

高压液相色谱法检测水稻根系伤流液中细胞分裂素类物质

沈 波^{1,2} 平霄飞² 汤富彬² 颜红岚² 王 煦²

(¹杭州师范学院 生物化学与分子生物学重点实验室, 浙江 杭州 310012; ²中国水稻研究所 水稻生物学国家重点实验室, 浙江 杭州 310006)

Determination of Cytokinins in Rice Root Exudates by High Performance Liquid Chromatography(HPLC)

SHEN Bo^{1,2}, PING Xiao-fei², TANG Fu-bing², YAN Hong-lan², WANG Xi²

(¹Key Laboratory for Biochemistry and Molecular Biology, Hangzhou Normal College, Hangzhou 310012, China; ²State Key Laboratory of Rice Biology, China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, China)

Abstract: A high performance liquid chromatographic method had been established to determine cytokinin contents of root exudates in rice. This method was simple, reliable and accurate, and could be used for measuring zeatin, dihydrozeatin, dihydrozeatin riboside, and N⁶-isopentenyladenine in rice root exudates.

Key words: high performance liquid chromatography; cytokinin; rice; methodology

摘要: 建立了应用高压液相色谱法检测水稻根系伤流液中细胞分裂素类物质的方法。该法具有灵敏、可靠、准确的特点, 可检测到玉米素(Z)、二氢玉米素(diHZ)、二氢玉米素核苷(diHZR)和异戊烯基腺嘌呤(iP)4种细胞分裂素。

关键词: 高压液相色谱; 细胞分裂素; 水稻; 方法

中图分类号: Q94-336; Q945; S-3

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2004)04-0362-03

试验证明根源激素可以作为信号载体, 参与地上部的信息传递, 调控植物冠部的生长发育与代谢功能^[1]。研究结果显示根部合成的细胞分裂素通常经木质部随着蒸腾流作向顶运输, 对地上部叶片蛋白质和叶绿素的代谢、叶片的生理活力及籽粒灌浆能力起着十分重要的作用^[2~5]。细胞分裂素种类和数量的变化也可作为根系衰老的一个生理指标^[6]。因此, 研究和分析根源细胞分裂素类物质对于深入理解植物激素在水稻根冠信号传递中的作用具有十分重要的作用。

测定细胞分裂素的方法目前主要有生物分析法、酶联免疫法、高压液相色谱法(HPLC)和气相色谱-质谱联用(GC-MS)^[7]。因实验精确度的要求和仪器设备的限制, 酶联免疫法和高压液相色谱法(HPLC)是其中常用的两种方法。本文主要介绍应用HPLC检测水稻根系伤流液中细胞分裂素类物质的实验方法并作一探讨。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

HP1100LC系统,DAD二极管阵列检测器,数据采集和处理均在 HP 化学工作站上进行。

所用细胞分裂素为Sigma产品; 甲醇为色谱纯, HP公司产品; 水为超纯净水; 高氯乙酸、磷酸、石油醚、乙酸乙酯、正丁醇为分析纯, 其中石油醚、乙酸乙酯、正丁醇均作重蒸处理。

1.2 色谱条件

色谱柱为HP公司的Hypersil ODS C-18柱(125 mm × 4.6 mm i. d., 5 μm)。测定条件: 流动相A为V_{甲醇}: V_水: V_{高氯乙酸}=60:40:0.08(pH 3.2), 流速为0.6~0.9 mL/min(0~3 min), 0.9 mL/min(3~10 min), 波长270 nm。此条件用于测定玉米素(Z)、二氢玉米素(diHZ)、二氢玉米素核苷

(diHZR)和反式玉米素葡萄糖苷(ZG)。流动相B为V_{甲醇}: V_水: V_{高氯乙酸}=90:10:0.07(pH 2.1), 流速为0.8 mL/min, 波长270 nm, 此条件用于测定异戊烯基腺嘌呤(iP)。进样量均为10 μL。

1.3 伤流液中细胞分裂素的提取纯化

供试水稻材料为籼粳亚种间杂交组合, 按沈波等的方法^[6]获得伤流液。伤流液中细胞分裂素的提取纯化依据丁静等^[4]和沈镇德等^[8]的方法(略有改动)进行。操作流程依次为: 伤流液纸过滤→等量石油醚萃取3次, 调pH至2.5~3.0→等量乙酸乙酯萃取3次, 加PVP, 震荡30 min→滤纸过滤, 调pH至8.0→水饱和正丁醇萃取3次→合并正丁醇相, 弃水相→60~65℃减压浓缩蒸干→甲醇1 mL溶解→过SEP-PAK C-18柱→淋洗液50℃减压浓缩, 定容至1 mL→HP的Syringe Filters→HPLC上样。

1.4 标准溶液的制作

各种细胞分裂素纯品, 用甲醇溶解后, 分别配制成100 mg/L的标准液。使用前配制成0.01~1.00 mg/L的工作溶液。

2 结果与分析

2.1 波长的确定

为了确定细胞分裂素的最大吸收峰, 对细胞分裂素的甲醇溶液进行全波长扫描(220~660 nm), 发现在270 nm处有最大的响应, 几种细胞分裂素的最大吸收波长相近, 从而

