

研究简报

葡萄藻三个品系脂类物质含量的比较研究

许常虹 俞敏娟

(中国科学院水生生物研究所, 武汉)

COMPARATIVE STUDY OF NEUTRAL LIPID CONTENTS FROM THREE STRAINS OF *BOTRYOCOCCUS BRAUNII*

Xu Changhung and Yu Minjuan

(Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan)

关键词 葡萄藻 (YNb-1A, YNb-1B 和 YNb-1C), 中性脂类物质, 尼罗红

Key Words *Botryococcus braunii*, Neutral lipid contents, Nile Red fluorescent dye

葡萄藻作为一种新的再生能源的研究, 已引起了不少学者的重视。其中较为关键的是对葡萄藻所含脂类物质的研究。过去通常采用重量法及各类色谱法测定植物中的脂类物质^[1,2,6,8]。这些方法不但繁琐, 而且均需一个较长时间的提取过程。近年来国外采用一种新型染料——尼罗红, 并结合荧光显微分光光度法可以直接检测出细胞中脂类含量^[3], 其方法较为灵敏、简便。本项研究利用尼罗红荧光测定法对采自云南的葡萄藻的三个品系进行了脂类物质的测定, 比较它们所含脂类物质的含量及不同生长时期藻体所含脂类物质含量的变化, 并与常用的重量法进行比较, 确认了应用尼罗红染色法测定藻类中性脂类含量的可行性, 并讨论了用“尼罗红荧光法”筛选含高脂类新品系的可能性。

材料和方法

藻种 葡萄藻, 1987年采自云南、抚仙湖品系 (YNb-1A, YNb-1B 和 YNb-1C)。

试剂 0.4 μ g/ml 尼罗红乙醇液 0.2 mol/L 的磷酸缓冲液 (pH7.0); 3% 的醋酸液。

培养 单种分离培养和 500ml 的批量培养, 采用 Chu 13 培养基和 Chu 13 × 4 培养基, 温度为 23—27°C, 光强为 4 000—5 000lx, 培养时间为 7—28 天。

染色 用 3% 醋酸固定葡萄藻样品 (藻浓缩液: 固定液为 1:1 V/V)。3 天后, 除去固定液后用 1:1 的尼罗红染色液和磷酸缓冲液染色, 10 分钟后用磷酸缓冲液洗 3 遍, 最后制片。

荧光测量 将制好的样片用荧光显微分光光度计 (UNIVAR (Reichert-Jung, Austria)) 测量。测量时用落射照明用泵灯 (CS 200-4 Philips)。物镜 40×、目镜 10×。激发光波为 450—459nm, 发射光波: 600nm。每个样品分别测 55 个细胞, 并重复。此项测定由武汉大学测试中心承担。

脂类提取 (重量法) 将葡萄藻样品 YNb-1A, YNb-1B 和 YNb-1C 冰冻干燥后称重, 用己烷抽提 3 次, 过滤, 除去己烷溶剂, 再加 1:10 的三氯甲烷和丙酮溶液 (按 1:10 的体积比), 置 4°C 低温下 48 小时后离心, 除去残滓, 干燥, 称重。

1989 年 9 月 18 日收到。

结 果

1. 三种不同品系的葡萄藻脂类物质的含量

尼罗红荧光法 用荧光显微分光光度计测定葡萄藻 YNb-1A, YNb-1B 和 YNb-1C 3 个品系的中性脂类含量的结果为 YNb-1C 的脂类含量最高, YNb-1A 和 YNb-1B 的脂类含量均明显低于 YNb-1C, 而且后两者间相差不明显(图 1)。经 F 值检验和 Duncan 检验证明, YNb-1C 与 YNb-1A 及 YNb-1C 与 YNb-1B 间的脂类含量具有极显著的差异, 而 YNb-1A 与 YNb-1B 之间差异不显著。

重量法 我们以重量法作对比, 测定了这 3 个品系的脂类含量。从表 1 可见, YNb-1C 的脂类含量仍居 3 个品系的首位, 明显高于品系 YNb-1A 和 YNb-1B, 其含量达到了藻体干重的 43.37%。而 YNb-1A 和 YNb-1B 之间无明显差别, 其脂类含量分别为 39.95% 和 38.96%。结果与荧光测定的结果一致。

由此可见, 葡萄藻中, 品系不同, 它们所含有的脂类物质的量也不同, 实验证明了尼罗红荧光法测定葡萄藻的脂类含量是可行的。

2. YNb-1C 葡萄藻品系脂类含量的变化

用尼罗红荧光法测定了脂类含量较高的品系 YNb-1C 在不同的生长时期中的脂类物质含量的变化。从图 2 可见 YNb-1C 的脂类含量随着生长时间的延长而不断增加, 到 14—21 天时达到最高, 随着时间进一步延长又由高点明显下降。经 F 值检验和 Duncan 检验表明, YNb-1C 的脂类含量在不同的生长时期是明显不同的, 只有在生长初期和生长期末所含脂类的量无显著差异。

