

# 不同生长期 6 种海洋微藻鞘糖脂含量变化的研究

李艳荣, 徐继林\*, 严小军, 周成旭

(宁波大学 应用海洋生物技术教育部重点实验室, 浙江 宁波 315211)

**摘要:** 利用超高效液相色谱—四极杆—飞行时间质谱联用分析系统(UPLC-Q-TOF MS)对 6 种海洋微藻 3 个培养时期(对数期、平台期、平台末期)的鞘糖脂组成和含量的变化进行研究. 结果表明: 6 种微藻中共检测到 3 种类型的鞘糖脂, 且每一种藻中仅检测到一种类型极性头部糖原的鞘糖脂. 在整个生长过程中, 每种藻中总鞘糖脂的含量在对数期最少, 每毫克干藻中含 0.23~8.42 nmol; 平台末期时大量积累, 每毫克干藻中含量达 5.37~50.10 nmol. 鞘糖脂组成和生长期含量的变化可为海洋微藻生理生态学研究、化学分类学研究以及赤潮的防治提供理论依据.

**关键词:** 海洋微藻; 生长期; 鞘糖脂; 液相色谱—质谱法

中图分类号: Q949.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2016) 01-0007-06

鞘糖脂(glycosphingolipids)作为细胞膜上的一部分, 具有结构和功能多样性, 它在所有的真核生物和大多数的原核生物中普遍存在<sup>[1]</sup>. 鞘糖脂在一些基本的细胞过程中发挥重要作用, 如信号转导、膜的形成以及细胞间的重组等, 大多数的功能与其结构紧密相关<sup>[2]</sup>. 鞘糖脂的合成对胚胎发育和组织分化是必需的<sup>[3]</sup>, 在细胞的表面决定胚胎的抗原性以及其分化和未分化的状态<sup>[4]</sup>. 另外, 鞘糖脂可以调节 T 细胞的免疫反应<sup>[5]</sup>, 人体的一些疾病往往与组织器官中鞘糖脂的异常表达紧密相关. 一些结构复杂的鞘糖脂还可以作为某些细胞类型的标志物, 在动植物的化学分类学中发挥重要作用.

微藻是主要的光合微生物, 而硅藻和定鞭藻是常见的赤潮优势种<sup>[6]</sup>, 其藻体细胞内脂质的组成和含量成为研究的热点. 微藻在不同生长阶段脂质的变化反应了它们在生长过程中经历不同的生化过程<sup>[7]</sup>, 研究这些变化可为微藻的生理生态学研究、饵料营养研究和新能源开发研究提供重要依据. 目前对于不同生长时期, 微藻细胞内脂类变化的研究主要集中在脂肪酸<sup>[8-9]</sup>、光合膜脂<sup>[10-11]</sup>和甘油三酯<sup>[12]</sup>等, 对于微藻培养过程中鞘脂代谢变化

研究还很少. 通过对几种骨条藻和定鞭藻细胞中鞘糖脂结构和含量变化的研究可深入了解这些生物, 从而更好地开发和利用这些丰富的水产资源.

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

UPLC-Q-TOF-MS 超高效液相色谱四级杆飞行时间质谱联用系统(美国 WATERS 公司); 颗粒粒度计数分析仪(上海求精生化试剂仪器有限公司); 超纯水系统(法国 MILLIPORE 公司); 冷冻干燥机(美国 LABCONCO 公司). 另外, 国产旋转蒸发器、旋涡混合仪、高速离心机、水浴锅、电子天平、充气泵等. 鞘脂的稳定同位素内标 N-palmitoyl(d31)-D-erythro-sphingosine 购自美国 Avanti Polar Lipids 公司. 乙腈、异丙醇、甲酸等用于样品提取、液相色谱质谱分析的试剂均为色谱级, 纯水取自 Milli-Q 纯水仪, 抗氧化剂 2,6-二丁基对甲酚(BHT, >99.9%)购自美国 SIGMA 公司.

### 1.2 微藻的培养和收集

6 株海洋微藻由宁波大学浙江省海洋生物重点实验室微藻种质库提供, 藻的种名和种质编号见

收稿日期: 2015-04-15.

