

营养盐对假微型海链藻中鞘脂合成的影响

黄莉莉, 陈文笔, 李艳荣, 徐继林*, 陈海敏, 朱竹君, 周成旭, 严小军

(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: 丝氨酸棕榈酰转移酶(Serine Palmitoyltransferase, SPT)是鞘脂合成途径中的关键酶, 其表达水平的高低影响生物体内鞘脂的含量. 该实验利用荧光定量 PCR 和液相色谱—质谱技术分析了营养盐对假微型海链藻中 SPT 表达及鞘脂合成的影响. 结果表明: SPT 在微藻细胞中的表达水平直接影响其鞘脂的合成, 且 P 饥饿促进 SPT 的表达和细胞内神经酰胺的合成, 进而影响假微型海链藻的生长; 而 N 饥饿抑制 SPT 的表达和细胞内神经酰胺的合成及假微型海链藻的生长.

关键词: 假微型海链藻; 营养盐; 鞘脂; 丝氨酸棕榈酰转移酶

中图分类号: Q542; Q555

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2016) 03-0023-06

鞘脂(sphingolipid)作为一类重要的脂质, 普遍存在于生物体的细胞膜、细胞器膜、载脂蛋白和富脂器官中, 并发挥重要的生物学功能. 鞘脂种类和含量的变化对于动物、植物、真菌、少数原核生物和病毒细胞生长、增值、分化和衰亡起到至关重要的作用^[1].

丝氨酸棕榈酰转移酶(Serine Palmitoyltransferase, SPT)是催化鞘脂从头合成途径的第一步, 也是该途径的第一限速酶, 在调节鞘脂代谢中起着枢纽作用, 其表达水平的高低影响各种鞘脂类成分在体内的合成、分布及功能^[2]. SPT 广泛分布在哺乳动物、高等植物和真菌中, 甚至存在于极少数的原核生物中^[3-5]. 不同生物的 SPT 在空间结构上具有差异性, 但是其功能却十分保守. SPT 在不同生物中的基因结构各异, 在原核生物中由 2 个同源亚基基因组成, 其表达产物为同源二聚体^[6]. 在真核生物中由 2 个异源亚基基因(*LCB1* 和 *LCB2*)组成, 其表达产物为异源二聚体^[7], 而且 *LCB1* 为调节亚基, *LCB2* 为催化亚基, *LCB1* 以及 *LCB2* 具有功能互补性^[8]. 机体在响应外界刺激时, 很可能通过 SPT 来控制机体内的鞘脂类物质水平^[9].

有研究表明, 光照、温度、pH、CO₂ 浓度、生

长期等因素会影响微藻的生长和微藻细胞的生化组成及含量, 而营养盐对微藻的影响更大^[10]. 许多实验证明 N、P 盐是微藻生长、繁殖过程中的重要环境因子, 对微藻的生长及脂质的组成、含量有较大的影响^[11-13].

假微型海链藻是一类重要的硅藻, 其全基因组序列已被测得^[14]. 本文以假微型海链藻为研究对象, 通过不同 N、P 营养盐处理, 对不同培养时间的假微型海链藻中鞘脂合成的 SPT(关键酶)进行实时荧光定量分析, 并检测鞘脂类物质的含量变化, 以期了解营养盐对假微型海链藻 SPT 表达和鞘脂合成的影响, 为今后假微型海链藻生长、衰败和代谢研究提供理论基础.

1 材料与方法

1.1 藻种来源及预培养

假微型海链藻由宁波大学海洋生物工程重点实验室微藻室提供, 培养基为无菌的 f/2 培养基^[15]. 培养器皿为 5 L 的锥形瓶, 海水取自宁波附近海域, 并经脱脂棉过滤, 煮沸灭菌. 光照周期为 12 h(白天):12 h(黑夜), 光照强度为 2 500 lx, 温度设置为 (20±1) °C, 培养至指数生长期进行后续实验.

收稿日期: 2015-11-04.

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

基金项目: 国家自然科学基金(31172448); 教育部博士点基金优先发展领域项目(20133305130001); 浙江省公益性项目(2014C32081); 浙江省自然科学基金(LY15C190004); 宁波市科技攻关项目(2013C10014, 2014C10005).

