

基于单细胞质谱组学研究珊瑚共生虫黄藻的 化学多样性

张佳宇¹, 陈仕国¹, 余克服¹, 梁甲元¹, 侯壮豪², 裴继影¹

(1. 广西南海珊瑚礁研究重点实验室, 广西大学珊瑚礁研究中心, 广西大学海洋学院, 广西南宁 530004;

2. 中国科学技术大学化学与材料科学学院, 安徽合肥 230000)

摘要: 虫黄藻(Symbiodiniaceae)作为珊瑚共生体的重要组成部分, 其生态特征在决定珊瑚对环境胁迫的响应中发挥着关键作用。然而, 目前尚不清楚不同生态类型虫黄藻的代谢多样性是否与其环境适应能力密切相关。为揭示二者之间的关联, 本研究基于单细胞质谱组学技术, 系统解析了耐光照的 *Symbiodinium* 属(A型)、广泛分布的 *Cladocopium* 属(C型)及耐热的 *Durusedinium* 属(D型)3种不同生态类型的虫黄藻代谢特征。结果表明, A型虫黄藻的亮氨酸含量显著低于C型和D型, C型虫黄藻富集缬氨酸, 而D型虫黄藻特异性积累二甲基巯基丙酸内盐(dimethylsulfoniopropionate, DMSP)。高分辨串联质谱(HRMS/MS)碎片离子匹配结果进一步验证了代谢物鉴定的可靠性。因此, 推测A型虫黄藻可能通过调控还原型辅酶I(reduced nicotinamide adenine dinucleotide, NADH)再生途径增强光保护能力, C型虫黄藻通过调节宿主氨基酸代谢维持共生稳态, 而D型虫黄藻依赖抗氧化防御系统提升对环境胁迫的耐受性。本研究为珊瑚共生虫黄藻的适应机制提供了新的分子视角, 有助于深入理解珊瑚-虫黄藻共生体系在全球气候变化背景下的响应机制。

关键词: 单细胞; 质谱; 虫黄藻; 代谢组学

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2025)06-0868-11

DOI: 10.7538/zpxb.2025.0069

CSTR: 32365.14.zpxb.2025.0069

Study on Chemical Diversity of Coral-Symbiotic Symbiodiniaceae Based on Single-Cell Mass Spectrometry

ZHANG Jia-yu¹, CHEN Shi-guo¹, YU Ke-fu¹, LIANG Jia-yuan¹, HOU Zhuang-hao², PEI Ji-ying¹

(1. School of Marine Sciences, Coral Reef Research Center of China, Guangxi Laboratory on the Study of Coral Reefs in the South China Sea, Guangxi University, Nanning 530004, China; 2. School of Chemistry and Materials Science,

University of Technology and Science of China, Hefei 230000, China)

Abstract: Coral reefs, often referred to as the ‘tropical rainforests of the sea’, are among the most ecologically diverse and productive marine ecosystems on Earth. However, climate change—especially global ocean warming—has triggered widespread coral bleaching events, posing a severe threat to reef biodiversity, structure, and their function. Central to coral resilience is the symbiotic relationship with Symbiodiniaceae, a family of photosynthetic dinoflagellates that provide

essential nutrients to the coral host. The environmental adaptability of this symbiosis is strongly influenced by the physiological and metabolic traits of the symbionts. While extensive research has characterized Symbiodiniaceae diversity and abundance at the population level, relatively little is known about the metabolic and functional heterogeneity that exists at the level of individual cells—particularly across phylogenetically distinct clades. To address this gap, a custom-built induced nano-electrospray ionization (Induced nanoESI) single-cell mass spectrometry platform was developed and applied. This platform enabled high-sensitivity, label-free profiling of intracellular metabolites from individual Symbiodiniaceae cells, facilitating a more detailed understanding of their functional and metabolic diversity. This platform was applied to characterize the metabolic profiles of three ecologically divergent Symbiodiniaceae clades, including the light-tolerant *Symbiodinium* (Clade A), the broadly distributed *Cladocopium* (Clade C), and the thermotolerant *Durudinium* (Clade D). The method demonstrated good reproducibility and sensitivity in single-cell metabolomics. Clear metabolic differentiation among the three clades was observed using multivariate statistical analyses, including principal coordinate analysis (PCoA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA). A total of 14 differential metabolites are identified through high-resolution mass spectrometry (HRMS) and further confirmed by liquid chromatography coupled to hybrid high-resolution mass spectrometry (LC-HRMS/MS) spectral matching. Among these, leucine is found to be significantly depleted in Clade A relative to Clades C and D; valine is highly enriched in Clade C; and dimethylsulfoniopropionate (DMSP), a well-known osmoprotectant and antioxidant, is specifically accumulated in Clade D. These results suggest distinct clade-specific metabolic strategies. It was proposed that leucine biosynthesis is downregulated by Clade A to reduce acetyl-CoA accumulation, thereby promoting reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) regeneration and enhancing cyclic electron flow under high-light stress. Clade C's elevated valine levels may aid in host nutritional support and symbiotic stability. Clade D's high DMSP production likely contributes to oxidative stress resistance and thermal tolerance. In conclusion, this study highlights the power of single-cell metabolomics in uncovering functional diversity within symbiodiniaceae. New molecular insights into coral-symbiont interactions are provided by our findings, and a foundation is established for understanding how clade-specific metabolic adaptations contribute to coral reef resilience in a changing climate.

Key words: single-cell; mass spectrometry; symbiodiniaceae; metabolomics

珊瑚礁作为海洋生态系统的重要组成部分, 凭借其丰富的生物多样性和较高的初级生产力, 被誉为“海洋中的热带雨林”^[1]。除提供渔业资源和天然药物原料外, 珊瑚礁还在旅游服务、海岸防护等方面发挥着不可替代的生态与经济功能^[2-4]。然而, 近年来全球气候变化导致珊瑚礁大规模白化, 例如 1997~1998 年、2009~2010 年以及 2015~2017 年发生的 3 次全球性“珊瑚白化”事件, 波及了全球 70% 以上的珊瑚礁区^[5-7]。珊瑚白化是指珊瑚宿主通过胞吐作用主动排出共生虫黄藻(Symbiodiniaceae), 导致发生光合色

素丧失、骨骼显现白色的现象, 其中海表温度异常升高被认为是主要诱因^[8]。高温引发的珊瑚白化威胁着珊瑚礁的存活, 并影响其生长、繁殖和生态功能。

近年来, 适应性白化假说提出, 珊瑚能够通过调节体内共生虫黄藻的群落结构来提升对环境胁迫的耐受性。研究表明, 珊瑚在经历热胁迫后, 可通过改变优势虫黄藻类型以增强热耐受性。例如, Berkelmans 等^[9]通过将鹿角珊瑚(*Acropora millepora*)移植至高温海域, 发现其体内主要共生藻型由热敏感的 *Cladocopium* 属转变

