

· 技术方法 ·

基于液质联用的莱茵衣藻极性甘油酯组定性定量分析

杨森^{1,2,3}, 孟迎迎^{1,3}, 褚亚东¹, 薛松^{1*}

¹中国科学院大连化学物理研究所, 大连 116023; ²中国科学院大学, 北京 100049; ³大连理工大学生命科学与技术学院, 大连 116024

摘要 以模式藻株莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)为材料, 基于液质联用技术对其极性甘油酯组进行定性定量分析。通过综合利用UPLC-ESI-Q-Trap/MS的一级质谱扫描(中性丢失或母离子扫描)及UPLC-ESI-Orbitrap/MS²的二级碎片信息扫描, 共鉴定出109种极性甘油酯分子; 再通过外标法利用UPLC-ESI-Q-Trap/MS在多级反应监测模式下对各分子进行靶向定量分析。结果表明, 莱茵衣藻的极性脂以糖脂MGDG、DGDG及甜菜碱脂DGTS为主, 所有极性脂的分子组成表明, DGDG、SQDG、DGTS及PI是C18脂肪酸的去饱和载体。该研究利用液质联用技术建立了莱茵衣藻极性甘油酯组的结构图谱及定量分析技术平台, 为微藻极性脂生物学功能及脂质代谢研究奠定了基础。

关键词 莱茵衣藻, 液质联用技术, 极性甘油酯组, 定性定量分析

杨森, 孟迎迎, 褚亚东, 薛松 (2018). 基于液质联用的莱茵衣藻极性甘油酯组定性定量分析. 植物学报 53, 812–828.

脂质不仅是微藻细胞中各种生物膜的骨架成分, 还是一种能量储存形式, 参与许多重要的生物学过程, 如叶绿体的光合作用、线粒体的电子传递及信号转导(Li-Beisson et al., 2016)。甘油酯包括极性脂和中性脂, 作为微藻脂质的主要组分, 其化学多样性与藻细胞的多种功能密切相关(Horn and Benning, 2016)。在正常生长条件下, 微藻甘油酯以极性甘油酯为主, 广泛分布于叶绿体中, 一些极性甘油酯还分布于叶绿体外的多种膜结构如线粒体、内质网及细胞质膜中, 对藻细胞的生长繁殖具有重要作用(Li et al., 2016)。在多种胁迫(光照、盐度、温度和pH等)条件下, 微藻能大量积累中性脂甘油三酯(TAG) (Zienkiewicz et al., 2016)。极性脂与TAG在藻细胞的不同亚细胞区室内发生合成、分解与转化等多种生物化学反应, 共同调控微藻的脂质代谢, 从而维持藻细胞的脂质内稳态(Li-Beisson et al., 2015; Allen et al., 2017)。因此, 极性甘油酯在微藻应对环境胁迫诱导的脂质代谢中发挥重要作用, 系统完整地解析微藻极性甘油酯组将有助于揭示微藻脂质代谢调控及生物学功能。

基于液相色谱及质谱的脂质组学是对脂质进行定性定量分析并在分子水平上研究脂质代谢的一种强有力的工具(Han and Gross, 2003; Li et al.,

2014)。已有利用液质联用技术研究微藻脂质代谢的报道, 研究对象包括莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*) (Yang et al., 2015; Légeret et al., 2016)、三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*) (Abida et al., 2015)、微拟球藻(*Nannochloropsis* sp.)及小球藻(*Chlorella* sp.) (Martin et al., 2014)等, 但这些报道多局限于微藻脂质组的定性及相对定量或各脂质种类总含量的定量研究, 关于微藻各甘油酯分子的绝对定量研究较少(Popko et al., 2016; Han et al., 2017)。本研究以模式微藻莱茵衣藻为研究对象, 旨在建立一种基于超高效液相色谱-四级杆线性离子阱高性能质谱(UPLC-Q-Trap/MS)及超高效液相色谱-二维线性离子阱静电场轨道阱组合式高分辨质谱(UPLC-Orbitrap/MS²)技术的极性甘油酯定性定量分析方法, 为获得完整的莱茵衣藻极性甘油酯分子库及其分布信息提供技术平台, 进而为开展微藻脂质代谢, 尤其是极性甘油酯的动态变化及其在逆境胁迫中的响应机制研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 藻种培养

莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii* L.)缺壁株

收稿日期: 2017-09-24; 接受日期: 2017-12-27

基金项目: 国家自然科学基金(No.21576253)

* 通讯作者。E-mail: xuesong@dicp.ac.cn

CC4326购自莱茵衣藻中心(<http://www.chlamycol-lection.org/>)。于鼓泡式柱状光生物反应器(内径4.5 cm, 高45 cm, 培养体积为600 mL)中进行通气培养, 通气量为 $120 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, CO_2 通入比例为2%, 单面光照强度为 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 起始接种密度为 1×10^4 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 。连续光照培养48小时后将光周期调整为12小时光照/12小时黑暗, 再继续培养48小时, 待进入光照期4小时后藻细胞密度达 1×10^7 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$, 离心收获呈指数生长的藻细胞($3000 \times \text{g}$, 4°C , 5分钟)。藻细胞经冷冻干燥后磨成粉状, 保存于 -80°C 冰箱中, 用于后续脂质分析。

1.2 脂质提取

按照Bligh和Dyer (1959)的方法提取莱茵衣藻的脂质。用分析天平(MSE125P-1CEDI, Sartorius, Germany)准确称取5 mg上述藻粉, 加入950 μL 氯仿:甲醇:水(1:2:0.8, v/v/v), 超声15分钟后振荡30秒; 加入250 μL 氯仿后振荡30秒; 加入250 μL 水后再振荡30秒; 离心($15520 \times \text{g}$, 2分钟)分层。将下层有机相转移至2 mL进样瓶中, 再重复提取2次, 合并有机相后用氮气吹干, 用氯仿:甲醇(1:4, v/v)复溶并定容至1 mL, 经尼龙膜(孔径0.22 μm)过滤后待用。

1.3 液相色谱分离

取上述脂质提取物利用反相液相色谱(reversed phase liquid chromatography, RPLC, Waters ACQUITY UPLC)在Ascentis® Express C8色谱柱(粒径2.7 μm ,

15 cm \times 2.1 mm I.D., Sigma-Aldrich, USA)上进行分离。二元泵系统包括流动相A及B, A为乙腈:水(60:40, v/v), B为异丙醇:乙腈(90:10, v/v), 二者均含有 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲酸铵。流速设置为 $0.26 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温及样品盘温度分别设置为 55°C 及 20°C 。洗脱梯度程序设置为33分钟, 初始流动相为30%B并保持1.5分钟, 在2.5分钟内线性增加至40%, 随后在11分钟内线性增加至60%, 然后在3分钟内增加至70%, 接着在4分钟内增加至75%, 随后在4分钟内增加至97%并维持3分钟, 然后在1分钟内恢复至初始梯度30%B, 平衡3分钟, 等待下次进样。

1.4 基于UPLC-ESI-Q-Trap/MS及UPLC-ESI-Orbitrap/MS²的莱茵衣藻甘油酯组定性分析

利用UPLC-Q-Trap/MS系统(Waters ACQUITY UPLC, AB SCIEX Q-Trap 5500)在正离子模式下对莱茵衣藻极性甘油酯种类及分子进行辨认。其中糖脂(单半乳糖甘油二酯(MGDG)、双半乳糖甘油二酯(DGDG)及硫代异鼠李糖甘油二酯(SQDG))及磷脂(磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酰甘油(PG)及磷脂酰肌醇(PI))以中性丢失扫描(neutral loss scan, NL)模式进行扫描, 甜菜碱脂(*N,N,N*-三甲基高丝氨酸甘油二酯(DGTS))以母离子扫描(precursor ion scan, PIS)模式进行扫描(Anesi and Guella, 2015)。此外, MGDG、DGDG、SQDG、PG及PI以 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ 形式检测, PE及DGTS以 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 形式检测。以上7种甘油酯的碰撞能(collision energy, CE)经优化分别设置为20、20、32、15、27、28及43 eV (表1),

表1 莱茵衣藻各类甘油酯中性丢失或母离子扫描参数

Table 1 Parameters of neutral loss or precursor ion scanning for the glycerolipids in *Chlamydomonas reinhardtii*

Lipids	Classes	Adduct ion	Scanning mode	Mass of characteristic fragment (m/z)	Chemical formula of characteristic fragment	Collision energy (eV)
Glycolipids	MGDG	$[\text{M}+\text{NH}_4]^+$	NL	179	$[\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_5]$	20
	DGDG	$[\text{M}+\text{NH}_4]^+$	NL	341	$[\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{NO}_{10}]$	20
	SQDG	$[\text{M}+\text{NH}_4]^+$	NL	261	$[\text{C}_6\text{H}_{15}\text{NO}_8\text{S}]$	32
Phospholipids	PE	$[\text{M}+\text{H}]^+$	NL	141	$[\text{C}_2\text{H}_8\text{NO}_4\text{P}]$	28
	PG	$[\text{M}+\text{NH}_4]^+$	NL	189	$[\text{C}_3\text{H}_{12}\text{NO}_6\text{P}]$	15
	PI	$[\text{M}+\text{NH}_4]^+$	NL	277	$[\text{C}_6\text{H}_{16}\text{NO}_9\text{P}]$	27
Betaine lipids	DGTS	$[\text{M}+\text{H}]^+$	PIS	236	$[\text{C}_{10}\text{H}_{22}\text{NO}_5]^+$	43

MGDG: 单半乳糖甘油二酯; DGDG: 双半乳糖甘油二酯; SQDG: 硫代异鼠李糖甘油二酯; PE: 磷脂酰乙醇胺; PG: 磷脂酰甘油; PI: 磷脂酰肌醇; DGTS: *N,N,N*-三甲基高丝氨酸甘油二酯

MGDG: Monogalactosyl diacylglycerol; DGDG: Digalactosyl diacylglycerol; SQDG: Sulfoquinovosyl diacylglycerol; PE: Phosphatidylethanolamine; PG: Phosphatidylglycerol; PI: Phosphatidylinositol; DGTS: *N,N,N*-trimethyl-homoserine-diacylglycerol

每种极性甘油酯的特征碎片信息(Anesi and Guella, 2015)见表1。离子源为Turbo VTM电喷雾离子源(ESI), 离子源电压及温度分别为5 500 eV及500°C, 去簇电压100 V, 气帘气压力10 psi。利用Analyst 1.4.2 (AB SCIEX)软件采集并处理数据, 最终得到具有不同质荷比(m/z)的所有极性甘油酯分子。