第一作者: 黄莉莉(1989-), 女, 河南商丘人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 微藻生物化学. E-mail: 1263623801@qq.com

*通信作者: 徐继林(1965-), 男, 浙江宁波人, 研究员, 主要研究方向: 微藻生物化学. E-mail: xujilin@nbu.edu.cn

1.2 培养基配制

营养盐按照 f/2 培养基配制, N、P 营养盐饥饿培养是在培养基中不加 NaNO_3 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 以及不加培养基的海水。

1.3 实验设计

将长至指数生长期的假微型海链藻在常温下 $3\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 8 min, 分别用完全培养基、缺 P 培养基、缺 N 培养基以及海水各洗涤 1 次, 重悬, 转接至 5 L 装有对应培养基的锥形瓶中(转接培养的细胞密度控制在 1×10^5 左右), 每个实验设置 3 个平行。

将假微型海链藻放置在恒温室内进行培养, 温度设置为 $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$, 光照周期 12 h(白天):12 h(黑夜), 光照为 $2\,500\text{ lx}$, 每天摇瓶 2 次, 每隔 1 d 按 $V(\text{营养盐}):V(\text{海水})=1:2\,000$ 加入相应的培养基。分别在第 0, 4, 8 d 取藻液, $5\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 4°C 离心, 藻泥保存于 -80°C 用于荧光定量 PCR 和鞘脂分析。

1.4 细胞生长的测定

从 0~8 d, 每天取样测藻液在 676 nm 的 OD 值, 用 OD_{676} 值表征细胞生长情况。生长速率 $= (A_n - A_0) n^{-1}$, 其中 $A_0 \sim A_n$ 为藻液 0~n d 测得的 OD_{676} 值。

1.5 UPLC-MS 分析鞘脂

1.5.1 总脂提取

称取 50 mg 干燥的藻粉样品置试管中, 加入质量浓度为 $10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的鞘脂标准品, 再加入 $V(\text{氯仿}):V(\text{甲醇})=1:1$ (已加有抗氧化剂 2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(BHT), 终质量浓度为 $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 5 mL, 漩涡震荡 5 min 后超声 10 min, $3\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 常温离心 10 min, 取上清液倒入旋蒸瓶中, 重复 3 次。通过旋转蒸发仪蒸干溶剂, 再用甲醇复溶, 并转移至 5 mL 小瓶中, 再次旋转蒸干, 充入氮气, -20°C 保存。分析前用 1 mL 甲醇复溶, 溶液 $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 常温离心, 取上清液用 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 的滤膜过滤。

1.5.2 UPLC-MS 条件

色谱条件: 使用 ACQUITY 超高效液相色谱分析系统用 ACQUITY UPLC BEH C_{18} 分析柱($2.1\text{ mm} \times 100\text{ mm}$, $1.7\text{ }\mu\text{m}$)对样品进行分析。流动相 A 为 $V(\text{异丙醇}):V(\text{水})=1:9$, 流动相 B 为 $V(\text{异丙醇}):V(\text{乙腈})=1:9$, 加入 0.01% 的氯化锂和 0.1% 的甲酸到流动相中作为电解质, 流速 $350\text{ }\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 。洗脱梯度为 A: 0~3 min 从 90% 降至 30%, 3~10 min 从 30% 降

至 15%, 10~13 min 从 15% 降至 5% 并保持至 16 min, 16~19 min 从 5% 降至 1% 保持至 32 min, 32~33 min 从 1% 升至 99% 并保持至 40 min。样品室的温度设定为 4°C , 每个样品的进样量为 $5\text{ }\mu\text{L}$ 。

质谱条件: 在电喷雾电离源(ESI)下进行, 离子源温度为 100°C , 脱溶剂温度为 250°C , 高纯度氮气作为雾化气和干燥气, 氮气流速 $400\text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ 。四级杆的扫描范围设置为 $60 \sim 1\,200\text{ m}\cdot\text{z}^{-1}$ 。在正离子模式中, 毛细管电压 3.0 kV, 且取样锥孔电压 35~65 V。TOF 离子飞行方式在 V 模式下使用并调整为最大分辨率。质谱采集速率设置为 0.3 s, 允许有 0.02 s 的延迟。氩气作为碰撞气, 碰撞能量为 5~30 V。在实验前, 用甲酸钠校准仪器, 使用质量浓度为 $0.5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 亮氨酸脑啡肽作为外标物对目标离子进行精确质量锁定。

