

# 黄丝藻细胞代谢物提取方法的比较研究

邵慧敏<sup>1,3</sup>, 王 聪<sup>2</sup>, 汪 辉<sup>1</sup>, 刘天中<sup>1</sup>

(1. 中国科学院 青岛生物能源与过程研究所 藻类生物技术中心, 山东 青岛 266101; 2. 中国科学院 青岛生物能源与过程研究所 公共实验室, 山东 青岛 266101; 3. 中国科学院大学, 北京 100049)

**摘要:** 利用代谢物组学技术有助于更为深入地了解不分枝丝状微藻黄丝藻细胞的生物学特性。本研究比较了3种黄丝藻细胞破碎方法(冻融法、超声破碎法、液氮研磨法)以及基于气相色谱-质谱联用技术的3种黄丝藻代谢物提取系统(冷甲醇、热乙醇、甲醇/氯仿法), 以期为黄丝藻细胞的代谢组学分析奠定基础。结果显示: 液氮研磨法处理下的黄丝藻细胞破碎效果最佳; 根据提取到的代谢物的种类角度出发, 冷甲醇法的提取效果要明显优于其他2种提取方法。在黄丝藻细胞中共检测到40种代谢物, 包括9种氨基酸、17种有机酸、12种糖类和2种醇类物质。

**关键词:** 黄丝藻; 代谢物组学; 细胞破壁; 代谢物提取

中图分类号: S968.3

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2018)02-0118-06

DOI: 10.11759/hyxx20170828002

代谢物是生物体新陈代谢的终端产物, 能够真实地反应生物系统的功能变化<sup>[1-2]</sup>。而代谢组学分析技术可对生物体内的代谢物(尤其是小分子代谢物)进行系统性的定性、定量分析<sup>[3-4]</sup>, 以此更为精准地了解生物体内的代谢途径变化。

黄丝藻(*Tribonema* sp.)是一类植物体为不分枝丝状体的黄绿藻, 隶属于黄藻门。黄丝藻多生长于池沼、潮湿的岩石和土壤中, 有的也可以在冰上生存, 环境适应能力极强<sup>[5]</sup>。另外, 黄丝藻具有高产油、抗污染、易采收的良好工业性状, 是生产生物柴油的理想材料<sup>[6-7]</sup>。目前已经对黄丝藻的培养条件进行优化, 以期提高其油脂产率, 使其适合工业化发酵生产油脂, 并从转录组学水平揭示了黄丝藻油脂积累的一些相关的代谢途径<sup>[8-9]</sup>。但是对其内源代谢物在油脂积累中的作用尚未有系统性的研究。

代谢组学分析主要由样品准备、数据采集和主成分分析三部分组成<sup>[10]</sup>, 其中样品制备是代谢组学研究的最重要的步骤, 直接决定了代谢物的提取质量和数据分析的精确度<sup>[11]</sup>。本研究主要通过比较不同的黄丝藻破壁以及代谢物的提取方法, 建立基于GC-MS检测技术的黄丝藻代谢组学的研究方法, 为黄丝藻细胞的代谢组学分析奠定基础, 为进一步探明黄丝藻的产油机制提供了理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 藻种及培养

实验所用小型黄丝藻(*Tribonema minus*)分离自

青岛平度水域, 并保存于本实验室。将藻种接至250 mL BG11培养基中置于光照培养箱中进行培养, 培养温度为(23±1)°C, 光照强度为100 μmol/(m<sup>2</sup>·s), 24 h持续光照。

### 1.2 细胞淬灭

取处于指数生长期的黄丝藻藻液, 利用0.45 μm滤膜对黄丝藻细胞进行抽滤, 期间采用超纯水清洗3次以除去BG11培养基。将得到的藻细胞在液氮中淬灭5 min以终止藻细胞的代谢反应<sup>[12]</sup>。在低温冷冻干燥机中冻干, 于-80°C保存待用。

### 1.3 细胞破壁

分别采用3种样品破碎方法(反复冻融、超声破碎、液氮研磨)对黄丝藻细胞进行破壁处理。(1)反复冻融法: 取100 mg冻干藻细胞, 液氮中冻3 min, -20°C冰箱融化15 min, 反复冻融5次; (2)超声破碎法: 取100 mg冻干藻细胞, 加入1 mL冷甲醇, 超声1 min(超声3 s, 停2 s); (3)液氮研磨法: 取100 mg冻