宁波大学学报(理工版) 网址: <http://journalg.nbu.edu.cn/>

基金项目: 国家自然科学基金(31172448); 科技部星火计划重点项目(2014GA720002); 教育部博士点基金优先发展领域项目(20133305130001); 宁波市科技攻关项目(2013C10014, 2014C10005); 浙江省公益性项目(2014C32081); 宁波市海洋藻类技术创新团队项目(2011B81007).

第一作者: 李艳荣(1989—), 女, 山东菏泽人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 微藻生物化学. E-mail: lyr200810211@163.com

\*通信作者: 徐继林(1965—), 男, 江苏泰州人, 研究员, 主要研究方向: 微藻生物化学. E-mail: xujilin@nbu.edu.cn

表 1. 用于微藻培养的海水均经脱脂棉过滤、煮沸消毒, 所有容器均高温灭菌. 培养液采用 f/2 配方<sup>[13]</sup>, 藻种在 5 000 mL 的锥形瓶中(20±2) °C 下自然光培养, 每天摇动数次, 并用颗粒粒度计数分析仪测量藻类密度. 藻类细胞在对数期、平台初期、平台末期分别取一定体积的藻液, 4 000~4 800 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 冷冻干燥后备用. 样品平行培养 3 次. 干燥后的样品用 Bligh-Dyer 法<sup>[14]</sup>提取后, 氮气吹干, 甲醇复溶后经 0.22 μm 超滤膜(美国 Millipore 公司)离心过滤进行 UPLC-Q-TOF MS 分析. 溶剂均加入 50 μg·mL<sup>-1</sup> 的 2,6-Di-tert-butyl-4- methylphenol(BHT).

表 1 6 株海洋微藻的种名和种质编码

| 分类                      | 实验室命名         | 种名                   | 种质编码        |
|-------------------------|---------------|----------------------|-------------|
| 硅藻<br>(Bacillariophyta) | SKSPXS0711    | <i>Skeletonema</i>   | NMBguh004-1 |
|                         |               | <i>costatum</i>      |             |
|                         | SCXMBO2       | <i>Skeletonema</i>   | NMBguh004-2 |
|                         |               | <i>costatum</i>      |             |
|                         | SKSPXS0807zjj | <i>Skeletonema</i>   | NMBguh004-5 |
|                         |               | <i>sp.</i>           |             |
|                         | 热带骨条藻         | <i>Skeletonema</i>   | NMBguh004-6 |
|                         |               | <i>tropicum</i>      |             |
| 定鞭藻<br>(Haptophyta)     | 等鞭金藻 3011     | <i>Isochrysis</i>    | NMBjih021-2 |
|                         |               | <i>galbana</i>       |             |
|                         | 颗石藻 Cocoo2    | <i>Pleurochrysis</i> | NMBjih026-1 |
|                         |               | <i>sp.</i>           |             |

注: 种质编码为宁波大学浙江省海洋生物重点实验室微藻种质库编码.

### 1.3 色谱条件

反向液相色谱(HPLC)分析通过 Waters Acquity Ultra Performance LC™ 超高效液相色谱分离系统(美国 WATERS 公司), 配置 Waters Acquity UPLC™ BEH C18 色谱柱(1.7 μm, 2.1 mm×100 mm)(美国 WATERS 公司). 流动相的流速为 300 μL·min<sup>-1</sup>, 3:7 分流进入离子源. 此外, 15 mmol 的甲酸和 0.004 mmol 的氯化锂加入到流动相中作为正离子模式下的助离子化试剂. 二元溶剂系统流动相 A 为 V(H<sub>2</sub>O):V(异丙醇)=9:1, 流动相 B 为 V(乙腈):V(异丙醇)=9:1, 洗脱梯度起始比例为 10% B, 13 min 内升到 95%, 保持 3.5 min; 然后在 2.5 min 内升到 100%, 保持 13 min; 1 min 内回到初始流动相平衡 12 min, 洗脱总时间 45 min. 分离柱温度 40 °C, 样品室温度为 4 °C, 每次取样量为 5 μL.