1.5.3 鞘脂类代谢物的鉴定及定量方法

鉴定方法: 在相应的检测模式下, 鞘脂骨架不同产生不同的特征碎片离子, 在正离子模式下, 常见的鞘脂骨架为: t 18:1, d 20:0, d 18:1, d 19:0, d 20:0, d 16:0, d 17:0, d 18:0, d 18:3, d 18:2, 分别产生 280.3, 290.3, 264.3, 280.3, 294.3, 238.3, 252.3, 266.3, 260.3, $262.3\text{ m}\cdot\text{z}^{-1}$ 的离子碎片。在高能量的总离子流图 TIC 中提取各特征碎片离子的 EIC 图, 再在低碰撞能量的 TIC 图中找到与其出峰位置对应的分子离子峰, 即可确定出样品中各分子的元素组成^[16]。

定量方法: 在微藻样品中加入质量浓度为 $5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的鞘脂标准品作为内标, 根据测定对象的峰面积跟已知浓度的标准品峰面积, 半定量样品中鞘脂的相对含量。

1.6 荧光定量 PCR

1.6.1 总 RNA 提取与 cDNA 第一链的合成

按照 Takara RNAiso Plus kit (Takara 公司, 日本)试剂盒说明书来提取总 RNA。反转录 cDNA 第一链的合成按照 Prime ScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser(Perfect Real Time)说明书步骤进行。

1.6.2 引物设计

依据 NCBI 上假微型海链藻 *SPT* 基因和 β -tubulin 基因的保守序列(XM_002296464 和 XM_002292443)采用 Primer 5 软件, 分别设计 2 对特异引物进行荧光定量 PCR 扩增。上下游引物分别为:

5'-GATGATTCTCACGGTATTGG-3',
 5'-TACCGTCATTCCACCTACAC-3';
 5'-GGACGCTACTTGACCTGTGC-3',
 5'-ATGACGGTGAAGTCTCTGC-3'.

1.6.3 荧光定量 PCR 反应

20 μL 的反应体系包括 SYBR Premix Ex Taq II (T/I RNaseH Plus) 10.0 μL 、dNTP ($2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 5.0 μL 、PCR Forward Primer ($10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.8 μL 、PCR Reverse Primer ($10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.8 μL 、cDNA 2.0 μL 、ddH₂O 6.4 μL 。反应程序为: 预变性 95°C 30 s 后, 95°C 3 s, 58°C 51 s 共 40 个循环, 95°C 15 s, 60°C 1 min 结束。

1.6.4 数据处理

对荧光定量 PCR 扩增数据进行处理, 选择 0 d 收的样品作为基准样品, 用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算实验处理样品 SPT 的相对表达量, 其中 $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{样本}) - \Delta C_t(\text{基准})$, $\Delta C_t(\text{样本}) = C_t(\text{样本}) - C_t(\text{内参})$, $\Delta C_t(\text{基准}) = C_t(\text{基准}) - C_t(\text{内参})$, 数值均用平均数 $\pm$ 标准差表示。利用统计软件 SPSS 13.0 分析各实验处理样品 SPT 表达变化的显著性。