收稿日期: 2017-08-28; 修回日期: 2017-10-27

基金项目: 青岛市应用基础研究计划项目(16-5-1-68-jch); 青岛市海洋经济创新发展产业链项目资助

[Foundation: Supported by Research Program of Application Foundation of Qingdao (Grant No.16-5-1-68-jch); Marine Economic Innovation and Development Regional Demonstration Project of Qingdao]

作者简介: 邵慧敏(1990-), 女, 黑龙江绥化人, 硕士研究生, 主要从事产油微藻代谢调控研究, 电话: 0532-80662737, E-mail: shaohm@qibebt.ac.cn; 汪辉, 通信作者, 副研究员, 电话: 0532-80662737, E-mail: wanghui@qibebt.ac.cn

干藻细胞, 置于研钵中, 加入液氮进行研磨。

#### 1.4 代谢物的提取方法

根据细胞破壁效果, 在代谢物提取时采取液氮研磨法对黄丝藻细胞进行破壁处理。主要采用三种提取方法对黄丝藻细胞中的代谢物进行提取。冷甲醇法: 参考文献[13]的方法并进行优化。称取 100 mg 冻干藻细胞置于研钵中, 加入液氮研磨至细粉状, 加入 1 mL 冷甲醇(甲醇: 水=1: 1,  $V/V$ ,  $-40^{\circ}\text{C}$ ), 混匀置于离心管中, 盖紧盖子后放入液氮中, 反复冻融 5 次, 5 000 r/min 在低温冷冻离心机中离心 5 min, 收集上清; 另向残渣中加入 0.5 mL 冷甲醇(甲醇: 水=1: 1,  $V/V$ ,  $-40^{\circ}\text{C}$ ), 离心后与之前上清混合。取 200  $\mu\text{L}$  样品, 在  $-80^{\circ}\text{C}$  下冷冻干燥得代谢物冻干粉。每个处理设 3 个重复。

热乙醇法: 将 75% 的乙醇水溶液置于  $95^{\circ}\text{C}$  水浴, 直至恒温, 称取 100 mg 冻干藻细胞置于研钵中, 加入液氮研磨至细粉状, 加入 1.5 mL 水浴好的乙醇溶液, 混匀置于离心管中, 放入  $95^{\circ}\text{C}$  水浴 3 min, 取出后再放入  $0^{\circ}\text{C}$  冰浴 3 min, 5 000 r/min 在低温冷冻离心机中离心 5 min, 收集上清, 取 200  $\mu\text{L}$  样品, 在  $-80^{\circ}\text{C}$  下冷冻干燥得代谢物冻干粉<sup>[14]</sup>。每个处理设 3 个重复。

甲醇氯仿提取法: 参考文献[15]的方法并进行优化。称取 100 mg 冻干藻细胞置于研钵中, 加入液氮研磨至细粉状, 加入 7.5 mL 甲醇/氯仿混合液( $V/V=2: 1$ ), 震荡 5 min, 摇床  $37^{\circ}\text{C}$  过夜, 离心收集上清。向沉淀中再加入 7.5 mL 甲醇/氯仿混合液( $V/V=2: 1$ ), 震荡 5 min, 摇床  $37^{\circ}\text{C}$  震荡 2 h, 离心收集上清。合并两次上清液, 加入 5 mL 氯仿和 9 mL 超纯水, 保证最终体系为甲醇: 氯仿: 水=2: 2: 1.8, 震荡混匀, 在 8 000 r/min 转速下离心 10 min, 收集上清液, 取 0.9 mL 样品(所获提取液较多, 因此取样较多), 在  $-80^{\circ}\text{C}$  下冷冻干燥得代谢物冻干粉。每个处理设 3 个重复。

#### 1.5 代谢物衍生化

采用两步衍生化法<sup>[16]</sup>: 在提取后的代谢物中加入 50  $\mu\text{L}$  甲氧胺盐酸盐的吡啶溶液(20 g/L), 混匀后放入  $30^{\circ}\text{C}$  恒温水浴 90 min; 再加入 80  $\mu\text{L}$  MSTFA, 混匀,  $37^{\circ}\text{C}$  恒温水浴 30 min, 离心, 样品室温放置 2 h 后装瓶编号, 进样, 进行 GC-MS 检测。