### 1.4 质谱条件

质谱采用四级杆飞行时间(Q-TOF Premier)质

谱仪, 在正离子模式下对离子进行监测. 仪器参数设置为: 质谱扫描范围  $m/z$  100~1 500, 扫描时间 0.3 s. 使用高纯氮作为脱溶剂气体, 氮气流速为 400 L·h<sup>-1</sup>. 离子源温度设为 120 °C, 毛细管电离电压为 6.0 kV, 取样锥孔电压为 35~65 kV. 用于 MSE 分析时的低碰撞能量设为 3.0 kV; 根据不同鞘脂碎裂时所需能量的不同, 二级质谱分析时的高碰撞设为 35~80 kV. 飞行时间分析器采用 V 模式,  $m/z$  1 000 时最大分辨率调整为大于 10 000. 仪器使用前, 先用 0.5 ng·μL<sup>-1</sup> 亮脑啡肽作为外表物对目标离子进行精确质量锁定, 正离子模式下的  $m/z$  556.277 1; 然后用甲酸钠进行多点校正.

### 1.5 鞘糖脂的定性和半定量分析

鞘糖脂定性是利用 UPLC-Q-TOF MS 分析系统, 在上述液质条件下, 微藻中不同生长阶段的样品在 BEH C18 柱上分离后, 经 Masslynx 4.1 软件处理, 获得各类物质的原始数据, 分别提取出每一个变量离子的  $m/z$  值的精确质量数(质量相对误差小于  $5 \times 10^{-6}$ )借助于元素组成分析软件、质谱解析软件 Massfragment 得到其可能的元素组成, 在互联网上免费提供的 LIPID MAPS 库(<http://www.lipidmaps.org>)、HMDB 库(<http://www.hmdb>)和 METLINE 库(<http://www.metline.Scripps.edu>)里进行搜检. 根据正离子模式下的二级质谱(MS/MS)图对每一种鞘糖脂的长链碱基、酰胺基链和极性头部进行进一步确认鉴定.

鞘糖脂的半定量: 分别在微藻样品中加入 2 μg·mL<sup>-1</sup> 的 N-palmitoyl(d31)-D-erythro-sphingosine (C16 Cer)稳定同位素内标对样品进行半定量分析. 根据流动相比比例的改变, 获得相应鞘糖脂的离子化效果. 从低碰撞能量下的色谱图中提取样品中每一种鞘糖脂的离子色谱图, 根据不同流动相比比例下的鞘糖脂离子化效果, 获得相应峰面积积分值. 根据峰面积与浓度的线性关系, 利用同位素标准品的浓度和峰面积半定量样品中每毫克干藻的鞘糖脂含量(nmol), 取 3 个平行结果的均值.