2 实验结果

2.1 营养盐对假微型海链藻生长的影响

分别取完全营养盐和营养盐饥饿培养了 0~8 d 的假微型海链藻培养液, 测其在 676 nm 波长的 OD 值, 观察藻的生长情况, 绘制生长曲线(图 1)。

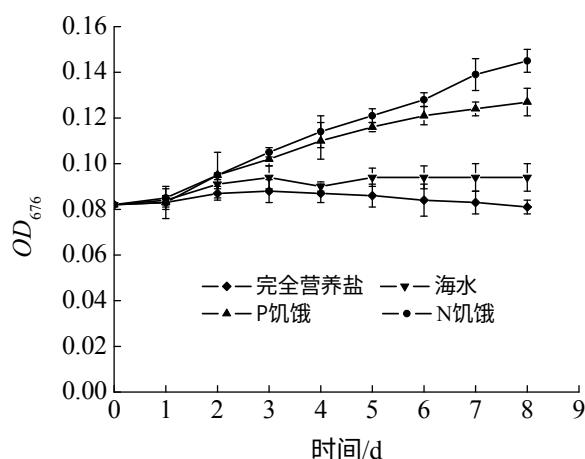


图1 不同培养条件下假微型海链藻 OD₆₇₆

从图1可看出, 完全营养盐组细胞生长状态良好, 细胞生长符合单细胞生物生长曲线, 具有明显的指数期生长, 且一直保持较高的生长速率, 第

8 d 时, 细胞 OD 值达到最大, 为 0.145。P 饥饿组培养的假微型海链藻也呈现出指数期生长, 细胞培养第 2 d 时, 种群生长速率最大, 为 0.006 d^{-1} ; 第 8 d 时, 种群 OD 值达到最大, 为 0.127; 但是 1~8 d 内 P 饥饿组的微藻的生长速率低于完全营养组微藻的生长速率。相较于完全营养和 P 饥饿组细胞, N 饥饿培养组细胞生长明显受到抑制, 没有明显的指数生长期。第 2 d 时种群生长速率最大达到 0.004 d^{-1} , 生长极为缓慢; 第 4 d 时, 细胞达到最大 OD 值 0.094, 较完全营养和 P 盐饥饿组细胞最大 OD 值明显下降, 此后 OD 值逐步下降。到第 8 d 时, 该组细胞 OD 值为 0.089。海水培养过程中细胞的生长变化规律同 N 饥饿培养组相似, 假微型海链藻生长明显受到抑制, 且生长周期缩短。第 2 d 时种群生长速率最大, 仅为 0.002 d^{-1} ; 第 3 d 时, 细胞达到最大 OD 值 0.088, 较其他组最大 OD 值明显下降。此后 OD 值逐步下降, 7~8 d 细胞生长进入衰败期, 第 8 d 时, 该组细胞 OD 值为 0.081。

2.2 营养盐对假微型海链藻鞘脂含量的影响

通过 UPLC-MS 分别检测完全营养盐、P 饥饿、N 饥饿和海水培养的假微型海链藻在第 0, 4, 8 d 的鞘脂种类及含量变化。结果表明, 在假微型海链藻中共检测出 5 种神经酰胺, 见表 1。而不同处理条件下微藻细胞内神经酰胺含量的变化如图 2 所示。

表1 假微型海链藻中神经酰胺种类

保留时间/min	[M+Li] ⁺ /(m·z ⁻¹)	特征碎片/(m·z ⁻¹)	种类
14.09	540.49	260.3 288.4	d18:3-n16:0-ceramide
18.39	544.50	264.3 288.4	d18:1-n16:0-ceramide
22.22	650.60	260.3 398.4	d18:3-n24:1-ceramide
25.37	652.60	260.3 400.4	d18:3-n24:0-ceramide
31.84	656.60	264.3 400.4	d18:1-n24:0-ceramide

从图 2 可知, 完全营养盐、P 饥饿和纯海水培养的假微型海链藻在 0~8 d 内神经酰胺均处于积累状态。第 8 d 神经酰胺含量达到最大值, 分别为 13.461、18.580、8.602 $\text{pmol} \cdot \text{mg}^{-1}$ 干藻, 较第 0 d 分别提高了 2.37、3.27、1.52 倍, 且 P 饥饿培养的假微型海链藻的神经酰胺含量在第 4~8 d 高于其他 2 组, 完全营养盐培养组的假微型海链藻的神经酰胺含量在第 4 d 低于海水组, 但是第 8 d 高于海水组。反之, N 饥饿组假微型海链藻细胞内的神经酰胺含

量在 0~8 d 内呈下降趋势,第 8 d 达到最低含量 $4.596 \text{ pmol} \cdot \text{mg}^{-1}$ 干藻,是第 0 d 的 81%。

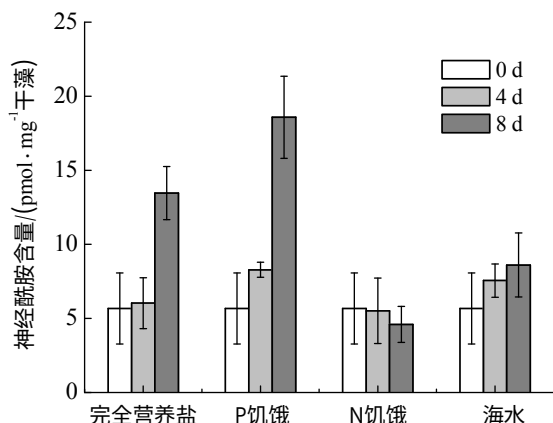


图2 不同培养条件下假微型海链藻中神经酰胺含量变化

2.3 营养盐对假微型海链藻 SPT 表达的影响

采用荧光定量 PCR 技术对完全营养盐、P 饥饿、N 饥饿和海水培养下假微型海链藻的 SPT 的 mRNA 进行定量分析,选择 0 d 收的样品作为基准样品,按照 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算出 SPT 在不同处理下的相对表达量。实验结果采用 SPSS 13.0 单因素方差分析, SPT 在不同营养盐下的表达如图 3 所示。

