

尼罗红荧光优化法快速检测微拟球藻细胞内油脂含量

刘林聪^{1,2} 杨菊平² 周健² 朱文杰² 罗锋^{1,2} 张晓辉^{1,2*}

(1. 西南大学资源环境学院 生物能源与环境修复研究中心 重庆 400715)

(2. 西南大学资源环境学院 重庆 400715)

摘要:【目的】利用尼罗红荧光染色法快速检测微拟球藻细胞内的油脂含量。【方法】系统性地调整激发波长与发射波长, 确定最佳二甲基亚砜(DMSO)浓度、尼罗红终浓度、染色时间和细胞密度的范围, 比较重量法和 Triolein 标准品的油脂含量分别与荧光强度之间的关系。【结果】分析得出了尼罗红荧光强度与微拟球藻细胞油脂含量的关系, 确定优化后染色条件为: 二甲基亚砜浓度为 5%, 尼罗红终浓度为 1 mg/L, 染色时间为 6 min, 且细胞密度为 $(0.5-3.0) \times 10^6$ cells/mL 的范围内, 激发波长和发射波长分别为 515 nm 和 570 nm。重量法和 Triolein 标准品的油脂含量分别与尼罗红染色荧光强度之间的关联性, 表明尼罗红荧光染色方法可以用来快速准确地检测细胞内的油脂含量, 且油脂含量与荧光强度之间正相关, 相关系数 R^2 为 0.997 3。尼罗红染色优化后油脂的检测下限达到 2 μ g, 大大减少了测定油脂含量所需细胞量。【结论】针对不同种属系统性地确认了荧光激发波长和发射波长, 并优化验证得到了最佳尼罗红荧光染色条件, 可以快速准确地检测微量微拟球藻细胞内的油脂含量, 便于大规模筛选高产油突变藻株。

关键词: 尼罗红, 荧光强度, 油脂含量, 微拟球藻

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31500038); Fundamental Research Funds for the Central Universities of China (No. XDJK2015C172); Undergraduate Scientific and Technological Innovation ‘Guangjiong’ Cultivation Project, College of Resources and Environment, Southwest University (No. 2016002); Chongqing Research Program of Basic Research and Frontier Technology (No. cstc2016jcyjA0540)

*Corresponding author: Tel: 86-23-68250279; E-mail: xhzhang@swu.edu.cn

Received: January 11, 2017; Accepted: March 07, 2017; Published online (www.cnki.net): April 05, 2017

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31500038); 中央高校基本科研业务费一般项目(No. XDJK2015C172); 西南大学资源学院“光炯”创新计划项目(No. 2016002); 重庆市基础科学与前沿技术研究专项项目(No. cstc2016jcyjA0540)

*通讯作者: Tel: 86-23-68250279; E-mail: xhzhang@swu.edu.cn

收稿日期: 2017-01-11; 接受日期: 2017-03-07; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-04-05

Modified rapid determination of lipid content in *Nannochloropsis* by Nile Red fluorescence staining

LIU Lin-Cong^{1,2} YANG Ju-Ping² ZHOU Jian² ZHU Wen-Jie²
LUO Feng^{1,2} ZHANG Xiao-Hui^{1,2*}

(1. Research Center of Bioenergy & Bioremediation, College of Resource and Environment, Southwest University, Chongqing 400715, China)

(2. College of Resource and Environment, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: [Objective] This study was aimed to investigate the optimal Nile Red fluorescence staining method to quickly determine the quantification of total lipid in *Nannochloropsis*. [Methods] We systematically adjusted the excitation wavelength, emission wavelength and optimized the dimethyl sulfoxide (DMSO) concentration, Nile Red concentration, staining time and cell density range. Meanwhile, we evaluated the relationship between the fluorescence intensity of Nile Red staining and the lipid contents of gravimetric method and Triolein standard method, respectively. [Results] The relationship between the Nile Red fluorescence intensity and the lipid content of green algae *Nannochloropsis* was obtained. The results showed that the optimal dyeing conditions are as follows: DMSO concentration was 5%, the final concentration of Nile Red was 1 mg/L, staining time was 6 min and the cell number ranged from 0.5×10^6 to 3.0×10^6 cells/mL, under the excitation and emission wavelengths was 515 nm and 570 nm. The correlation between the lipid content from gravimetric method and Triolein standard indicated that the Nile Red fluorescence staining method can be used to rapidly and exactly detect the lipid content in *Nannochloropsis*. The lipid content was positively correlated with the fluorescence intensity, and the correlation coefficient R^2 was 0.997 3. The detection limit of lipid content reached 2 μg after the optimization of Nile Red staining, which greatly reducing the amount of cells required for the determination of lipid content. [Conclusion] These results indicated that the Nile Red fluorescence staining method can be used to determine the lipid content rapidly and exactly in the *Nannochloropsis* with a microdose cell, and be applied in screening *Nannochloropsis* mutants with higher lipids content in large scale, conveniently.