为耐热性更强的 *Durusdinium* 属, 珊瑚的热耐受阈值提高了 1~1.5 °C。同样, Baker 等^[10]在 1997~1998 年 ENSO 事件前后对巴拿马海域 *Pocillopora* 属珊瑚的跟踪研究发现, 含 *Durusdinium* 属虫黄藻的珊瑚比例由 43% 升至 63%, 且几乎未发生白化, 而以 *Cladocopium* 属共生的珊瑚则出现严重白化。系统发育分析显示, 虫黄藻科已被鉴定出 11 个属, 其中与珊瑚形成稳定共生关系的主要包括 *Symbiodinium* (A 型)、*Breviolum* (B 型)、*Cladocopium* (C 型) 和 *Durusdinium* (D 型) 等^[11-14]。不同属虫黄藻在生理生态特性上存在显著差异: A 型耐高光环境, C 型物种丰富且生态位广泛, D 型则在高温波动及高浊度环境中表现出更强的耐受性^[11]。可见, 珊瑚对环境胁迫的耐受性在很大程度上取决于其共生虫黄藻群落的组成与结构。然而, 目前多数研究主要集中在群体水平, 对珊瑚组织中虫黄藻的整体种类和丰度进行分析, 忽略了单细胞层面上虫黄藻细胞间潜在的功能和代谢异质性^[15]。细胞间代谢差异可能在珊瑚应对环境变化、帮助珊瑚白化恢复等过程中发挥关键作用。因此, 为深入揭示不同属虫黄藻在珊瑚-虫黄藻共生关系中的功能异质性, 有必要引入具备单细胞分辨率的代谢组学等高通量分析技术, 以解析不同虫黄藻个体间的代谢差异及其在环境适应中的潜在作用。

单细胞分析技术以单个细胞为研究单位, 能够独立、精准地解析珊瑚共生虫黄藻的代谢特征, 揭示被群体平均效应掩盖的细胞特异性机制。目前, 单细胞分析常用的方法包括荧光检测、超微电极电化学检测、色谱分析与质谱分析等, 其中, 质谱技术凭借高灵敏度和高分辨率的优点, 已成为单细胞代谢组学研究的核心手段^[16]。纳升电喷雾离子化 (nano-electrospray ionization, nano-ESI) 作为广泛应用的单细胞质谱离子化方式, 在单细胞分子分析中发挥着重要作用^[17]。传统 nano-ESI 技术通过将金属丝插入毛细管并施加高电压实现样品离子化, 其操作复杂, 且金属电极直接接触样品溶液易引发电化学干扰, 导致代谢物氧化或其他变化。为此, 感应电喷雾离子化 (induced nano-electrospray ionization, Induced nanoESI) 技术应运而生。该方法避免了电极与样品溶液的直接接触, 不仅简化了电压施加流程, 还显著降低了电化学副反应对代谢物信号的

干扰^[18]。Induced nanoESI 技术已成功应用于神经元、肿瘤细胞及溶酶体等多种单细胞或细胞器的代谢组学研究, 展现出优异的灵敏度和良好的重复性^[19-22]。

本研究基于 Induced nanoESI 质谱技术, 针对 A、C、D 型三属珊瑚共生虫黄藻进行单细胞代谢组学分析。通过多元统计分析, 系统比较三属虫黄藻在单细胞水平的代谢指纹特征, 筛选具有属特异性的标志性代谢物, 并结合液相色谱-高分辨串联质谱 (liquid chromatography coupled to hybrid high-resolution mass spectrometry, LC-HRMS/MS) 技术进行验证, 进一步探讨关键代谢物在珊瑚-虫黄藻共生体系中参与化学生态适应机制的潜在作用, 旨在为揭示珊瑚礁生态系统应对环境变化的代谢调控策略提供新的单细胞代谢组学证据与理论支撑。

1 实验部分

1.1 主要仪器与装置

Exactive Plus Orbitrap 质谱仪、UPLC-Q-Exactive Orbitrap 质谱仪: 美国 Thermo Fisher Scientific 公司产品; Olympus CK2 倒置显微镜: 日本 Olympus 公司产品; Burleigh 显微操作平台、Sutter Instruments P-2000 激光拉针仪: 美国 Novato 公司产品; Sigma 3-18KS 高速冷冻离心机: 德国 Sigma 公司产品。

1.2 主要材料与试剂

Reef Crystals 人工海盐: 美国 Instant Ocean 公司产品; 硼硅玻璃毛细管 (外径 1.2 mm, 内径 0.9 mm): 美国 Sutter Instrument 公司产品; L1 培养基: 上海光语生物科技有限公司产品; 甲醇: 德国 Merck 公司产品; 卡那霉素、氨苄青霉素、链霉素、两性霉素 B: 德国 Biofrox 公司产品。

1.3 虫黄藻的培养

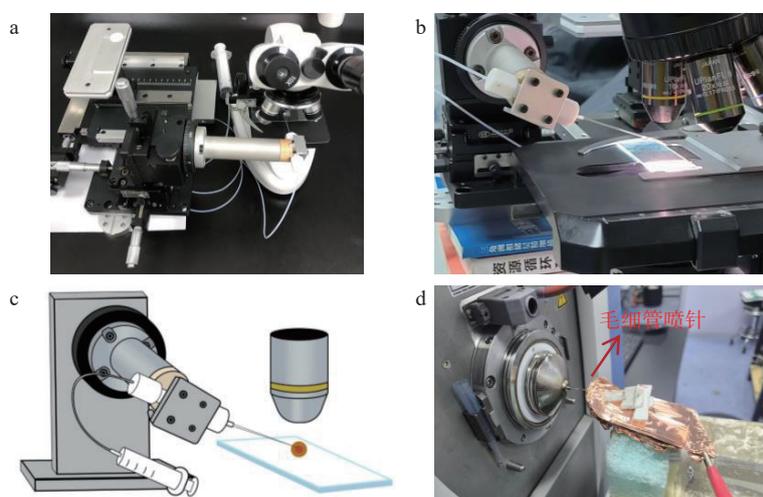
使用人工海盐配制盐度为 35‰ 的人工海水, 初始 pH 值调至 8.2。海水经 0.22 μm 孔径微孔滤膜, 通过真空抽滤系统预过滤后, 置于高压蒸汽灭菌器中, 在 121 °C 下灭菌 15 min, 冷却至室温, 备用。以灭菌后的人工海水为基质, 配制含抗生素的 L1 培养基, 抗生素添加浓度为 50 mg/L 卡那霉素、100 mg/L 氨苄青霉素、50 mg/L 链霉素、2.5 mg/L 两性霉素 B。A、C 和 D 型虫黄藻在盐度 35‰、温度 (25±1) °C、

光照强度 $90 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、明暗周期为 14 h 光照/10 h 黑暗的培养条件下生长。

