT2对棕榈酸的底物偏好性使得其作为OPO细胞工厂的优势更加突出^[14,15]。

本研究为定量分析微藻中特定结构的TAG提供了一种高效、准确和便捷的技术手段,并证实了莱茵衣藻作为OPO细胞工厂的可行性。作为一种安全级微生物,莱茵衣藻底盘细胞的发展空间巨大,在胁迫条件下如何精准地调控微藻细胞内的碳流,将固碳网络向目的产物的方向延伸,加强莱茵衣藻中OPO的积累是未来重点研究的方向。脂质合成途径的关键酶基因作为潜在靶点,对其的进一步研究将帮助加速构建莱茵衣藻绿色生物制造平台。

参考文献:

- [1] Kallio H, Nylund M, Bostrom P, *et al.* Triacylglycerol regioisomers in human milk resolved with an algorithmic novel electrospray ionization tandem mass spectrometry method [J]. *Food Chemistry*, 2017(233): 351-360.
- [2] Mu H, Høy C E. The digestion of dietary triacylglycerols [J]. *Progress in Lipid Research*, 2004, 43(2): 105-133.
- [3] Mu H, Porsgaard T. The metabolism of structured triacylglycerols [J]. *Progress in Lipid Research*, 2005, 44(6): 430-448.
- [4] Kennedy K, Fewtrell M S, Morley R, *et al.* Double-blind, randomized trial of a synthetic triacylglycerol in formula-

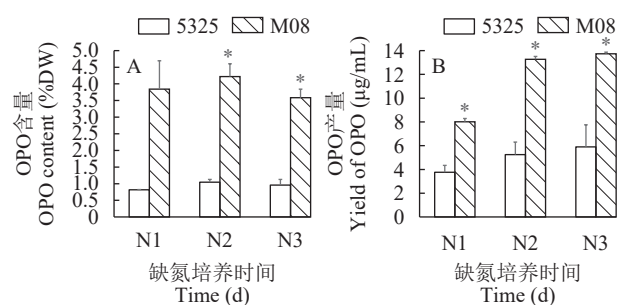


图6 缺氮培养时莱茵衣藻野生型cc-5325和Crgh突变株M08的OPO积累(* $P<0.05$)

Fig. 6 The accumulation of OPO in wild-type cc-5325 and Crgh mutant strain M08 under nitrogen deprivation (* $P<0.05$)

