

水稻 IAA、JA、ABA、SA 定量检测分析

Quantification Analysis of IAA, JA, ABA and SA in Rice

刘红波, 李冬芹, 都浩, 袁猛*

作物遗传改良国家重点实验室, 华中农业大学, 武汉

*通讯作者邮箱: myuan@mail.hzau.edu.cn

引用格式: 刘红波, 李冬芹, 都浩, 袁猛. (2018). 水稻 IAA、JA、ABA、SA 定量检测分析. *Bio-101: e1010156*. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010156.

How to cite: Liu, H. B., Li, D. Q., Du, H. and Yuan, M. (2018). Quantification analysis of IAA, JA, ABA and SA in rice. *Bio-101: e1010156*. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010156. (in Chinese)

实验原理: 植物激素在植物的生长发育及多种逆境中发挥重要作用, 根据相似相容原理溶解抽提水稻组织激素, 再用高效液相色谱-质谱联用法分离检测。高效液相色谱是色谱法的一个重要部分, 采用高压输液系统, 将不同极性的单一溶剂或不同比例的混合溶剂、缓冲液等流动相泵入装有固定相的色谱柱, 样品各组分在色谱柱内被分离后, 进入质谱检测器进行检测, 从而实现对试样的分析。

实验目的: 检测水稻组织 IAA、JA、ABA、SA 及其衍生物的含量, 此法也可用于其他植物组织的检测。

关键词: 植物激素, 液质联用

材料与试剂

1. 1.5 ml 离心管
2. 移液吸头
3. 1 ml 注射器 (上海治宇医疗器械有限公司)
4. 0.22 μm 滤膜 (津腾尼龙 66)
5. 氮气
6. 冰
7. 甲醇 (Fisher, HPLC, USA)
8. 乙酸 (TEDIA, HPLC, USA)
9. NAA (Sigma, USA)

10. d5-IAA (Sigma-Aldrich, USA)
11. H₂JA (Olomouc, Czech Republic)
12. d6-ABA (Olomouc, Czech Republic)
13. 抽提液 buffer 1 (见溶液配方)
14. 抽提液 buffer 2 (见溶液配方)

仪器设备

1. 冷冻离心机
2. 氮吹仪 (Dry N-EVAP™111, Organomation Associates Inc. USA)
3. 研磨设备
4. -70 °C 冰箱
5. 脱色摇床
6. 移液枪
7. 通风橱
8. VP-ODS 150L*2.0 column (Shimadzu)
9. AB SCIEX Triple Quad™ 5500 System

实验步骤

1. 田间或温室取样水稻组织 0.5 g 以上放入液氮中带回实验室, 因为每份样 3 个重复, 每个样品抽提激素要约 0.1 g 鲜重, -70 °C 保存直到抽提, 尽量不要反复冻融。
2. 激素抽提
 - 2.1 液氮研磨, 尽量磨碎; 取约 0.1 g 于 1.5 ml 离心管中, 加 750 µl 抽提液 buffer 1 (见溶液配方), 颠倒混匀, 置冰上, 避光 (植物粉末不要加太多, 0.1 g 足够了, 粉末太多抽提不完全)。
 - 2.2 4 °C、脱色摇床 300 转/分钟避光抽提 16 小时以上; 4 °C、13,000 rpm 离心 10 分钟, 吸上清于一新离心管中。
 - 2.3 在沉淀中加 450 µl 抽提 buffer 2 (见溶液配方), 4 °C、脱色摇床 300 转/分钟避光抽提 4 小时以上, 4 °C、13,000 rpm 离心 10 分钟, 吸上清, 合并两次上清。
 - 2.4 用 1 ml 注射器吸取合并的上清过 0.22 µm 滤膜(津腾公司, 尼龙 66), 至一新

1.5 ml 离心管中，在通风橱中用氮气吹干，加 200 μ l 30% 甲醇颠倒混匀后 4 $^{\circ}$ C 溶解 15 分钟。

2.5 溶解液在 4 $^{\circ}$ C、13,000 rpm 离心 15 分钟后，轻轻吸取上清 150-180 μ l 至内插管中，放置于质谱专用上样瓶等待上样。

3. 质谱测定

3.1 IAA、JA、ABA 可直接上样检测。

3.2 检测 SA 要稀释 50-100 倍 (根据质谱上机信号决定)。

仪器: AB SCIEX Triple QuadTM 5500 System

色谱条件:

Column: VP-ODS 150L*2.0 column (Shimadzu), P/N228-34937-94

Mobile phase A: 0.04% 乙酸水

Mobile phase B: 乙腈

流速: 0.25 ml/min

进样体积: 10 μ l

洗脱梯度: 时间	梯度	
(min)	%A	%B
0	95	5
3	95	5
8	84	16
15	0	100
18	0	100
20	95	5
26	95	5

注: 同一样品在不同的色谱条件下出峰时间是不同的, 所以没有特定的色谱条件说某一化合物在什么时间出峰没有任何意义。将一般条件下改为具体的色谱条件下各化合物保留时间。完整的色谱条件包括色谱仪型号、色谱柱型号规格、流动相 A、B 分别是什么溶剂、A、B 两项的梯度变化程序、流动相总流速、柱温箱温度, 检测器型号等。我们这里用质谱检测就不用写检测器了。

结果与分析

1. 在 **quantitate** 中点击 **quantitation wizard** (定量向导), 选取要分析的数据文件, 根据提示做结果分析。选取中间浓度的标准样品, 对各个标准品及内标的谱图进行平滑等积分优化处理, 仪器将自动根据标准品的出峰时间和积分参数对未知样品中各对应的峰进行定性和定量分析。
2. 点每个样的文件(**sample name**), 可以查看目前操作的是哪种激素, 双击可以查看积分是不是对的。目标化合物在采集过程中因偶然因素出峰时间与标准品保留时间产生较大的偏离时, 自动积分会出现峰误判现象, 此时需用手动积分重新选取目标化合物的峰进行重新积分, 然后更新到结果文件即可; 手动积分时, 点 **manual integration mode**, 选取目标峰进行积分; 所以每个文件都必须自己看一下, 检查积分是否有问题。
3. 在标准曲线文件中 **sample type** 中选择 **standard**, 在 **concentration** 中填写各个标准样品所对应的梯度浓度, 点 **calibration**, 会出现标准曲线。要求样品中的待测化合物浓度要落在标准曲线的线性范围内: 即检测激素的最低和最高浓度都在标准曲线线性范围内; 否则都要进行浓缩或者稀释后再定量。
4. 曲线做好以后, 仪器会根据曲线自动计算出所有未知样品中各个化合物的浓度。先保存结果文件, 然后再将结果转化成 **TXT** 格式导出, 否则其它电脑打不开。导出计算的结果, “file” → “export”, 用 **excel** 打开, 倒数第五列即 **Calculated Concentration (ng/ml) C** 就是原始数据。
5. 原始数据是检测的浓度, 用它乘以体积即 **200 μl**, 再除以重量 **W**,
IAA、JA、ABA 激素含量 = C * 200/W/1,000 μg/g,
SA 因为稀释了 **200** 倍, 所以要再乘以稀释的倍数

注意事项

1. 抽提液全配成 **mixture**, **-20 °C** 避光可有效保存 **1-2** 年。
2. 抽提 **buffer 1** 和抽提 **buffer 2** 使用时, 取出后放在冰盒上使用。
3. 抽提 **buffer 2** 无内标用于洗涤抽提残余内标及样品。
4. 抽提 **buffer 1** 中有内标, 小心操作, 如溅到皮肤上应及时清洗。
5. 因抽提 **buffer** 中含甲醇、乙酸, 氮吹仪应在通风橱中使用。

6. 因抽提 buffer 中含低辐射放射性物质，所有直接接触到放射性物质的一次性物品应用塑料袋包装后再丢到垃圾桶中。
7. 本实验方法改编自 Liu 等, 2012。

溶液配方

1. 抽提 buffer 1 (含内标)

甲醇:ddH₂O:乙酸=80:19:1(V:V:V)

内标加入量如下:

NAA: 作为 SA 内标, 3 ng/μl

d5-IAA: 作为 IAA, IAA-Asp, IAA-Ala 内标, 10 ng/ml

H2JA: 作为 JA, OPDA, JA-Ile 内标, 10 ng/ml

d6-ABA: 作为 ABA 内标, 10 ng/ml

2. 抽提 buffer 2 (不含内标)

甲醇:ddH₂O:乙酸=80:19:1 (V:V:V)

参考文献

1. Liu, H., Li, X., Xiao, J. and Wang, S. (2012). [A convenient method for simultaneous quantification of multiple phytohormones and metabolites: application in study of rice-bacterium interaction.](#) *Plant Methods* 8(1): 2.