Keywords: Nile Red, Fluorescence intensity, Lipid content, *Nannochloropsis*

随着化石燃料的日益枯竭与全球温室效应的加剧, 可再生性能源的研究蓬勃发展。微藻由于其生长速度快、产量高而且油脂含量高的特点, 已经成为全球研究的焦点^[1]。然而, 大规模利用微藻作为新能源的载体, 还需要实现从实验室到工业生产的转变^[2]。快速鉴定筛选高产油量的藻株已成为当前行业发展中的关键步骤^[3]。

尼罗红 [Nile Red, 9-(diethylamino)benzo[a]phenoxazin-5(5H)-one, 简称 NR] 是一类苯吩恶嗪酮类化合物, 能与以甘油三酯为主的中性脂和磷脂为主的极性脂相结合, 与油脂结合在不同波长的激发光照射下, 可以发射不同波长的荧光^[4]。尼罗红染色后的含脂质细胞经激发而产生的相对荧光强度与细胞内油脂的含量具有一定正相关关系, 同时由

于尼罗红染色法所需细胞量较少, 所以可以用于细胞内油脂含量的初步定量测定^[5]。尼罗红染色法由于其便捷性, 可以用来快速高效地测定细胞中的油脂相对含量, 从而筛选高产藻株。如 Doan 等用流式细胞仪通过测定微拟球藻细胞经尼罗红染色后的荧光强度, 经过 3 次分选得到总脂含量占生物量干重 55% 的微拟球藻高产油藻株^[6]。

微拟球藻 (*Nannochloropsis*), 属于真眼点藻纲, 直径约为 2 μm –5 μm , 分布广、生长快、产油量高, 是一种重要的海产经济微藻。微拟球藻富含油脂, 多不饱和脂肪酸二十碳五烯酸 (EPA) 尤其多, 因而具有良好的开发前景^[7]。一方面, 二十碳五烯酸 (EPA) 在食品工业中应用广泛, 可以有效降低心脏病和动脉硬化等病症的发病率^[8]。另一方面, 微拟球藻中

的饱和脂肪酸不仅产量较高,而且具有含硫量低、含氧量高、十六烷值低等特点,优于石化柴油的燃烧特性,可以用于生产生物柴油^[9]。微拟球藻细胞壁主要是含有纤维素和果胶质的双层结构,尼罗红不易穿过细胞壁对内部油脂进行染色,易导致染色效果差。二甲基亚砷(Dimethyl sulfoxide, DMSO)是一种无色粘稠含硫有机化合物,能提高藻液的极性,改变细胞的通透性,使尼罗红易于透过细胞壁与脂类结合。

目前用于脂质测定的常规方法主要是改进 Bligh 和 Dyer 的溶剂萃取和重量测定的方法^[10]。分析脂含量时首先需要油脂完全提取,需要去除一定量杂质^[11],同时实验耗时过长且提取过程繁杂,难以适用于大规模筛选高脂质积累的藻株。

不同种类的微藻中所含脂质成分与含量的差别,导致染色与荧光参数有所区别,尼罗红染色结果呈现的不是中性脂或者极性脂的单一结果,而是二者一定关系的叠加^[12]。虽然尼罗红染色已在微拟球藻中广泛应用^[13-14],但是针对不同种的染色方法还是有很大差异,例如没有对激发波长与发射波长进行系统性的选择,而且优化参数也仅适用于特定培养环境下的特定藻种。

本研究首先系统地研究了激发波长与发射波长这两个最基础也是最能反应物种脂质特性的变量,然后再对尼罗红染色方法过程中的 DMSO 浓度、尼罗红染液的终浓度、染色时间与细胞密度等参数进行了优化。鉴于微拟球藻在生产生物柴油与高附加产物方面的重要性,建立尼罗红荧光优化法快速检测微拟球藻细胞内油脂含量的方法具有重大意义,可以用于大规模筛选脂质积累的突变微拟球藻藻株。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 藻种和试剂:微拟球藻藻株 *Nannochloropsis gaditana* CCMP527,获赠于法国 Atomic Energy and Alternative Energies Commission Gif-sur-Yvette。尼