A. OPO含量; B. OPO产量

A. The content of OPO (% dry weight); B. The yield of OPO

- fed term infants: effects on stool biochemistry, stool characteristics, and bone mineralization [J]. *American Journal of Clinical Nutrition*, 1999, **70**(5): 920-927.
- [5] Decker E A. The role of stereospecific saturated fatty acid positions on lipid nutrition [J]. *Nutrition Reviews*, 1996, **54**(4): 108-110.
- [6] Béghin L, Marchandise X, Lien E, *et al.* Growth, stool consistency and bone mineral content in healthy term infants fed *sn*-2-palmitate-enriched starter infant formula: A randomized, double-blind, multicentre clinical trial [J]. *Clinical Nutrition*, 2019, **38**(3): 1023-1030.
- [7] Innis S M. Dietary Triacylglycerol Structure and Its Role in Infant Nutrition [J]. *Advances in Nutrition*, 2011, **2**(3): 275-283.
- [8] National Health Commission of People's Republic of China. Announcement of the National Health Commission of People's Republic of China [J]. *Gazette of the National Health Commission of People's Republic of China*, 2008(7): 6-19. [中华人民共和国卫生部. 中华人民共和国卫生部公告(2008年 第13号) [J]. 中华人民共和国卫生部公报, 2008(7): 6-19.]
- [9] Zou L, Pande G, Akoh C C. Infant formula fat analogs and human milk fat: new focus on infant developmental needs [J]. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2016(7): 139-165.
- [10] Ferreira-dias S, Tecelão C. Human milk fat substitutes: Advances and constraints of enzyme-catalyzed production [J]. *Lipid Technology*, 2014, **26**(8): 183-186.
- [11] Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, *et al.* Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances [J]. *Plant Journal*, 2008, **54**(4): 621-639.
- [12] Li-Beisson Y, Beisson F, Riekhof W. Metabolism of acyl-lipids in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Plant Journal*, 2015, **82**(3): 504-522.
- [13] Fan J, Andre C, Xu C. A chloroplast pathway for the de novo biosynthesis of triacylglycerol in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *FEBS Letters*, 2011, **585**(12): 1985-1991.
- [14] Yamaoka Y, Achard D, Jang S, *et al.* Identification of a *Chlamydomonas* plastidial 2-lysophosphatidic acid acyl-transferase and its use to engineer microalgae with increased oil content [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2016, **14**(11): 2158-2167.
- [15] Kim Y, Terng E L, Riekhof W R, *et al.* Endoplasmic reticulum acyltransferase with prokaryotic substrate preference contributes to triacylglycerol assembly in *Chlamydomonas* [J]. *Proceedings of the National Academy of the Sciences of the United States of America*, 2018, **115**(7): 1652-1657.
- [16] Zhao H Z, Lu Z X, Bie X M, *et al.* Analysis of positional distribution of fatty acids in triacylglycerols from lard by high performance liquid chromatography [J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2005, **23**(2): 142-145. [赵海珍, 陆兆新, 别小妹, 等. 高效液相色谱法测定猪油甘油三酯中的脂肪酸位置分布 [J]. 色谱, 2005, **23**(2): 142-145.]
- [17] Han R L, Ma J, Zhang J C, *et al.* Determination of *sn*-2 fatty acid in triglyceride of milk by HPLC-ELSD and GC-MS [J]. *Analysis and Testing Technology and Instruments*, 2009, **15**(1): 30-34. [韩瑞丽, 马健, 张佳程, 等. HPLC-ELSD与GC-MS法测定牛乳甘油三酯 sn -2位脂肪酸组成 [J]. 分析测试技术与仪器, 2009, **15**(1): 30-34.]
- [18] Wei W, Tu H Y, Wang H Q, *et al.* Analysis of 1, 3-Dioleoyl-2-Palmitoylglycerol by Silver-Ion HPLC [J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2014, **29**(1): 105-109, 115. [王伟, 屠海云, 王红青, 等. Silver-ion HPLC测定1, 3-二油酸-2-棕榈酸三酰甘油的含量 [J]. 中国粮油学报, 2014, **29**(1): 105-109, 115.]
- [19] Wang X G. Human Milk Fat and Human Milk Fat Substitutes [M]. Beijing: Science Press, 2018. [王兴国. 人乳脂及人乳替代脂 [M]. 北京: 科学出版社, 2018.]
- [20] Gu X, Cao L, Wu X, *et al.* A lipid bodies-associated galactosyl hydrolase is involved in triacylglycerol biosynthesis and galactolipid turnover in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Plants (Basel)*, 2021, **10**(4): 675.
- [21] Yin Y, Huang L, Hu Q, *et al.* Effects of light-paths and nitrogen concentration on the growth, total lipids and arachidonic acid accumulation of *Parietochloris incisa* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2019, **43**(3): 654-663. [印尤强, 黄罗冬, 胡强, 等. 光径及氮浓度对缺刻缘绿藻生长、油脂和花生四烯酸积累的影响 [J]. 水生生物学报, 2019, **43**(3): 654-663.]
- [22] Yoon K, Han D, Li Y, *et al.* Phospholipid: diacylglycerol acyltransferase is a multifunctional enzyme involved in membrane lipid turnover and degradation while synthesizing triacylglycerol in the unicellular green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Plant Cell*, 2012, **24**(9): 3708-3724.
- [23] Guo X, Li Y, Han D. Analysis of lipidomes of the *Synechocystis* sp. PCC 6803 cells [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2021, **45**(2): 376-386. [郭晓烨, 李艳华, 韩丹翔. 集胞藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803脂组分的分析 [J]. 水生生物学报, 2021, **45**(2): 376-386.]
- [24] Li J, Han D, Wang D, *et al.* Choreography of transcriptomes and lipidomes of *Nannochloropsis* reveals the mechanisms of oil synthesis in microalgae [J]. *The Plant Cell*, 2014, **26**(4): 1645-1665.
- [25] Yi F. Analysis of functional lipids [D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2014. [易芳. 功能性脂质分析方法的研究 [D]. 北京: 北京化工大学, 2014.]
- [26] Hvattum E. Analysis of triacylglycerols with non-aqueous reversed-phase liquid chromatography and positive ion electrospray tandem mass spectrometry [J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2001, **15**(3): 187-190.
- [27] Mottram H R, Woodbury S E, Evershed R P. Identifica-

