

水稻植硅石沉积硅的有机组分研究

马雪泷, 房江育*

(黄山学院 生命与环境科学学院, 中国安徽 黄山 245041)

摘要: 硅是最新确认的植物必需元素, 但硅在高等植物中的沉积机理尚未揭示. 以新鲜水稻茎、叶为材料, 分别采用传统湿法灰化和低温粉碎自然沉降法分离出植硅石, HF 溶液溶解、离心后用 NaOH 等溶液对沉淀物逐级分离、提取, 得到一系列碱性有机物质, 上清液层析脱盐后得到酸性蛋白质; 将各组分分别与硅溶液进行反应. 结果表明传统湿法灰化提取水稻植硅石不含有能够沉淀硅的物质, 低温粉碎自然沉降法提取的植硅石含有两种组分能够诱导形成硅沉淀. 这两种物质分别为来自 HF 提取液中的酸性蛋白和来自 NaOH 提取液的碱性多肽与酚类混合物. 酸性提取液中含有相对分子质量约为 14.4 kD 的蛋白质, 与硅藻沉淀硅的蛋白相对分子质量近似. 不同酸碱度下酸性蛋白对硅的沉积量不同, 以 pH 5 左右诱导量最大.

关键词: 水稻; 植硅石; 蛋白质; 硅沉积

中图分类号: Q946-33; Q946. 91*4

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2011)05-0396-06

Organic Matter in Rice Phytoliths Inducing Silicon Deposition

MA Xue-long, FANG Jiang-yu*

(College of Life and Environmental Sciences, Huangshan University, Huangshan 245041, Anhui, China)

Abstract: Although silicon is the most recently confirmed essential element for plants life, its deposition mechanism in plants has not been understood. Silica phytoliths were isolated from rice leaves and stems with traditional wet ashing or natural precipitation after cryogenic comminution methods, dissolved in HF solution, centrifuged and then separated a series of cell wall matter with NaOH solution to investigate organic constitution and the related chemical properties that could induce silicon deposition. The results showed that silica phytoliths from wet ashing did not contain organic matter capable of inducing silica deposition, but silica phytoliths obtained by natural precipitation contained two components which resulted in the formation of silica particles. One was the mixture of alkaline polypeptide and phenols from NaOH extract, and the other was acidic protein from HF extract, which had a composition of 14.4 kD molecular weight similar to protein in diatom involved in silica deposition. The acidic protein had different induction amount of silica deposition under different pH, with the greatest at about 5.

Key words: rice; phytolith; protein; silica deposition

(Life Science Research, 2011, 15(5): 396~401)

现代植物生理学将硅列为植物必需元素, 认为硅对植物完整的生命周期具有不可替代的作用^[1]. 硅以中性单硅酸 $\text{Si}(\text{OH})_4$ 被植物吸收, 在体内聚合成水合无定形二氧化硅($\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$)^[2]. 最近, 科学

家相继在水稻、玉米、大麦和南瓜中鉴定出硅转运蛋白^[3-8], 由此开始揭示这些植物吸收和转运硅的分子机制. 目前在水稻中发现了 3 个硅转运体, 分别是 Lsi1、Lsi2 和 Lsi6, 属于水孔蛋白家族^[3-5],

收稿日期: 2011-07-13; 修回日期: 2011-08-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30170550); 黄山学院引进博士启动资助项目(2007xkj028)

作者简介: 马雪泷(1963-), 男, 北京市人, 黄山学院副教授, 主要从事细胞生物学研究; * 通讯作者: 房江育(1962-), 女, 江苏溧阳人, 黄山学院教授, 主要从事植物生理生化研究, E-mail: fjy@hsu.edu.cn.

承担水稻根对单硅酸的吸收及其在地上部的转运。Lsi1 和 Lsi2 位于根部, 从土壤中吸收硅进入根中柱, 随蒸腾流通过木质部运往地上; Lsi6 位于叶鞘、叶片和根尖, 位于叶鞘和叶片木质薄壁细胞的 Lsi6 将木质部中的单硅酸转到木质薄壁细胞。这些单硅酸最终在水稻地上部细胞壁中沉积, 形成硅-角质双层或在特殊的细胞中沉积形成硅体细胞^[9]。

然而迄今人们对于硅在水稻地上部的聚合作用还远远不够了解, 更多的信息借鉴于对硅藻中硅沉积的认识。Kröger 等人曾经用无水 HF 将硅藻 *Cylindrotheca fusiformis* 细胞壁完全溶解, 在 HF 提取物中分离出二类蛋白质^[10, 11]。一类蛋白质相对分子质量较大, 称作 HEPs, 位于细胞壁的特殊亚结构中; 另一类是相对分子质量为 4~17 kD 的阳离子多肽, 称为 Siliffins。在离体条件下, 给硅酸溶液加入 Siliffins, 立即形成纳米硅球, 证明 Siliffins 独特的氨基酸序列和结构域能够催化硅酸分子聚合形成硅胶沉淀。此外 Shimizu 等在海绵 *Tethya aurantia* 的生物硅化中取得了进展^[12]。海绵抵御捕食的针形硅化刺中含有一个轴向蛋白丝。当用 HF 将其中的硅溶解后, 可分离纯化出 3 个结构相似的蛋白亚基。这些蛋白亚基能在常温离体条件下将正硅酸乙酯凝聚成二氧化硅。Perry 和 Tucker 则在木贼中发现了与植硅石紧密结合的蛋白质, 认为该蛋白可能是催化木贼中指导硅酸发生聚合的“模板”分子, 因而推测高等植物硅中存在着和硅藻、海绵类似的控制硅沉积的蛋白^[13]。然而一直以来, 为了消除植硅石表面有机物质的污染, 提高植硅石的纯度, 多采用强酸氧化方法即湿灰化法提取植硅石, 很有可能破坏了目标有机物, 所以至今尚未取得有机物质诱导硅沉积的直接证据。