罗红购于 Sigma 公司, DMSO 购于 Amresco 公司, Triolein 购于 Sangon 公司,其余试剂均为分析纯。三株微拟球藻突变株 S10、P16 和 P24 为本实验室保藏藻种。

1.1.2 主要仪器:真空冷冻干燥机 Telstar LyoQuest-55 Plus,西班牙 Telstar 公司;万分之一天平 BSA224S-CW,德国赛多利斯公司;台高速冷冻离心机 Beckman Allegra X-30R,美国 Beckman 公司;荧光分光光谱仪 Hitachi F-7000,日本日立公司。

1.1.3 培养基及相关试剂的配制:培养基为改进的 ESAW 人工海水培养基^[15] (g/L) NaCl 21.190, Na₂SO₄ 3.550, KCl 0.599, NaHCO₃ 0.174, NaBr 0.086 3, H₃BO₃ 0.023, MgCl₂·6H₂O 9.592, CaCl₂·2H₂O 1.344; (mg/L): NaNO₃ 140.000, Na₂HPO₄ 8.943, Na₂SiO₃·9H₂O 30.000, FeCl₃·6H₂O 1.300, Na₂EDTA·2H₂O 45.000, ZnCl₂ 4.200, CoCl₂·6H₂O 4.000, MnCl₂·4H₂O 0.360, Na₂MoO₄·2H₂O 0.350, CuSO₄·5H₂O 4.000, Vitamin B1 0.200, Vitamin B12 0.010。缺氮培养基为去除 NaNO₃ 后的培养基。

尼罗红染液:5 mg 尼罗红粉末溶于 50 mL 丙酮,得到质量浓度为 0.1 g/L 的尼罗红染液。

1.2 实验方法

1.2.1 培养:接种藻种培养于 200 mL 的三角瓶,接种后细胞浓度为 4×10^6 cells/mL,光照强度为 3 000 lx, pH 为 8.0 培养温度为 25 ± 1 °C 光暗周期为 16 h:8 h。

1.2.2 重量法分析油脂含量:离心收集细胞,冷冻干燥后,取 10 mg 藻粉加入 3 mL 氯仿和甲醇,氯仿:甲醇为 2:1 (体积比),使用涡旋振荡器将混合液振荡 10 min。加入 1 mL 蒸馏水后 $2\ 000 \times g$ 离心 4 min 使混合液分层,下层氯仿溶液转移到新玻璃管中。上层溶液加入 1 mL 正己烷,涡旋振荡后 $2\ 000 \times g$ 离心 4 min 分层,取上层溶液与氯仿溶液混合在一起。混合液在氮气下干燥至氯仿和正己烷等有机溶剂挥发完全,称重。

1.2.3 藻类荧光强度的测定:取缺氮培养条件下稳定生长 12 d 后的微藻藻液, $5\ 000 \times g$ 离心 8 min 弃上清,藻细胞用缺氮培养基清洗 2 次后重悬。取 500 μ L

重悬藻液分别加入缺氮培养基与 DMSO, 确保荧光强度测定体系的终体积为 1 mL, 且细胞终密度相同。通过设置不同的 DMSO 浓度、尼罗红终浓度与染色时间, 以 500 nm 为固定激发波长, 在 520–700 nm 波长之间进行发射波谱扫描, 观察并测定分析染色特性。

1.2.4 标准品荧光强度的测定: 分别取 1.375、2.750、5.500、8.250、13.750、22.000、27.500 μg 的 Triolein 荧光染色条件跟藻细胞的荧光染色条件相同, 通过紫外分光光度计测定荧光强度。

2 结果与讨论

2.1 尼罗红染色条件的优化

2.1.1 不同 DMSO 浓度对染色的影响: 取缺氮条件下稳定生长期微藻藻液若干, 离心重悬至细胞密度为 2×10^6 cells/mL, 取 5 个离心管按表 1 所示分别加入不同量的藻液、培养基与 DMSO, 确保每管最终体系是 1 mL, 细胞终密度相同, 尼罗红终浓度为 1.0 mg/L, 染色 6 min, 以 500 nm 为固定激发波长, 在 520–700 nm 波长之间进行发射波谱扫描, 观察分析染色特性。其中 X 分别用缺氮培养基(对照)和缺氮条件下稳定生长期微藻藻液代替。