## 2 结果与讨论

### 2.1 6 种海洋微藻中鞘糖脂的定性分析

利用 UPLC-Q-TOF MS 分析系统获得高分辨的  $m/z$  值, 基于我们实验室已经建立的鞘糖脂的分

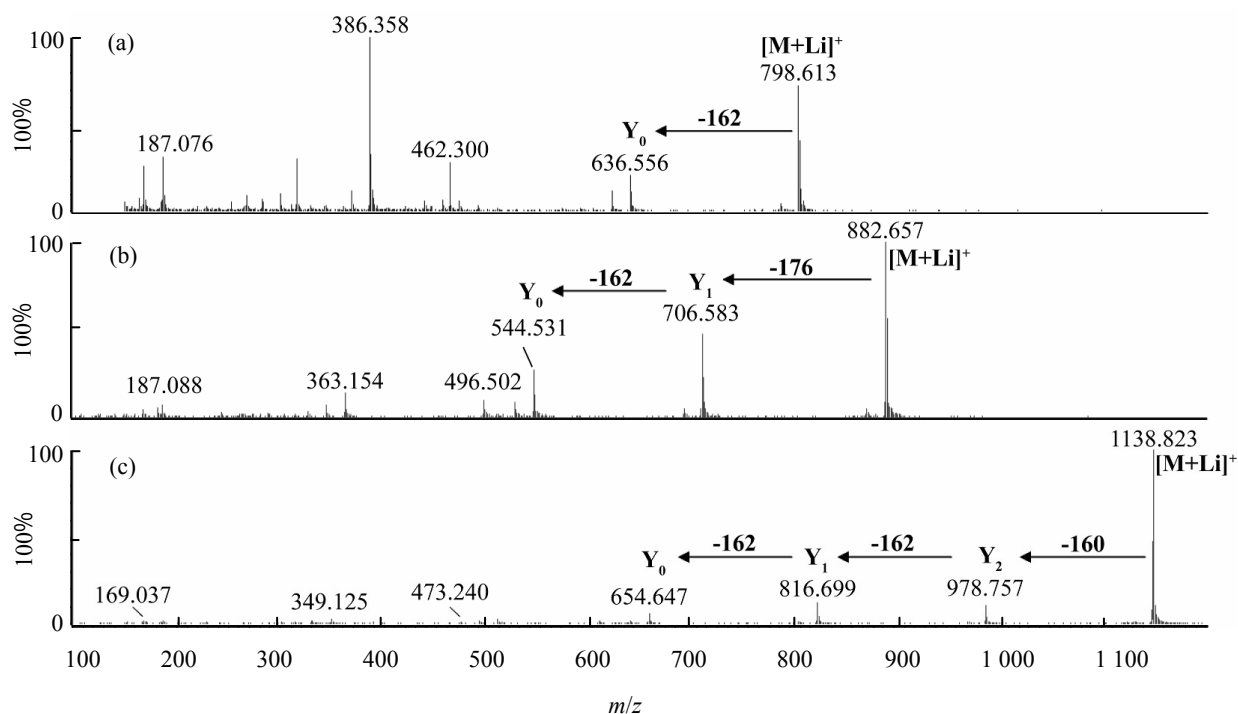
析方法<sup>[15]</sup>, 从 6 种微藻(表 1)中共鉴定出 3 类鞘糖脂, 分别为单糖鞘脂、双糖鞘脂和三糖鞘脂。其中等鞭金藻 3011 和颗石藻 Cocoo2 中的鞘糖脂均为单糖鞘脂; 中肋骨条藻 SKSPXS0711 和 SCXMBO2 中所含的鞘糖脂相同, 均为双糖鞘脂; 骨条藻 SKSPXS0807zjj 和热带骨条藻中检测到的鞘糖脂相同, 为三糖鞘脂。通过高分辨二级质谱图上中性丢失的碎片信息, 可以初步了解这 3 种类型鞘糖脂极性头部的差异, 如图 1 所示。

2 种定鞭藻中的鞘糖脂的二级质谱图中, 中性丢失碎片  $m/z$  为 162, 元素组成为  $C_6H_{12}O_6-H_2O$ , 一种己糖。中肋骨条藻 SKSPXS0711 和 SCXMBO2 中所含双糖鞘脂的母离子首先中性丢失外侧的糖原 ( $m/z$  176), 接着中性丢失还原端的糖原 ( $m/z$  162)。通过高分辨质谱可以获得这 2 种糖原的元素组成为  $C_7H_{14}O_6-H_2O$  和  $C_6H_{12}O_6-H_2O$ , 分别为庚糖和己糖。而骨条藻 SKSPXS0807zjj 和热带骨条藻中顺序中性丢失 3 个糖基, 最外侧糖原  $m/z$  160, 元素组成  $C_7H_{14}O_5-H_2O$ , 是一种庚糖。靠近还原端的 2 个糖原中性丢失的  $m/z$  相同, 均为 162, 元素组成为  $C_6H_{12}O_6-H_2O$ , 是一种己糖。总之, 这 6 种微藻

中都含有己糖。据文献[1,16,17]报道, 植物中较为常见 6 个碳的鞘糖脂为葡萄糖鞘脂, 而 Bhattacharya 等研究也表明植物组织中最重要鞘糖脂是葡萄糖神经酰胺, 它能诱导细胞增殖, 阻止细胞的程序性死亡<sup>[18-19]</sup>。但是微藻中含有的己糖是否是葡萄糖, 还需要通过多级质谱、同位素标记、核磁等技术进一步确定。Zhao 等<sup>[15]</sup>在研究三株骨条藻中的鞘糖脂时发现同一种藻中所含有的鞘糖脂的极性头部糖原是一样的。本文研究结果与其相似, 在同一种藻中仅检测到一种类型极性头部糖原的鞘糖脂, 而微藻内鞘糖脂结构多样性和复杂性是由神经酰胺骨架的不同引起的。