通过自然沉降法从水稻中提取的植硅石表面含有较多的有机物, 尽管纯度有所下降, 但或许正是这些有机物质能够直接诱导硅的沉积。我们在植硅石有机组成及其价态分析试验等研究已经显示出有这方面的迹象^[14]。此外, 在过去的试验中, 用 HF 缓冲液去除硅后往往只保留离心后的沉淀物进行研究, 而 HF 提取液总是被当作废物丢弃。然而从硅藻蛋白 siliffins 的作用来看, 探测 HF 提取液中的有机组分应该是十分有意义的。至少这部分有机物与硅之间具有非常紧密的结合。本试验对水稻湿法灰化植硅石和自然沉降植硅石分别

进行了有机物的分级、分离, 并逐级进行了硅沉积诱导试验, 旨在找到能够诱导硅在水稻中发生生物矿化的有机化学物质。在做硅沉积诱导试验时, 除使用显微技术检测外, 硝酸纤维素膜(Nitrocellulose membrane, NCM) 由于价格便宜, 能提供非特异位点, 容易封闭, 可以消除溶液中盐的影响等优点而用于微量反应的定性和半定量分析检测中。

1 材料与方法

1.1 水稻植硅石的分离与提取

1.1.1 湿法灰化提取植硅石

将水稻新鲜茎、叶洗净, 风干, 粉碎。在通风橱中配置酸液, 含浓硝酸:浓硫酸=4:1。按 0.5 g 样加 5 mL 酸液比例, 在振荡瓶中加入粉碎干样 14 g, 140 mL 酸液分 6 次加入, 前 4 次每次 10 mL, 待黄烟消失后加入下次。第 5 次加进 20 mL, 第 6 次将剩余酸液全部倾入。放入 60~70 °C 水浴中 30 h 后取出, 室温下放置 20 h。以 $\leq 3\ 500$ r/min 低速离心 3 min, 弃去酸液, 用水离心洗涤 8 次。用玻璃棒在蒸馏水中充分搅拌后自然沉淀, 虹吸管吸出水, 反复操作, 直至沉淀变为白色粉末, 用光学显微镜检查纯度。将纯净的植硅石保存于冰箱中。

1.1.2 低温粉碎自然沉降法提取植硅石

水稻新鲜茎、叶洗净, 晾干, 剪碎后冷冻。按 1:5(V:V)加入提取液(50 mmol/L pH 7.2 Tris-HCl, 0.5%~1% Triton X-100)。用高速组织捣碎机(79219 Staufen, 德国制造)在 8 000~9 500 r/min 下破碎细胞, 2 层纱布过滤。弃残渣, 用 0.5%~1% Triton X-100 漂洗滤液数次直至漂浮物(叶绿体、淀粉粒、线粒体、几丁质等)消失^[15]。过 110 μm 筛得到粗植硅石, 反复用水洗涤和自然沉降, 过 40~50 μm 筛得到纯植硅石。在光学显微镜下检查植硅石的纯度。纯净植硅石干燥后保存在含 P₂O₅ 和硅胶的干燥器中。

1.2 植硅石有机物的分离提取

按照 1 g 植硅石加入 500 mL 2% HF 溶液(溶解于 3% NH₄F 中, 起缓冲作用)量浸泡植硅石。在恒温摇床上 4 °C、80 r/min 下振动 60 h。离心(4 °C, 21 000×g, 60 min), 得到 HF 提取液(清液)和植硅石有机混合物(沉淀)。沉淀物在相同离心条件下用 1 mmol/L HCl 洗 2 次, 水洗 3 次, 保存于干燥器中。