在没有含脂质细胞的情况下, DMSO 在 5%–40% 的不同浓度下通过尼罗红染色均在 650 nm 处出现发射峰, 且峰值大小随着 DMSO 浓度的升高而增大。因此可以确定 DMSO 能与尼罗红结合并在 650 nm 处产生最佳发射波长, 如图 1A 所示。

图 1B 为缺氮条件下培养的细胞染色结果, 由于细胞含有较高的油脂, 经尼罗红染色后, 发射波长的峰值发生了明显的变化。当 DMSO 浓度为 20%–40% 区间时, 发射光谱在 650 nm 处依然有较高的峰值, 表明尼罗红在 DMSO 浓度较高情况下更倾向于与 DMSO 结合, 导致细胞内脂质不能被充分染色, 反而使结果偏低; 在 DMSO 浓度为 5%–10% 时, 细胞染色后的发射波谱在 570 nm 处具有最高峰值, 且在 650 nm 处具有很低的峰值, 说明此时尼罗红与 DMSO 结合对测定结果的影响很小。Chen 等研究微拟球藻的结果选择了 25% 浓度的 DMSO^[13],

表 1 X 为 500 μL 条件下不同 DMSO 浓度的实验体系
Table 1 Experimental system of different DMSO concentration when X was 500 μL

DMSO (μL)	DMSO (%)	Medium (μL)
50	5	440
100	10	390
200	20	290
300	30	190
400	40	90

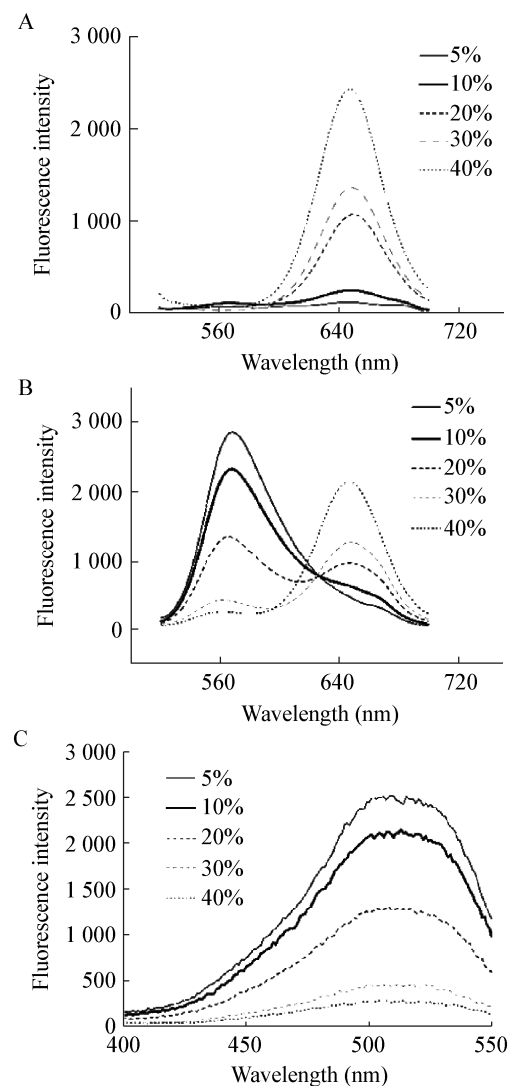


图 1 尼罗红染色中最佳 DMSO 浓度和激发、发射波长的确定

Figure 1 Determination of optimal DMSO concentration and excitation, emission wavelength by Nile Red staining

注: A: 无细胞对照; B: 缺氮培养藻液; C: 激发波长的确定。
Note: A: Without cell (control); B: Staining in nitrogen culture; C: Determination of the excitation wavelength.

而 Doan 等选择了 15% 的浓度^[14], 不同浓度 DMSO 的差异可能由于不同藻种的细胞壁通透性不尽相同引起。DMSO 具有与尼罗红结合的能力, 并能使发射波谱在 650 nm 处产生峰值, 影响尼罗红对油脂的染色与定量, 因此, 选择 5% 浓度 DMSO 作为染色后混合溶液的终浓度, 并且确定了微拟球藻中脂质的最适发射波长为 570 nm。