基于以上鉴定出的极性甘油酯分子, 利用UPLC系统经ESI与LTQ-Orbitrap XL质谱(Thermo Fisher Scientific, CA, USA)相连, 分别在正、负离子模式下通过二级碎片信息扫描鉴定具有相同质荷比但不同酰基链组成的分子种类。在正离子模式下, MGDG、DGDG及SQDG以[M+NH₄]⁺形式检测, DGTS以[M+H]⁺形式检测; 在负离子模式下, PE、PG及PI以[M-H]⁻形式检测。质量扫描范围设置为(140–1 000) m/z。在样品检测之前, 需提前计算或确认每个极性甘油酯分子的精确质量(精确至小数点后四位)以确保高分辨率。该精确质量的查询可在LIPIDMAPS (<http://www.lipidmaps.org/>)数据库中进行, 同时需确定每个甘油酯分子的保留时间以设置二级碎片扫描信息。一级质谱扫描采用傅里叶变换(FTMS)模式, 二级质谱扫描采用离子阱(ion trap, IT)模式。碰撞诱导解离(collision-induced dissociation, CID)碎裂由氦气碰撞产生。MGDG及SQDG的碰撞能设置为50 eV, DGDG为70 V, PE、PG、PI及DGTS为35 eV。活化Q值(Activation Q)设为0.18。隔离宽度(isolation width)分别设置为1.0 m/z (PE、PG、PI及DGTS)及3.0 m/z (MGDG、DGDG及SQDG)。利用Xcalibur 2.1 (Thermo Fisher Scientific, CA, USA)软件进行数据采集。各极性甘油酯分子的脂酰基链位置分布(sn-1及sn-2位)按已发表文献中的检测结果确定(Giroud et al., 1988; Légeret et al., 2016)。

1.5 基于UPLC-ESI-Q-Trap/MS的莱茵衣藻甘油酯分子定量分析

通过联合超高效液相色谱(Waters ACQUITY UPLC)及串联质谱(AB SCIEX Q-TRAP 5500), 在多级反应监测模式(multiple reaction monitoring, MRM)下对上述已鉴定出的各极性甘油酯分子进行靶向定量分析。设置的所有母离子-子离子对信息如表2所示。制备的样品浓度为5 mg·mL⁻¹, 进样量为2 μL, 碰撞能设置同上述部分(表1)。结合每种极性甘油酯分子的保留时

间, 利用Analyst 1.4.2 (AB SCIEX)软件的定量功能对采集的数据进行自动整合, 得到每种分子的峰面积积分值。利用外标法对各极性甘油酯分子含量进行绝对定量测定, 这些标准品分别为购自Matreya LLC (Pleasant Gap, PA, USA)的MGDG 18:0/18:0和DGDG 18:0/18:0以及购自Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA)的SQDG 16:0/18:3、PE 17:0/17:0、PG 17:0/17:0、PI 16:0/16:0和DGTS 16:0/16:0。藻细胞各极性甘油酯分子的绝对含量以每毫克藻细胞干重所含有分子的纳摩尔数表征(nmol·mg⁻¹), 该绝对含量先通过相应标准品浓度(nmol·mL⁻¹)及其峰面积之间的线性回归方程计算出目标分子浓度(nmol·mL⁻¹), 再通过藻细胞油脂提取液的生物质浓度(mg·mL⁻¹)计算得到。

2 结果与讨论

2.1 基于UPLC-Q-Trap/MS的莱茵衣藻甘油酯分子鉴定

通过UPLC-Q-Trap/MS在正离子模式下对极性脂进行一级质谱全扫描, 包括中性丢失或母离子扫描, 共得到65种具有不同质荷比的分子, 其中糖脂MGDG、DGDG及SQDG分别检出7、11和6种, 磷脂PE、PG及PI分别检出11、8和4种, 甜菜碱脂DGTS检出18种, 每种甘油酯分子种类的质荷比及分子式如表2所示。根据每种极性甘油酯分子的质荷比, 在LIPIDMAPS数据库中进行比对, 确认每种分子的碳原子及不饱和键数目, 表示为C:N (表2)。结果表明, 莱茵衣藻极性脂分子包括C32、C34及C36共3类, 其sn-1及sn-2位酰基链组合形式分别为C16/C16、C16/C18及C18/C18 (该组合形式不区分sn-1及sn-2位置)。

2.2 基于UPLC-Orbitrap/MS²的莱茵衣藻极性甘油酯分子的酰基链解析

根据上述鉴定出的65种具有不同质荷比的分子种类组成, 先利用UPLC-Orbitrap/MS在FTMS模式及正负离子模式下获得莱茵衣藻所有甘油酯分子的高分辨质谱全扫描图, 对Q-Trap/MS获得的质荷比不同的所有甘油酯分子进行再次确认及鉴定; 再利用UPLC-Orbitrap/MS²在IT模式下对上述各极性甘油酯分子进行二级碎片信息扫描。通过对每类极性甘油酯分子二

表2 基于UPLC-Q-Trap/MS和UPLC-Orbitrap/MS²的莱茵衣藻极性甘油酯分子种类及MRM模式下的109个离子对信息**Table 2** The molecular species of polar glycerolipids in *Chlamydomonas reinhardtii* identified by UPLC-Q-Trap/MS and UPLC-Orbitrap/MS² and the information of 109 ion pairs of polar lipids in MRM mode

Lipid species (C:N)	Theoretical mass (m/z)	Chemical formula	No.	Molecular species (sn-1/sn-2)	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)
MGDG 34:7	762.5156	C ₄₃ H ₇₂ NO ₁₀	1	MGDG 18:3/16:4	762.5	335.2
MGDG 34:6	764.5312	C ₄₃ H ₇₄ NO ₁₀	2	MGDG 18:3/16:3	764.5	335.2
			3	MGDG 18:2/16:4	764.5	337.2
			4	MGDG 18:4/16:2	764.5	309.2
MGDG 34:5	766.5469	C ₄₃ H ₇₆ NO ₁₀	5	MGDG 18:3/16:2	766.5	335.2
			6	MGDG 18:2/16:3	766.5	337.2
			7	MGDG 18:1/16:4	766.5	339.2
			8	MGDG 18:4/16:1	766.5	333.2
MGDG 34:4	768.5625	C ₄₃ H ₇₈ NO ₁₀	9	MGDG 18:1/16:3	768.5	339.2
			10	MGDG 18:2/16:2	768.5	337.2
			11	MGDG 18:3/16:1	768.5	311.2
			12	MGDG 18:4/16:0	768.5	313.2
			13	MGDG 18:0/16:4	768.5	341.2
MGDG 34:3	770.5781	C ₄₃ H ₈₀ NO ₁₀	14	MGDG 18:1/16:2	770.5	339.2
			15	MGDG 18:2/16:1	770.5	337.2
			16	MGDG 18:3/16:0	770.5	335.2
MGDG 34:2	772.5938	C ₄₃ H ₈₂ NO ₁₀	17	MGDG 18:1/16:1	772.5	339.2
			18	MGDG 18:0/16:2	772.5	341.2
			19	MGDG 18:2/16:0	772.5	313.2
MGDG 34:1	774.6094	C ₄₃ H ₈₄ NO ₁₀	20	MGDG 18:1/16:0	774.6	339.2
			21	MGDG 18:0/16:1	774.6	341.2
DGDG 32:3	904.5997	C ₄₇ H ₈₆ NO ₁₅	22	DGDG 16:0/16:3	904.5	313.2
			23	DGDG 16:1/16:2	904.5	311.2
DGDG 34:7	924.5684	C ₄₉ H ₈₂ NO ₁₅	24	DGDG 18:3/16:4	924.5	335.2
DGDG 34:6	926.5840	C ₄₉ H ₈₄ NO ₁₅	25	DGDG 18:3/16:3	926.5	335.2
			26	DGDG 18:2/16:4	926.5	337.2
			27	DGDG 18:4/16:2	926.5	333.2
			28	DGDG 18:2/16:3	928.5	337.2
			29	DGDG 18:3/16:2	928.5	335.2
DGDG 34:5	928.5997	C ₄₉ H ₈₆ NO ₁₅	30	DGDG 18:3/16:1	930.6	335.2
			31	DGDG 18:2/16:2	930.6	337.2
			32	DGDG 18:1/16:3	930.6	339.2
DGDG 34:4	930.6153	C ₄₉ H ₈₈ NO ₁₅	33	DGDG 18:1/16:2	932.6	339.2
			34	DGDG 18:3/16:0	932.6	313.2
			35	DGDG 18:2/16:1	932.6	337.2
DGDG 34:3	932.6309	C ₄₉ H ₉₀ NO ₁₅	36	DGDG 18:1/16:1	934.6	339.2
			37	DGDG 18:2/16:0	934.6	337.2
DGDG 34:2	934.6466	C ₄₉ H ₉₂ NO ₁₅	38	DGDG 18:1/16:0	936.6	339.2
DGDG 34:1	936.6622	C ₄₉ H ₉₄ NO ₁₅	39	DGDG 18:0/16:0	938.6	341.2
DGDG 34:0	938.6779	C ₄₉ H ₉₆ NO ₁₅	40	DGDG 18:1/18:3	958.6	339.2
DGDG 36:4	958.6466	C ₅₁ H ₉₂ NO ₁₅	41	DGDG 18:2/18:2	958.6	337.2
			42	DGDG 18:0/18:3	960.6	341.2
DGDG 36:3	960.6622	C ₅₁ H ₉₄ NO ₁₅	43	SQDG 16:0/16:1	810.5	313.2
SQDG 32:1	810.5400	C ₄₁ H ₈₀ NO ₁₂ S	44	SQDG 16:0/16:0	812.5	313.2
SQDG 32:0	812.5557	C ₄₁ H ₈₂ NO ₁₂ S	45	SQDG 18:3/16:0	834.5	313.2
SQDG 34:3	834.5400	C ₄₃ H ₈₀ NO ₁₂ S				

表2 (续) Table 2 (continued)