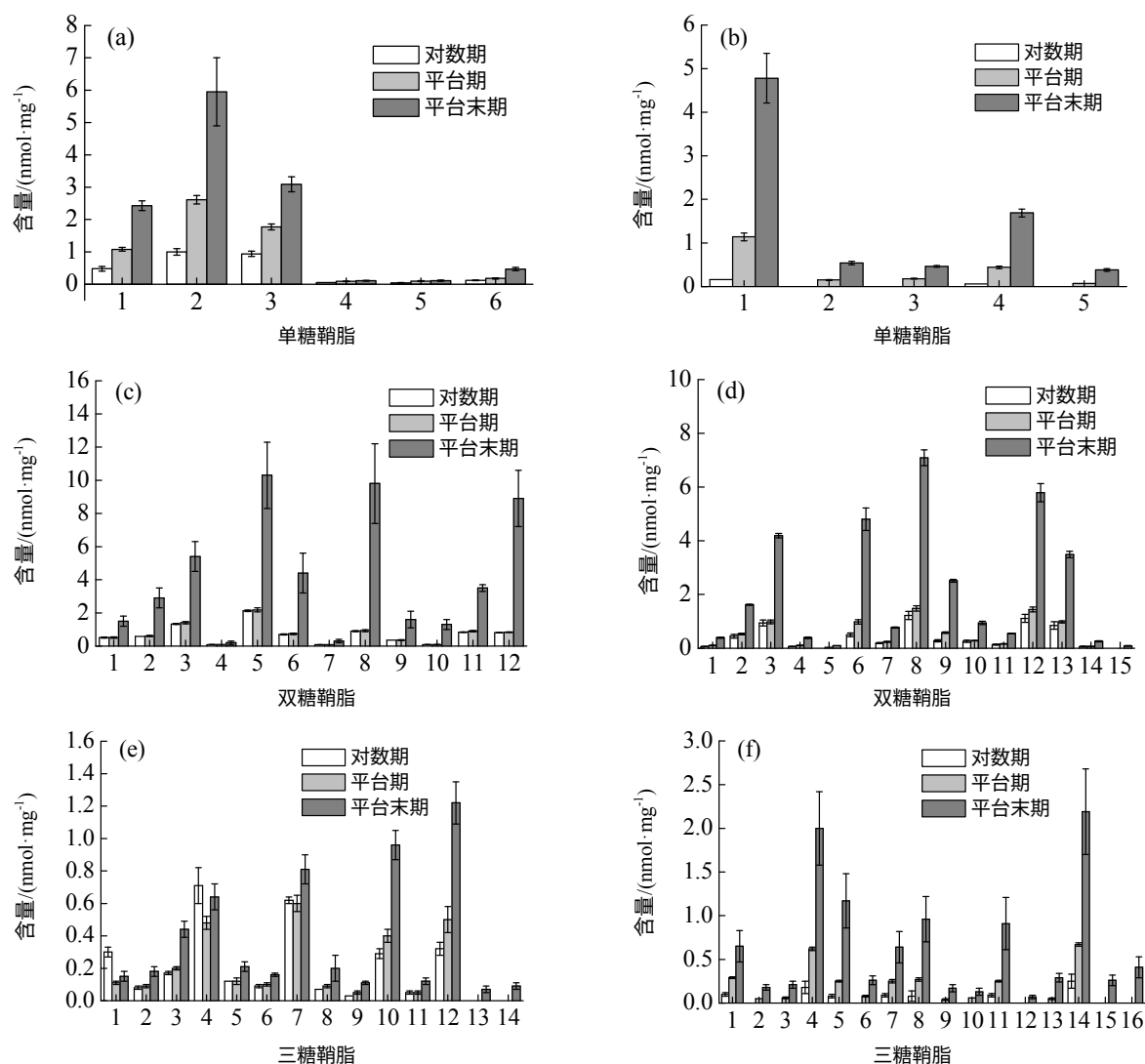
## 2.2 不同生长时期鞘糖脂含量的变化

使用 UPLC-Q-TOF MS, 在样品中加入鞘脂内标, 利用已建立的定性分析方法<sup>[15]</sup>, 对微藻中鞘糖脂的神经酰胺骨架的具体结构进行分析, 并对不同生长阶段每一种鞘糖脂进行半定量分析。实验结果表明(图 2), 等鞭金藻 3011 中共检测到 6 种单糖鞘脂, 3 个不同生长阶段(对数期、平台初期和平台末期)每毫克干藻中总鞘糖脂含量分别为  $(2.63 \pm 0.27)$ 、 $(5.83 \pm 0.33)$ 、 $(12.17 \pm 1.51)$  nmol; 颗石藻



