

DOI:10.7524/j.issn.0254-6108.2013.08.011

## 采用尼罗红荧光探针对微藻中油脂的定量测定\*

梁文艳\*\* 张元春 曹敬灿 汪丽 于建

(北京林业大学环境科学与工程学院, 北京, 100083)

**摘要** 以尼罗红为荧光探针,对小球藻油脂含量的定量分析条件进行了研究.测定中,使用48孔酶标仪作为荧光检测器.研究显示,当荧光激发光波长为485 nm,发射光波长为580 nm时,适用于测定微藻中的中性油脂含量.当二甲基亚砜终浓度为20%,尼罗红终浓度为 $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,藻液与尼罗红置于40℃暗处反应5 min后,能够获得最大的相对荧光测定值.当藻液光密度 $\text{OD}_{680}$ 在0.61至1.73时,藻液油脂含量与尼罗红荧光测定值呈现良好的线性关系,相关系数 $R^2$ 为0.9836,可以通过尼罗红荧光值的测定推算油脂的含量.

**关键词** 尼罗红, 油脂, 微藻, 定量.

由于化石燃料开采量的局限性,以及二氧化碳对全球气候变化的影响,生物质能源受到广泛关注.其中,微藻由于生长速度快、占用土地面积小、油脂含量较高(三酰甘油能占30%—70%)而独具优势<sup>[1]</sup>.对于微藻油脂的定量分析,目前使用较多的是基于Bligh等人的方法<sup>[2]</sup>,采用特定有机溶剂提取和重量法进行测定,或者采用高效液相<sup>[3]</sup>、气相色谱法<sup>[4]</sup>、红外分光光度法<sup>[5]</sup>等测定,但是这些方法操作比较繁琐、耗时.

尼罗红(9-diethylamino-5-benzo[ $\alpha$ ]phenoxazinone)是一种脂溶性的荧光染料,能够与活体细胞内的中性脂或其他脂类物质发生反应,而被用于微生物、细菌、酵母、浮游植物等细胞中脂类的定性和定量分析<sup>[6-7]</sup>.尼罗红最早用于产油藻种的筛选<sup>[8]</sup>,细胞中的油滴被尼罗红染色后,在荧光显微镜下发出金黄色荧光.在定量分析中,尼罗红作为荧光探针,在进入藻细胞与油脂反应后,可以采用荧光分光光度计<sup>[7]</sup>、酶标仪<sup>[9]</sup>、或流式细胞仪<sup>[10]</sup>等仪器进行定量测定.但是尼罗红对藻类油脂的定量测定受到藻种的影响,并不是所有藻类都适用于尼罗红荧光定量分析<sup>[9]</sup>.绿藻由于细胞壁较厚,尼罗红不易与细胞内油脂发生反应,有时难于测定.

本文选择从天然水体筛选出的产油绿藻—小球藻作为研究对象,采用酶标仪作为检测仪器,研究了激发光波长、尼罗红浓度、二甲基亚砜(DMSO)浓度、反应时间、反应温度对微藻油脂测定的影响,分析了微藻油脂含量与尼罗红相对荧光测定值之间的线性关系,为小球藻油脂含量的测定提供了一个简便、快速的方法.

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

尼罗红(Nile Red, NR)购自美国MP Biomedicals公司. DMSO、丙酮购自美国Pharmco-Aaper公司. 试剂采用Milli-Q制备的超纯水( $18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ )进行配制. 48孔酶标板(Costar 3548 48)购自美国Costar公司. 其他化学药剂均为分析纯试剂.

### 1.2 实验仪器

美国BioTek Synergy HT多功能酶标仪; SIMAminco® 3000 UV/Vis紫外可见分光光度计; Labnet Orbit™ P2酶标板振荡器.

2012年11月8日收稿.

\* 中央高校基本科研业务费专项(BLYX200909); 国家水体污染控制与治理科技重大专项(2012ZX07307-001-006)资助.