不同环境下不同种的微拟球藻藻类含有不同的脂质种类, 经尼罗红染色后的激发波长和发射波长也有所差异。现有的报道大都是直接选择激发波长与发射波长, 没有系统的选择方法论, Chen 等直接使用 530 nm 激发波长和 575 nm 发射波长来检测微拟球藻^[13]。Balduyck 等利用尼罗红染色微拟球藻, 直接选择的激发波长为 486 nm, 发射波长为 570 nm^[5]。Doan 等直接选择 480 nm 的激发波长和 575 nm 的发射波长来对微拟球藻进行荧光染色^[14]。本研究结合微拟球藻的特性, 先在常见激发波长范围 480–530 nm 内假设 500 nm 为激发波长, 寻找到最适发射波长后再扫描获得实际激发波长, 这样便获得了最佳激发波长和发射波长。在得到细胞经尼罗红染色后最适发射波长为 570 nm 之后, 利用所得发射波长对激发波长进行扫描, 得到最适激发波长 515 nm, 见图 1C。

2.1.2 尼罗红浓度对染色的影响: 在确定 DMSO 最适浓度为 5% 的情况下, 加入不同量的尼罗红溶液使终浓度分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、3.0 mg/L, 染色 6 min, 激发波长与发射波长分别为 515 nm 和 570 nm 下检测, 结果如图 2 所示。

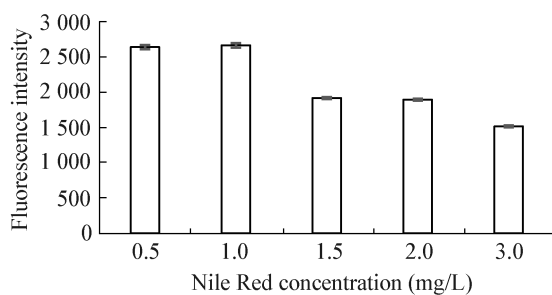


图 2 最佳尼罗红浓度的测定

Figure 2 Determination of optimal concentration of Nile Red

细胞在 1 mg/L 的尼罗红终浓度下相对荧光强度最高, 大于 1 mg/L 时荧光强度反而有所降低。因此可以推测, 当尼罗红浓度大于 1 mg/L 时, 尼罗红对油脂的染色效果已达饱和, 并且可能引起 DMSO 与尼罗红结合而降低荧光强度。当尼罗红浓度低于 1 mg/L 时, 在细胞密度较大的情况下, 尼罗红对油脂的染色可能不够充分, 从而导致荧光测定结果偏低。因此 1 mg/L 的浓度可作为微拟球藻的最适尼罗红染色终浓度, 此结果高于 Chen 等在分析微拟球藻时选择的 0.5 mg/L, 而与 Kou 等在研究衣藻所使用的尼罗红终浓度一致^[16]。

2.1.3 染色时间的影响: 在确定 DMSO 浓度为 5%、尼罗红终浓度为 1 mg/L 的最适条件下, 细胞浓度分别选择为 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 cells/mL, 检测时间点设置为 1、3、6、10、15、20、25 min, 激发波长与发射波长分别为 515 nm 和 570 nm。

总体来说, 不同浓度的细胞经尼罗红染色后的荧光强度随着时间的递增均呈现不断下降的趋势, 如图 3 所示。荧光强度在刚开始加入尼罗红时的 3 min 内最高, 但由于持续时间短, 不利于平稳测定; 在 5–10 min 这个时间段内, 虽然荧光强度数值在下降, 但出现一个相对平滑的区间, 数据较稳定。所以选择尼罗红染色 6 min 来作为荧光强度的检测时间点, 与石健等对小球藻的最佳染色时间相符合^[17], 而低于 Chen 等针对微拟球藻选择的 10 min, 主要由于 Chen 等选择的时间间隔跨度较大, 因此取了一个较大的平台时间点。本研究在稳定测定荧光强度数据的前提下, 尽可能降低随时间延长而产生的尼罗红荧光衰减误差, 因而选择 6 min 作为最佳检测时间点。

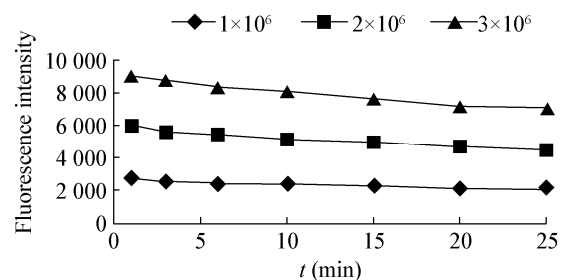


图 3 最佳染色时间的确定

Figure 3 Determination of optimal staining time

2.1.4 细胞浓度的影响: 在 DMSO 浓度为 5%、尼罗红终浓度为 1 mg/L、染色时间为 6 min 的最适条件下, 分别测定不同藻细胞浓度的荧光强度。