#### 1.6 代谢物的检测

采用 GC-MS(Agilent GC-MS 系统, 包括配有安捷伦 G4513A 自动进样器、安捷伦 7890 气相色谱和单四极杆质谱仪)对样品进行定性分析。色谱条件: 色谱柱为 DB-5 毛细管石英柱(30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25  $\mu\text{m}$ ), 进样量 1  $\mu\text{L}$ , 分流比 5: 1, 进样口温度  $300^{\circ}\text{C}$ , 接口温度  $300^{\circ}\text{C}$ 。载气为高纯氦气, 载气流量: 1 mL/min (恒定流量模式)。升温程序:  $50^{\circ}\text{C}$  保持 1 min, 以  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$  的速率升到  $300^{\circ}\text{C}$ , 并在  $290^{\circ}\text{C}$  保持 10 min。质谱参数: 电离电压 70 eV, 离子源温度  $230^{\circ}\text{C}$ , 四极杆温度  $150^{\circ}\text{C}$ , 扫描范围( $m/z$ )40~500 amu。

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同破壁方法的破壁效果

在显微镜下观察黄丝藻经冻融、超声破碎、液氮研磨三种破壁方法处理后的细胞形态变化(图 1)。图 1(a)所示的是冻融法处理后黄丝藻细胞的形态, 由图中所示, 黄丝藻植物体是由单列细胞构成的不分枝的丝状体, 黄丝藻的丝状体很长, 且没有明显细胞破裂的情况, 由此可见, 冻融法的破壁效果非常一般。图 1(b)和(c)所示的分别是超声破碎和液氮研磨法处理后的黄丝藻细胞形态, 两种方法处理后的黄丝藻植物体有非常明显的丝状体断裂现象。此外, 相较于超声破碎处理, 液氮研磨后的黄丝藻植物体断裂成更短的单细胞或是两三个相连细胞, 且细胞有明显的细胞壁破碎、内容物流出的迹象。

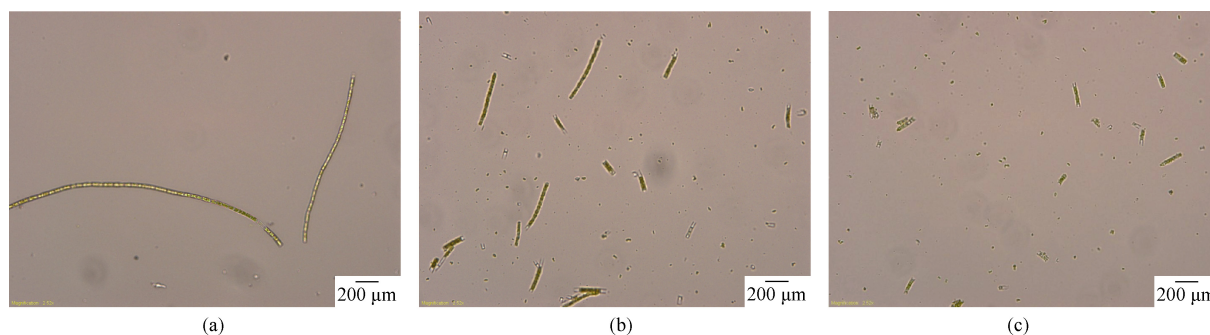


图 1 三种破碎方式处理后的黄丝藻细胞形态

Fig. 1 Cellular morphology of *Tribonema minus* treated by three methods

代谢物提取前,细胞的破碎是样品准备的限速步骤,细胞破碎的效果对于提高代谢物样品的通量是非常重要的<sup>[2]</sup>。而采用3种细胞破壁方法对黄丝藻细胞进行破壁处理后,通过比较黄丝藻细胞的形态变化,我们发现相比于其它两种破壁方法,液氮研磨法的破壁效果更好,因此更适用于黄丝藻细胞的破碎处理。

## 2.2 不同抽提方法获得代谢谱图解析

液氮研磨破碎细胞后3种代谢物提取方式获得的黄丝藻代谢物的代谢谱图如图2所示,其中(a)、(b)、(c)分别代表冷甲醇、热乙醇和氯仿/甲醇法提取后的代谢物的代谢图谱。从图2中能够看出,冷甲醇提取后的代谢物的种类明显多于热乙醇以及氯仿/甲醇法提取的代谢物的种类。通过进一步分析<sup>[17]</sup>,由GC-MS检测到的黄丝藻细胞代谢物主要可分为以下几类:氨基酸、有机酸、糖类和醇类。