1.4 单细胞质谱分析

1.4.1 样品制备 取 $2 \mu\text{L}$ 初始浓度为 $6.1 \times 10^5 \text{ cells}/\text{mL}$ 的虫黄藻细胞悬液, 均匀滴加于载玻片表面。为便于在显微镜下快速定位目标细胞, 先使用马克笔在载玻片上划定 1 个圆形区域, 然后将细胞悬液滴加至该区域内。随后在 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温条件下静置 5 min, 以使细胞沉底。使用拉针仪制备尖端孔径约为 $1.0 \mu\text{m}$ 的硼硅玻璃

毛细管, 其拉制参数设定如下: 加热强度(heat)=550, 加热线圈类型(filament)=4, 拉伸速度(velocity)=23, 延迟时间(delay)=130, 拉力强度(pull)=50。向毛细管内预先注入超纯水作为电极内液。将装载溶剂的毛细管连接至气压控制装置, 随后固定在显微操作平台上。实验中, 将毛细管尖端接触目标单细胞膜表面, 并将针尖插入细胞, 通过气压系统实现对单细胞内容物的抽取。取样平台的构建及操作示意图示于图 1a~1c。



注: a、b. 单细胞取样实验装置实物图; c. 单细胞取样示意图; d. 单细胞质谱分析平台

图 1 实验装置图

Fig. 1 Experimental setup

1.4.2 质谱分析 单细胞质谱分析平台示于图 1d, 将装载有样品的毛细管尖端对准质谱锥口, 并保持约 5 mm 的距离。在感应电极上施加幅值 10 kV、频率 1 000 Hz 的交流电压, 在感应电场作用下, 实现毛细管内液体的电喷雾与离子化, 从而获得单细胞的质谱信号。质谱采集采用正离子模式, 该模式具有较高的离子化效率和信噪比, 可实现灵敏且稳定的检测效果, 因此广泛应用于单细胞质谱分析中^[21, 23-26]。相比之下, 负离子模式在 Induced nanoESI 过程中更易发生放电, 降低喷雾稳定性, 进而影响信号质量。在相同条件下, 分别采集 A、C、D 型三属虫黄藻各 24 个单细胞数据。质谱参数设置如下: S 型离子透镜的 S-lens 设为 50%(正离子模式), 毛细管温度 $275 \text{ }^\circ\text{C}$, 质量分辨率 140 000, 微扫描数量设置为 1, 最大离子注入时间 10 ms。

1.4.3 数据分析 通过 Thermo Fisher Xcalibur 软件导出原始质谱数据, 并在 MATLAB 2016b 平台上进行峰位对齐与峰强度提取。为减少因盐基质抑制、仪器敏感度变化及喷雾效率波动所带来的系统误差, 本实验采用总离子流归一化方法。具体而言, 将每个代谢物峰面积标准化到其所属样本的总离子流强度上^[27]。归一化后的数据用于后续的多维统计分析和差异筛选, 以此提高数据的稳定性、可比性与分析的可靠性。

1.4.4 代谢物鉴定 单细胞质谱分析得到的数据基于 PlantCy 代谢物库, 通过精确的质量数进行代谢物鉴定。检索的物质以质子化形式 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), 钠、钾、 NH_3 加合物的形式 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$ 、 $[\text{M}+\text{K}]^+$ 、 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$), 脱水形式 ($[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ 、 $[\text{M}+\text{H}-2\text{H}_2\text{O}]^+$) 的理论分子质量为基准, 当质量数的误差小于 10^{-5} 时, 即认定为同一代谢物。

1.5 LC-HRMS/MS 分析

1.5.1 样品制备 取 50 mL 虫黄藻细胞悬液, 在 4 °C 下以 3 606 r/min 离心 5 min, 弃除上清液, 保留细胞沉淀。向细胞沉淀中加入 1 mL 70% 甲醇水溶液(V/V), 摇晃均匀。将混合液超声处理 20 min 后, 再次在 4 °C 下以 3 606 r/min 离心 5 min, 收集上清液。随后, 使用孔径为 0.22 μm 的有机系针式过滤器对上清液进行过滤, 并转移至色谱小瓶中。A、C、D 型三属虫黄藻每种样品均制备 4 个生物学重复, 最后对提取物进行 LC-HRMS/MS 分析。

1.5.2 仪器分析 使用 ACQUITY CSH C18 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)进行色谱分离, 流速 200 μL/min, 温度 30 °C。流动相为含 0.1% 甲酸的水溶液(A 相)和含 0.1% 甲酸的甲醇溶液(B 相); 洗脱梯度为 0~3 min(5%B), 3~20 min(5%~95%B), 20~25 min(95%B), 25~26 min(95%~5%B), 并在下次进样前平衡 4 min, 每个样品的进样体积为 2 μL。采用数据依赖采集模式, 鞘气流速 35 L/min, 辅助气体流速 15 L/min, 吹扫气流速 0 L/min, 辅助气体温度 250 °C。喷雾电压 3.5 kV, 进样毛细管温度 350 °C, S-lens 射频电压 50 V。在全扫描模式下, 质量扫描范围 m/z 100~1 000, m/z 200 处的分辨率为 35 000。最大离子注入时间 100 ms, 自动增益控制(AGC)目标值为 3.0×10^6 。在 MS/MS 模式下, 每次采集选择最强的前 10 个母离子进行碎片化。 m/z 200 处的分辨率为 17 500, 最大离子注入时间 50 ms, AGC 目标值设为 1.0×10^5 。母离子隔离窗口宽度为 m/z 1.5, 归一化碰撞能量按 15%~30% 逐步递增。

1.5.3 质谱数据预处理 使用 MZmine 4.3.0 软件对原始质谱数据进行预处理, 以提取代谢物特征信息。预处理流程包括以下 9 个步骤: 1) 进行质谱峰检测, 提取 m/z 特征信号; 2) 采用自动化数据分析 workflow 进行色谱峰构建; 3) 通过局部最小特征解析进行解卷积; 4) 使用 ^{13}C 同位素过滤以去除同位素干扰; 5) 通过峰对齐匹配不同样本中的特征峰; 6) 进行峰识别; 7) 应用重复特征过滤去除冗余信号; 8) 利用特征筛选剔除低质量峰; 9) 最后进行线性归一化以校正样本间的信号偏差。