如图 4 所示, 由于荧光分光光谱仪 Hitachi F-7000 的最大量程为 10 000, 所以缺氮情况下细胞密度不应超过 4×10^6 cells/mL, 而在 $(0.5-3.0) \times 10^6$ cells/mL 的范围内, 尼罗红染色后藻细胞的荧光强度与细胞密度之间具有良好的线性关系, 相关系数 R^2 为 0.997 2。缺氮情况下细胞密度在 $(0.5-3.0) \times 10^6$ cells/mL 之间时荧光强度与细胞数成正相关关系, 因此尼罗红染色法可以用来确定一定量藻细胞内油脂的含量。

2.2 油脂含量与尼罗红染色荧光强度之间的关系

2.2.1 藻的油脂重量与荧光强度之间的相关性: 分别选取氮缺乏与氮饱和条件下不同培养时间的藻液, 利用重量法对微拟球藻的油脂含量进行绝对定量, 与尼罗红荧光染色法测定的荧光强度进行线性回归。如图 5 所示, 藻细胞内的总脂含量与荧光强度之间的相关系数 R^2 为 0.991 4, 说明二者之间具有良好线性关系, 可以利用荧光强度值来表征藻株的油脂含量。

2.2.2 标准品的重量与荧光强度之间的相关性: 标准品 Triolein 在 1.375–27.500 μg 之间与尼罗红荧光染色测定的荧光强度之间具有良好的线性关系, 如图 6 所示, 相关系数 R^2 为 0.990 3。说明荧光强度可以表征标准品 Triolein 的脂质含量。

2.2.3 藻的油脂含量与荧光强度的关系: 藻的油脂重量和标准品油脂的重量分别与经过尼罗红荧光染色后的荧光强度之间成正相关。相关公式分别为 $y=179.7x_1-340.22$ 和 $y=184.16x_2-435.91$, 得到 $x_1=1.02x_2-0.53$, 说明荧光染色法测定脂质含量与重量法测定脂质含量极为接近。通过尼罗红荧光染色法来快速测定细胞内油脂含量, 且重量法得到藻的油脂含量与荧光强度之间具有线性相关, 如图 7 所示, R^2 为 0.997 3。

2.2.4 突变藻株的验证: 建立尼罗红荧光染色法快速检测油脂含量的目的, 在于快速而便捷地从大量

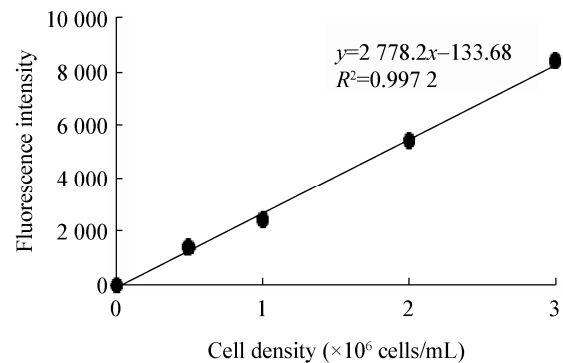


图 4 不同细胞密度的尼罗红染色荧光强度

Figure 4 Fluorescence intensity with different cell density stained by Nile Red

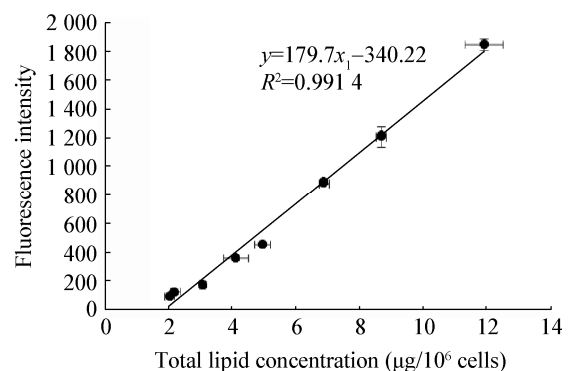


图 5 重量法测定总脂含量与尼罗红染色荧光强度的相关性

Figure 5 Correlation of lipid content by gravimetric and fluorescence intensity stained by Nile Red

