

海带中细胞激动素的纯化分离方法*

黄冰心 范 晓 韩丽君

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

提要 海带样品于 2001 年采自青岛太平角海湾,用三种不同方法处理样品,通过对实验方法及条件的筛选,确立了提取、纯化和分离海带中细胞激动素的方法步骤和流程。结果表明,最佳方法的基本步骤为:(1) 用甲醇:水:醋酸(70:30:3, V/V/V)从海带组织中提取出细胞激动素,再用 PVPP 柱去除提取液中的酚类和其他杂质;(2) 将提取液通过连在一起的 PVPP 柱、DEAE 柱和 C_{18} 柱,以纯化样品并同时从自由基、核苷、核苷酸和葡糖苷型细胞激动素混合物中分离出核苷酸型细胞激动素;(3) 用接有氨基柱的正相液相色谱进一步将葡糖苷型细胞激动素分离出来;(4) 用 C_{18} 液相色谱柱分离其他各种细胞激动素。

关键词 海带,细胞激动素,纯化,高效液相色谱

中图分类号 Q946

海藻生物活性物质的研究已有较多报道(何家苑等,1999;张新宇等,2000)。海带作为肥料使用的历史可以追溯到公元前,但是直到 20 世纪中期英国才首次使用碱提取的方法提取海带中的有效成分,制备了真正可以应用的海藻肥料。这种海藻肥料一问世就在农业上产生了许多很好的效果,如增加作物的产量、减少病虫害的发生等,所以产量迅速增加(纪明侯等,1960;史升耀等,1980)。大量研究发现,海藻肥中不但含有微量元素和矿物元素而且还含有植物激素,这些植物激素可能对作物产生了促生长的效果(徐年军等,2001)。Bentley 等(1968)首次在微藻中发现了具有类似细胞激动素活性的物质;日本科学家 Farooqi 等(1991)采用 NMR 技术发现大型海藻中含有上述细胞激动素,并且证实了这些细胞激动素的活性。细胞激动素也称细胞分裂素,是嘌呤环的衍生物,其活性与化学结构有关,其结构大致可以分为四大类:嘌呤类、修饰的嘌呤类、脲类(包括酰胺)和氨基嘧啶(D'Agostino *et al.*, 1999)。目前的研究已经证实细胞激动素是海藻中主要的生长调节物质之一(Pacakova *et al.*, 1997)。文中通过大量和系统的实验,确定了以有机溶剂提取法提取海带中的细胞激动素,以萃取法和柱层析法对其进行分离纯化的初步方案,对该方案中各关键步骤(包括前处理、提取、萃取纯化、柱层析纯化等)的具体操作条件进行了优选,建立了一种操作简便、提取率较高且重复性较好的海带细胞激动素的提取和纯化方法。

1 材料与方法

海带(*Laminaria japonica*)幼体于 2001 年采自青岛太平角海湾。

* 国家高技术研究发展计划(863)资助项目,2001AA620503 号。黄冰心,女,出生于 1974 年 6 月,博士研究生,

E-mail: huangbx@ms. qdio. ac. cn

收稿日期: 2001-10-23, 收修改稿日期: 2002-04-28

1.1 提取方法

将海带样品清洗, 去除沙粒和附着物。用以下 3 种不同方法处理样品, 根据实验结果确定提取海带样品中细胞激动素的最佳方案。

(1) 称取并粉碎样品, 80% 甲醇 4℃提取过夜, 过滤(Vlasakova *et al.*, 1998)。提取液 40℃减压浓缩。

(2) 称取并粉碎样品, 用 80% 甲醇溶液超声波振荡 20s, 4℃高速离心 10min, 倾出上清液。重复 2—3 次。合并上清液, 减压蒸发到 2ml。

(3) 称取样品, 放入已准备的 Bielecki's 溶液(甲醇: 水: 醋酸= 70: 30: 3, V/V/V, 所用体积为海带的 5—6 倍)(Vijaylalitha *et al.*, 1999) 中, - 20℃冷冻, 放置 3 天, 用来在样品粉碎前钝化酶, 3 天后在提取液的存在下将样品研磨成粉末。超声波振荡 20s, 4℃高速离心 10min 后, 倾出上清液。重复 2—3 次。合并上清液, 减压蒸发到 2ml, - 20℃冷藏。