不同提取方法得到的代谢物的种类如表1所示。3种提取方法从黄丝藻细胞中共检测到9种氨基酸(L-缬氨酸、甘氨酸、L-苏氨酸、L-天冬氨酸、L-脯氨酸、L-苏氨酸、5-氧-L-脯氨酸、谷氨酰胺、L-天冬酰胺、L-丝氨酸),其中冷甲醇法提取到9种氨基酸;甲醇/氯仿法都提取到6种氨基酸,其中L-丝氨酸、5-氧-L-脯氨酸、谷氨酰胺未检测到;而热乙醇法提取到5种氨基酸,除未检测到甲醇/氯仿法未检测到的物质外,L-天冬氨酸也未被检测到。因此,根据氨基酸种类检测情况来看,冷甲醇提取法明显好于热乙醇和甲醇/氯仿法。

黄丝藻细胞中有机酸种类较多,共检测到17种有机酸。冷甲醇提取到的有机酸种类比热乙醇和甲醇/氯仿法多,冷甲醇提取到16种有机酸(除花生四烯酸外);热乙醇法提取到9种有机酸,包括丙酸、丁酸、十四烷酸、顺-9-十六碳烯酸、反-9-十八碳烯酸、十八烷酸、二十烷酸、花生四烯酸、二十五碳五烯酸甲酯;甲醇/氯仿法提取到13种有机酸,其中,反式乌头酸、十二烷酸、十七烷酸甲酯和反式-9-十八碳烯酸未被检测到。因此,对于有机酸来讲,冷甲醇提取法最优,而其次是氯仿-甲醇提取法。

由表1可知,在黄丝藻细胞中,3种提取方法共检测到了12种糖类物质。冷甲醇法提取到10种糖类物质,其中,景天庚酮糖和D-吡喃半乳糖苷未检测到;热乙醇法提取到6种糖类物质,具体包括D-半乳糖、D-葡萄糖、D-甘露糖、D-吡喃葡萄糖、D-吡喃半乳糖苷、景天庚酮糖;而氯仿/甲醇法提取到4

种糖类物质,具体包括D-葡萄糖、D-甘露糖、D-甘露醇、D-吡喃葡萄糖苷。此外,黄丝藻细胞中共检测到了2种醇类物质:甘油和肌醇。3种提取方法均提到了这2种醇类物质,在醇类物质种类方面,此3种提取方法未呈现明显差别。