Lipid species (C:N)	Theoretical mass (m/z)	Chemical formula	No.	Molecular species (sn-1/sn-2)	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)
SQDG 34:2	836.5557	C ₄₃ H ₈₂ NO ₁₂ S	46	SQDG 18:2/16:0	836.5	313.2
SQDG 34:1	838.5713	C ₄₃ H ₈₄ NO ₁₂ S	47	SQDG 18:1/16:0	838.5	313.2
SQDG 34:0	840.587	C ₄₃ H ₈₆ NO ₁₂ S	48	SQDG 18:0/16:0	840.5	341.2
PE 32:2	688.4916	C ₃₇ H ₇₁ NO ₈ P	49	PE 16:1/16:1	688.4	547.4
PE 32:1	690.5073	C ₃₇ H ₇₃ NO ₈ P	50	PE 16:0/16:1	690.5	549.5
PE 32:0	692.5229	C ₃₇ H ₇₅ NO ₈ P	51	PE 16:0/16:0	692.5	551.5
PE 34:4	712.4916	C ₃₉ H ₇₁ NO ₈ P	52	PE 16:0/18:3	714.5	573.5
PE 34:2	716.5229	C ₃₉ H ₇₅ NO ₈ P	53	PE 34:2	716.5	575.5
PE 34:1	718.5386	C ₃₉ H ₇₇ NO ₈ P	54	PE 16:0/18:1	718.5	577.5
PE 36:6	736.4916	C ₄₁ H ₇₁ NO ₈ P	55	PE 18:3/18:3	736.4	595.4
PE 36:5	738.5073	C ₄₁ H ₇₃ NO ₈ P	56	PE 18:2/18:3	738.5	597.5
PE 36:4	740.5229	C ₄₁ H ₇₅ NO ₈ P	57	PE 36:4	740.5	599.5
PE 36:3	742.5386	C ₄₁ H ₇₇ NO ₈ P	58	PE 18:0/18:3	742.5	601.5
PE 36:2	744.5543	C ₄₁ H ₇₉ NO ₈ P	59	PE 18:1/18:1	744.5	603.5
PG 32:2	736.5128	C ₃₈ H ₇₅ NO ₁₀ P	60	PG 16:1/16:1	736.5	547.5
PG 32:1	738.5284	C ₃₈ H ₇₇ NO ₁₀ P	61	PG 16:0/16:1	738.5	549.5
PG 32:0	740.5441	C ₃₈ H ₇₉ NO ₁₀ P	62	PG 16:0/16:0	740.5	551.5
PG 34:4	760.5128	C ₄₀ H ₇₅ NO ₁₀ P	63	PG 18:3/16:1	760.5	571.5
PG 34:3	762.5284	C ₄₀ H ₇₇ NO ₁₀ P	64	PG 34:3	762.5	573.5
PG 34:2	764.5441	C ₄₀ H ₇₉ NO ₁₀ P	65	PG 34:2	764.5	575.5
PG 34:1	766.5598	C ₄₀ H ₈₁ NO ₁₀ P	66	PG 18:1/16:0	766.5	577.5
PG 34:0	768.5754	C ₄₀ H ₈₃ NO ₁₀ P	67	PG 18:0/16:0	768.5	579.5
PI 34:3	850.5445	C ₄₃ H ₈₁ NO ₁₃ P	68	PI 18:3/16:0	850.5	573.5
PI 34:2	852.5601	C ₄₃ H ₈₃ NO ₁₃ P	69	PI 34:2	852.5	575.5
PI 34:1	854.5757	C ₄₃ H ₈₅ NO ₁₃ P	70	PI 18:1/16:0	854.5	577.5
PI 34:0	856.5914	C ₄₃ H ₈₇ NO ₁₃ P	71	PI 18:0/16:0	856.5	579.5
DGTS 32:4	704.5464	C ₄₂ H ₇₄ NO ₇	72	DGTS 16:0/16:4	704.5	474.4
			73	DGTS 16:3/16:1	704.5	472.4
			74	DGTS 16:2/16:2	704.5	470.4
DGTS 32:3	706.5621	C ₄₂ H ₇₆ NO ₇	75	DGTS 16:0/16:3	706.5	474.4
			76	DGTS 16:2/16:1	706.5	470.4
DGTS 32:2	708.5778	C ₄₂ H ₇₈ NO ₇	77	DGTS 16:0/16:2	708.5	474.4
DGTS 32:1	710.5934	C ₄₂ H ₈₀ NO ₇	78	DGTS 16:0/16:1	710.5	474.4
DGTS 32:0	712.6091	C ₄₂ H ₈₂ NO ₇	79	DGTS 16:0/16:0	712.6	474.4
DGTS 34:7	726.5308	C ₄₄ H ₇₂ NO ₇	80	DGTS 16:4/18:3	726.5	466.4
			81	DGTS 16:3/18:4	726.5	468.4
DGTS 34:6	728.5464	C ₄₄ H ₇₄ NO ₇	82	DGTS 16:3/18:3	728.5	468.4
			83	DGTS 16:4/18:2	728.5	466.4
			84	DGTS 16:2/18:4	728.5	494.4
DGTS 34:5	730.5621	C ₄₄ H ₇₆ NO ₇	85	DGTS 16:4/18:1	730.5	500.4
			86	DGTS 16:1/18:4	730.5	472.4
			87	DGTS 16:3/18:2	730.5	498.4
			88	DGTS 16:2/18:3	730.5	470.4
DGTS 34:4	732.5778	C ₄₄ H ₇₈ NO ₇	89	DGTS 16:1/18:3	732.5	496.4
			90	DGTS 16:2/18:2	732.5	498.4
			91	DGTS 16:3/18:1	732.5	500.4
			92	DGTS 16:0/18:4	732.5	474.4

表2 (续) Table 2 (continued)

Lipid species (C:N)	Theoretical mass (m/z)	Chemical formula	No.	Molecular species (sn-1/sn-2)	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)
			93	DGTS 16:4/18:0	732.5	502.4
DGTS 34:3	734.5934	C ₄₄ H ₈₀ NO ₇	94	DGTS 16:0/18:3	734.5	474.4
DGTS 34:2	736.6091	C ₄₄ H ₈₂ NO ₇	95	DGTS 16:0/18:2	736.6	474.4
DGTS 34:1	738.6247	C ₄₄ H ₈₄ NO ₇	96	DGTS 16:0/18:1	738.6	474.4
			97	DGTS 16:1/18:0	738.6	502.4
DGTS 36:7	754.5621	C ₄₆ H ₇₆ NO ₇	98	DGTS 18:3/18:4	754.5	496.4
DGTS 36:6	756.5778	C ₄₆ H ₇₈ NO ₇	99	DGTS 18:3/18:3	756.5	496.4
			100	DGTS 18:4/18:2	756.5	498.4
DGTS 36:5	758.5934	C ₄₆ H ₈₀ NO ₇	101	DGTS 18:2/18:3	758.5	498.4
			102	DGTS 18:1/18:4	758.5	500.4
DGTS 36:4	760.6091	C ₄₆ H ₈₂ NO ₇	103	DGTS 18:2/18:2	760.6	498.4
			104	DGTS 18:1/18:3	760.6	500.4
			105	DGTS 18:0/18:4	760.6	502.4
DGTS 36:3	762.6247	C ₄₆ H ₈₄ NO ₇	106	DGTS 18:0/18:3	762.6	502.4
			107	DGTS 18:1/18:2	762.6	500.4
DGTS 36:2	764.6404	C ₄₆ H ₈₆ NO ₇	108	DGTS 18:1/18:1	764.6	500.4
			109	DGTS 18:0/18:2	764.6	502.4

MGDG、DGDG、SQDG、PE、PG、PI和DGTS同表1。MGDG, DGDG, SQDG, PE, PG, PI and DGTS see Table 1.

级质谱(MS/MS)信息进行解析, 获得各类极性甘油酯的碎裂方式以及碰撞诱导解离(CID)碎片(表3) (Han, 2016a)。

图1—图3为莱茵衣藻7种极性甘油酯各典型分子的二级质谱图。在所有质谱图中, 除PE外均未检测到各甘油酯分子的母离子质谱峰, 可能是由于在Orbitrap/MS下所设置的碰撞能偏高所致。其中糖脂MGDG、DGDG及SQDG在正离子模式下分别有5、6和4种碎片离子, 我们以MGDG 18:3/16:4、DGDG 18:1/16:0及SQDG 16:0/16:0为例进行说明(图1)。首先, 3种糖脂有4种相同的碎裂方式, 分别为丢失NH₃ (碎片离子m/z分别为745.51、918.83和795.50)、NH₃+H₂O (碎片离子m/z分别为727.48、901.78和777.55)、加NH₃极性基团(碎片离子m/z分别为583.47、595.50和551.56)和同时丢失加NH₃极性基团及sn-1或sn-2位脂肪酸形成的碎片离子([M+NH₄-179-R_xCOOH]⁺、[M+NH₄-341-R_xCOOH]⁺和[M+NH₄-261-R_xCO+H]⁺)。其次, MGDG及DGDG还有另外1种相同的碎裂方式, 即同时丢失加NH₃极性基团及H₂O形成的碎片离子, 其m/z分别为565.48和577.52。最后, 值得注意的是, DGDG还能同时丢失极性基团-单半乳糖基及H₂O, 形成碎片离子[M+NH₄-180]⁺。

在负离子模式下, 磷脂PE、PG及PI的碎裂形式(图2)各有特点, 分别能形成3、4和6种碎片离子, 我们以PE 18:0/18:3、PG 18:1/16:0及PI 18:1/16:0为例, 其母离子均为[M-H]⁻。首先, 这3种磷脂均有相同的碎片离子[R_xCOO]⁻、[M-H-R_xCOOH]⁻及[M-H-R_xCO+H]⁻。其中, [R_xCOO]⁻如图2A (-m/z 277.18及283.26)、图2B (-m/z 255.20及281.26)和图2C (-m/z 255.24及281.26)所示; [M-H-R_xCOOH]⁻如图2A (-m/z 456.3及462.42)、图2B (-m/z 465.42及491.29)和图2C (-m/z 553.35及579.35)所示; [M-H-R_xCO+H]⁻如图2A (-m/z 474.29及480.32)、图2B (-m/z 483.35及509.31)和图2C (-m/z 571.38及597.39)所示。其次, PG与PI还具有另外1种相同的碎片离子[PA-H-R_xCOOH]⁻, 通过丢失1个酰基链及极性基团(甘油或肌醇基团)获得, 如图2B (-m/z 391.32及417.25)和图2C (-m/z 391.29及417.29)所示。最后, PI还有特征碎片-m/z 241, 通过丢失2个酰基链(R₁CO⁺及R₂CO⁺)及甘油基获得, 由磷酸基及肌醇基团组成。

在正离子模式下对甜菜碱脂DGTS进行碎裂(图3), 其碎片离子共3种, 包括丢失1个酰基链的碎片离子[M+H-R_xCOOH]⁺及[M+H-R_xCO+H]⁺。其中[M+H-R_xCOOH]⁺如图3中的456.37及478.35, [M+H-R_xCO+

表3 莱茵衣藻甘油酯的碰撞诱导解离(CID)碎片

Table 3 The collision-induced dissociation (CID) fragments of glycerolipids in *Chlamydomonas reinhardtii*