1.2 纯化方法

细胞激动素的种类较多, 但是因为海带提取液粘稠且细胞激动素的含量很低, 所以需要合适的纯化步骤, 本文中进行了几种实验。

1.2.1 过中性氧化铝柱实验 取中性氧化铝 1.5g, 湿法装柱, 备用。取提取液 1ml, 加稀氨水调节 pH 至 5—7, 上柱, 先以甲醇 10ml 洗脱, 收集洗脱液 A, 再以 1mol/L 的盐酸溶液 10ml 洗脱, 得到洗脱液 B。分别将洗脱液 A、B 水浴浓缩, 并定容到 1ml, 离心分离上清液, 进行 HPLC 测定。

1.2.2 强酸性阳离子交换树脂富集实验 取提取液 1ml, 加 0.01mol/L 的盐酸 1ml, 混匀上柱(磺酸型强酸性阳离子交换树脂 2.5g, 加 0.01mol/L 的盐酸 5ml 再生, 以纯水冲洗至中性)。先以 20ml 水洗涤, 再以 1mol/L 的盐酸 20ml 洗脱, 准确收集洗脱液 20ml, 水浴蒸发至干, 加甲醇溶解并定容 2ml, 离心分离上清液(Kamajda, 1998)。

1.2.3 多次过柱实验 先用 PVPP 柱去除酚类和其他杂质, 为了纯化样品并同时从自由基、核苷、核苷酸和葡萄糖苷型细胞激动素混合物中分离出核苷酸型细胞激动素, 样品应通过连在一起的 PVPP 柱、DEAE 柱和 C₁₈柱。每个柱子装好并且预处理好后, 用软管和木塞将它们连起来。首先加 20ml 10mmol/L 的醋酸铵缓冲液(pH= 6.5)来处理整个系统, 加入调节好 pH 值的样品 2ml, 用 60ml 10mmol/L 的醋酸铵缓冲液(pH= 6.5)洗脱组合层析柱后, 断开三个柱子。用 50ml 1mol/L 的醋酸(pH= 2.5)洗脱 DEAE 柱来收集核苷酸型细胞激动素, 将洗脱液(酸洗)减压蒸发至干。用 9ml 80% 的甲醇(pH= 9.0—10.0)冲洗 C₁₈柱洗脱自由基、核苷和葡萄糖苷型细胞激动素, 将洗脱液减压蒸发, 在加到液相色谱氨基柱前用 50μl 乙腈溶解。

1.3 细胞激动素高压液相色谱分析条件的筛选

1.3.1 纯化后样品稀释溶剂的筛选 选择甲醇、1mol/L 的盐酸溶液、2% 的磷酸溶液、2% 的冰醋酸溶液及甲醇-三乙胺缓冲液(pH= 3.2)-水(12: 28: 60)分别作稀释剂, 进行实验。

1.3.2 检测波长的选择实验 取细胞激动素标准品, 配成 1.5μg/ml, 在 200—300nm 进行紫外扫描。

1.3.3 流动相的筛选 实验中比较了四种流动相: 甲醇-三乙胺缓冲液(pH= 3.2)(1: 1); 甲醇-三乙胺缓冲液-水(12: 28: 60); 甲醇-水, 选用甲醇-水(70: 30)、(66: 34)、(45: 55)以

及(40:60)四种配比;乙腈-水(40:60)。

1.4 方法的线性关系的考察

1.4.1 制备标准品溶液 选择细胞激动素的主要成分——玉米素,进行方法的线性关系考察实验。配制 152.4μg/ml 的玉米素标准品储备液,加甲醇-三乙胺-缓冲液-水(12:28:60)稀释为 15.24μg/ml 及 1.524μg/ml 的溶液。

1.4.2 HPLC 的色谱条件

色谱柱为正相氨基柱;检测波长为 268nm,流动相为乙腈-水(40:60);流速为 1ml/min,柱温为 30℃;灵敏度为 0.04AUFS,纸速为 1mm/min (Laureys *et al.*, 1999)。

1.4.3 测定方法 吸取 15.24μl/ml 的玉米素标准品溶液 5、10、15、20μl,吸取 1.524μg/ml 的玉米素标准品溶液 2、5、10μl,各重复进样三次,求得峰面积平均值 A 与玉米素的进样量的回归方程。