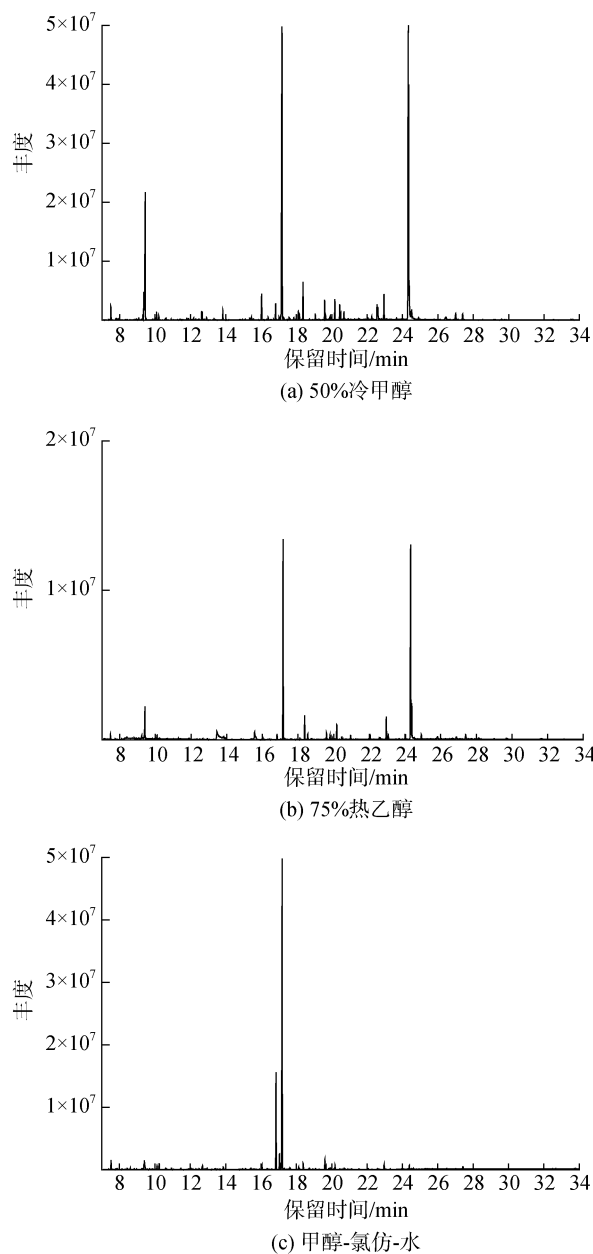


图2 三种提取方式获得的黄丝藻代谢物的代谢谱图  
Fig. 2 The total ion chromatograms of Metabolic profiling in *Tribonema minus* cells by three extract methods

某些黄丝藻细胞代谢物在特定的提取系统中具有很高的丰度,而在其它的提取系统中没有出现,这主要是由代谢物提取策略的差异引起的。3种溶剂提取体系具有不同的极性,因此代谢物提取种类也

表 1 不同提取方式下的黄丝藻代谢物组分分析  
Tab. 1 Metabolites analysis of *Tribonema minus* by different extraction methods

代谢物组分	冷甲醇	热乙醇	甲醇/氯仿
L-缬氨酸			
甘氨酸			
L-丝氨酸			
氨基 L-苏氨酸			
基 L-天冬氨酸			
酸 5-氧-L-脯氨酸			
L-脯氨酸			
谷氨酰胺			
L-天冬酰胺			
丙酸			
丁酸			
邻苯二甲酸			
苹果酸			
反式乌头酸			
柠檬酸			
有机酸 十二烷酸			
有机酸 十四烷酸			
有机酸 顺-9-十六碳烯酸			
有机酸 十六烷酸			
有机酸 十七烷酸甲酯			
有机酸 反式-9-十八碳烯酸			
有机酸 十八烷酸			
有机酸 二十烷酸			
有机酸 花生四烯酸			
有机酸 二十五碳五烯酸甲酯			
阿糖醇			
D-半乳糖			
D-葡萄糖			
D-甘露糖			
D-甘露醇			
糖类 L-海藻糖			
糖类 D-葡萄糖苷			
糖类 D-吡喃葡萄糖			
糖类 麦芽糖			
糖类 D-呋喃半乳糖苷			
糖类 景天庚酮糖			
醇 甘油			
类 肌醇			

不完全相同。冷甲醇(甲醇/水)溶剂体系极性最高,能提取到更多含-COOH、-OH 基团的化合物,例如谷氨酰胺、天冬氨酸等;而甲醇/氯仿提取方法能够同时提取疏水和疏水的代谢物。Maharjan 等<sup>[14]</sup>研究了

6 种提取方法冷甲醇、热甲醇、热乙醇、酸、碱和甲醇/氯仿对大肠杆菌代谢物谱的影响,结果表明冷甲醇法可得到更多的代谢物。而 Dettmer<sup>[18]</sup>等研究了甲醇、甲醇/水、乙腈、乙腈/水、甲醇/氯仿、甲醇/异丙醇、酸性甲醇 7 种提取方法对结肠癌细胞株代谢物谱的影响,结果发现甲醇/水提取的代谢物最多。而在本实验室中,根据图 2 与表 1 所示,相较于其他 2 种提取方法,冷甲醇溶剂提取方法能够实现对大多数代谢物的提取,更适合用于黄丝藻细胞代谢物的提取,为黄丝藻代谢组学分析奠定了良好基础。