\*\* 通讯联系人, E-mail: lwybjfu@126.com

### 1.3 藻的培养

小球藻 *Chlorella vulgaris* 来自美国纽约州立大学生化实验室所分离的藻种. 培养基组成为 ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ): 23.75  $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、49.25  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、19  $\text{MgCl}_2$ 、17.5  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、85  $\text{NaNO}_3$ 、7.45L EDTA-2Na、5.25L  $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、6.18L  $\text{H}_3\text{BO}_3$ 、2.3  $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、6.65  $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、0.05  $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.0035  $\text{CuCl}_2\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ . pH 7.4—7.6. 培养光照条件为 2000 Lux, 光暗比为 12:12. 接种培养 20 d 后, 用于实验. 此时藻液光密度  $\text{OD}_{680}$  约为 1.73, 实验前用培养基将藻液稀释至  $\text{OD}_{680}$  为 0.4 时开始测定.

### 1.4 藻细胞油脂尼罗红相对荧光值的测定

首先向酶标板中加入 800  $\mu\text{L}$  藻液, 然后加入 190  $\mu\text{L}$  DMSO (二甲基亚砜), 于酶标板振荡器上振荡混合 30 s 后, 加入 10  $\mu\text{L}$  50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  NR 溶液 (NR 配制于丙酮中), 溶液总体积为 1000  $\mu\text{L}$ , DMSO 终浓度为 20% (V/V), NR 终浓度为 0.5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . 于酶标板振荡器上振荡混合 30 s 后, 置于 40  $^\circ\text{C}$  暗处反应 5 min, 放入酶标仪中进行测定. 实验结果为 3 个平行样的算术平均值.

酶标仪的测定条件为: 激发光波长 485 nm, 带宽 20 nm, 发射光波长 580 nm, 带宽 50 nm; 激发光入射方向为酶标板上方, 发射光检测方向为酶标板上方, 温度 40  $^\circ\text{C}$ , 以 800  $\mu\text{L}$  超纯水代替藻液的样品作为 NR 的自发荧光背景值, 作为参比样品, 设置为 1000 FU.

### 1.5 其他分析测定

取约 2.5 mL 藻液置于比色皿中, 于波长 680 nm 处测定吸光度值, 所测值为藻液光密度  $\text{OD}_{680}$ . 藻细胞油脂含量为油脂占藻细胞干重的质量百分数, 采用 Bligh 等人的方法测定<sup>[2]</sup>.

## 2 结果与讨论

### 2.1 激发光波长的影响

培养 20 d 后的藻液光密度值  $\text{OD}_{680}$  为 1.725, 将藻液稀释成 0.387 和 0.937 后, 分别改变激发光波长和发射光波长进行测定, 结果如图 1 所示. 当激发光波长为 485 nm、发射光波长为 580 nm 时, 所测得的荧光值最大; 当激发光波长为 485 nm、发射光波长为 645 nm (带宽 40 nm) 时, 测定值次之. 而当激发光波长为 528 nm (带宽 20 nm), 发射光波长为 645 nm 时, 荧光值最小.

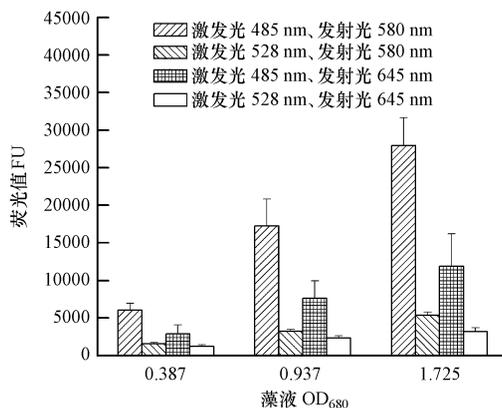


图 1 不同激发光和发射光波长下的荧光值

Fig. 1 The fluorescence intensity with different excitation and emission wavelength