1.5.4 代谢物鉴定 将 MZmine 软件导出的 mgf 格式文件与特征量化表上传至 GNPS 平台,

用于代谢物鉴定分析。参数设置中, 母离子质量容差和碎片离子质量容差均设置为 0.02 u, 其余参数保持默认值。

1.6 统计学分析

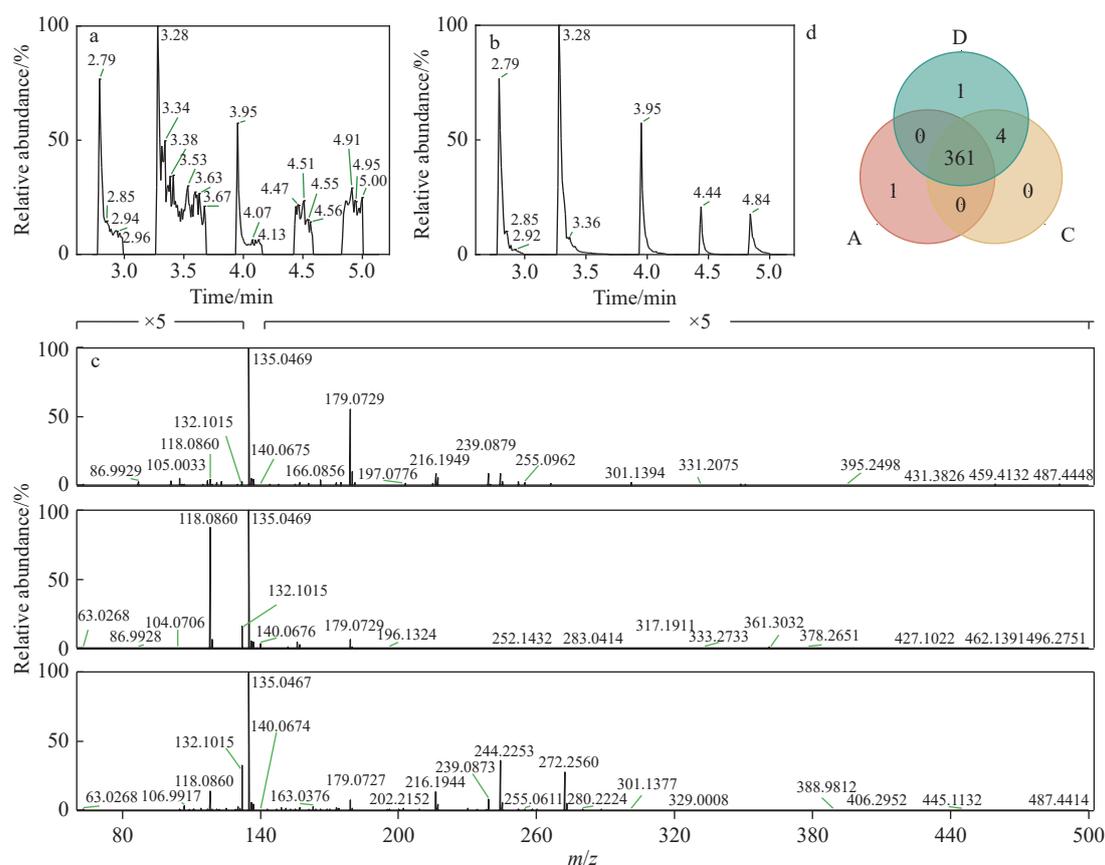
鉴于单细胞质谱数据的稀疏性、强非正态分布及复杂非线性结构, 本文采用主坐标分析(principal coordinate analysis, PCoA)对单细胞数据进行无监督统计学分析。PCoA 在 RStudio(R for Windows 4.4.3)中进行, 基于 vegan 包的 vegdist() 函数计算 Bray-Curtis 距离矩阵, 随后使用 adonis() 函数(置换次数设为 999)进行置换多元方差分析(permutational multivariate analysis of variance, PERMANOVA)检验, 以评估组间差异。为进一步识别潜在差异代谢物, 在 SIMCA-P v14.1 软件中进行正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA), 并计算变量投影重要性(variable importance in projection, VIP)值。VIP 值大于 1.0 的代谢物被认为是具有显著区分贡献的候选差异标志物。通过 Shapiro-Wilk 检验评估数据正态性, 符合正态分布时采用独立样本 t 检验, 非正态分布时采用非参数检验。 $p < 0.05$ 被认为具有统计学差异, $p < 0.01$ 表示具有高度统计学差异。

2 结果与讨论

2.1 虫黄藻单细胞质谱分析的性能表征

本研究基于自建的单细胞质谱分析平台, 对虫黄藻细胞进行系统的分析性能评估。在连续 5 次测试中, 单个虫黄藻细胞的信号持续时间稳定在 0.15~0.42 min 之间, 表明该方法的重复性良好, 示于图 2a。以 m/z 135.046 9 代谢物为代表, 其信号在 0.41 min 内迅速达到峰值并迅速衰减至基线, 提示细胞内代谢物在极短时间内完成释放与电离过程, 示于图 2b。这一特征可归因于虫黄藻细胞体积较小(细胞直径为 8~11 μm, 体积约为 512~1 331 μm³), 导致其胞内代谢物总量有限。当施加电压引发电喷雾过程后, 代谢物立即释放至电喷雾区域, 在毛细管末端形成瞬时强信号。随着胞内物质耗尽, 后续信号主要来源于毛细管中残余溶剂和背景离子。

质谱分析结果表明, 该平台对低分子质量代谢物($m/z < 300$)具有良好的检测灵敏度, 而高分子质量代谢物的检出率较低, 示于图 2c。可能原



注: a. 连续5次单细胞分析的总离子流图; b. 最强信号代谢物(m/z 135.0469)的提取离子流图; c. 三属虫黄藻(A、C、D)典型的单细胞分析质谱图; d. 三属虫黄藻(A、C、D)代谢产物的韦恩图

图2 虫黄藻单细胞的质谱分析

Fig. 2 Single-cell mass spectrometry analysis of Symbiodiniaceae

因是单细胞样本基质复杂,抑制了大分子代谢物的电离效率与挥发能力,限制其被质谱捕获。值得注意的是, m/z 135.0469代谢物在所有检测信号中的相对丰度最强,推测其可能为虫黄藻中一种重要的胞内代谢物,在后续的结构鉴定和功能解析中需给予重点关注。为评估不同属虫黄藻代谢组组成的一致性,本实验对A、C、D型三属虫黄藻样品进行代谢物的韦恩图分析,示于图2d。结果显示,检出的代谢物中有361种为三者共有,所占比例显著,表明这三属虫黄藻在基础代谢组组成上高度一致。同时,仅在A型和D型中各检出1种特异性代谢物,而在C型中未检出特异性成分,表明其核心代谢物组成差异极小,仅存在有限的种属特异性表达。本实验进一步基于PlantCyc代谢物数据库和LC-HRMS/MS二级质谱图对所检测到的代谢物进行比对鉴定,最终确认了14种代谢物,具体信息列于表1。

2.2 差异代谢物筛选

为深入解析不同虫黄藻种属间的代谢组差异,本实验结合无监督的PCoA与有监督的OPLS-DA方法,对三属虫黄藻样品的代谢轮廓进行系统分析。PCoA结果显示,三类样品在二维空间中显著分离,第一主坐标(principal coordinate 1, PCo1)和第二主坐标(principal coordinate 2, PCo2)分别解释了41.5%和14.2%的变异,总体累计解释变异达55.7%,示于图3a。PERMANOVA检验进一步证实了组间差异具有统计学显著性($R^2=0.17$, $p=0.001$),表明3种虫黄藻在代谢层面存在显著差异。OPLS-DA模型进一步验证了该分离趋势,模型的拟合优度和预测能力分别为 $R^2X=0.624$ 、 $R^2Y=0.754$ 和 $Q^2=0.594$,呈现出良好的分类性能,示于图3b。200次置换检验结果($p<0.01$)排除了模型过拟合的可能性,表明OPLS-DA模型稳定可靠,可用于筛选虫