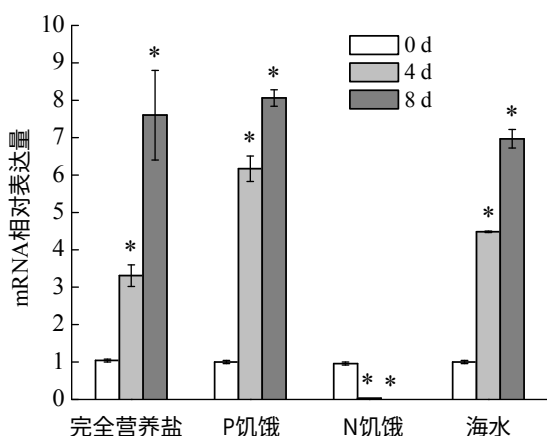


图3 不同培养下假微型海链藻 SPT 表达变化

从图 3 可以发现, SPT 在所有营养盐处理下的假微型海链藻中均有表达,通过分析可知,完全营养盐培养条件下微藻的 SPT 的相对表达量在 0~8 d 内呈明显上升趋势,在第 8 d 该基因的表达量达到最大值,为初始表达量的 7.29 倍,此阶段该基因的表达水平变化显著($P < 0.05$)。同样 P 饥饿组 SPT 的相对表达量在 0~8 d 内也呈显著上升趋势,第 8 d 该基因的表达量达到最大值,为初始表达量的 8.06

倍,此阶段该基因的表达水平变化显著($P < 0.05$)。反之, N 饥饿组微藻 SPT 的相对表达水平在 0~8 d 内呈明显下降趋势,第 8 d 该基因的表达量降低到最低水平,为初始表达量的 0.16%,此阶段该基因的表达水平变化显著($P < 0.05$)。海水培养条件下, SPT 表达水平的变化规律与前 2 组相似, 0~8 d 内可以检测到 SPT 的相对表达水平上升,第 8 d 该基因的表达量达到最高水平,为初始表达量的 6.96 倍,此阶段该基因的表达水平变化显著($P < 0.05$)。另外在 4~8 d, P 饥饿处理下 SPT 的相对表达量最高, N 饥饿下最低。

3 讨论

营养盐是微藻生长繁殖所必须的主要成分,营养盐不足会限制微藻的生长。在 N、P 营养盐胁迫条件下海洋微藻的生长与种类相关性较高。研究表明,布朗葡萄藻的生长更容易受到 P 限制的影响^[17],海洋卡盾藻则对 N 胁迫较敏感,而锥状斯氏藻以及塔玛亚历山大藻对 N 或 P 胁迫的反应相一致^[18-20]。

在海洋生态系统中, N 是最常见的限制性营养元素^[21]。1995 年 Justic 的营养盐绝对限制法则指出:营养盐限制浮游植物生长的物质的量浓度阈值为溶解无机氮 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,溶解无机磷 $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[22],所以 N 饥饿对微藻的生长具有显著的抑制作用。另外,2009 年 Van 研究指出,光合自养浮游植物在 P 限制的环境中能够用含有 S 和 N 的类脂取代细胞膜当中的磷脂,以减少细胞对 P 的利用,应对低 P 环境,为细胞提供生存和竞争优势。这种“磷脂替代物”生物机制的出现为 P 限制下的藻细胞提供了生存可能^[23]。图 1 显示完全营养盐培养条件下假微型海链藻呈指数生长, N、P 饥饿都会影响假微型海链藻的生长,而且 N 饥饿和海水培养的假微型海链藻的生长明显受到抑制, P 饥饿对假微型海链藻生长抑制情况不显著。实验结果表明,假微型海链藻对 N、P 饥饿耐受性存在差异,其生长更易受 N 饥饿的影响。