### 3 讨论

黄丝藻细胞载色体的色素包含叶绿素 a、β-胡萝卜素和硅甲黄素,并且其同化产物主要为油滴和金藻昆布糖,具有广泛的应用前景。目前,关于黄丝藻的研究主要集中于其生态特征<sup>[19]</sup>以及微藻培养与油脂提取方面<sup>[6, 20]</sup>,尤其是用黄丝藻制备生物柴油受到了广泛关注,本研究通过比较黄丝藻细胞破碎与代谢物提取方法,确定了黄丝藻代谢组学研究中的样品制备流程,对于通过代谢组学技术分析黄丝藻细胞的生物学特性与产油机制有着非常积极的意义。本研究通过比较黄丝藻细胞破碎与代谢物提取方法,确定了样品制备流程,为黄丝藻代谢物组学研究奠定了基础。本文首先选择了冻融法、超声法以及液氮研磨法对细胞进行破碎处理,结果表明液氮研磨法对于黄丝藻细胞的破壁效果最佳。本文继而选择了三种提取方法(冷甲醇、热乙醇、甲醇/氯仿)对黄丝藻细胞中的代谢物进行提取,希望找出一种最优的提取方法,结果表明,黄丝藻细胞主要代谢物为氨基酸、有机酸、糖类和醇类,对于大多数代谢物,冷甲醇法的提取效果都明显优于甲醇/氯仿法和热乙醇法。因此,黄丝藻代谢物组学分析样品准备的关键环节是先用液氮研磨法对细胞进行破碎,再采用冷甲醇法提取细胞代谢物。

#### 参考文献:

- [1] Viant M R, Rosenblum E S, Tjeerdema R S. Optimized method for the determination of phosphoarginine in abalone tissue by high-performance liquid chromatography[J]. Journal of Chromatography B, 2001, 765(1): 107-111.
- [2] 于倩,王清,韩伟,等. 具槽帕拉藻代谢组提取方法的比较研究[J]. 海洋通报, 2015, 34(6): 703-709. Yu Qian, Wang Qing, Han Wei, et al. Comparison of

- metabolome extraction strategies from *Paralia sulcata*[J]. Marine Science Bulletin, 2015, 34(6): 703-709.
- [3] Griffiths W. Metabolomics, Metabonomics And Metabolite Profiling[M]. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2007: 1-323.
- [4] Zhang L B, Liu X L, You L, et al. Metabolic responses in fills of Manila clam *Ruditapes philippinarum* exposed to copper using NMR-based metabolomics[J]. Marine Environmental Research, 2011, 72(1-2): 33-39.
- [5] 张玮, 王为东, 王丽卿, 等. 嘉兴石臼漾湿地冬季浮游植物群落结构特征[J]. 应用生态学报, 2011, 22(9): 2431-2437.  
Zhang Wei, Wang Weidong, Wang Liqing, et al. Phytoplankton community structure in Shijuyang constructed wetland of Jiaying in winter[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2011, 22(9): 2431-2437.
- [6] Wang H, Gao L L, Chen L, et al. Integration process of biodiesel production from filamentous oleaginous microalgae *Tribonema minus*[J]. Bioresource Technology, 2013, 142: 39-44.
- [7] Wang Hui, Ji Chunli, Bi Shenglei, et al. Joint production of biodiesel and bioethanol from filamentous oleaginous microalgae *Tribonema* sp[J]. Bioresource Technology, 2014, 172: 169-173.
- [8] Wang Hui, Zhou Wenjun, Cheng Wentao, et al. Strategy study on enhancing lipid productivity of filamentous oleaginous microalgae *Tribonema*[J]. Bioresource Technology, 2016, 218: 161-166.
- [9] Wang Hui, Gao Lili, Shao Huimin, et al. Lipid accumulation and metabolic analysis based on transcriptome sequencing of filamentous oleaginous microalgae *Tribonema minus* at different growth phases[J]. Bioprocess and biosystems engineering, 2017, 40(9): 1327-1335.
- [10] Kim H K, Verpoorte R. Sample preparation for plant metabolomics[J]. Phytochemical Analysis, 2010, 21(1): 4-13.
- [11] Liu Xiaoli, Zhang Linbao, You Liping, et al. Metabolomic study on the halophyte *Suaeda salsa* in the Yellow River Delta [J]. Clean-Soil Air Water, 2011, 39(8): 720-727.
- [12] Canelas A B, Ras C, Pierick A T, et al. Leakage-free rapid quenching technique for yeast metabolomics[J]. Metabolomics, 2008, 4(3): 226-239.
- [13] Lu Shuhuan, Wang Jiangxin, Niu Yanhong, et al. Metabolic profiling reveals growth related FAME productivity and quality of *Chlorella sorokiniana* with different inoculum sizes[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2012, 109(7): 1651-1662.
- [14] Maharjan R P, Ferenci T. Global metabolite analysis: The influence of extraction methodology on metabolome profiles of *Escherichia coli*[J]. Analytical Biochemistry, 2003, 313(1): 145-154.
- [15] Weckwerth W, Wenzel K, Fiehn O. Process for the integrated extraction, identification and quantification of metabolites, proteins and RNA to reveal their co-regulation in biochemical networks[J]. Proteomics, 2004, 4(1): 78-83.
- [16] 韩培培, 孙莹, 段文倩, 等. 液体培养发状态念珠蓝细菌代谢物提取方法的比较分析[J]. 天津科技大学学报, 2014, 29(1): 7-10.  
Han Peipei, Sun Ying, Duan Wenqian, et al. Comparison of metabolites extracting methods from liquid cultured *Nostoc flagelliforme*[J]. Journal of Tianjing University of Science & Technology, 2014, 29(1): 7-10.
- [17] 张元圣. 湛江等鞭金藻氮营养胁迫条件下的代谢组学研究[D]. 大连: 大连工业大学生物工程学院, 2015.  
Zhang Yuansheng. Metabolomics studies on *Isochrysis zhangjiangensis* under nitrogen stress conditions[D]. Dalian: Undergraduate Thesis of Dalian Polytechnic University, 2015.
- [18] Dettmer K, Aronov P A, Hammock B D. Mass spectrometry-based metabolomics[J]. Mass Spectrometry Reviews, 2007, 26(1): 51-78.
- [19] Ivan K, Kiryakov K N V, Dragieva K D. Species compositions and distribution of genus *Tribonema* (*Xanthophyceae*) in Bulgaria[J]. Phytologia Balcanica, 2011, 17(3): 273-277.
- [20] Wang H, Zhou WJ, Shao H M, et al. A comparative analysis of biomass and lipid content in five *Tribonema* sp. strains at autotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultivation[J]. Algal Research, 2017, 24: 284-289.