表1 虫黄藻代谢物鉴定结果

Table 1 Identification results of Symbiodiniaceae metabolites

中文名 Chinese name	英文名 English name	实测 m/z Experimental m/z	加合离子类型 Adduct type	理论 m/z Theoretical m/z	误差 Error/ $\times 10^{-6}$
3-氨基丙醛	3-Aminopropionaldehyde	74.0603	$[M+H]^+$	74.0606	-4.05
戊内酯	Valerolactone	101.0595	$[M+H]^+$	101.0603	-7.92
阿拉伯糖醇	Arabitol	117.0545	$[M+H-2H_2O]^+$	117.0552	-5.98
缬氨酸	Valine	118.0866	$[M+H]^+$	118.0868	-1.69
烟酰胺	Nicotinamide	123.0551	$[M+H]^+$	123.0558	-5.69
焦谷氨酸	Pyroglutamic acid	130.0495	$[M+H]^+$	130.0504	-6.92
亮氨酸	Leucine	132.1021	$[M+H]^+$	132.1025	-3.03
二甲基巯基丙酸内盐	Dimethylsulfoniopropionate	135.0469	$[M+H]^+$	135.0480	-8.15
2-氨基苯甲酸	2-Aminobenzoic acid	138.0546	$[M+H]^+$	138.0555	-6.52
甜菜碱	Betaine	140.0676	$[M+Na]^+$	140.0687	-7.85
三羟基丁烷	Trihydroxybutane	145.0254	$[M+K]^+$	145.0267	-8.96
谷氨酰胺	Glutamine	147.0760	$[M+H]^+$	147.0770	-6.80
<i>N</i> -氨甲酰腐胺	<i>N</i> -Carbamoylputrescine	170.0681	$[M+K]^+$	170.0696	-8.82
精氨酸	Arginine	175.1183	$[M+H]^+$	175.1195	-6.85

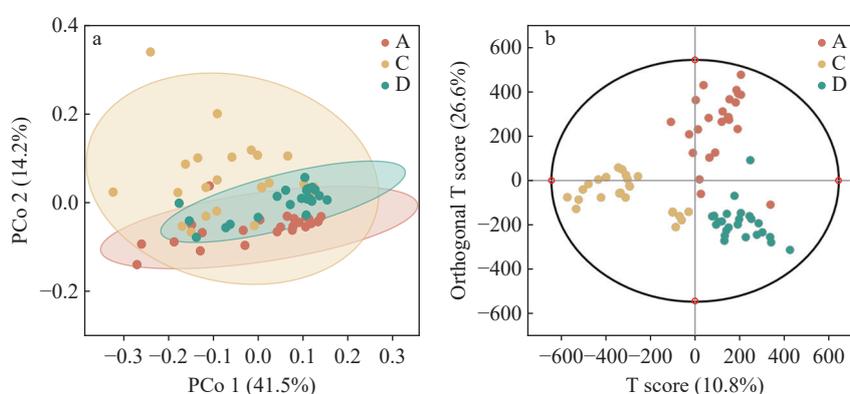


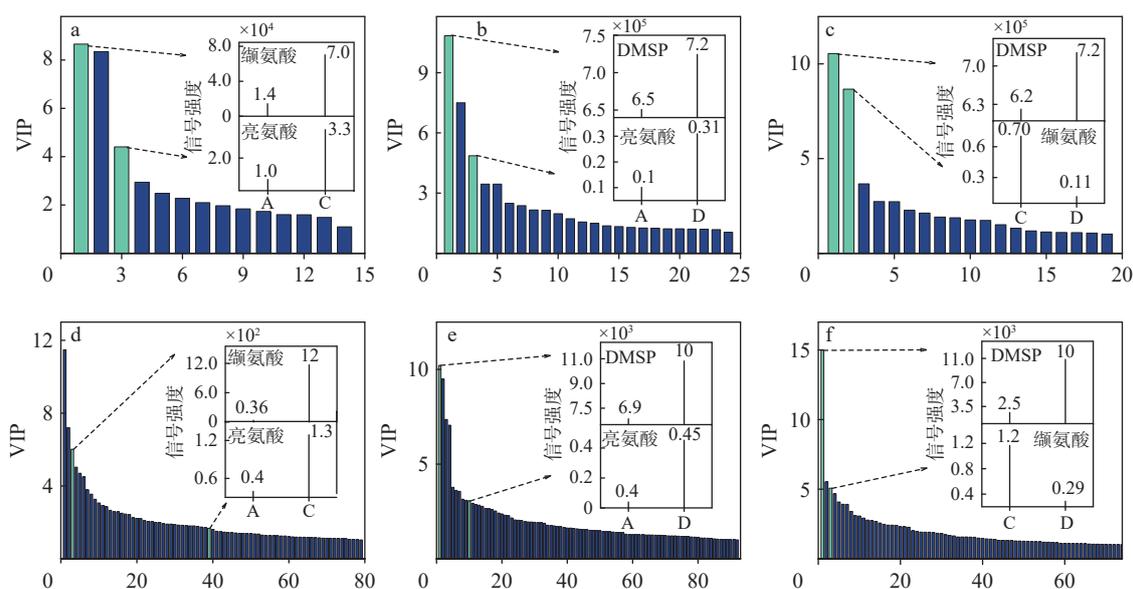
图3 三属虫黄藻单细胞代谢物的PCoA(a)和OPLS-DA(b)得分图

Fig. 3 PCoA (a) and OPLS-DA (b) score plots of single-cell metabolites of three clades of Symbiodiniaceae

黄藻间的差异代谢物。

基于三属虫黄藻单细胞代谢物的OPLS-DA结果,以变量重要性投影值($VIP > 1.0$)和显著性检验($p < 0.05$)为标准,筛选出具有显著差异的特征代谢物。从图4a~4c可见,在不同虫黄藻属间的比较中,A型与C型:缬氨酸($VIP=8.660$, $p < 0.001$)和亮氨酸($VIP=4.405$, $p < 0.001$) 在C型中含量显著高于A型;A型与D型:DMSP($VIP=10.844$, $p=0.004$)和亮氨酸($VIP=4.863$, $p < 0.001$) 在D型中含量更高;C型与D型:DMSP($VIP=10.544$, $p=0.011$) 在D型中富集,而缬氨酸

($VIP=8.668$, $p < 0.001$) 在C型中显著富集。综上所述,在所有比较组中,亮氨酸在A型虫黄藻含量最低,缬氨酸在C型中最富集,而DMSP在D型中含量最高。各差异代谢物在3种虫黄藻中的丰度分布情况示于图5。同时,这些代谢物的HRMS/MS谱图与标准谱图的余弦相似度(cosine)在0.88~0.99之间,表明匹配良好,示于图6。此外,2种平台下差异代谢物的丰度变化趋势一致,显著性水平相符,进一步证明了单细胞质谱法在代谢物定性和定量分析中的稳定性和可靠性,示于图4d~4f。