收稿日期: 2003-07-09; 修改稿收到日期: 2003-11-06。

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目(302364); 杭州市“131”人才工程培养基金资助项目。

第一作者简介: 沈 波(1965—), 男, 副教授。

确定最佳检测波长为 270 nm。

2.2 HPLC 分离条件的确定

水稻根系伤流液成分与叶片及籽粒相比,没有色素等干扰物质,但仍含有各种激素、氨基酸等物质,因此无法按文献[9]的方法直接上样进行 HPLC 分析,必须经过上述的提取和纯化步骤。

在色谱条件的探讨上,流动相的选择是关键。实验中,最初用激素分析常用的乙腈或乙腈-冰浴溶液作为流动相,但无法分离出细胞分裂素;而强极性的甲醇-水溶液为流动相的保留时间过长,峰形太宽。经过优化,加入不同比例的磷酸或高氯乙酸,提高检测的灵敏度,采用梯度洗脱的方法使保留时间缩短,从而可以在 10 min 内实现样品的完全分离。

2.3 CTK 标准液测定

按上述方法,将各种细胞分裂素标准液,逐个注入高效液相色谱仪,记录其保留时间,用以标定每一种标准物的色谱峰位置,而后将 4 种细胞分裂素混合的标准液(Z、diHZ、diHZR、ZG)和 iP 标准液分别进样测试,验证保留时间的重现性,检验色谱柱的分辨能力。结果表明,ZG、diHZR、Z 和 diHZ 的保留时间分别为 2.281、2.687、4.877 和 5.683 min。iP 的出峰时间为 3.784 min。经多次测试,保留时间的 RSD 为 0.085%~0.213%,重现性较好(图 1)。

2.4 线性回归

由于细胞分裂素在根系伤流液中的含量很低,所以在实验中尽可能地选择较低浓度的细胞分裂素进样。结果如图 2,Z、diHZ、diHZR、ZG 在 0.01~1.00 mg/L 的范围内线性关系良好,相关系数均在 0.999 以上。在此 HPLC 试验条件下,Z、diHZ、diHZR、ZG 的最低检出量为 0.10 ng, iP 的最低检出量为 0.05 ng。

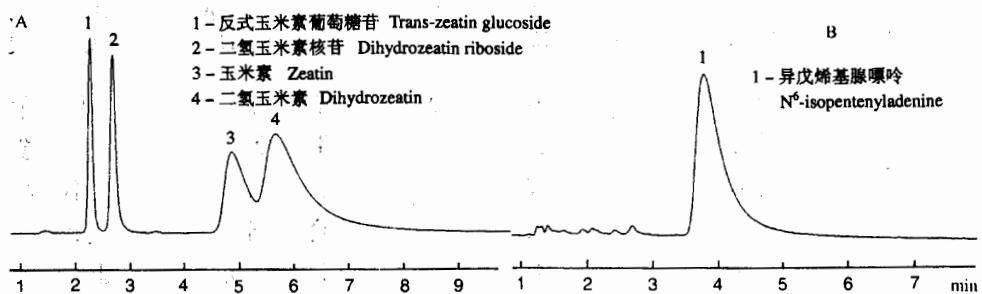


图 1 细胞分裂素标准液的色谱图

Fig. 1. Chromatogram of cytokinin standards.

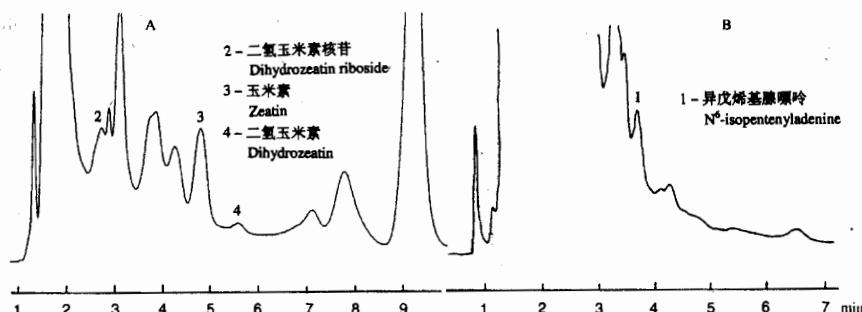


图 3 水稻根系伤流液细胞分裂素的色谱图

Fig. 3. Chromatogram of cytokinin in rice root exudates.