讨 论

尼罗红 (Nile Red) 是一种具较强荧光特性的染料。它具有较强的疏水性, 依溶剂疏水程度不同呈现不同的荧光颜色(从金黄色到红色)。但在水溶剂中, 它的荧光完全淬灭。另外尼罗红具有光化学稳定性。它特有的激发光波长范围可以排除一些生物分子对测定的干扰。已经作为一种独特的方法用于中性脂类等物质的测定^[3, 13]。

本项研究的结果证明, 尼罗红荧光法可以直接用于葡萄藻的脂类测定, 是一种微量、迅速灵敏的有效方法。它既可以测定葡萄藻不同品系的脂类物质的含量, 又可以测定葡萄藻在不同生长过

程中体内脂类含量的变化。它的确是一种比较理想的中性脂类物质的测定方法。目前, 关于葡萄藻脂类的绝对量以及整个群体整体脂类的测量尚需进一步探索。

尼罗红荧光法的应用已经从不同的方面显出它的优越性^[3-5, 13]。我们从尼罗红荧光法测定葡

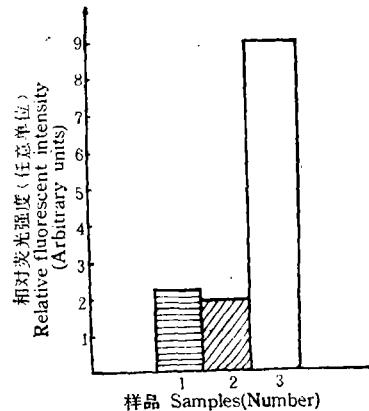


图 1 3 种不同葡萄藻品系的脂类含量

Fig. 1 The Contents of neutral lipids from three strains of *Botryococcus braunii* (quantitated by spectromicroscope)

■—YNb-1A; ▨—YNb-1B;
□—YNb-1C

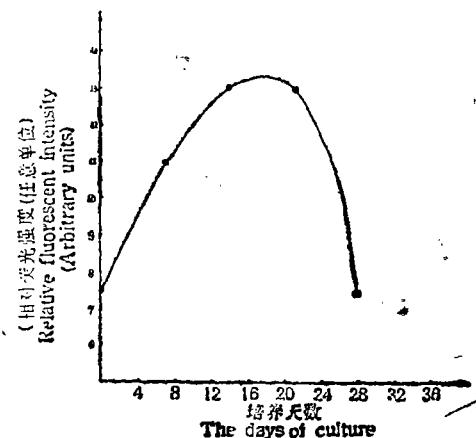


图 2 葡萄藻 YNb-1C 品系中脂类含量变化

Fig. 2 The contents of neutral lipids from *Botryococcus braunii* strain YNb-1C in various periods of growth

萄藻细胞中脂类含量的实验证明, 尼罗红可以直接作为葡萄藻新品系筛选的特异指标, 使葡萄藻

的筛选过程更加迅速准确。为此,尼罗红不仅作为疏水性分子的探针,而且可以作为脂类物质含量的一种指标,用以含多量脂类物质的微型生物

新品种的筛选,为探索和研究新的再生能源提供了捷径。

表 1 3 种不同品系的葡萄藻的脂类含量(重量法)

Tab.1 The contents of neutral lipids from three different strains of *Botryococcus braunii* (Gravimetry)

品系 Strain (number)	YNb-1A	YNb-1B	YNb-1C
样品 Samples			
藻干重(克) Dry weight(g)	0.1126	0.6548	0.2445
脂类提取物(克) Neutral lipid (g)	0.0450	0.2551	0.1068
总脂类百分含量(%) Total neutral lipid (as% dry weight)	39.95	38.96	43.37

参 考 文 献

- [1] 许常虹,俞敏娟,1988。成油藻——布郎葡萄藻的研究。水生生物学报,12(1): 90-93。
- [2] Ben-Amotz, A., Tonadene, T. G. & Thomas, W. H., 1985. Chemical profile of selected species of Microalgae with emphasis on lipid. *J. Phycol.*, 21: 72—81.
- [3] Cooksey, K. E., Guckert, J. B., Williams, S. A. & Callis P. R., 1987. Fluorometric determination of the neutral lipid content of Microalgal cells using Nile Red. *J. Microbiol. Methods*, 6(6): 333—345.
- [4] Fowler, S. D. & Greenspan, P., 1985. Application of Nile Red, a Fluorescent Hydrophobic Probe, for the detection of neutral lipid deposits in tissue sections: Comparison with Oil Red O. *J. Histochem. and Cytochem.*, 33(8): 833—836.
- [5] Greenspan, P., Mayer, E. P. & Fowler, S. D., 1985. Nile Red: A selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J. Cell Biol.*, 100: 965—973.
- [6] Hillen, L. W. & Wake, L. V., 1979. 'Solar-Oil'—Liquid hydrocarbon fuels from solar energy via algae. Air National Conference, Newcastle, 5—9 Feb: pp. 18—25.
- [7] Sackett, D. L. & Wolfe, J., 1987. Nile Red as a polarity-sensitive fluorescent probe of hydrophobic protein surfaces. *Analytical Biochem.*, 167: 228—234.
- [8] Walf, F. R., 1983. *Botryococcus braunii*: an unusual hydrocarbon-producing alga. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 8(3): 249—260.