尼罗红作为脂类荧光探针, 与细胞中中性油脂反应后, 在激发光波长 450—500 nm, 发射光波长大于 528 nm 时, 在荧光显微镜下可观测到金黄色荧光, 而极性脂与尼罗红反应后, 在激发光波长 515—560 nm, 发射光波长大于 590 nm 时, 观测到的是红色荧光<sup>[11]</sup>. 这是因为当环境物质极性下降, 与尼罗红反应后所发出的荧光会出现蓝移, 因此, 利用这点可以通过选择激发光波长来区分中性脂和极性脂<sup>[12]</sup>. Liu 等人采用荧光分光光度计进行中性脂测定时, 使用的激发光波长为 480 nm, 发射光波长为 500—750 nm<sup>[11]</sup>. 在对海洋微藻 *D. tertiolecta* 进行研究时, Chen 等人所使用的激发光波长为 485 nm, 发射光波长为 595 nm<sup>[13]</sup>. Kimura 等人研究中性脂时, 选用的激发光波长为 480—490 nm, 对极性脂, 选择的激发

光波长为 510—560 nm<sup>[6]</sup>. 研究还显示,当以 480 nm 为激发光波长,对小球藻的发射荧光进行扫描后发现,在 580 nm 处有一个最大发射光波长,在 668 nm 处有另一个最大发射光波长,前者强度约是后者的 6—7 倍,前者是尼罗红与中性脂反应发出的荧光,而后者主要来源于叶绿素的荧光<sup>[14]</sup>. 从本研究也可以看出,发射光波长不管是 580 nm 还是 645 nm,激发光波长为 485 nm 时的荧光值远大于激发光波长为 528 nm 时的荧光值,说明此株小球藻产生的油脂是以中性脂为主. 因此,对于小球藻油脂的尼罗红荧光测定,可选择 485 nm 作为激发光波长,580 nm 作为发射光波长.

## 2.2 DMSO 浓度和反应时间的影响

DMSO 作为一种促渗剂,能够促进细胞壁对尼罗红的渗透,从而提高尼罗红与细胞内油脂的反应效率. 当 NR 与藻液的反应时间为 5 min 时,DMSO 浓度对荧光值测定的影响如图 2 所示. 结果显示,浓度为 0—30% 时,其产生的背景荧光值相差不大,在 858—1349 之间. 但 DMSO 浓度对藻样荧光的测定影响较大,当 DMSO 终浓度为 20% 时,藻液加入 NR 后的荧光值最大,达到 6061,当 DMSO 浓度再增大时,荧光值反而下降,这是由于过高的 DMSO 浓度会对藻细胞产生一定的毒性,从而影响了荧光值的测定. 当 DMSO 浓度为 0 时,其荧光值也较高,与 25% DMSO 的结果相近,显示不加入 DMSO 也可以得到较好的测定结果,这与 Chen 等人的结果并不一致<sup>[13]</sup>. 不加入 DMSO 荧光值偏高的原因可能与藻细胞的生长状态有关,经过 20 d 的培养后,小球藻处于稳定期后期,细胞壁并不是非常坚韧,所加入的 NR 能够比较快速地进入细胞中. 但是,从图 3 藻液荧光值随时间的变化可以看出,当 DMSO 浓度为 0 时,藻液的荧光值随时间下降速率明显大于加入 DMSO 的藻液,也就是在 100% 水溶液环境中,NR 与油脂反应后的荧光值受到水的淬灭影响较大,而 DMSO 可以消减荧光值的下降速率,因此,不加入 DMSO 虽然能够产生较高的荧光测定值,但并不适合小球藻的测定.

图 2 还显示,10% DMSO 反应 5 min 后的荧光值是所有结果中最低的,甚至低于不加入 DMSO 的荧光值. 但是图 3 显示,随着时间的延长,10% DMSO 的荧光值在 20 min 后出现了明显的上升,80 min 后超过了 25%、30% DMSO 以及不加 DMSO 时的荧光值,这是由于 DMSO 浓度较低时,DMSO 渗透较慢,导致荧光值随时间而逐步上升. 至于起始一段时间内荧光值较低的现象与其他结果并不一致<sup>[13]</sup>,这可能与藻种有关,还需要进一步研究.