鞘脂在细胞增殖、分化、衰老到凋亡过程中起着重要的作用,其中神经酰胺是高效的生长抑制剂,可诱导许多细胞发生周期停顿,抑制细胞的生长和使其凋亡^[24]。表 1 显示,假微型海链藻中的鞘

脂主要是神经酰胺。由于完全营养盐和 P 饥饿条件培养的假微型海链藻生长旺盛, 细胞内的各种生理代谢活动旺盛, *SPT* 的表达量成显著的上升趋势(图 3), 从而引起细胞内神经酰胺含量的增加(图 2), 并且 P 饥饿条件培养组在 4~8 d 内 *SPT* 的表达量和神经酰胺含量均高于完全营养组, 所以高含量的神经酰胺反过来又抑制了 P 饥饿培养组微藻的生长, 使得 4~8 d 内 P 饥饿条件培养组微藻的生长速率低于完全营养组。同样, 在 N、P 共同饥饿的相互作用下, 海水组的微藻细胞内 *SPT* 的表达量和神经酰胺含量增加, 假微型海链藻的生长也明显受到抑制。而图 2 和图 3 表明, N 饥饿明显抑制了假微型海链藻 *SPT* 的表达和细胞内神经酰胺的合成, 但微藻的繁殖同样受到抑制(图 1), 说明纯粹的 N 饥饿对假微型海链藻的抑制机理跟前面的几种抑制机理不同, 这也许是因为 N 饥饿会抑制微藻细胞内某些酶的正常表达和活性, 进而影响藻细胞内某些代谢物的合成, 从而抑制微藻的生长繁殖。

本研究通过营养盐对假微型海链藻中 *SPT* 的实时定量分析, 以及其对细胞内鞘脂含量的影响表明, *SPT* 在微藻细胞中的表达水平影响着其鞘脂的合成, 发现 P 饥饿促进细胞内 *SPT* 的表达和神经酰胺的合成, 进而影响假微型海链藻的生长, 而 N 饥饿却抑制细胞内 *SPT* 的表达和神经酰胺的合成, 说明 N 饥饿具备不同于 P 饥饿对微藻的抑制机制。但具体的机制还有待进一步研究。本实验结果为今后关于假微型海链藻生长、衰败和代谢的研究提供了理论依据。

参考文献:

- [1] 刘圣红, 苟萍. 鞘脂类的研究进展[J]. 生物技术, 2009, 19(2):96-97.
- [2] 刘小平, 苟萍. 鞘脂合成的中间代谢酶类的研究进展[J]. 科技信息, 2008(16):7-8.
- [3] IKUSHIRO H, HAYASHI H, KAGSMIYAMA H. A water-soluble homodimeric serine palmitoyltransferase from *Sphingomonas paucimobilis* EY2395T strain purification, characterization, cloning, and overproduction [J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(21):18249-18256.
- [4] NAGIEC M M, BALTISBERGER J A, WELLS G B, et al. The LCB2 gene of *Saccharomyces* and related LCB1 gene encode subunits of serine palmitoyltransferase, the initial enzyme in sphingolipid synthesis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1994, 91(17): 7899-7902.
- [5] WEISS B, STOFFEL W. Human and murine serine-palmitoyl-CoA transferase cloning expression and characterization of the key enzyme in sphingolipid synthesis[J]. European Journal of Biochemistry, 1997, 249(1):239-247.
- [6] IKUSHIRO H, ISLAM M M, TOJO H, et al. Molecular characterization of membrane associated soluble serine palmitoyltransferases from *Sphingobacterium multivorum* and *Bdellovibrio stolpii*[J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(15):5749-5761.
- [7] GABLE K, HAN G, MONAGHAN E, et al. Mutations in the yeast LCB1 and LCB2 genes, including those corresponding to the hereditary sensory neuropathy type I mutations, dominantly inactivate serine palmitoyltransferase [J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(12): 10194-10200.
- [8] HANADA K. Serine palmitoyltransferase, a key enzyme of sphingolipid metabolism[J]. Biochimica Biophysica Acta (Molecular and Cell Biology of Lipids), 2003, 1632(1):16-30.
- [9] 刘旭宏. 海洋球石藻病毒(*Coccolithovirus*)丝氨酸棕榈酰转移酶(*SPT*)基因克隆表达及其与宿主神经酰胺合成之间的关系[D]. 厦门: 集美大学, 2012.
- [10] 杨秀霞, 于浩, 曾晓起. 影响微藻脂肪酸组成因素概述 [J]. 海洋湖沼通报, 2001(1):76-82.
- [11] YONGMANITCHAI W A R D, WARD O P. Growth of and omega-3 fatty acid production by *Phaeodactylum tricornutum* under different culture conditions[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1991, 57(2):419-425.
- [12] ZHILA N O, KALACHEVA G S, VOLOVA T G. Influence of nitrogen deficiency on biochemical composition of the green alga *Botryococcus*[J]. Journal of Applied Phycology, 2005, 17(4):309-315.
- [13] DELAJARA A, MENDOZA H, MARTEL A, et al. Flow cytometric determination of lipid content in a marine dinoflagellate, *Cryptocodini umcohnii*[J]. Applied Phycology, 2003, 15(5):433-438.
- [14] ARMBRUST E V, BERGES J A, BOWLER C, et al. The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: Ecology, evolution, and metabolism[J]. Science, 2004, 306(5693):79-86.
- [15] GUILLARD R R L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates[C]//Smith W, Chanley M H. Culture