(a)为等鞭金藻 3011 和颗石藻 Cocoo2 中的单糖鞘脂(-162); (b)为中肋骨条藻 SKSPXS0711 和 SCXMBO2 中的双糖鞘脂(-176-162); (c)为骨条藻 SKSPXS0807zjj 和热带骨条藻中的三糖鞘脂(-160-162-162)

图 1 微藻中 3 种鞘糖脂的二级质谱图



(a)为等鞭金藻 3011 中的单糖鞘脂(-162), 其中 1~6 分别代表 d18:4-n23:0、d19:4-n23:0、d18:4-n24:6、d18:3-n24:6、d19:4-n24:6、d19:3-n23:0;  
 (b)为颗石藻 Cocco2 中的单糖鞘脂(-162), 其中 1~5 分别代表 d19:3-n23:1、d19:3-n24:1、d19:3-n23:0、d19:3-n25:1、d19:3-n24:0;  
 (c)为中肋骨条藻 SKSPXS0711 中的双糖鞘脂(-176-162), 其中 1~12 分别代表 d18:3-n16:0、d18:2-n16:0、d18:1-n16:0、d18:3-n22:0、d18:3-n24:1、d18:2-n24:1、d18:2-n22:0、d18:3-n24:0、d18:1-n24:1、d18:1-n22:0、d18:2-n24:0、d18:1-n24:0;  
 (d)为中肋骨条藻 SCXMB02 中的双糖鞘脂(-176-162), 其中 1~15 分别代表 d18:3-n16:0、d18:2-n16:0、d18:1-n16:0、d18:2-n22:1、d18:3-n23:0、d18:3-n24:0、d18:2-n22:0、d18:2-n24:1、d18:3-n24:0、d18:1-n24:1、d18:1-n22:0、d18:2-n24:0、d18:1-n24:0、d18:2-n26:0、d18:1-n26:0;  
 (e)为骨条藻 SKSPXS0807zjj 中的三糖鞘脂(-162-162-160), 其中 1~14 分别代表 d18:3-n16:0、d18:2-n16:0、d18:1-n16:0、d18:3-n24:1、d18:2-n24:1、d18:2-n24:2、d18:3-n24:0、d18:1-n24:1、d18:1-n22:0、d18:2-n24:0、d18:3-n26:0、d18:1-n24:0、d18:2-n26:0、d18:1-n26:0;  
 (f)为热带骨条藻中的三糖鞘脂(-162-162-160), 其中 1~16 分别代表 d18:1-n16:0、d18:3-n24:2、iso-d18:3-n24:2、d18:3-n24:1、d18:2-n24:1、d18:2-n24:2、d18:3-n24:0、iso-d18:2-n24:1、d18:1-n24:1、d18:1-n22:0、d18:2-n24:0、d18:2-n26:1、d18:3-n26:0、d18:1-n24:0、d18:2-n26:0、d18:1-n26:0.

图 2 6 株微藻 3 个培养时期各鞘糖脂含量的变化

Cocco2 中共检测到 5 种单糖鞘脂, 3 个不同生长阶段, 每毫克干藻总鞘糖脂含量分别为(0.23±0.01)、(1.97±0.14)、(7.86±0.76) nmol. 骨条藻 SKSP0807ZJJ 中检测到 14 种三糖鞘脂, 3 个不同生长阶段每毫克干

藻总鞘糖脂含量分别为(2.87±0.28)、(2.80±0.28)、(5.37±0.69) nmol. 骨条藻 SKSPXS0711 中检测到 12 种双糖鞘脂, 3 个不同生长阶段每毫克干藻总鞘糖脂含量分别为(8.42±0.25)、(8.76±0.48)、(50.10±

2.30) nmol. 骨条藻 SCXMB02 中共检测到 15 种双糖鞘脂, 3 个不同生长阶段每毫克干藻总鞘糖脂含量分别为 (6.09±0.84)、(7.94±0.50)、(32.99±1.50) nmol. 热带骨条藻中检测到 16 种三糖鞘脂, 3 个不同生长阶段每毫克干藻总鞘糖脂含量分别 (0.87±0.30)、(2.95±0.15)、(10.52±1.59) nmol. 而 3 个不同生长阶段每一种鞘糖脂的具体组成和含量变化如图 2 所示.