2.5 样品测定及回收率

吸取 10 μL 根系伤流液的提取液注入高效液相色谱仪,检测结果见图 3。根据标准液的保留时间,判明所试水稻品种(组合)根系伤流液中存在玉米素 Z、二氢玉米素(diHZ)、二氢玉米素核苷(diHZR)和异戊烯基腺嘌呤(iP)4 种细胞分裂素,未检测到反式玉米素葡萄糖苷(ZG)。分别在伤流液中添加 2.5 μg 的 4 种 CTK(Z、diHZ、diHZR、ZG)混合物和 iP,按 CTKs 的提取纯化流程进行操作, HPLC 分析测定其含量,最后计算回收率。经计算 CTKs 的回收率分别为: ZG, 71.0%; Z, 60.8%; diHZ, 65.2%; diHZR, 92.8%; iP, 81.3%。

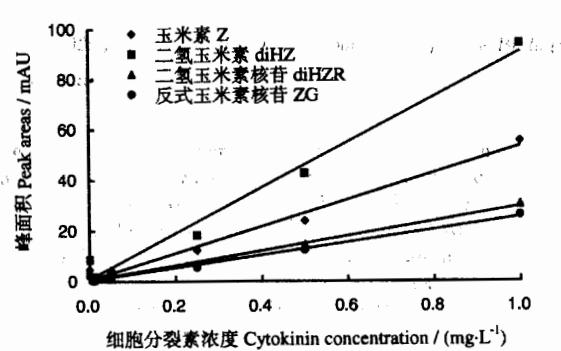


图 2 细胞分裂素与色谱峰面积的关系

Fig. 2. Correlation between cytokinin concentration and peak areas.

3 讨论

酶联免疫法和HPLC是植物激素分析测定的常用方法。前者由于高选择性、设备简单及操作方便的优点,目前使用较多,但尚不能对某一种激素进行确切的鉴别和测定^[10]。HPLC由于色谱柱、检测器等部件的日趋完善,灵敏度、选择性及数据处理能力得到极大地提高,在配备HPLC仪器的条件下,应用HPLC分析植物激素应该是很好的测试方法,但目前的测定方法主要集中于叶片和籽粒中的吲哚乙酸、赤霉素、玉米素和脱落酸,对不同细胞分裂素物质的鉴别测定报道很少^[11,12]。本文应用HP1100LC系统建立了分析水稻根系伤流液中的细胞分裂素成分的方法,可检测到Z、diHZ、diHZR和iP四种细胞分裂素,并在灵敏度、重现性和回收率等方面可满足研究要求。

参考文献:

- 1 Lou C H(娄成后). Root-shoot interrelationship in higher plants. *Life Sci (生命科学)*, 1994, 6(5): 1—6. (in Chinese)
- 2 Bano A, Dorffling K, Hahn H. Abscisic acid and cytokinins as possible root-to-shoot signals in xylem sap of rice plants in drying soil. *Austra J Plant Physiol*, 1993, 20: 109—115.
- 3 Nooden L D, Letham D S. Cytokinin metabolism and signalling in the soybean plant. *Austra J Plant Physiol*, 1993, 20: 639—653.
- 4 Ding J(丁 静), Shen Z D(沈镇德). Cytokinins in root exudates of cotton plants. *Acta Phytophysiol Sin (植物生理学报)*, 1985, 11(3): 249—259. (in Chinese with English abstract)
- 5 Soejima H, Sugiyama T, Ishihara K. Changes in the chlorophyll contents of leaves and in leaves of cytokinins in root exudates during ripening of rice cultivars: Nipponbare and Akenohoshi. *Plant Cell Physiol*, 1995, 36(6): 1105—1114.
- 6 Shen B(沈 波), Wang X(王 煦). Studies on physiological activities of root system of two inter-subspecific hybrid rices. *Chinese J Rice Sci (中国水稻科学)*, 2002, 16(2): 153—157. (in Chinese with English abstract)
- 7 Li Z T(李宗霆), Zhou X(周 磐). *Plant Hormones and Their Immunoassays(植物激素及其免疫检测技术)*. Nanjing: Jiangsu Scientific and Technical Publishers(江苏科学技术出版社), 1996. 9. (in Chinese)
- 8 Shen Z D(沈镇德), Shao D S(邵大森), Ding J(丁 静). The application of high performance liquid chromatography to the analysis of cytokinins. *Plant Physiol Comm (植物生理学通讯)*, 1984, (5): 45—48. (in Chinese)
- 9 Wu M C(吴谋成). Determination of zeatin in bleeding sap by HPLC. *Plant Physiol Comm (植物生理学通讯)*, 1983, (4): 48—51. (in Chinese)
- 10 Zhang Y Z(张玉宗), Chen Z L(陈振玲), Lu X Z(吕杏者). Simultaneous determination of gibberellins A₁ and A₃ in foxtail millet seedlings by high performance liquid chromatography. *Chinese J Chromatography (色谱)*, 1999, 17(5): 469—472. (in Chinese with English abstract)
- 11 Wang R Z(王若仲), Xiao L T(萧浪涛), Lin W H(蔺万煌). High performance liquid chromatographic determination of internal hormones in inter-subspecific hybrid rice. *Chinese J Chromatography (色谱)*, 2002, 20(2): 148—150. (in Chinese with English abstract)
- 12 Zhao Y J(赵玉锦), Wang T(王 台), Tong Z(童 哲). A simplified method for extraction of endogenous IAA, ABA and GAs from rice leaves. *Chinese Bull Bot (植物学通报)*, 1994, 11(4): 52—54. (in Chinese with English abstract)