- of Marine Invertebrate Animals, New York: Plenum Press, 1975:29-60.
- [16] 赵方. 几种海洋硅藻中鞘脂的液质分析及其结构规律研究[D]. 宁波: 宁波大学, 2013.
- [17] 孙凯峰, 胡章喜, 段舜山. N、P 营养盐胁迫对两株布朗葡萄藻生长的影响[J]. 水生生物学报, 2010, 34(3): 517-524.
- [18] 张冬鹏, 武宝玕. 几种赤潮藻对温度、氮、磷的响应及藻间相互作用的研究[J]. 暨南大学学报(自然科学版), 2000, 21(5):82-87.
- [19] 石岩峻, 胡晗华, 马润宇, 等. 塔玛亚历山大藻对氮和磷的吸收及其生长特性[J]. 应用生态学报, 2003, 14(7): 1143-1146.
- [20] 袁美玲, 王朝晖, 李友富. N、P 营养盐对海洋卡盾藻 (*Chattonella marina*)生长的影响[J]. 生态学报, 2008, 28(1):430-435.
- [21] 王勇, 焦念志. 营养盐对浮游植物生长上行效应机制的研究进展[J]. 海洋科学, 2000, 24(10):30-33.
- [22] JUSTIC D, RABALAIS N N, TURNER R E, et al. Changes in nutrient structure of river-dominated coastal waters: Stoichiometric nutrient balance and its consequences[J]. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 1995, 40(3):339-356.
- [23] VAN MOOY B A, FEWDRICKS H F, PEDLER B E, et al. Phytoplankton in the ocean use non-phosphorus lipids in response to phosphorus scarcity[J]. Nature, 2009, 458:69-72.
- [24] 蒲云峰, 张伟敏, 钟耕. 神经酰胺功能和应用[J]. 粮食与油脂, 2005(7):14-16.

Effect of Nutrient on the Sphingolipid Synthesis of *Thalassiosira pseudonana*

HUANG Li-li, CHEN Wen-bi, LI Yan-rong, XU Ji-lin*, CHEN Hai-min, ZHU Zhu-jun,
ZHOU Cheng-xu, YAN Xiao-jun

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

Abstract: Serine palmitoyltransferase (SPT) is the key enzyme in the de novo synthesis of sphingolipid, and its expression level can affect the content of sphingolipid in cells. In this experiment, the effect of nutrient on the expression of SPT and the synthesis of sphingolipid in *Thalassiosira pseudonana* is investigated using real-time PCR and ultra performance liquid chromatography mass spectrometry. Results indicate that the expression level of SPT affects sphingolipid content in microalgae cells. Moreover, phosphorus starvation makes both the expression level of SPT and the synthesis of ceramides in cell increase, which affects the growth of *T. pseudonana*. In contrast, the nitrogen deprivation inhibites both the expression of SPT and the synthesis of ceramides in cell, and significantly restrains the growth of *T. pseudonana*. The results are expected to provide theory foundation for some studies of the growth, decay and metabolism of *T. pseudonana*.

Key words: *Thalassiosira pseudonana*; nutrient; sphingolipid; serine palmitoyltransferase

(责任编辑 史小丽)