注: a、d 为 A、C 两属虫黄藻; b、e 为 A、D 两属虫黄藻; c、f 为 C、D 两属虫黄藻

图 4 三属虫黄藻单细胞质谱分析(a、b、c)和 LC-HRMS/MS 分析(d、e、f)的 VIP 图

Fig. 4 VIP figures of single-cell mass spectrometry (a, b, c) and LC-HRMS/MS analysis (d, e, f) of three clades of Symbiodiniaceae

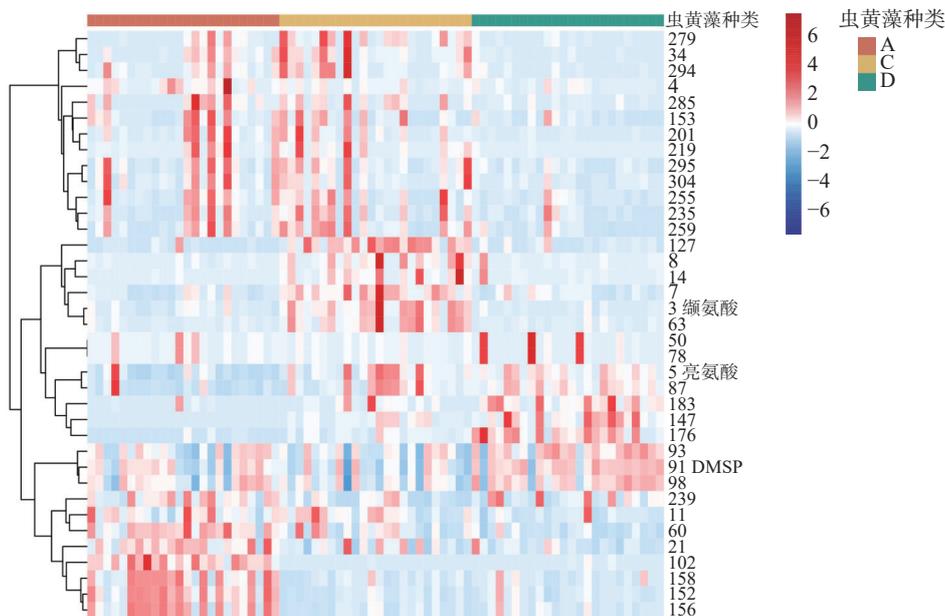


图 5 三属虫黄藻单细胞质谱中差异代谢物的丰度热图

Fig. 5 Heatmap of differential metabolite abundances in single-cell mass spectrometry of three clades of Symbiodiniaceae

2.3 差异代谢物功能分析

本实验进一步探讨了基于上述筛选获得的缬氨酸、亮氨酸和 DMSP 等 3 种关键差异代谢物在不同虫黄藻种属中的潜在生理功能, 这些代谢物的差异分布模式与各虫黄藻的生态适应特征表现出一致性, 提示它们可能在虫黄藻的环境

适应和共生关系中发挥重要作用。

A 型虫黄藻表现出独特的亮氨酸代谢特征, 其细胞内亮氨酸含量显著低于 C 型和 D 型虫黄藻, 这一现象可能与其典型的高光环境适应性相关。A 型虫黄藻主要分布于浅海高光强环境中, 表现出显著的循环电子传递(cyclic electron flow,

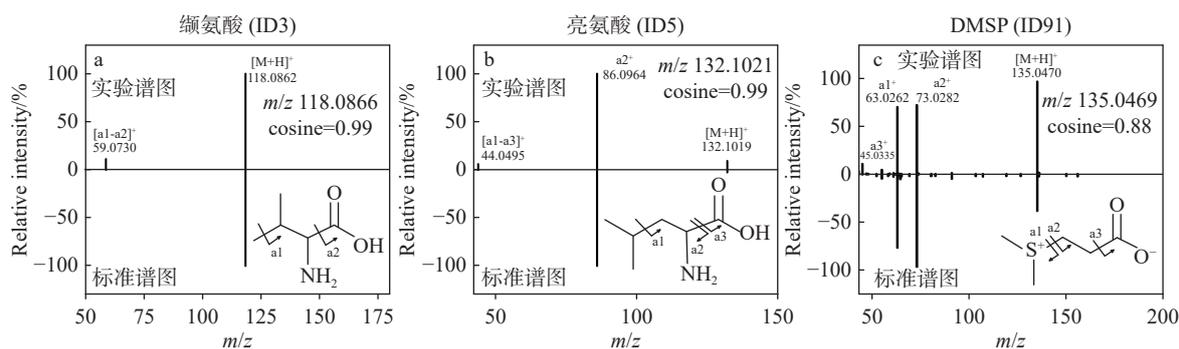


图6 3种差异代谢物的二级质谱图

Fig. 6 LC-HRMS/MS spectra of three differential metabolites

CEF)活性,以缓解高光胁迫下叶绿体内腺嘌呤核苷三磷酸/还原型辅酶II (adenosine triphosphate/reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, ATP/NADPH)的代谢失衡^[28]。根据现有研究并结合系统进化特征推测:A型虫黄藻极可能依赖II型NADH脱氢酶(type II NADH dehydrogenase, NDH-2)介导的还原型辅酶I (reduced nicotinamide adenine dinucleotide, NADH)代谢途径来调节CEF^[29-30]。在代谢层面,亮氨酸首先降解形成3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A,然后在酶的作用下生成乙酰辅酶A和乙酰乙酸^[31]。已有研究表明,乙酰辅酶A能通过反馈机制抑制NADH的再生^[32]。因此,推测A型虫黄藻通过降低亮氨酸含量来减少乙酰辅酶A的生成,缓解其对NADH再生的抑制作用。这一代谢调控策略可能促进NADH的积累,进而增强依赖NDH-2的CEF活性,最终提高其对高光环境的适应能力。

作为目前分布最广泛的虫黄藻类型之一,C型虫黄藻表现出显著的缬氨酸代谢特征,其细胞内缬氨酸含量显著高于A型和D型虫黄藻。这一代谢特征可能与其共生适应性密切相关。缬氨酸作为一种必需氨基酸,多数后生动物宿主无法自行合成,需通过外源性补充。相关研究表明,在刺胞动物(如海葵和有孔虫)中,携带共生虫黄藻的个体体内缬氨酸水平显著高于无共生或去除共生体的对照组,表明共生虫黄藻可能在一定程度上弥补宿主在缬氨酸合成方面的不足^[33-34]。因此,C型虫黄藻中缬氨酸的富集可能增强其为宿主提供必需氨基酸的能力,从而提高共生的稳定性,促进其在多种宿主中的广泛分布和持久共生关系。这一代谢补偿机制可能是C型虫黄藻适应广泛生态环境的重要基础之一。