2 结果

2.1 提取方法的比较

在测试样品中加入单磷酸苄基腺苷(BAMP)作内标,提取方法见表 1。

表 1 提取方法的比较
Tab.1 The comparison of extraction method

方法	溶剂	提取方法	提取时间
1	80% 甲醇	静置	过夜
2	80% 甲醇	超声波振荡重复 3 次	60s
3	甲醇: 水: 醋酸 = 70: 30: 3 (V/V/V)	超声波振荡重复 3 次	60s

实验结果显示,用方法 1 提取细胞激动素,单磷酸苄基腺苷的降解率为 31%;用方法 2 提取细胞激动素,单磷酸苄基腺苷的降解率为 5%,用方法 3 提取细胞激动素,单磷酸苄基腺苷不降解。第 3 种方法,即用甲醇-水:醋酸= 70:30:3 (V/V/V)、超声波振荡的方法提取,可使 BAMP→BAR(苄基腺苷)的分解率最低,取得了较好的效果。

文中采用将样品低温保存、在 Bielecki's 溶液中提取及短时间提取等措施来抑制潜在的核苷酸降解。通过比较提取方法,可以发现核苷酸的损失很大程度上被文中所用的第 2 和第 3 种方法抑制。其中低温和短时间提取起到了决定性作用,因为使用 80% 甲醇提取时也未发现明显的核苷酸降解。Palmer 等(1981)采用长时间提取,且未用超声波装置,虽然核苷酸没有很大损失,但是未能抑制核苷酸酶活性,因为通过检测发现了细胞激动素标准品 BAMP→BAR 的降解。

海带中多酚类物质较多,而且易氧化,因此在提取过程中常常出现沉淀,多过滤几次可以去除一些多酚类物质,以免影响以后的纯化。

2.2 纯化方法的比较

过中性氧化铝柱实验的洗脱液 A、B 均有细胞激动素的峰,但是含量甚微,证实此法无助于海带中细胞激动素的检出;强酸性阳离子交换树脂富集实验的洗脱液经 HPLC 检查,未见细胞激动素峰出现,可见此法也无助于海带中细胞激动素的检出。经过多次过柱纯化的海带提取液经 HPLC 检查,细胞激动素的分离情况和峰形良好。

2.3 细胞激动素高压液相色谱分析条件的比较

2.3.1 纯化后样品稀释溶剂的比较 选择1mol/L的盐酸溶液、2%的磷酸溶液、2%的冰醋酸溶液及甲醇为稀释剂,峰形都不好。最后选用甲醇-三乙胺缓冲液(pH= 3.2)-水(12: 28: 60)作稀释剂,峰形很好。

2.3.2 检测波长的比较 据文献记载(Bartak *et al*, 1998),玉米素的最大吸收峰为268nm,扫描结果显示玉米素标准品在275nm处有最大吸收。实测中比较275nm和268nm的吸收值,发现两者无明显差异,可能是采用不同溶剂所致,故仍以268nm为检测波长。

2.3.3 流动相的比较 实验结果如下。

(1) 甲醇-三乙胺缓冲液(pH= 3.2)(1: 1): 玉米素的保留时间位置出现多个峰,无法判断哪个是主峰,且分离度差。

(2) 甲醇-三乙胺缓冲液-水(12 28 60): 杂质峰与玉米素峰分离度差。

(3) 甲醇-水: 选用甲醇-水(70: 30)、(66 34)、(45 55)以及(40: 60)四种配比,杂质峰与玉米素的峰分离度差。

(4) 乙腈-水: 选用乙腈-水(40: 60)洗脱。出峰时间稳定,重复性好,海带中杂质峰与标准峰达到基线分离,选定为检测细胞激动素的流动相。

2.4 方法的线性关系的考察结果(表2、表3)

表2 线性关系数据表

Tab 2 The data of linearity

编号	检品(μg/ml)	进样量(μl)	玉米素含量(μg)	峰面积	平均峰面积
1	15.24	20	0.3048	1040810	1028506
1	15.24	20	0.3048	1016755	
1	15.24	20	0.3048	1035990	
2	15.24	15	0.2286	781773	782424
2	15.24	15	0.2286	783075	
3	15.24	10	0.1524	521199	518838
3	15.24	10	0.1524	516477	
4	15.24	5	0.07620	251746	
4	15.24	5	0.07620	260594	259143
4	15.24	5	0.07620	257692	
5	1.524	10	0.01524	50052	50510
5	1.524	10	0.01524	50968	
6	1.524	5	0.00762	25280	25284
6	1.524	5	0.00762	25288	
7	1.524	2	0.003048	3726	4039
7	1.524	2	0.003048	4352	