# Comparison of metabolome extraction strategies from *Tribonema minus*

SHAO Hui-min<sup>1, 3</sup>, WANG Cong<sup>2</sup>, WANG Hui<sup>1</sup>, LIU Tian-zhong<sup>1</sup>

(1. Research Center of Microalgae Biotechnology, Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, CAS, Qingdao 266101, China; 2. Public Laboratory, Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, CAS, Qingdao 266101, China; 3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Received:** Aug. 28, 2017

**Key words:** *Tribonema* sp.; metabolomics; cell lysis; Metabolite extraction

**Abstract:** Metabolomics Technology contributes to the study on the biological characteristics of filamentous microalgae *Tribonema minus*. In this study, in order to find a reliable cell disruption and extraction methodology and lay foundation for metabolomics of *Tribonema minus*, three ways of cell disruption method (freeze-thawing, ultrasonic and liquid nitrogen grinding), and three different extraction method based on freezing-thawing in methanol extraction, boiling ethanol extraction, methanol/chloroform extraction were compared for their extraction efficiency of metabolites using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) as the evaluation standard. The results showed that ultrasonic and liquid nitrogen grinding was helpful on the fragmentation of filaments microalgae *Tribonema minus*, while there is no obvious effect on the cell disruption after freezing-thawing. Moreover, compared with ultrasonic, the majority filaments of *Tribonema minus* were broken into pieces after liquid nitrogen grinding, and the intracellular components were released effectively. Therefore, liquid nitrogen grinding is the best method for breaking cells. For the extraction system, the total metabolite number of cold methanol extraction is much more than those of boiling ethanol extraction and methanol/chloroform extraction. In particular, the extraction efficiency of cold methanol extraction is higher than those of boiling ethanol extraction and methanol/chloroform extraction in amino acids, organic acids and sugar. Using cold methanol extraction method, 40 kinds of metabolites from *Tribonema minus* were detected and identified, including 9 kinds of amino acids, 16 kinds of organic acids, 11 kinds of sugar and 2 kinds of alcohols. Accordingly, cold methanol extraction is an efficient extraction method for further analysis of metabolites from *Tribonema minus*. In conclusion, our study provided evidence that the optimal conditions for *Tribonema minus* sample preparation are cell disruption with liquid nitrogen grinding, and extraction of metabolites by cold methanol method.

(本文编辑: 康亦兼)