由图 1 每一种藻的鞘糖脂组成结果可以看出, 每种藻中仅含有一种极性头部糖原的鞘糖脂, 而微藻内鞘糖脂结构多样性和复杂性是由神经酰胺骨架的不同引起的(图 2). 神经酰胺由鞘氨醇长链碱基和酰胺基链两部分组成; 而碳链的长度、不饱和度, 双键的位置, 羟基的个数和位置等都可以引起鞘氨醇链和酰胺基链的不同, 进而导致鞘糖脂结构和功能的多样性.

对不同生长时期鞘糖脂的含量, 随着培养时间的延长有不同程度的变化. 以中肋骨 SCXMB02 为例, 在对数期时 15 种双糖鞘脂含量较低, 个别双糖鞘脂在对数期时还未开始合成. 从对数期到平台期时鞘糖脂的含量逐渐积累, 平台末期时含量达到最大值, 每毫克干藻含量在 7 nmol 以上. 其他 5 种藻中不同生长时期含量的变化相似, 均在平台末期时鞘脂的含量大量积累. 在整个生长过程中, 每种藻中总鞘糖脂的含量在对数期最少, 每毫克干藻为 0.23~8.42 nmol; 平台末期时大量积累, 每毫克干藻含量达 5.37~50.10 nmol.

以上现象表明, 生长阶段是影响鞘糖脂含量的重要变量因素. 鞘糖脂作为细胞膜上的一部分, 在一些基本的细胞过程中发挥着重要作用, 而鞘糖脂的代谢产物神经酰胺和鞘氨醇等在细胞的生长和死亡中发挥着重要作用. 研究表明, 神经酰胺含量的大量积累可以作为细胞凋亡的信号, 而植物中鞘糖脂的大量积累能引起许多脂类代谢疾病, 从而抑制植物细胞的正常生长<sup>[20]</sup>. 本研究中, 平台末期时藻类的密度达到最大值, 此时培养基中的营养物质几乎消耗殆尽, 而鞘脂含量大量增加. 因此, 鞘脂含量的大量积累可能与细胞周期的调控有关, 可以作为细胞开始凋亡的信号. 近年, 赤潮的发生越来越频繁, 赤潮藻的种类越来越多. 有研究表明, 某些细胞内含有特殊鞘糖脂的微藻可以

作为病毒的寄主, 而一些大型赤潮的发生往往是由这些藻类引起的<sup>[21]</sup>. Vardi 等<sup>[22]</sup>研究也表明病毒性的鞘糖脂可以作为病毒感染海洋的生物标志物. 因此, 研究微藻不同阶段鞘糖脂含量的变化, 不仅可以了解到它们在生长过程中经历的不同生化过程, 而且可以通过研究这些变化为微藻的生理生态学、化学分类学研究和赤潮的防治提供参考.

#### 参考文献:

- [1] WARNECKE D, HEINZ E. Recently discovered functions of glucosylceramides in plants and fungi[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2003, 60(5):919-941.
- [2] PATA M O, HANNUN Y A, NG C K Y. Plant sphingolipids: Decoding the enigma of the Sphinx[J]. New Phytologist, 2010, 185(3):611-630.
- [3] YAMASHITA T, WADA R, SASAKI T, et al. A vital role for glycosphingolipid synthesis during development and differentiation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1999, 96(16):9142-9147.
- [4] FENDERSON B A, EDDY E, HAKOMORI S I. Glycoconjugate expression during embryogenesis and its biological significance[J]. BioEssays, 1990, 12(4):173-179.
- [5] FELDING-HABERMANN B, IGARASHI Y. A ceramide analog inhibits T cell proliferative response through inhibition of glycosphingolipid synthesis and enhancement of N, N-dimethylsphingosine synthesis[J]. Biochemistry, 1990, 29(26):6314-6322.
- [6] ORLOVA T, MOROZOVA T, KAMENEVA P, et al. Harmful algal blooms on the Russian east coast and their possible economic impacts[J]. Pices Scientific Report, 2014, 47:41.
- [7] EIZADORA T Y, ZENDEJAS F J, LANE P D, et al. Triacylglycerol accumulation and profiling in the model diatoms *Thalassiosira pseudonana* and *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) during starvation[J]. Journal of Applied Phycology, 2009, 21(6):669-681.
- [8] DUNSTAN G A, VOLKMAN J K, BARRETT S M, et al. Essential polyunsaturated fatty acids from 14 species of diatom (Bacillariophyceae)[J]. Phytochemistry, 1993, 35(1):155-161.
- [9] 李文权, 廖启斌. 三种海洋微藻生长期脂肪酸组成研究[J]. 海洋环境科学, 2002, 21(2):10-13.
- [10] YAN XIAOJUN, CHEN DEYING, XU JILIN, et al. Profiles of photosynthetic glycerolipids in three strains of *Skeletonema* determined by UPLC-Q-TOF-MS[J]. Journal of Applied Phycology, 2011, 23(2):271-282.