就1—6号结果数据进行回归,第7号测定结果峰面积数值偏离上述6个标准品的结果较大,将其舍弃。

A= 479.6; B= 3390463.0; r= 0.9999

y= 479.6+ 3390463.0x

本测定结果证实玉米素在0.00762—0.3048μg之间线性关系良好。

表 3 线性关系实验结果
Tab 3 Result of the linearity

项目	玉米素含量(μg/ml)						
	15. 24			1. 524			
取样量(μl)	20	15	10	5	10	5	2
玉米素(μg)	0. 3048	0. 2286	0. 1524	0. 0726	0. 01524	0. 00762	0. 003048
对应峰面积	1028506	782424	518838	259143	50510	25284	4039

3 讨论与结论

海带中细胞激动素的分析通常较为费时和麻烦, 因为细胞激动素含量低, 分子结构各异。早期人们期望以海带粗提液直接测定其含量, 但得出的结果不准确。精细分析要求样品纯度非常高, 各种细胞激动素应该被分离开, 以避免分析中的干扰。

通过对实验方法及条件的筛选, 本文中确立了提取、纯化、分离和定量海带中细胞激动素的一套试剂系统和方法步骤以及流程。其基本步骤为: 用 Bieleški's 溶剂(甲醇: 醋酸: 水= 70: 3: 30, V/V/V) 把细胞激动素从海带组织中提取出来, 先用 PVPP 柱去除提取液中的酚类和其他杂质; 然后将提取液通过连在一起的 PVPP 柱、DEAE 柱和 C₁₈柱, 以纯化样品并同时从自由基、核苷、核苷酸和葡糖苷型的细胞激动素混合物中分离出核苷酸型细胞激动素; 用接有氨基柱的正相液相色谱进一步将葡糖苷型细胞激动素分离出来; 最后用 C₁₈液相色谱柱分离各种细胞激动素。

开始提取时, 应该注意防止细胞激动素发生酶解和化学变化, 并要求提高提取率。用甲醇提取粉碎的海带组织是传统的方法, 现在仍然广泛使用, 但是核苷酸型细胞激动素可能在甲醇提取液中水解, 因为磷酸酶会起作用。为了避免磷酸酶的问题, 本文中采用了 Bieleški's 溶剂(甲醇: 醋酸: 水= 70: 3: 30, V/V/V) 从海带中提取细胞激动素。

样品的纯化一般通过不同的层析柱来进行。细胞激动素很容易从 PVPP 柱洗脱, 由于亲和力, 酚类被吸附。甲醇是从 PVPP 柱洗脱细胞激动素的有效试剂。样品纯化过程中, 从各种形式的细胞激动素混合物中分离出细胞激动素核苷酸是比较容易的, 它的化学结构中存在半个磷酸, 可以结合负电荷。此分离通常是将样品通过一个磷酸纤维素柱, 但是因为磷酸纤维素在低 pH 值(pH= 3. 0) 时是比较弱的离子交换物质, 所以需要大量的洗脱液(最初的核苷酸型细胞激动素的洗脱(酸洗) 和稍后的其他细胞激动素的洗脱(碱洗) 都需要大量的洗脱液)。洗脱结束后, 洗脱液应该被减压蒸发到几毫升。此外在磷酸纤维素柱下直接加上 C₁₈层析柱是没有意义的, 因为在酸洗(pH= 3. 0) 和碱洗(pH= 9. 0—10. 0) 的条件下, 核苷酸型细胞激动素和其他一些离子化的细胞激动素不能被 C₁₈层析柱吸附。

在样品纯化中 DEAE 纤维素柱用于去除杂质以及收集核苷酸型细胞激动素, 包括那些未被磷酸纤维素柱收集的细胞激动素。在中性条件下, 直接与 DEAE 纤维素柱相连的 C₁₈柱可以收集通过 DEAE 纤维素柱的细胞激动素。自从它们被用于细胞激动素粗提液的纯化, DEAE 纤维素柱和 C₁₈柱已被广泛使用。