Lipid class	Adduct ion	Ion mode	CE (eV)	CID fragments
MGDG	[M+NH ₄] ⁺	+	50	[M+NH ₄ -17] ⁺ , [M+NH ₄ -35] ⁺ , [M+NH ₄ -179] ⁺ , [M+NH ₄ -197] ⁺ , [M+NH ₄ -179-R _x COOH] ⁺
DGDG	[M+NH ₄] ⁺	+	70	[M+NH ₄ -17] ⁺ , [M+NH ₄ -35] ⁺ , [M+NH ₄ -180] ⁺ , [M+NH ₄ -341] ⁺ , [M+NH ₄ -359] ⁺ , [M+NH ₄ -341-R _x COOH] ⁺
SQDG	[M+NH ₄] ⁺	+	50	[M+NH ₄ -17] ⁺ , [M+NH ₄ -35] ⁺ , [M+NH ₄ -261] ⁺ , [M+NH ₄ -261-R _x CO+H] ⁺
PE	[M-H] ⁻	-	35	[R _x COO] ⁻ , [M-H-R _x COOH] ⁻ , [M-H-R _x CO+H] ⁻
PG	[M-H] ⁻	-	35	[R _x COO] ⁻ , [M-H-R _x COOH] ⁻ , [M-H-R _x CO+H] ⁻ , [PA-H-R _x COOH] ⁻
PI	[M-H] ⁻	-	35	[R _x COO] ⁻ , [M-H-R _x COOH] ⁻ , [M-H-R _x CO+H] ⁻ , [M-H-R ₁ COOH-R ₂ -COOH] ⁻ , [PA-H-R _x COOH] ⁻ , 241
DGTS	[M+H] ⁺	+	35	[M+H-R _x COOH] ⁺ , [M+H-R _x CO+H] ⁺ , 236

17代表NH₃; 35代表H₂O和NH₃; 179代表加NH₃的单半乳糖基(m/z, 162); 197代表加NH₃的单半乳糖基和H₂O; 180代表单半乳糖基和H₂O; 359代表加NH₃的双半乳糖基(m/z, 324)和H₂O; 261代表加NH₃的硫代异鼠李糖基(m/z, 244); x代表1或2。MGDG、DGDG及SQDG的特异性中性丢失碎片m/z分别为179、341和261, 化学式分别为C₆H₁₃NO₅、C₁₂H₂₃NO₁₀和C₆H₁₅NO₈S。PA代表磷脂酸, PI的特征碎片m/z为241, 分子式为[C₆H₁₀PO₈], DGTS的母离子m/z为236, 分子式为[C₁₀H₂₂NO₅]⁺。MGDG、DGDG、SQDG、PE、PG、PI和DGTS见表1。

17 denotes NH₃; 35 denotes H₂O and NH₃; 179 denotes ammoniated monogalactose (m/z, 162); 197 denotes ammoniated monogalactose plus a water molecule; 180 denotes monogalactose plus a water molecule; 359 denotes ammoniated digalactose (m/z, 324) plus a water molecule; 261 denotes ammoniated sulfoquinovose (m/z, 244); x denotes 1 or 2. The mass (m/z) of specific neutral loss fragments of MGDG, DGDG and SQDG are 179, 341 and 261, respectively, and their chemical formulas are C₆H₁₃NO₅, C₁₂H₂₃NO₁₀ and C₆H₁₅NO₈S, respectively. PA denotes phosphatidic acid. The characteristic fragment of PI is [C₆H₁₀PO₈] with a mass of 241 (m/z) and the precursor of DGTS is [C₁₀H₂₂NO₅]⁺ with a mass of 236 (m/z). MGDG, DGDG, SQDG, PE, PG, PI and DGTS see Table 1.

H]⁺如图3中的474.38及496.36; 此外, DGTS的碎片离子还包括特征碎片离子[C₁₀H₂₂NO₅]⁺-m/z 236, 通过丢失2个酰基链(R₁CO⁺及R₂CO⁺)获得, 由甘油基及甜菜碱基组成。

通过对莱茵衣藻所有极性甘油酯种类及分子进行辨认(基于UPLC-Q-Trap/MS), 同时对极性甘油酯分子进行二级碎片信息扫描和结构解析(基于UPLC-Orbitrap/MS²), 结合相关数据库搜索及文献比对, 最终获得莱茵衣藻的极性甘油酯组整体轮廓, 其中包括7个甘油酯亚类, 即3种糖脂(MGDG、DGDG及SQDG)、3种磷脂(PE、PG及PI)及1种甜菜碱脂(DGTS)。通过以上分析, 共检出109种极性甘油酯分子, 包括21种MGDG、21种DGDG、6种SQDG、11种PE、8种PG、4种PI及38种DGTS(表2)。

2.3 基于UPLC-Q-Trap/MS的莱茵衣藻极性甘油酯分子的定量分析

利用UPLC-Q-Trap/MS在MRM模式下采用外标法获得每一种极性甘油酯分子的含量, 每1种极性甘油酯分子的母离子-子离子对信息及提取离子色谱图

(XIC)(表2; 图4)。糖脂的子离子为同时丢失加NH₃极性基团及sn-1或sn-2脂肪酸后的碎片离子, 磷脂PE、PG及PI的子离子分别为中性丢失极性基团(m/z分别为141、189和277)后的碎片离子, 甜菜碱脂DGTS的子离子为丢失1个酰基链后的碎片离子([M+H-R_xCO+H]⁺)。我们在MRM模式下同时扫描了甘油一酯(MAG)、甘油二酯(DAG)、TAG及Lyso-甘油酯分子(图4), 由于是针对莱茵衣藻极性甘油酯的定性定量分析, 故不再提及上述分子。每种标准品浓度及其峰面积之间的线性回归方程和各自的线性范围如表4所示。藻细胞各种甘油酯分子的绝对含量通过相应标准品的线性回归方程及油脂提取液中其生物质浓度计算得出。基于Q-Trap/MS的检测灵敏度及检出限, 共准确定量检测出45种极性甘油酯分子, 包括4种MGDG、12种DGDG、4种SQDG、4种PE、6种PG、4种PI及11种DGTS。表2中其余64种离子对并未在Q-Trap/MS的MRM模式下扫描到或其含量低于定量的检测下限。结果表明, 莱茵衣藻的主要极性甘油酯为糖脂MGDG及DGDG, 其含量分别为69及37 nmol·mg⁻¹, 二者占总极性脂含量的58%, 还包括

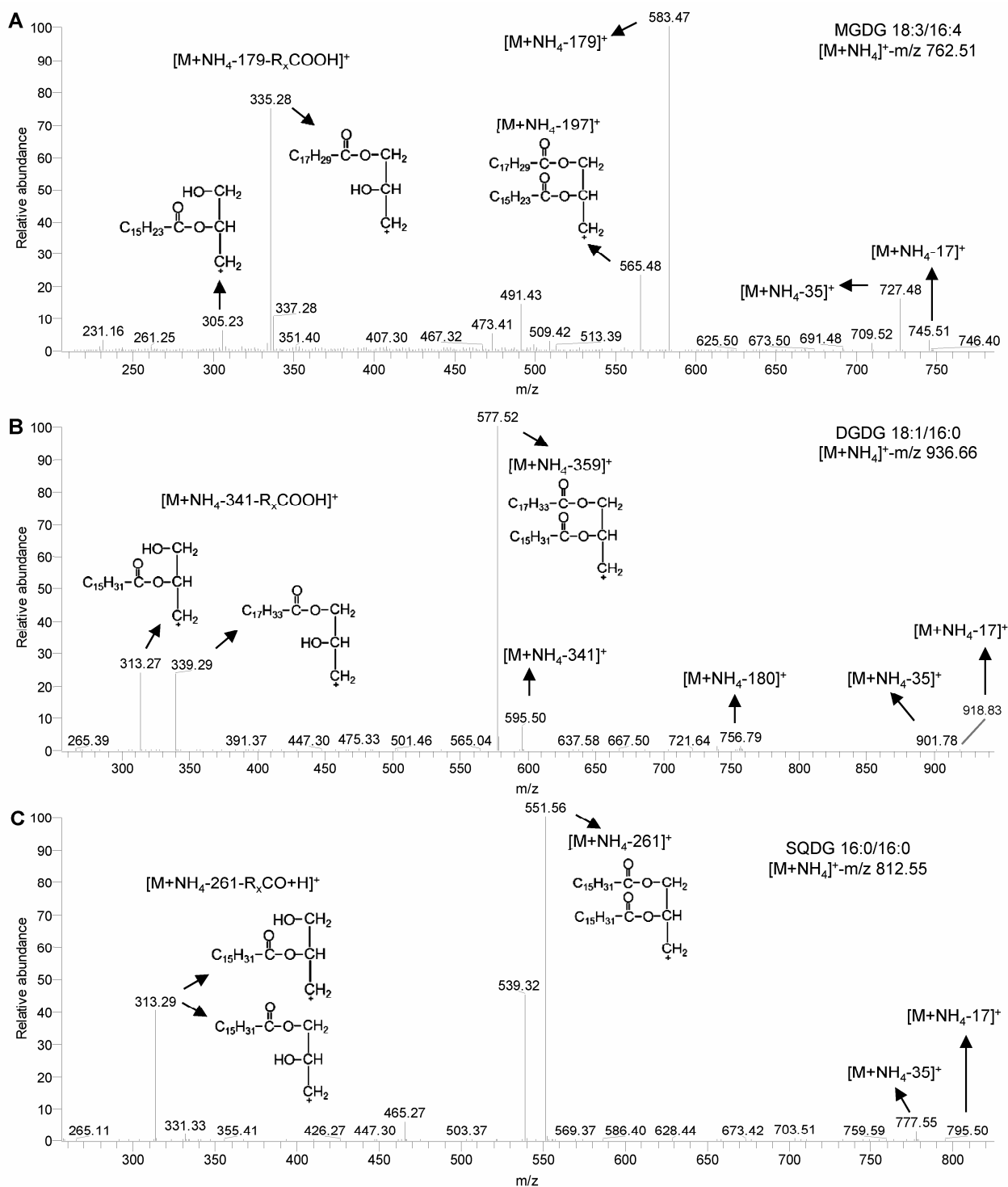


图1 莱茵衣藻的糖脂在ESI-MS/MS下的碎裂方式

(A) MGDG 18:3/16:4的二级碎裂方式; (B) DGDG 18:1/16:0的二级碎裂方式; (C) SQDG 16:0/16:0的二级碎裂方式。MGDG、DGDG和SQDG同表1。

Figure 1 ESI-MS/MS spectra of glycolipids in *Chlamydomonas reinhardtii*

(A) MS/MS spectra of MGDG 18:3/16:4; (B) MS/MS spectra of DGDG 18:1/16:0; (C) MS/MS spectra of SQDG 16:0/16:0. MGDG, DGDG and SQDG see Table 1.