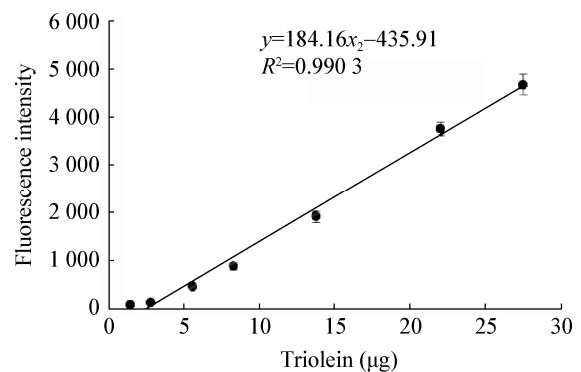


图 6 Triolein 标准物法测定总脂含量与尼罗红染色荧光强度的相关性

Figure 6 Correlation of lipid content by Triolein standard and fluorescence intensity stained by Nile Red

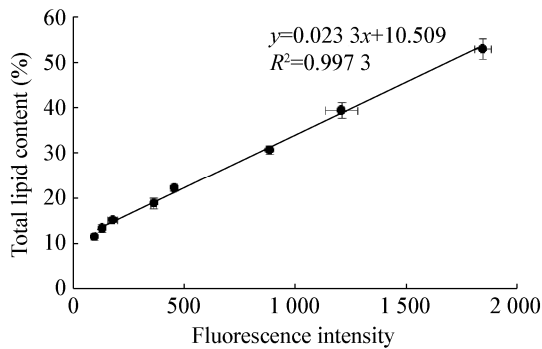


图 7 藻的油脂含量与荧光强度的关系

Figure 7 The relationship between lipid content of fluorescence intensity

突变藻株中筛选出高产油藻株。图 7 所示野生型藻株的油脂含量与荧光强度具有线性相关的结论，因此选择实验室保存的 3 株突变藻株 S10、P16 和 P24 来验证尼罗红荧光染色法对筛选突变株是否有效。S10 和 P16 是两株诱变得到的 高产油藻株，而 P24 是一株产油量较野生型略低但油脂组分有所差异的突变藻株。

如图 8 所示，野生型藻株的荧光强度和油脂含量分别为 173.93 和 15.12%，突变株 S10、P16 和 P24 的荧光强度平均值分别为 594、516.75 和 125.51，重量法测定油脂含量占总干重比例平均值分别为 24.05%、22.46%和 14.10%。利用油脂含量与荧光强度之间的线性相关性函数计算得出，S10、P16 和 P24 的油脂含量占总干重比例分别为 24.35%、22.55%和 13.43%。突变株测定出来的油脂含量实际测定值与应用函数的计算值非常接近，因而可以用尼罗红染色法测定荧光强度来表征微拟球藻细胞内的油脂含量，并大规模筛选高含量脂质积累的突变微拟球藻藻株。用 Chen 等选择的 480 nm 激发波长和 575 nm 发射波长的尼罗红染色条件，野生株与突变株经尼罗红染色测定的油脂含量均小于重量法的测定结果。因而，本研究所确定的尼罗红染色优化条件适用于微拟球藻这一株系，这一现象也正好跟 Balduyck 等提出的针对不同物种需要重新优化染色条件的结论相吻合^[5]，但又比其多了一项系统性确定激发波长和发射波长这一基础条件，从而更加完善。

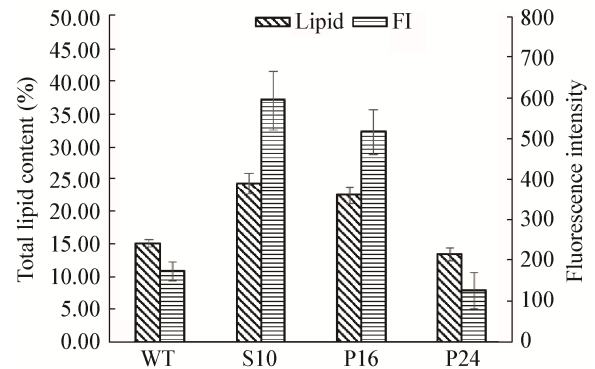


图 8 比较突变株油脂含量与荧光强度

Figure 8 Comparison of lipid content and fluorescence intensity of mutants

3 结论

本研究通过分析微拟球藻经尼罗红染色后的特性，未直接选用前人发表的激发波长与发射波长这一基础特性，而是通过系统的实验准确测定了最佳激发波长与发射波长分别为 515 nm 和 570 nm。在此基础上优化了最佳染色条件：DMSO 的浓度为 5%，尼罗红染色溶液终浓度为 1 mg/L，染色时间为 6 min，细胞浓度范围为 $(0.5-3.0) \times 10^6$ cells/mL。通过比较重量法和标准物法分别与荧光强度之间的线性相关性，得出尼罗红荧光染色法可以快速准确测定细胞内油脂含量的结论，且二者具有良好的线性相关性，线性系数 R^2 为 0.997 3。同时尼罗红能检测到的油脂下限达到 2 μ g，大大减少了测定油脂所需细胞量，便于快速大规模筛选突变微拟球藻藻株。