D型虫黄藻表现出显著的环境适应特性,其

细胞内DMSP含量显著高于其他两种虫黄藻。这一特征可能与其在温度和浊度波动较大环境中的生存策略直接相关。DMSP及其裂解产物二甲基硫醚(dimethylsulphide, DMS)和丙烯酸酯在极端环境条件下发挥重要的抗氧化防御功能。它们能够与羟基自由基($\cdot\text{OH}$)等反应活性氧(reactive oxygen species, ROS)迅速反应,从而有效清除细胞内的自由基,特别是DMS和丙烯酸酯的反应活性可达到DMSP的20~60倍^[35]。此外,DMSP也参与浮游植物和大型海藻细胞内多种保护性生理机制,包括渗透压调节和低温适应^[36-37]。基于这些发现,我们认为D型虫黄藻可能通过维持高水平的DMSP,构建了一个包含抗氧化防御、渗透调节和温度适应在内的多层次保护系统,这为其在环境波动剧烈的环境中生存提供了重要的代谢保障。

3 结论

本研究通过自建的单细胞质谱分析平台对不同属的虫黄藻进行了系统的代谢组学分析,并评估了该方法的重复性和灵敏度。结果表明,该平台在低分子质量代谢物检测中表现出良好的灵敏度,且具有较高的重复性,适用于虫黄藻细胞的代谢组学研究。基于PCoA和OPLS-DA的结果,发现不同属虫黄藻在整体代谢轮廓上存在显著差异,提示其在长期进化中可能形成了独特的代谢适应策略:A型虫黄藻在高光强环境中可能通过调控亮氨酸代谢来缓解叶绿体内ATP/NADPH的代谢失衡;C型虫黄藻可能通过为宿主提供缬氨酸来维持其与宿主的稳定共生关系;而D型虫黄藻则通过合成DMSP构建高效的抗氧化防御体系,从而提升其对极端环境的耐受能力。总体而言,本研究以单细胞代谢组学为手

段,从分子水平揭示了不同属虫黄藻的代谢适应机制。该研究不仅为理解虫黄藻的环境响应和宿主共生策略提供了思路,也为进一步探索珊瑚共生体的功能协同及其生态意义奠定了理论基础。

参考文献:

- [1] 赵美霞, 余克服, 张乔民. 珊瑚礁区的生物多样性及其生态功能[J]. *生态学报*, 2006, 26(1): 186-194.
ZHAO Meixia, YU Kefu, ZHANG Qiaomin. Review on coral reefs biodiversity and ecological function[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26(1): 186-194(in Chinese).
- [2] SMITH S V. Coral-reef area and the contributions of reefs to processes and resources of the world's oceans[J]. *Nature*, 1978, 273(5 659): 225-226.
- [3] WOODHEAD A J, HICKS C C, NORSTRÖM A V, WILLIAMS G J, GRAHAM N A J. Coral reef ecosystem services in the anthropocene[J]. *Functional Ecology*, 2019, 33(6): 1 023-1 034.
- [4] PEIXOTO R S, SWEET M, BOURNE D G. Customized medicine for corals[J]. *Frontiers in Marine Science*, 2019, 6: 686.
- [5] HUGHES T P, KERRY J T, ÁLVAREZ-NORIEGA M, ÁLVAREZ-ROMERO J G, ANDERSON K D, BAIRD A H, BABCOCK R C, BEGER M, BELLWOOD D R, BERKELMANS R, BRIDGE T C, BUTLER I R, BYRNE M, CANTIN N E, COMEAU S, CONNOLLY S R, CUMMING G S, DALTON S J, DIAZ-PULIDO G, MARK EAKIN C, FIGUEIRA W F, GILMOUR J P, HARRISON H B, HERON S F, HOEY A S, HOBBS J A, HOOGENBOOM M O, KENNEDY E V, KUO C Y, LOUGH J M, LOWE R J, LIU G, McCULLOCH M T, MALCOLM H A, McWILLIAM M J, PANDOLFI J M, PEARS R J, PRATCHETT M S, SCHOEPP V, SIMPSON T, SKIRVING W J, SOMMER B, TORDA G, WACHENFELD D R, WILLIS B L, WILSON S K. Global warming and recurrent mass bleaching of corals[J]. *Nature*, 2017, 543(7 645): 373-377.
- [6] FENG M, McPHADEN M J, XIE S P, HAFNER J. La Niña forces unprecedented leewind current warming in 2011[J]. *Scientific Reports*, 2013, 3(1): 1 277.
- [7] HUGHES T P, ANDERSON K D, CONNOLLY S R, HERON S F, KERRY J T, LOUGH J M, BAIRD A H, BAUM J K, BERUMEN M L, BRIDGE T C, CLAAR D C, MARK EAKIN C, GILMOUR J P, GRAHAM N A J, HARRISON H, HOBBS J A, HOEY A S, HOOGENBOOM M, LOWE R J, McCULLOCH M T, PANDOLFI J M, PRATCHETT M, SCHOEPP V, TORDA G, WILSON S K. Spatial and temporal patterns of mass bleaching of corals in the Anthropocene[J]. *Science*, 2018, 359(6 371): 80-83.
- [8] DOUGLAS A E. Coral bleaching—how and why?[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2003, 46(4): 385-392.
- [9] BERKELMANS R, van OPPEN M J H. The role of zooxanthellae in the thermal tolerance of corals: a 'nugget of hope' for coral reefs in an era of climate change[J]. *Proceedings Biological Sciences*, 2006, 273(1 599): 2 305-2 312.
- [10] BAKER A C, STARGER C J, McCLANAHAN T R, GLYNN P W. Corals' adaptive response to climate change[J]. *Nature*, 2004, 430(7 001): 741.
- [11] LaJEUNESSE T C, PARKINSON J E, GABRIELSON P W, JEONG H J, REIMER J D, VOOLSTRA C R, SANTOS S R. Systematic revision of Symbiodiniaceae highlights the antiquity and diversity of coral endosymbionts[J]. *Current Biology*, 2018, 28(16): 2 570-2 580.
- [12] POCHON X, LaJEUNESSE T C. *Miliolidium* n. gen, a new symbiodiniacean genus whose members associate with soritid foraminifera or are free-living[J]. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 2021, 68(4): e12856.
- [13] NITSCHKE M R, CRAVEIRO S C, BRANDÃO C, FIDALGO C, SERÔDIO J, CALADO A J, FROMMLET J C. Description of *Freudenthalidium* gen. nov. and *Halluxium* gen. nov. to formally recognize clades Fr3 and H as genera in the family Symbiodiniaceae (Dinophyceae)[J]. *Journal of Phycology*, 2020, 56(4): 923-940.
- [14] LaJEUNESSE T C, WIEDENMANN J, CASADO-AMEZÚA P, D'AMBRA I, TURNHAM K E, NITSCHKE M R, OAKLEY C A, GOFFREDO S, SPANO C A, CUBILLOS V M, DAVY S K, SUGGETT D J. Revival of *Philozoon* Geddes for host-specialized dinoflagellates, 'zooxanthellae', in animals from coastal temperate zones of northern and southern hemispheres[J]. *European Journal of Phycology*, 2022, 57(2): 166-180.
- [15] CHEN B, WEI Y, YU K, LIANG Y, YU X, LIAO Z, QIN Z, XU L, BAO Z. The microbiome dynamics and interaction of endosymbiotic Symbiodiniaceae and fungi are associated with thermal bleaching susceptibility of coral holobionts[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2024, 90(4): e0193923.
- [16] ZHU Y, LIU R, YANG Z. Redesigning the T-probe for mass spectrometry analysis of online lysis of non-adherent single cells[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2019, 1 084: 53-59.
- [17] 尤穆英楠, 刘心昱, 石先哲, 许国旺. 基于质谱的单细胞分析技术研究新进展[J]. *质谱学报*, 2024, 45(3): 316-331.
YOU Muyingnan, LIU Xinyu, SHI Xianzhe, XU Guowang. New advances of single-cell analysis based on