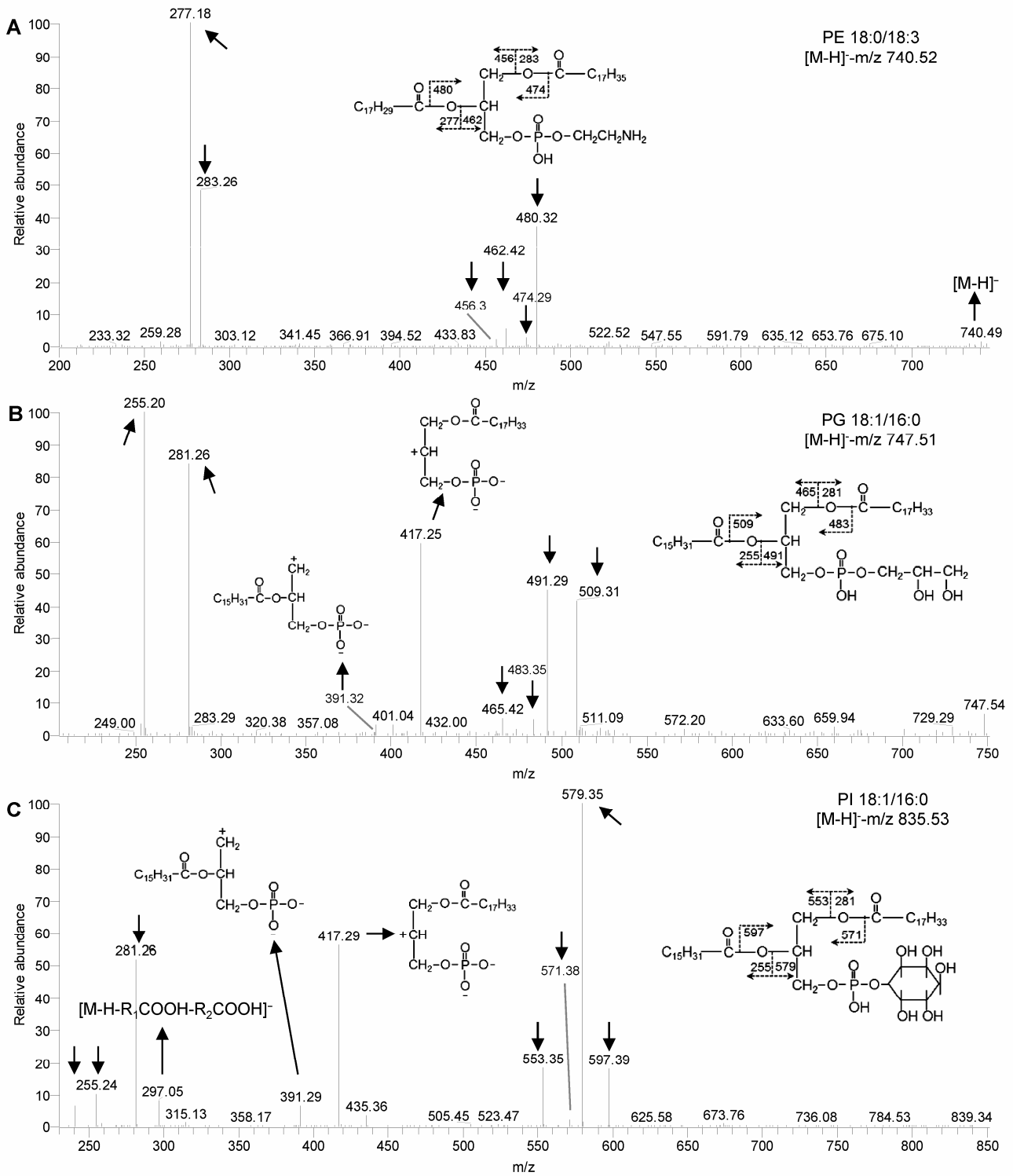


图2 莱茵衣藻的磷脂在ESI-MS/MS下的碎裂方式

(A) PE 18:0/18:3的二级碎裂方式; (B) PG 18:1/16:0的二级碎裂方式; (C) PI 18:1/16:0的二级碎裂方式。PE、PG和PI同表1。

Figure 2 ESI-MS/MS spectra of phospholipids in *Chlamydomonas reinhardtii*

(A) MS/MS spectra of PE 18:0/18:3; (B) MS/MS spectra of PG 18:1/16:0; (C) MS/MS spectra of PI 18:1/16:0. PE, PG and PI see Table 1.

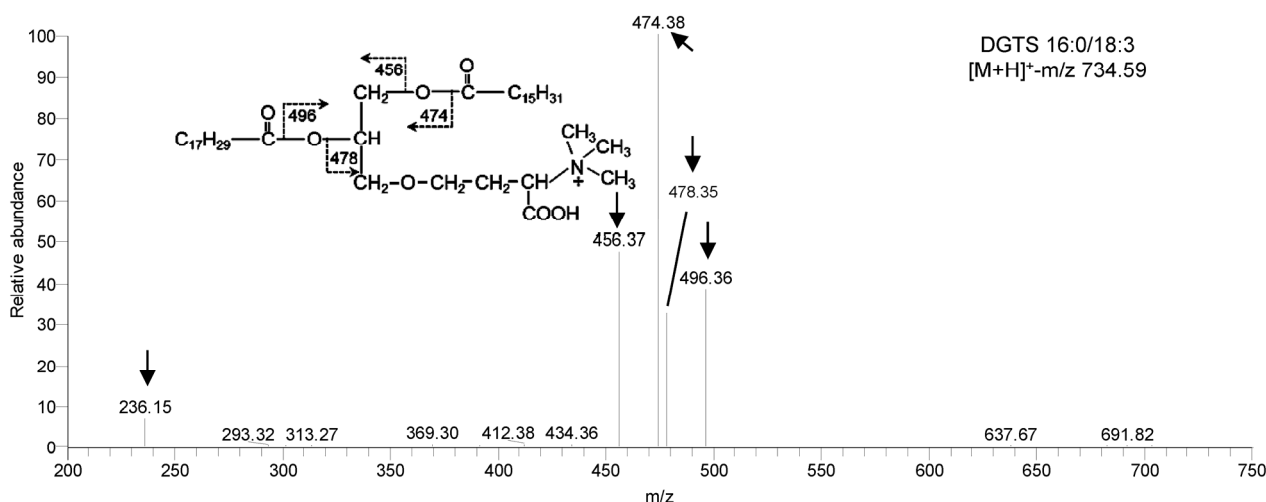


图3 莱茵衣藻的甜菜碱脂在ESI-MS/MS下的碎裂方式 DGTS同表1。

Figure 3 ESI-MS/MS spectra of betaine lipid in *Chlamydomonas reinhardtii* DGTS see Table 1.

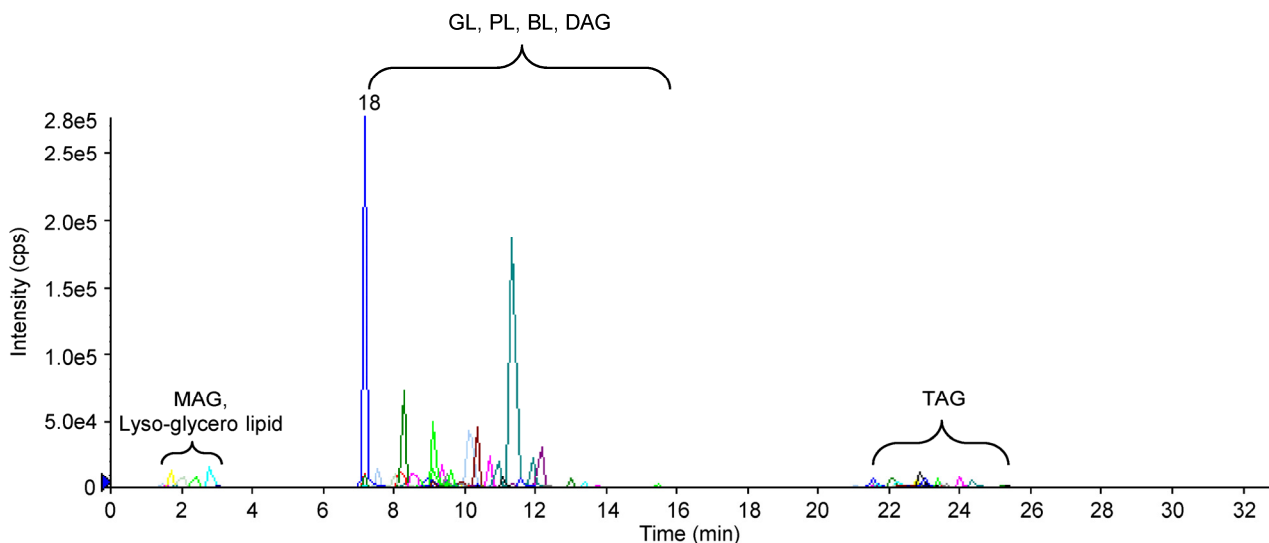


图4 正离子及MRM扫描模式下莱茵衣藻极性脂的提取离子色谱图(XIC)
MAG: 甘油一酯; GL: 糖脂; PL: 磷脂; BL: 甜菜碱脂; DAG: 甘油二酯; TAG: 甘油三酯

Figure 4 The extracted ion chromatography (XIC) of polar lipids of *Chlamydomonas reinhardtii* in positive and MRM scanning mode
MAG: Monoacylglycerol; GL: Glycolipid; PL: Phospholipid; BL: Betaine lipid; DAG: Diacylglycerol; TAG: Triacylglycerol

15%的甜菜碱脂DGTS, 其含量为27 nmol·mg⁻¹; 此外, 光合膜脂SQDG及PG含量均占总极性脂含量的9%, 磷脂PE及PI含量最低, 分别占总极性脂含量的5%及4% (图5)。