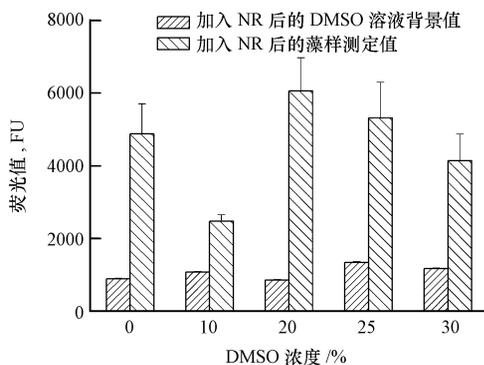


图 2 DMSO 浓度对尼罗红荧光测定的影响

Fig. 2 The effect of DMSO concentration on Nile red fluorescence intensity

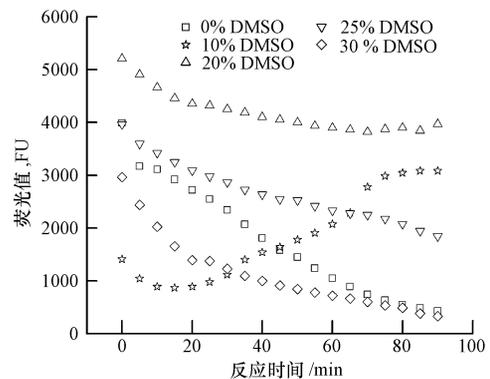


图 3 不同 DMSO 浓度下藻液荧光值随时间的变化

Fig. 3 Variation of fluorescence intensity with time at different DMSO concentrations

## 2.3 反应温度的影响

反应温度对荧光值的测定影响可见图 4. 结果显示,当 NR 与藻液的反应温度为 40 °C 时,所测得的藻液荧光值最高,当温度升高到 45 °C 时,所测定的荧光值反而有所下降,表明高温对藻细胞的活性带来影响,而影响了荧光值的测定. 其他的研究结果显示,有的最佳测定温度是在 35—40 °C<sup>[13]</sup>,有的最佳温度是 20—25 °C<sup>[12]</sup>,可见当温度在 25—40 °C 之间时,它对测定的影响并不是非常大.

## 2.4 NR 终浓度的影响

NR 终浓度对荧光值的影响见图 5. 结果显示,当 NR 浓度为 0.50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  时,荧光值最大. NR 浓度在

0.25—1.00  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  范围内可获得较好的荧光测定效果. 但当浓度低于 0.10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  时, 荧光测定值急剧下降, 表明过低的 NR 浓度所发荧光太弱. 当浓度高于 2.00  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  时, 荧光测定值也急剧下降, 这主要是由于过高的 NR 浓度会影响藻细胞活性, 而且 NR 浓度过高, 导致 NR 溶液的背景测定值偏高, 不利于藻液样品的荧光测定. 其他研究也显示, NR 终浓度在 0.25—1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  内能够获得最佳的测定效果<sup>[7,9,14]</sup>.