需要强调的是, 如果要研究储藏形式的 O- 葡糖苷和 N- 葡糖苷型细胞激动素, 应该将葡糖苷型细胞激动素从自由基和核苷型细胞激动素中分离出来。薄层色谱(TLC) 在此分离过程中很有用, 但该技术不具有广泛适用性。本文中用正相液相色谱来分离自由基、核

苷型细胞激动素和葡糖苷型细胞激动素,其后用反相液相色谱纯化和进一步分离样品,取得了很好的效果。

参 考 文 献

- 史升耀, 纪明侯, 1965. 几种食用海藻中抗坏血酸含量的测定. 海洋与湖沼, 7(1): 67—72
- 纪明侯, 史升耀, 曾呈奎, 1960. 我国几种经济褐藻的含碘量测定. 海洋与湖沼, 3(3): 205—213
- 何家苑, 施之新, 张银华等, 1999. 一种棕囊藻的形态特征与毒素分析. 海洋与湖沼, 30(2): 172—179
- 张新宇, 王 雷, 李光友等, 2000. 绿色巴夫藻多糖的提取、分离与纯化. 海洋与湖沼, 31(6): 643—646
- 徐年军, 范 晓, 韩丽君等, 2001. 山东沿海海藻抗肿瘤活性的筛选. 海洋与湖沼, 32(4): 408—413
- Bartak P, Sevcik J, Adam T *et al*, 1998. Study of cytokinin separation using capillary electrophoresis with cyclodextrin additives. J Chromatography A, 18: 231—238
- Bentley T, Tokota N, 1968. Molecular aspects of plant hormones. Planta, 149: 155—162
- D'Agostino I B, Kieber J J, 1999. Molecular mechanisms of cytokinin action. Curr Opin Plant Biol, 2(5): 359—364
- Farooqi G, Palmi L M S, 1991. Determination of intact zeatin nucleotide by direct chemical ionisation mass spectrometry. FEBS Letters, 151(1): 122—126
- Kamajda M, 1998. Drugs of the future. Arch Mal Coeur Vaiss, 91(11): 1423—1427
- Laureys Francoise, Smets Rafael, Lenjou Marc *et al*, 1999. A low content in zeatin type cytokinins is not restrictive for the occurrence of G1/S transition in tobacco BY-2 cells. FEBS Letters, 460(1): 123—128
- Pacakova V, Stulik K, Vlasakova V *et al*, 1997. Capillary electrophoresis of cytokinins and cytokinin ribosides. J Chromatography A, 764/2: 331—335
- Palmer M V, Horgan R, Wareing P F, 1981. Identification of endogenous cytokinins and metabolism of dihydrozeatin in stems of decapitated plants. Planta, 153: 297—302
- Vijayalitha S J, 1999. Influence of cytokinin on modifying sex in musk melon (*Cucumis melo* L.). Advances in Plant Sciences, 12(1): 31—34
- Vlasakova V, Brezinova A, Holik J, 1998. Study of cytokinin metabolism using HPLC with radioisotope detection. J Pharmaceutical Biomedical Anal, 17: 39—44

METHOD OF EXTRACTION AND PURIFICATION OF CYTOKININS IN *LAMINARIA JAPONICA*

HUANG Bing-Xin, FAN Xiao, HAN Li-Jun

(Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

Abstract This report comprehensively reports the methods of extraction and purification of cytokinins in *Laminaria japonica*. A series of experiments have been carried out on every key step of the procedure for extraction and purification of cytokinins in *Laminaria japonica*. Initial extraction of plant material is followed by the removal of phenolics and other impurities using a polyvinylpyrrolidone powder (PVPP) column. To purify the sample and simultaneously achieve the separation of the cytokinin nucleotides from the free base, riboside, and glucoside forms, the sample is passed through columns containing PVPP, DE52, and C₁₈, which are linked in series. Following purification, separation of cytokinin glucosides from the bases and ribosides is achieved by using normal phase HPLC with an amine column. Separation of individual cytokinins then occurs during reverse phase C₁₈ HPLC.

Key words *Laminaria japonica*, Cytokinins, Purification, HPLC