由图6可知, MGDG的主要分子为18:3/16:4, 其

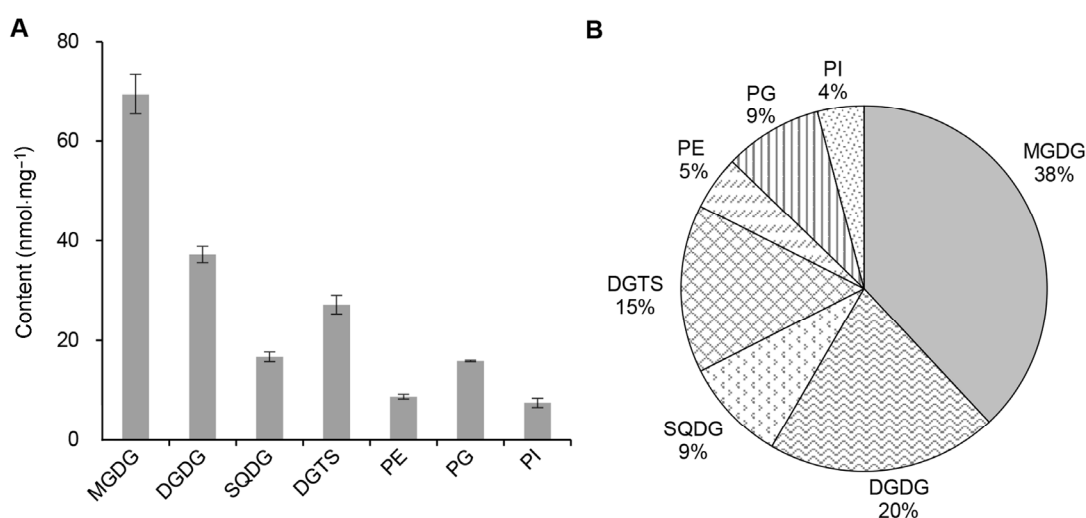
含量在MGDG所有分子含量中的比例为69%, 还包括18:2/16:3、18:3/16:3及18:2/16:4, MGDG的sn-1及sn-2位脂肪酸几乎全部为PUFA。DGDG的主要分子为18:1/16:0、18:2/16:0及18:3/16:0, 三者总含量为DGDG所有分子总含量的59%。SQDG的主要分子为

表4 脂质标准品浓度及其峰面积之间的线性关系**Table 4** Linear correlations between the concentrations and the peak areas of lipid standards

Lipid standard	Linear equation	Correlation coefficient (R^2)	Linear range (nmol·mL ⁻¹)
MGDG 18:0/18:0	$y=6.00E-05x+2.50E-01$	0.9981	0.37–39.88
DGDG 18:0/18:0	$y=6.45E-04x+7.98E-01$	0.9989	1.26–41.38
SQDG 18:3/16:0	$y=2.18E-04x-3.30E-01$	0.9919	0.02–35.95
PE 17:0/17:0	$y=2.39E-04x+4.26E-01$	0.9994	1.02–27.76
PG 17:0/17:0	$y=9.25E-05x+6.39E-01$	0.9971	0.68–26.02
PI 16:0/16:0	$y=1.49E-04x+1.65E-01$	0.9993	0.23–22.61
DGTS 16:0/16:0	$y=1.37E-05x+8.63E-02$	0.9998	1.00–28.11

x代表峰面积, y代表脂质标准品浓度(nmol·mL⁻¹)。MGDG、DGDG、SQDG、PE、PG、PI和DGTS同表1。

x denotes peak area and y denotes concentration of lipid standard (nmol·mL⁻¹). MGDG, DGDG, SQDG, PE, PG, PI and DGTS see Table 1.

**图5** 莱茵衣藻极性甘油酯的组成

(A) 莱茵衣藻7种极性甘油酯的含量(nmol·mg⁻¹); (B) 莱茵衣藻7种极性甘油酯的相对百分含量(%). MGDG、DGDG、SQDG、PE、PG、PI和DGTS同表1。

Figure 5 The glycerolipid components of *Chlamydomonas reinhardtii*

(A) The content of the individual polar glycerolipid of *C. reinhardtii* (nmol·mg⁻¹); (B) The relative abundance (%) of the individual polar glycerolipid of *C. reinhardtii*. MGDG, DGDG, SQDG, PE, PG, PI and DGTS see Table 1.

16:0/16:0, 占其总分子含量的80%, sn-1及sn-2位全部为饱和脂肪酸C16:0, 此外还包括少量的18:1/16:0、18:2/16:0及18:3/16:0, 与DGDG具有相同的DAG碳骨架。PG的主要分子为18:2/16:1及18:3/16:1, 二者占其总分子含量的65%。

莱茵衣藻的磷脂PE主要包括16:0/18:1、18:1/18:1及18:0/18:3, 还包括35%的16:0/16:1。PI分子几乎全部由18:1/16:0组成, 该分子占其总分子含量的82%, 此外还包括少量的18:0/16:0、18:2/16:0及18:3/16:0。甜菜碱脂DGTS的分子种类多, 包括C32、

C34及C36, 其主要分子为16:0/18:3, 该分子占其总分子含量的43%, 其它还包括16:0/18:1、16:0/18:2及16:0/18:4分子。

2.4 讨论

脂质组是微藻科学领域中一种新兴的重要工具(Tenenboim et al., 2016), 在微藻中应用脂质组技术能够对微藻脂质组轮廓及其生物合成、调控、响应、重组、功能及相互作用有深入认识, 因此建立微藻脂质组学研究方法尤为重要。

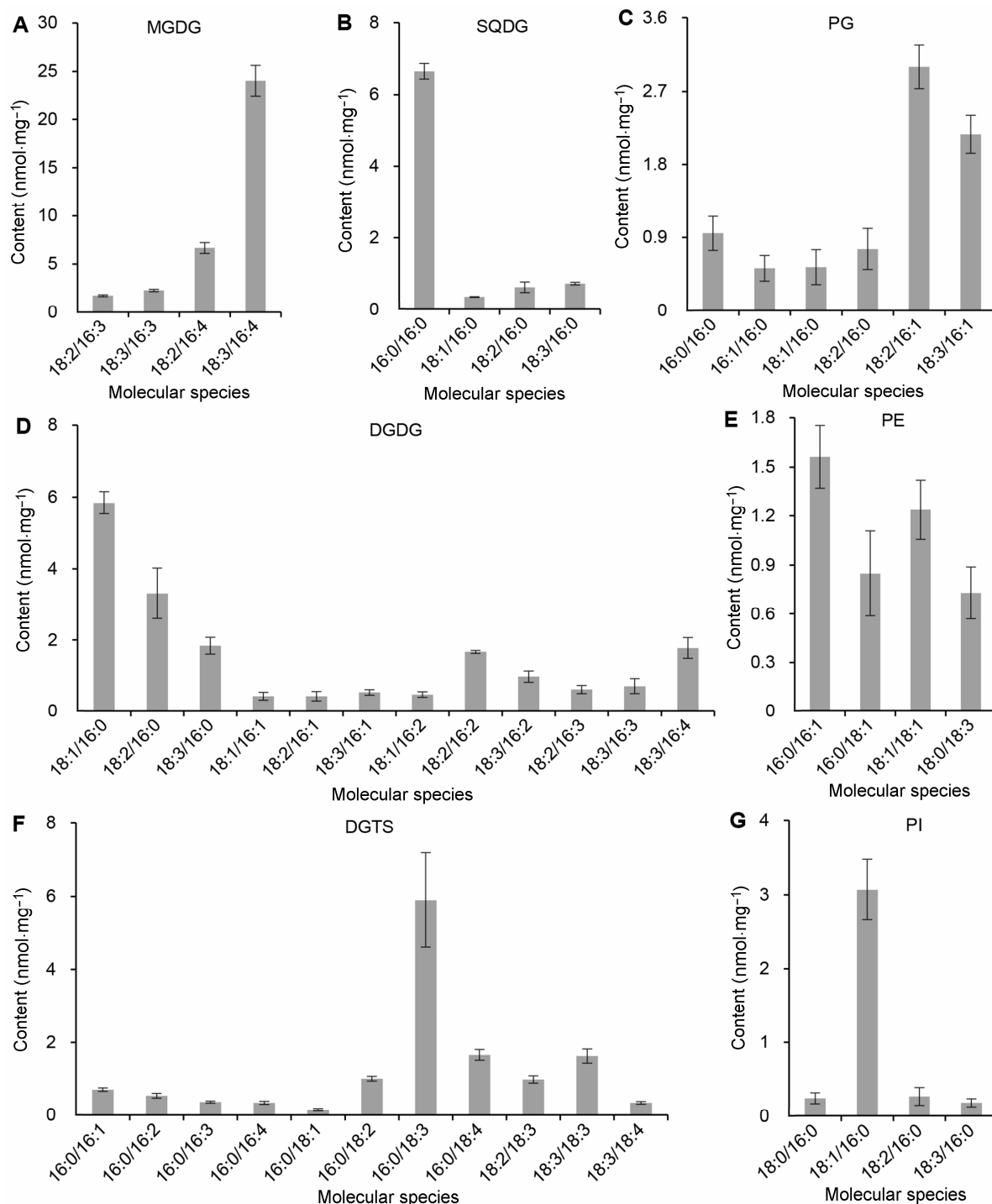


图6 莱茵衣藻各极性甘油酯分子的主要组分及其含量

(A) MGDG的各分子含量; (B) SQDG的各分子含量; (C) PG的各分子含量; (D) DGDG的各分子含量; (E) PE的各分子含量; (F) DGTS的各分子含量; (G) PI的各分子含量。MGDG、DGDG、SQDG、PE、PG、PI和DGTS同表1。

Figure 6 The constituents and contents of each molecular species of polar lipids in *Chlamydomonas reinhardtii*

(A) The content of the individual molecular species of MGDG; (B) The content of the individual molecular species of SQDG; (C) The content of the individual molecular species of PG; (D) The content of the individual molecular species of DGDG; (E) The content of the individual molecular species of PE; (F) The content of the individual molecular species of DGTS; (G) The content of the individual molecular species of PI. MGDG, DGDG, SQDG, PE, PG, PI and DGTS see Table 1.