参考文献

- [1] Chisti Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol[J]. Trends in Biotechnology, 2008, 26(3): 126-131
- [2] Brennan L, Owende P. Biofuels from microalgae — a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products[J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2010, 14(2): 557-577
- [3] Taleb A, Pruvost J, Legrand J, et al. Development and validation of a screening procedure of microalgae for biodiesel production: application to the genus of marine microalgae *Nannochloropsis*[J]. Bioresource Technology, 2015, 177: 224-232
- [4] Jiang XY, Wang WY, Zhong M, et al. Rapid determination of oil in *Schizochytrium* sp. cell by Nile Red fluorescence dyeing[J].

- China Oils and Fats, 2016, 41(1): 51-55 (in Chinese)
蒋晓艳, 王婉玉, 钟敏, 等. 裂殖壶菌胞内油脂尼罗红荧光染色快速检测方法的研究[J]. 中国油脂, 2016, 41(1): 51-55
- [5] Balduyck L, Veryser C, Goiris K, et al. Optimization of a Nile Red method for rapid lipid determination in autotrophic, marine microalgae is species dependent[J]. Journal of Microbiological Methods, 2015, 118: 152-158
- [6] Doan TTY, Obbard JP. Enhanced lipid production in *Nannochloropsis* sp. using fluorescence-activated cell sorting[J]. Global Change Biology Bioenergy, 2011, 3(3): 264-270
- [7] Camacho-Rodríguez J, González-Céspedes AM, Cerón-García MC, et al. A quantitative study of eicosapentaenoic acid (EPA) production by *Nannochloropsis gaditana* for aquaculture as a function of dilution rate, temperature and average irradiance[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(6): 2429-2440
- [8] Nodera M, Suzuki H, Yamada S, et al. Association of serum n-3/n-6 polyunsaturated fatty acid ratio with T-wave alternans in patients with ischemic heart disease[J]. International Heart Journal, 2015, 56(6): 613-617
- [9] Wang CW, Cui FF, Song Y. Research situation and development prospect of biodiesel[J]. China Oils and Fats, 2014, 39(5): 44-48 (in Chinese)
王常文, 崔方方, 宋宇. 生物柴油的研究现状及发展前景[J]. 中国油脂, 2014, 39(5): 44-48
- [10] Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification[J]. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, 1959, 37(8): 911-917
- [11] López EN, Medina AR, Moreno PAG, et al. Biodiesel production from *Nannochloropsis gaditana* lipids through transesterification catalyzed by *Rhizopus oryzae* lipase[J]. Bioresource Technology, 2015, 203: 236-244
- [12] Alonzo F, Mayzaud P. Spectrofluorometric quantification of neutral and polar lipids in zooplankton using Nile red[J]. Marine Chemistry, 1999, 67(3/4): 289-301
- [13] Chen W, Zhang CW, Song LR, et al. A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae[J]. Journal of Microbiological Methods, 2009, 77(1): 41-47
- [14] Doan TTY, Obbard JP. Improved Nile Red staining of *Nannochloropsis* sp.[J]. Journal of Applied Phycology, 2011, 23(5): 895-901
- [15] BergesJA, Franklin DJ, Harrison PJ. Evolution of an artificial sea water medium: improvements in enriched seawater, artificial water over the last two decades[J]. Journal of Phycology, 2001, 37(6): 1138-1145
- [16] Kou Z, Bei SQ, Sun J, et al. Fluorescent measurement of lipid content in the model organism *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Journal of Applied Phycology, 2013, 25(6): 1633-1641
- [17] Shi J, Zhang WJ, Feng X, et al. The optimization and application of Nile Red fluorescent determination[J]. Industrial Safety and Environmental Protection, 2016, 42(4): 61-64 (in Chinese)
石健, 张雯婕, 冯汛, 等. 尼罗红荧光染色法的优化及应用[J]. 工业安全与环保, 2016, 42(4): 61-64