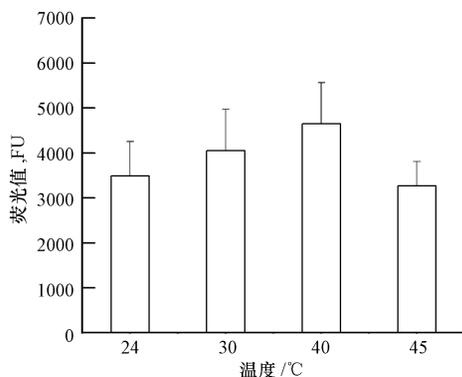


图 4 温度对尼罗红荧光值测定的影响

Fig. 4 The effect of temperature on Nile red fluorescence intensity

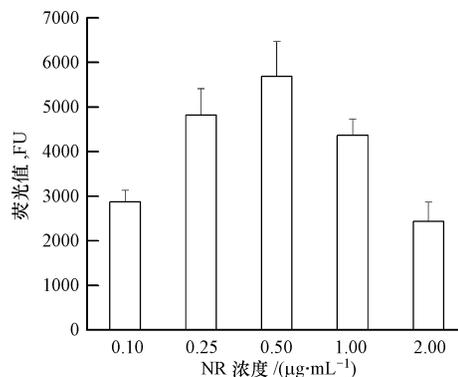


图 5 NR 终浓度对尼罗红荧光值测定的影响

Fig. 5 The effect of Nile red concentration on its fluorescence intensity

## 2.5 藻液油脂含量与荧光值的线性关系

为了快速测定微藻产生的油脂含量, 通常可以将采用重量法测定的油脂含量与尼罗红荧光值之间建立一定的线性关系, 通过测定尼罗红荧光值而推算出藻细胞油脂的产量<sup>[7,9]</sup>. 在本研究中, 小球藻经过 20 d 培养后,  $\text{OD}_{680}$  为 1.725, 采用 Bligh 等人<sup>[2]</sup> 的方法测定的油脂含量为干藻细胞质量的 17.6%, 藻细胞生物量产量为 0.62  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . 将藻液进行稀释, 得到  $\text{OD}_{680}$  为 0.061、0.196、0.387、0.776、0.937、1.115 和 1.725 的不同浓度的藻液. 当取 800  $\mu\text{L}$  藻样于酶标板时, 其所对应的油脂含量为 3.1、9.9、19.6、39.3、47.4、56.4、87.3  $\mu\text{g}$ . 结果显示, 尼罗红荧光值与藻细胞油脂含量呈现了很好的线性关系, 以  $\text{OD}_{680}$  为  $x$  值, 荧光值为  $y$ ,  $y = 17501x - 105.78$ , 其相关系数  $R^2 = 0.9836$ . 因此, 可以根据尼罗红荧光值来推算小球藻油脂的产量. 但是当  $\text{OD}_{680}$  为 0.061 时, 尼罗红荧光值为 1039, 接近于此时的尼罗红背景荧光值 1000, 且两者之间不存在显著性差异 ( $P < 0.05$ ). 因此在进行油脂定量测定时, 藻液的  $\text{OD}_{680}$  最好大于 0.1, 如果不到 0.1, 可以将藻细胞进行浓缩后进行测定.

尼罗红荧光强度与时间存在很大的关系, 从图 6 的结果可以看出, 在加入 NR 后, 藻液的荧光值稍有所提高后, 出现了下降的趋势. 但是 50—60 min 后, 高浓度藻液的 NR 荧光值却又出现了明显的上升.

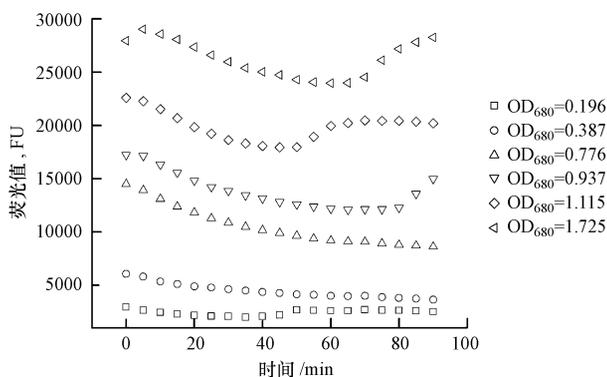


图 6 不同浓度藻液荧光值随时间的变化

Fig. 6 Variation of fluorescence intensity with time at different algae concentrations

在 Elsey 等人的研究中<sup>[12]</sup>, 藻液尼罗红的荧光值也表现出相似的规律, 因此, 他们将测定时间设置为加入尼罗红后 30—40 min. 在真菌和酵母菌的油脂研究中, Kimura 等人发现 NR 加入后 1—5 min 荧光值上升, 5 min 后开始下降<sup>[6]</sup>, 则将反应时间设置为 5 min. 从本研究结果看, 对于高浓度藻液, 即使后期

荧光值上升,也是与反应 5—10 min 的荧光值相近,而且当藻液浓度越低, NR 荧光值出现上升的时间也越长. 结合图 3 的结果,测定时间可以选择加入 NR 后 5—10 min.

### 3 结论

(1) 采用 NR 作为荧光探针,可以测定小球藻所产生的中性油脂含量,测定条件为:激发光波长 485 nm,发射光波长 580 nm, DMSO 终浓度为 20% (V/V), NR 终浓度为  $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,藻液与 NR 置于 40 °C 暗处反应 5 min.