脂质组学研究的核心是分析技术平台, LC-ESI-MS具有快速及高灵敏度等特点, 已广泛应用于检测识别低含量并具有重要生物功能的各类脂质分子(王涛等, 2010), 其分析流程主要包括脂质提取、基于液相色谱的脂质分离、脂质结构解析及鉴定和脂质分子的定量分析。RPLC根据脂质的脂酰基链长短和不饱和度的差异进行分离, RPLC-MS (/MS)能与绝大多数亲脂性的HPLC流动相兼容, 由于流动相含一定比例的水, 故质谱分析时雾化效果好, 对包括极性或非极性在内的所有脂质组分均能良好地保留。本研究采用RPLC-MS (/MS)对莱茵衣藻的极性甘油酯组进行了定性定量分析, 极大地丰富了微藻脂质组学的研究内容(Kindt et al., 2012)。此外, 脂质结构“组成模块”(building block)的特点是进行脂质结构鉴定的基础。特定的MS/MS信息(表征极性头基和酰基链等组成模块)(Murphy and Axelsen, 2011)、保留时间规律(Brouwers, 2011)及精确质量是脂质鉴定需要综合考虑的因素。脂质鉴定包括一级质谱分子离子鉴定及二级质谱碎片离子解析。目前基于组学的定量包括2种, 即相对定量及绝对定量。在脂质组学中, 相对定量测定脂质组中各脂质分子的类型变化及相对丰度变化, 能表征脂质组在刺激物作用下的响应变化, 同时有利于生物标志物的筛选; 绝对定量是基于外标(用与目标化合物相同的标准品进行平行测定)或内标(加入样品中不存在标准品进行同时测定)测定每种脂质分子、脂质亚类及整个脂质组的质量含量变化, 而脂质分子质量含量的动态变化有利于代谢途径的构建或生物化学机制的解析(Han, 2016b)。本研究采用外标法对莱茵衣藻各甘油酯分子进行了绝对定量, 有助于微藻脂质代谢的深入研究。

本研究利用UPLC-Q-Trap/MS进行一级质谱分子离子鉴定及基于MRM模式的甘油酯分子靶向定量分析。基于QQQ的脂质分析包括母离子扫描、子离子扫描及中性丢失扫描, 是“自下而上”(Bottom-up)的脂质组学分析典型方法。利用微藻各类甘油酯特定的中性丢失或母离子扫描模式不仅可以准确辨认出具有不同质荷比的各类甘油酯分子(表1), 即一级结构鉴定; 而且还可通过非靶向方法获取MRM离子对, 进行复杂样品中目标化合物的靶向定量分析, 即“拟靶标”代谢组学方法(Chen et al., 2013; Zhang et al., 2016), 其优势在于定量分析的灵敏度、稳定性、重

复性较好及较宽的线性范围(10^4 – 10^5), 同时数据处理及定量分析过程简单(Chen et al., 2013)。目前, 基于Q-Trap/MS的脂质组学研究集中于哺乳动物(Overgaard et al., 2016; Slatter et al., 2016)及高等植物(Tarazona et al., 2015), 在微藻中的应用还很少(Meng et al., 2017)。本研究利用Q-Trap/MS的MRM模式能快速靶向定量分析莱茵衣藻各极性甘油酯分子的质量含量, 从而为微藻脂质代谢的动态变化及新途径的构建奠定基础。

Orbitrap/MS (Zubarev and Makarov, 2013)是近年来新开发出的一种具有高分辨率、高灵敏度、高准确度的质谱, 与普通质谱相比, 它在扫描碎片离子、分析鉴别各种脂质同分异构体方面具有明显优势(Hu et al., 2005; Taguchi and Ishikawa, 2010)。本研究所用的LTQ Orbitrap/MS质量分辨率高达240 000 FWHM (full width half maximum, 半峰处全峰宽), 能进行精确的质量测定(精度为 1 – 3 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), 同时快速采集高分辨率的质谱全扫描谱图, 并基于不同脂质类别的特定元素组成进行脂质鉴定, 是一种高通量的“自上而下”(Top-down)的脂质组学分析模式(Schuhmann et al., 2011)。此外, LTQ Orbitrap/MS作为一种高分辨率质谱, 同时具备FTMS和IT模式。这2种检测模式可进行快速切换, 并具备多级质谱的扫描功能(Eliuk and Makarov, 2015), 目前已广泛应用于蛋白质(Geiger et al., 2010)、多糖(Rohmer et al., 2011)、类胡萝卜素(Bijtebier et al., 2013)及番茄碱(Caprioli et al., 2015)等多类复杂化合物的二级及多级结构鉴定。而基于Orbitrap/MS的甘油酯组二级及多级结构鉴定研究还较少。本研究利用Orbitrap/MS²采集各甘油酯分子二级质谱的碎片离子信息, 确定了莱茵衣藻各极性甘油酯分子的二级结构, 为其定量分析提供了准确可靠的信息。

综上所述, 在脂质组的定性定量分析中, Q-Trap/MS兼具一级结构鉴定(母离子及中性丢失扫描)及靶向定量分析(MRM模式)的优势, 而Orbitrap/MS²的高质量分辨率性能使其更适于进行脂质分子二级结构的准确鉴定。本研究中莱茵衣藻脂质经UPLC的反相色谱分离、ESI离子化、Q-Trap/MS及Orbitrap/MS²检测, 确定了109种极性甘油酯分子种类及结构谱图。基于以上极性甘油酯组轮廓, 又通过UPLC-Q-Trap/MS的MRM模式定量分析出莱茵衣藻的45种极

性甘油酯分子含量。虽然Q-Trap/MS并未全部扫描并定量检出基于Orbitrap/MS²定性得到的所有极性脂分子,但研究所获得的定性定量信息可以完善目前现有的莱茵衣藻极性甘油酯组(Yang et al., 2015; Légeret et al., 2016),从而为进一步研究其合成机制及生物学功能奠定技术基础。

根据以上定性定量分析结果可知,莱茵衣藻的极性脂以糖脂MGDG、DGDG及甜菜碱脂DGTS为主,还包括光合膜脂SQDG、PG及磷脂PE、PI。这些极性脂的组成比例与Li-Beisson等(2015)的研究结果一致,同时各类极性脂的分子种类及酰基组成各有特点,这也表明其合成途径及生物学功能各不相同。在高等植物中,甘油酯通过真核或原核途径合成(Roughan and Slack, 1982)。在真核途径中,脂肪酸由叶绿体合成后被转运至叶绿体外区室形成酰基辅酶A,然后在内质网中进一步合成膜脂。在内质网中合成的膜脂再返回至叶绿体并转化成DAG,随后DAG在叶绿体被膜中被进一步糖基化合成MGDG及DGDG,高等植物通过真核途径合成甘油酯的sn-2位脂肪酸为C18脂肪酸;相比之下其原核途径几乎全部发生于叶绿体中,叶绿体合成的脂肪酸先与酰基载体蛋白(ACP)结合,再合成脂质前体物质磷脂酸(PA)和DAG,最后合成膜脂,这些通过原核途径合成甘油酯的sn-2位脂肪酸为C16脂肪酸(Warakanont et al., 2015)。本研究中,莱茵衣藻的MGDG、DGDG、SQDG、PG及PI的sn-2位脂肪酸全部为C16脂肪酸,这表明莱茵衣藻的光合膜脂及磷脂PI全部通过原核途径合成;与此相反,莱茵衣藻DGTS与PE的sn-2位脂肪酸同时含有C16及C18脂肪酸,表明这2种膜脂的合成既包括原核途径又包括真核途径(Giroud et al., 1988)。莱茵衣藻甘油酯合成途径与高等植物不同,这也表明了植物在进化上的多样性。

此外,DGDG、SQDG及PI这3种甘油酯均含有相同的DAG碳骨架分子18:1/16:0、18:2/16:0及18:3/16:0,表明其作为sn-1位C18脂肪酸去饱和的载体;而DGTS中16:0/18:1、16:0/18:2、16:0/18:3及16:0/18:4分子的存在表明其作为sn-2位C18脂肪酸去饱和的载体,这与Schlapfer和Eichenberger (1983)的研究结果相一致。虽然这4种甘油酯均为C18脂肪酸去饱和的载体,在莱茵衣藻的生长代谢过程中具有重要的生理功能,但是DGTS与DGDG、SQDG和PI的具

体作用机制可能因脂肪酸sn位的差异而不同。研究表明,在微拟球藻及高等植物中,PC是C18脂肪酸去饱和的载体,与其它极性脂的合成密切相关(Botella et al., 2017; Meng et al., 2017),而DGTS与PC的结构及生物物理性质类似,因此二者在脂质代谢过程中的生理功能可能也相似(Liu and Benning, 2013)。这些结果也进一步丰富了微藻的脂质代谢信息。

3 结论

本研究利用液质联用技术鉴定了莱茵衣藻的极性甘油酯组成,并对其进行了定量分析。通过分析莱茵衣藻极性脂组分的特征碎片离子与裂解规律,共获得109种具有不同酰基链组成的极性脂分子。此外,通过MRM模式对各极性甘油酯分子进行靶向定量分析,确定其主要组分为糖脂MGDG、DGDG及甜菜碱脂DGTS。莱茵衣藻各极性脂分子的酰基链组成特点表明,其极性脂通过专一性原核途径或混合型原核及真核途径合成,同时多种极性脂包括DGDG、SQDG、PI及DGTS,它们均具有C18脂肪酸去饱和载体的功能。综上所述,本研究所建立的莱茵衣藻极性甘油酯组定性定量分析方法,可为获得完整的极性甘油酯分子库及其分布信息提供技术平台,并为进一步开展微藻脂质代谢,尤其是极性甘油酯的动态变化及其在逆境胁迫中的响应机制研究奠定基础。

参考文献

- 王涛,梅旭荣,钟秀丽,李玉中 (2010). 脂质组学研究方法及其应用. *植物学报* **45**, 249–257.
- Abida H, Dolch LJ, Mei C, Villanova V, Conte M, Block MA, Finazzi G, Bastien O, Tirichine L, Bowler C, Rébeillé F, Petroutsos D, Jouhet J, Maréchal E (2015). Membrane glycerolipid remodeling triggered by nitrogen and phosphorus starvation in *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Physiol* **167**, 118–136.
- Allen JW, DiRusso CC, Black PN (2017). Carbon and acyl chain flux during stress-induced triglyceride accumulation by stable isotopic labeling of the polar microalga *Coccomyxa subellipsoidea* C169. *J Biol Chem* **292**, 361–374.
- Anesi A, Guella G (2015). A fast liquid chromatography-mass spectrometry methodology for membrane lipid profiling through hydrophilic interaction liquid chromatography. *J Chromatogr A* **1384**, 44–52.