- [11] XU JILIN, CHEN DEDING, YAN XIOAJUN, et al. Global characterization of the photosynthetic glycerolipids from a marine diatom *Stephanodiscus* sp. by ultra performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization-quadrupole-time of flight mass spectrometry[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2010, 663(1): 60-68.
- [12] LI SHUANG, XU JILIN, CHEN JIAO, et al. The major lipid changes of some important diet microalgae during the entire growth phase[J]. *Aquaculture*, 2014, 428:104-110.
- [13] ROUSCH J M, BINGHAM S E, SOMMERFELD M R. Changes in fatty acid profiles of thermo-intolerant and thermo-tolerant marine diatoms during temperature stress [J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2003, 295(2):145-156.
- [14] BLIGH E G, DYER W J. A rapid method of total lipid extraction and purification[J]. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 1959, 37(8):911-917.
- [15] ZHAO FANG, XU JILIN, CHEN JIAO, et al. Structural elucidation of two types of novel glycosphingolipids in three strains of *Skeletonema* by liquid chromatography coupled with mass spectrometry[J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2013, 27(13):1535-1547.
- [16] SHUI G, BENDT A K, PETHE K, et al. Sensitive profiling of chemically diverse bioactive lipids[J]. *Journal of Lipid Research*, 2007, 48(9):1976-1984.
- [17] SOMMER U, HERSCOVITZ H, WELTY F K, et al. LC-MS-based method for the qualitative and quantitative analysis of complex lipid mixtures[J]. *Journal of Lipid Research*, 2006, 47(4):804-814.
- [18] BHATTACHARYA S, LEE Y T, MICHOWSKI W, et al. The modular structure of SIP facilitates its role in stabilizing multiprotein assemblies[J]. *Biochemistry*, 2005, 44(27):9462-9471.
- [19] BLEICHER R J, CABOT M C. Glucosylceramide synthase and apoptosis[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-molecular and Cell Biology of Lipids*, 2002, 1585(2):172-178.
- [20] MORALES A, LEE H, GOÑI F M, et al. Sphingolipids and cell death[J]. *Apoptosis*, 2007, 12(5):923-939.
- [21] MICHAELSON L V, DUNN T M, NAPIER J A. Viral trans-dominant manipulation of algal sphingolipids[J]. *Trends in Plant Science*, 2010, 15(12):651-655.
- [22] VARDI A, VAN MOOY B A S, FREDRICKS H F, et al. Viral glycosphingolipids induce lytic infection and cell death in marine phytoplankton[J]. *Science*, 2009, 326: 861-865.

## Study on Glycosphingolipid Content in 6 Marine Microalgae at Different Cell Growth Phases

LI Yan-rong, XU Ji-lin\*, YAN Xiao-jun, ZHOU Cheng-xu

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

**Abstract:** The composition and content of glycosphingolipids are gauged for 6 marine microalgae at three growth phases (exponential phase, and the onset of stationary phase and end of stationary phase) are analyzed by measuring the ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole time of flight tandem mass spectrometry (UPLC-Q-TOF MS) using electron spraying ionization. The results show that the three types of glycosphingolipid are detected in 6 marine microalgae, and the glycosphingolipids species in one microalgae share the same polar head. As the culture proceeds from exponential phase to end of stationary phase, the total content of glycosphingolipid in one microalgae increase over time and their levels go lower during the logarithmic phase (ranged from 0.23 to 8.42 nmol·mg<sup>-1</sup> dry algae) but are mainly accumulated at the end of stationary phase (ranged from 5.37 to 50.10 nmol·mg<sup>-1</sup> dry algae). It is concluded that the glycosphingolipids composition and content analysis can be used as a theoretical basis for the research of physiology and ecology of marine microalgae, microalgae chemotaxonomy and red tide prevention and control.

**Key words:** marine microalgae; growth stage; glycosphingolipids; LC/MS

(责任编辑 史小丽)