(2) 在采用酶标仪作为荧光检测器的条件下,能够定量地测定小球藻油脂含量,荧光测定值与油脂含量呈现较好的线性关系,相关系数  $R^2$  为 0.9836.

#### 参 考 文 献

- [ 1 ] Sharma K K, Schuhmann H, Schenk P M. High lipid induction in microalgae for biodiesel production energies[J]. 2012, 5: 1532-1553
- [ 2 ] Bligh E G, Dyer W J. A rapid method for total lipid extraction and purification[J]. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, 1959, 37: 911-917
- [ 3 ] Eltgroth M L, Watwood R L, Wolfe G V. Production and cellular localization of neutral long-chain lipids in the haptophyte algae *Isochrysis galbana* and *Emiliania huxleyi*[J]. Journal of Phycology, 2005, 41: 1000-1009
- [ 4 ] 马新东, 冀平, 林忠胜, 等. 海洋沉积物中甾醇类物质的气相色谱/质谱方法分析[J]. 环境化学, 2012, 31(5): 731-736
- [ 5 ] Dean A P, Sigee D C, Estrada B, et al. Using FTIR spectroscopy for rapid determination of lipid accumulation in response to nitrogen limitation in freshwater microalgae[J]. Bioresource Technology, 2010, 101: 4499-4507
- [ 6 ] Kimura K, Yamaoka M, Kamisaka Y. Rapid estimation of lipids in oleaginous fungi and yeasts using Nile red fluorescence[J]. Journal of Microbiological Methods, 2004, 56: 331-338
- [ 7 ] Bertozzini E, Galluzzi L, Penna A, et al. Application of the standard addition method for the absolute quantification of neutral lipids in microalgae using Nile red[J]. Journal of Microbiological Methods, 2011, 87: 17-23
- [ 8 ] Wilkie A C, Edmundson S J, Duncan J G. Indigenous algae for local bioresource production: Phycoprospecting[J]. Energy for Sustainable Development, 2011, 15: 365-371
- [ 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: 41-47
- [ 10 ] Silva T L D, Santos C A, Reis A. Multi-parameter flow cytometry as a tool to monitor heterotrophic microalgal batch fermentations for oil production towards biodiesel[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2009, 14: 330-337
- [ 11 ] Liu Z Y, Wang G C, Zhou B C. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*[J]. Bioresource Technology, 2008, 99: 4717-4722
- [ 12 ] Eley D, Jameson D, Raleigh B, et al. Fluorescent measurement of microalgal neutral lipids[J]. Journal of Microbiological Methods, 2007, 68: 639-642
- [ 13 ] Chen M, Tang H, Ma H, et al. Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta* [J]. Bioresource Technology, 2011, 102: 1649-1655
- [ 14 ] Huang G H, Chen G, Chen F. Rapid screening method for lipid production in alga based on Nile red fluorescence[J]. Biomass and Bioenergy, 2009, 33: 1386-1392

## Quantification of lipid content in microalgae using Nile red as fluorescent probe

LIANG Wenyan\*      ZHANG Yuanchun      CAO Jincan      WANG Li      YU Jian

(College of Environmental Science & Engineering, Beijing Forestry University, Beijing, 100083, China)

#### ABSTRACT

This paper studied the quantification of the lipid content of *Chlorella vulgaris* by Nile red assay. Fluorescence could be measured on a 48-well plate spectrofluorometer. The results showed that the excitation wavelength of 485 nm and the emission wavelength of 580 nm were optimal for the detection of neutral lipid. The maximum fluorescence could be reached when the final concentration of dimethyl sulfoxide was 20%, and the final concentration of Nile red was  $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , after 5 min reaction of microalgae with NR at 40 °C. When the optical density  $\text{OD}_{680}$  of algal solution was between 0.61 and 1.73, the fluorescence of Nile red assay had a linear relationship with the lipid content of algae with the  $R^2$  of 0.9836. It is concluded that the Nile red assay can be used to detect the lipid content of *Chlorella vulgaris*.

**Keywords:** Nile red, lipid, microalgae, quantification.