- tion of triacylglycerol positional isomers present in vegetable oils by high performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry [J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1997, **11**(12): 1240-1252.
- [28] Moellering E R, Muthan B, Benning C. Freezing tolerance in plants requires lipid remodeling at the outer chloroplast membrane [J]. *Science*, 2010, **330**(6001): 226-228.
- [29] Van Erp H, Bryant F M, Martin-Moreno J, *et al.* Engineering the stereoisomeric structure of seed oil to mimic human milk fat [J]. *Proceedings of the National Academy of the Sciences of the United States of America*, 2019, **116**(42): 20947-20952.

ANALYSIS OF 1, 3-DIOLEOYL-2-PALMITOYLGLYCEROL OF *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* BY ULTRA-HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY-TANDEM TRIPLE QUADRUPOLE MASS SPECTROMETRY

LU Yuan-Chen^{1,2}, LI Yan-Hua¹, YU Li-Hua³, HAN Dan-Xiang^{1,2} and MA Hai-Yan¹

(1. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Laboratory for Algae Biotechnology & Innovation, College of Engineering, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract: In human breast milk, over 50% energy is in the form of triacylglycerol (TAG), which is dominated by a functional lipid, 1,3-dioleoyl-2-palmitoyl-glycerol (OPO). A number of studies have shown that OPO possesses particular stereospecific arrangement of acyl chains which is essential for the absorption of fatty acids in infant gut. However, most of the commercial OPOs in the domestic market rely on imports currently. The contradiction between price and quality has restricted the wide application of OPO in the infant formula. *Chlamydomonas reinhardtii* is a model organism for investigating lipid metabolism, and numerous studies suggested that *C. reinhardtii* is able to accumulate OPO under stress conditions such as nitrogen deficiency. This study established a method to quantify 1,3-dioleoyl-2-palmitoyl-glycerol OPO by employing ultra-high performance liquid chromatography coupled with tandem triple quadrupole mass spectrometry. The OPO content was quantified with the internal standard method through multi-reaction monitoring mode (MRM) under positive mode, and the selected ion-pair was [876>577]. The OPO production was investigated in the wild-type *C. reinhardtii* strain cc-5325 and the galactosyl hydrolase gene mutant strain M08. The results showed that the content of OPO in *C. reinhardtii* accumulated greatly under nitrogen deprivation with great difference in the two strains. Compared to cc-5325, from day1 to day3, nitrogen deprivation increased the content of OPO of M08 by 3.70, 3.04 and 2.74 times, and it increased the yield of OPO of M08 by 1.13, 1.53 and 1.33 times, respectively. These data suggest that modifying lipid metabolic pathway can increase the production of OPO in *C. reinhardtii*. Therefore, *C. reinhardtii* has potential as a new food ingredient for commercial oils. This study provide technical support and basis to increase OPO production in different genetically engineered *C. reinhardtii*.

Key words: 1,3-Dioleoyl-2-Palmitoylglycerol; UPLC-MS/MS; Nitrogen Deprivation; Accumulation; *Chlamydomonas reinhardtii*