- mass spectrometry[J]. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, 2024, 45(3): 316-331(in Chinese).
- [18] PEI J, ZHOU X, WANG X, HUANG G. Alleviation of electrochemical oxidation for peptides and proteins in electrospray ionization: obtaining more accurate mass spectra with induced high voltage[J]. *Analytical Chemistry*, 2015, 87(5): 2 727-2 733.
- [19] ZHU H, WANG N, YAO L, CHEN Q, ZHANG R, QIAN J, HOU Y, GUO W, FAN S, LIU S, ZHAO Q, DU F, ZUO X, GUO Y, XU Y, LI J, XUE T, ZHONG K, SONG X, HUANG G, XIONG W. Moderate UV exposure enhances learning and memory by promoting a novel glutamate biosynthetic pathway in the brain[J]. *Cell*, 2018, 173(7): 1 716-1 727.
- [20] ZHU H, ZOU G, WANG N, ZHUANG M, XIONG W, HUANG G. Single-neuron identification of chemical constituents, physiological changes, and metabolism using mass spectrometry[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(10): 2 586-2 591.
- [21] ZHENG X, HOU Z, QIAN Y, ZHANG Y, CUI Q, WANG X, SHEN Y, LIU Z, ZHOU Y, FU B, SUN R, TIAN Z, HUANG G, WEI H. Tumors evade immune cytotoxicity by altering the surface topology of NK cells[J]. *Nature Immunology*, 2023, 24(5): 802-813.
- [22] ZHU H, LI Q, LIAO T, YIN X, CHEN Q, WANG Z, DAI M, YI L, GE S, MIAO C, ZENG W, QU L, JU Z, HUANG G, CANG C, XIONG W. Metabolomic profiling of single enlarged lysosomes[J]. *Nature Methods*, 2021, 18(7): 788-798.
- [23] ZHUANG M, HOU Z, CHEN P, LIANG G, HUANG G. Introducing charge tag *via* click reaction in living cells for single cell mass spectrometry[J]. *Chemical Science*, 2020, 11(28): 7 308-7 312.
- [24] HOU Z, LUAN M, ZHAN L, WANG X, YUAN S, CAO K, SHENG Y, YIN H, LIU Y, HUANG G. Native mass spectrometry for peptide-metal interaction in picoliter cell lysate[J]. *Analytical Chemistry*, 2022, 94(40): 13 829-13 833.
- [25] ONJIKO R M, MOODY S A, NEMES P. Single-cell mass spectrometry reveals small molecules that affect cell fates in the 16-cell embryo[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(21): 6 545-6 550.
- [26] LORENZO TEJEDOR M, MIZUNO H, TSUYAMA N, HARADA T, MASUJIMA T. *In situ* molecular analysis of plant tissues by live single-cell mass spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2012, 84(12): 5 221-5 228.
- [27] LIU R, YANG Z. Single cell metabolomics using mass spectrometry: techniques and data analysis[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2021, 1 143: 124-134.
- [28] REYNOLDS J M, BRUNS B U, FITT W K, SCHMIDT G W. Enhanced photoprotection pathways in symbiotic dinoflagellates of shallow-water corals and other cnidarians[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(36): 13 674-13 678.
- [29] SHOGUCHI E, SHINZATO C, KAWASHIMA T, GYOJA F, MUNGPADDEE S, KOYANAGI R, TAKEUCHI T, HISATA K, TANAKA M, FUJIWARA M, HAMADA M, SEIDI A, FUJIE M, USAMI T, GOTO H, YAMASAKI S, ARAKAKI N, SUZUKI Y, SUGANO S, TOYODA A, KUROKI Y, FUJIYAMA A, MEDINA M, COFFROTH M A, BHATTACHARYA D, SATOH N. Draft assembly of the symbiodinium minimum nuclear genome reveals dinoflagellate gene structure[J]. *Current Biology*, 2013, 23(15): 1 399-1 408.
- [30] PELTIER G, ARO E M, SHIKANAI T. NDH-1 and NDH-2 plastoquinone reductases in oxygenic photosynthesis[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2016, 67(1): 55-80.
- [31] DÍAZ-PÉREZ A L, DÍAZ-PÉREZ C, CAMPOS-GARCÍA J. Bacterial *l*-leucine catabolism as a source of secondary metabolites[J]. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 2016, 15(1): 1-29.
- [32] TAKEUCHI M, AMAO Y. Inhibitory effect of acetyl-CoA on a visible light-driven NADH regeneration system composed a of water-soluble zinc porphyrin and a rhodium complex[J]. *Chemistry Letters*, 2024, 53(3): upae014.
- [33] WANG J T, DOUGLAS A E. Essential amino acid synthesis and nitrogen recycling in an alga-invertebrate symbiosis[J]. *Marine Biology*, 1999, 135(2): 219-222.
- [34] UHLE M E, MACKO S A, SPERO H J, ENGEL M H, LEA D W. Sources of carbon and nitrogen in modern planktonic foraminifera: the role of algal symbionts as determined by bulk and compound specific stable isotopic analyses[J]. *Organic Geochemistry*, 1997, 27(3/4): 103-113.
- [35] SUNDA W, KIEBER D J, KIENE R P, HUNTSMAN S. An antioxidant function for DMSP and DMS in marine algae[J]. *Nature*, 2002, 418(6 895): 317-320.
- [36] STEFELS J. Physiological aspects of the production and conversion of DMSP in marine algae and higher plants[J]. *Journal of Sea Research*, 2000, 43(3/4): 183-197.
- [37] TREVENA A J, JONES G B, WRIGHT S W, van den ENDEN R L. Profiles of DMSP, algal pigments, nutrients and salinity in pack ice from eastern Antarctica[J]. *Journal of Sea Research*, 2000, 43(3/4): 265-273.

(收稿日期: 2025-05-27; 修回日期: 2025-07-09)