- Bijtebier SKA, D'Hondt E, Hermans N, Apers S, Voorspoels S** (2013). Unravelling ionization and fragmentation pathways of carotenoids using orbitrap technology: a first step towards identification of unknowns. *J Mass Spectrom* **48**, 740–754.
- Bligh EG, Dyer WJ** (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* **37**, 911–917.
- Botella C, Jouhet J, Block MA** (2017). Importance of phosphatidylcholine on the chloroplast surface. *Prog Lipid Res* **65**, 12–23.
- Brouwers JF** (2011). Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of phospholipids. Chromatography, ionization and quantification. *Biochim Biophys Acta* **1811**, 763–775.
- Caprioli G, Cahill M, Logrippo S, James K** (2015). Elucidation of the mass fragmentation pathways of tomatidine and β 1-hydroxytomatine using orbitrap mass spectrometry. *Nat Prod Commun* **10**, 575–576.
- Chen SL, Kong HW, Lu X, Li Y, Yin PY, Zeng ZD, Xu GW** (2013). Pseudotargeted metabolomics method and its application in serum biomarker discovery for hepatocellular carcinoma based on ultra high-performance liquid chromatography/triple quadrupole mass spectrometry. *Anal Chem* **85**, 8326–8333.
- Eliuk S, Makarov A** (2015). Evolution of Orbitrap mass spectrometry instrumentation. *Rev Anal Chem* **8**, 61–80.
- Geiger T, Cox J, Mann M** (2010). Proteomics on an Orbitrap benchtop mass spectrometer using all-ion fragmentation. *Mol Cell Proteomics* **9**, 2252–2261.
- Giroud C, Gerber A, Eichenberger W** (1988). Lipids of *Chlamydomonas reinhardtii*. Analysis of molecular species and intracellular site (s) of biosynthesis. *Plant Cell Physiol* **29**, 587–595.
- Han DX, Jia J, Li J, Sommerfeld M, Xu J, Hu Q** (2017). Metabolic remodeling of membrane glycerolipids in the microalga *Nannochloropsis oceanica* under nitrogen deprivation. *Front Mar Sci* **4**, 242.
- Han XL** (2016a). Fragmentation patterns of glycerolipids. In: Han XL, ed. *Lipidomics: Comprehensive Mass Spectrometry of Lipids*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Incorporation. pp. 217–228.
- Han XL** (2016b). Quantification of individual lipid species in lipidomics. In: Han XL, ed. *Lipidomics: Comprehensive Mass Spectrometry of Lipids*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Incorporation. pp. 305–334.
- Han XL, Gross RW** (2003). Global analyses of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples by ESI mass spectrometry: a bridge to lipidomics. *J Lipid Res* **44**, 1071–1079.
- Horn PJ, Benning C** (2016). The plant lipidome in human and environmental health. *Science* **353**, 1228–1232.
- Hu QZ, Noll RJ, Li HY, Makarov A, Hardman M, Cooks RG** (2005). The Orbitrap: a new mass spectrometer. *J Mass Spectrom* **40**, 430–443.
- Légeret B, Schulz-Raffelt M, Nguyen HM, Auroy P, Beisson F, Peltier G, Blanc G, Li-Beisson Y** (2016). Lipidomic and transcriptomic analyses of *Chlamydomonas reinhardtii* under heat stress unveil a direct route for the conversion of membrane lipids into storage lipids. *Plant Cell Environ* **39**, 834–847.
- Li J, Han DX, Wang DM, Ning K, Jia J, Wei L, Jing XY, Huang S, Chen J, Li YT, Hu Q, Xu J** (2014). Choreography of transcriptomes and lipidomes of *Nannochloropsis* reveals the mechanisms of oil synthesis in microalgae. *Plant Cell* **26**, 1645–1665.
- Li NN, Xu CC, Li-Beisson Y, Philippart K** (2016). Fatty acid and lipid transport in plant cells. *Trends Plant Sci* **21**, 145–158.
- Li-Beisson Y, Beisson F, Riekhof W** (2015). Metabolism of acyl-lipids in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J* **82**, 504–522.
- Li-Beisson Y, Nakamura Y, Harwood J** (2016). Lipids: from chemical structures, biosynthesis, and analyses to industrial applications. In: Nakamura Y, Li-Beisson Y, eds. *Lipids in Plant and Algae Development*. Cham: Springer International Publishing. pp. 1–18.
- Liu BS, Benning C** (2013). Lipid metabolism in microalgae distinguishes itself. *Curr Opin Biotechnol* **24**, 300–309.
- Martin GJO, Hill DRA, Olmstead ILD, Bergamin A, Shears MJ, Dias DA, Kentish SE, Scales PJ, Botté CY, Callahan DL** (2014). Lipid profile remodeling in response to nitrogen deprivation in the microalgae *Chlorella* sp. (Trebouxiophyceae) and *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae). *PLoS One* **9**, e103389.
- Meng YY, Cao XP, Yao CH, Xue S, Yang Q** (2017). Identification of the role of polar glycerolipids in lipid metabolism and their acyl attribution for TAG accumulation in *Nannochloropsis oceanica*. *Algal Res* **24**, 122–129.
- Murphy RC, Axelsen PH** (2011). Mass spectrometric analysis of long-chain lipids. *Mass Spectrom Rev* **30**, 579–599.
- Overgaard AJ, Weir JM, De Souza DP, Tull D, Haase C, Meikle PJ, Pociot F** (2016). Lipidomic and metabolomic characterization of a genetically modified mouse model of

- the early stages of human type 1 diabetes pathogenesis. *Metabolomics* **12**, 13.
- Popko J, Herrfurth C, Feussner K, Ischebeck T, Iven T, Haslam R, Hamilton M, Sayanova O, Napier J, Khozin-Goldberg I, Feussner I** (2016). Metabolome analysis reveals betaine lipids as major source for triglyceride formation, and the accumulation of sedoheptulose during nitrogen-starvation of *Phaeodactylum tricorutum*. *PLoS One* **11**, e0164673.
- Rohmer M, Baeumlisberger D, Stahl B, Bahr U, Karas M** (2011). Fragmentation of neutral oligosaccharides using the MALDI LTQ Orbitrap. *Int J Mass Spectrom* **305**, 199–208.
- Roughan GP, Slack CR** (1982). Cellular organization of glycerolipid metabolism. *Annu Rev Plant Biol* **33**, 97–132.
- Schlapfer P, Eichenberger W** (1983). Evidence for the involvement of diacylglycerol (*N,N,N*-trimethyl homoserine) in the desaturation of oleic and linoleic acids in *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae). *Plant Sci Lett* **32**, 243–252.
- Schuhmann K, Herzog R, Schwudke D, Metelmann-Strupat W, Bornstein SR, Shevchenko A** (2011). Bottom-up shotgun lipidomics by higher energy collisional dissociation on LTQ Orbitrap mass spectrometers. *Anal Chem* **83**, 5480–5487.
- Slatter DA, Aldrovandi M, O'Connor A, Allen SM, Brasher CJ, Murphy RC, Mecklemann S, Ravi S, Darley-Usmar V, O'Donnell VB** (2016). Mapping the human platelet lipidome reveals cytosolic phospholipase A₂ as a regulator of mitochondrial bioenergetics during activation. *Cell Metab* **23**, 930–944.
- t'Kindt R, Jorge L, Dumont E, Couturon P, David F, Sandra P, Sandra K** (2012). Profiling and characterizing skin ceramides using reversed-phase liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem* **84**, 403–411.
- Taguchi R, Ishikawa M** (2010). Precise and global identification of phospholipid molecular species by an Orbitrap mass spectrometer and automated search engine Lipid Search. *J Chromatogr A* **1217**, 4229–4239.
- Tarazona P, Feussner K, Feussner I** (2015). An enhanced plant lipidomics method based on multiplexed liquid chromatography-mass spectrometry reveals additional insights into cold- and drought-induced membrane remodeling. *Plant J* **84**, 621–633.
- Tenenboim H, Burgos A, Willmitzer L, Brotman Y** (2016). Using lipidomics for expanding the knowledge on lipid metabolism in plants. *Biochimie* **130**, 91–96.
- Warakanont J, Tsai CH, Michel EJS, Murphy III GR, Hsueh PY, Roston RL, Sears BB, Benning C** (2015). Chloroplast lipid transfer processes in *Chlamydomonas reinhardtii* involving a TRIGALACTOSYLDIACYLGLYC-EROL 2 (TGD2) orthologue. *Plant J* **84**, 1005–1020.
- Yang DW, Song DH, Kind T, Ma Y, Hoefkens J, Fiehn O** (2015). Lipidomic analysis of *Chlamydomonas reinhardtii* under nitrogen and sulfur deprivation. *PLoS One* **10**, e0137948.
- Zhang JJ, Zhao CX, Zeng ZD, Luo P, Zhao YN, Zhao JY, Li LL, Lu X, Xu GW** (2016). Sample-directed pseudotargeted method for the metabolic profiling analysis of rice seeds based on liquid chromatography with mass spectrometry. *J Sep Sci* **39**, 247–255.
- Zienkiewicz K, Du ZY, Ma W, Vollheyde K, Benning C** (2016). Stress-induced neutral lipid biosynthesis in microalgae-molecular, cellular and physiological insights. *Biochim Biophys Acta* **1861**, 1269–1281.
- Zubarev RA, Makarov A** (2013). Orbitrap mass spectrometry: Orbitrap is the newest addition to the family of high-resolution mass spectrometry analyzers. With its revolutionarily new, miniature design, Orbitrap combines high speed with excellent quantification properties, ranking favorably in many analytical applications. *Anal Chem* **85**, 5288–5296.

Qualitative and Quantitative Analyses of Polar Glycerolipids in *Chlamydomonas reinhardtii* based on LC-MS Techniques

Miao Yang^{1,2,3}, Yingying Meng^{1,3}, Yadong Chu¹, Song Xue^{1*}

¹Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China; ²University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; ³School of Life Sciences and Biotechnology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China

Abstract The polar glycerolipidome of the model algal strain *Chlamydomonas reinhardtii* was analyzed qualitatively and quantitatively by using liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS). Based on UPLC-ESI-Q-Trap/MS and UPLC-ESI-Orbitrap/MS², MS scanning, including neutral loss or precursor ion scanning, and MS/MS scanning were used to identify 109 molecular species possessing distinct mass-to-charge ratios and acyl chains. Targeted quantitative analyses based on external standards with UPLC-ESI-Q-Trap/MS in multiple reactions monitoring (MRM) mode was used to analyze individual molecular species. The results indicated that the glycerolipids of *C. reinhardtii* mainly included glycolipids (i.e., MGDG and DGDG) and betaine lipid, DGTS. In addition, analysis of fatty acyl constituents of all polar membrane lipids revealed that DGDG, SQDG, DGTS and PI acted as carriers for desaturation of C18 fatty acids. This study established a platform for characterizing the structure spectra and quantitative analysis with LC-MS techniques for *C. reinhardtii*, which provides a useful tool for studies of the biological function of polar membrane lipids and lipid metabolism in microalgae.

Key words *Chlamydomonas reinhardtii*, LC-MS technique, polar glycerolipids, qualitative and quantitative analyses

Yang M, Meng YY, Chu YD, Xue S (2018). Qualitative and quantitative analyses of polar glycerolipids in *Chlamydomonas reinhardtii* based on LC-MS techniques. *Chin Bull Bot* **53**, 812–828.

* Author for correspondence. E-mail: xuesong@dicp.ac.cn

(责任编辑: 朱亚娜)