根据水稻植硅石中有机物及其价态的研究结

果^[4], 以及植硅石沉积于细胞壁的基本事实, 假设植硅石中含有纤维素、半纤维素、脂类、酚酸、酚类和蛋白质. 综合 Hartmut 等^[6]、Sun^[7]酚酸和酚类提取技术以及常规生物化学分离、纯化方法将各类有机成分逐步分离和提取(图 1). 在有机混合物中加进 10 mL 1 mmol/L NaOH 20 h. 期间将反应烧杯置于暗箱中冲进 N₂ 气以赶走 O₂ 气, 防止氧化. 将 pH 调至 5.5, 在 17 000×g 离心力下离心 30 min, 得到沉淀, 为纤维素. 用 pH 5.5 的 H₂O 洗涤沉淀, 离心, 合并 2 次上清液, 测得 pH 为 6.1. 用 1 mmol/L HCl 调 pH 到 5.5, 加入无水乙醇 (占总体积 40%). 静置 2 h 后离心, 沉淀为半纤维素. 用 40%乙醇(溶于 pH 5.5 的 H₂O 中)洗涤沉淀. 合并 2 次上清液, 在真空离心浓缩仪中浓缩至 15 mL 左右. 将 pH 调至 2.5, 在分液漏斗与等体积正己烷充分混合. 上层为脂类物质. 萃取 2 次, 脂类物质真空浓缩, 保存于适量丙酮中. 分液漏斗内下层液体与等体积乙酸乙酯混合, 上层为酚酸. 萃取 2 次, 酚酸真空浓缩, 溶于适量甲醇中保存. 分液漏斗下层液体离心, 沉淀为酚类. 用 pH 2.5 的 H₂O 洗涤酚类沉淀、离心 3 次, 保留在冰箱中. 合并上清液, 在通风橱中蒸发干燥后溶于 1 mol/L NaOH, 调 pH 至 5.7, 柱层析脱盐, 得到碱性肽或(和)蛋白质. 层析柱选用葡聚糖凝胶 G-10, 乙酸铵 (pH 6.8)作洗脱液, 液体流速 0.5 mL/min. 用 0.025 mol/L AgNO₃ 检测 Cl⁻ 的出现.

将 HF 提取液在通风橱中蒸发干燥, 溶解于适量 8 mol/L HCl 中, 通过 Sephadex G25 凝胶过滤层析脱盐, 得到酸性蛋白质(如果存在).

通过光谱扫描、蛋白质染色、多胺染色和电泳等进一步确认目标物组分.

1.3 有机组分对硅沉淀的诱导

1.3.1 有机质与硅反应的染色显微观察

将 0.1 mol/L pH 6.4 磷酸缓冲液与乙醇按 4:1 混合, 按照 1 mg 有机物加进 1 mL 混合液量依次加入各有机组分中, 超声波处理 0.5 h 后再用恒温磁力搅拌器搅拌均匀.

用 0.1 mol/L pH 6.4 磷酸缓冲液配制 10 mmol/L Na₂SiO₃ 溶液, 用 1 mol/L HCl 调节 pH 至 6.4. 按照 1:1 比例将此 Na₂SiO₃ 溶液分别和各有机质溶液在微型漩涡混合仪上充分混合, 同时设各有机质在缓冲液中的反应作对照. 10 h 后在 17 000×g 离心力下离心 30 min 并用蒸馏 H₂O 洗涤沉淀 2 次.

离心管底部沉淀在少量蒸馏 H₂O 中搅起, 吸取少许滴在载玻片上, 晾干, 用溶于二甲苯的 1% 甲基红染色数次(每次干后再染下次), 树脂(溶于二甲苯)封片后在显微镜下观察. 根据 Dayanandan 等^[8], 含硅的样品被染上红色.

1.3.2 硅酸的制备

采用离子交换层析技术制备硅酸, 阳离子交换树脂为购自中国医药(集团)上海化学试剂公司生产的强酸性苯乙烯阳离子交换树脂(湿计). 连续活化树脂、交换两次. 将树脂活化后不断清洗直至 pH 5.3 时装柱、上样交换. 以比色法测硅中的钼酸铵(0.5%)作检测硅酸出现的显色剂(生成硅钼黄). 测得硅出现时的初始 300 mL 溶液 pH 为 7.3, 再连续收集 7 L, pH 约为 4.6, 上 ICP 测定其中硅和钠的浓度.

1.3.3 NCM 上有机质与硅的沉淀反应

分别将各有机组分溶液滴在 NCM 上, 晾干后投入 1:4 缓冲液(0.1 mol/L pH 5.5 柠檬酸-磷酸缓冲液)中多次, 洗去盐分, 再投入 44 mmol/L 硅酸溶液中 1 h, 在 1:4 缓冲液中浸泡 10 min, 充分淋洗. 蒸馏水中浸泡 10 min, 充分淋洗, 晾干. 1% 甲基红染液中浸泡 10 min, 二甲苯中脱色、拍照.

对 HF 提取的酸性蛋白重复上述步骤, 分别以梯度 pH 的柠檬酸-磷酸缓冲液与硅酸的混合液浸泡、淋洗、晾干、染色、脱色、拍照.

1.4 电子显微镜和 X-射线能谱观察

将 HF 提取物与硅酸反应后的沉积物滴到铜网上, 室温干燥后用透射电镜观察沉淀物的形态, 用 X-射线能谱仪检测沉淀物的元素组成.

2 结果与分析

2.1 有效沉积硅的植硅石提取方法选择

显微观察与 NCM 结果完全一致. 在两种植硅石提取法中, 湿灰化植硅石有机物没有硅沉积反应; 自然沉降植硅石含有能够沉积硅的有机物. 因此进行硅的生物矿化研究时应该采用自然沉降技术提取植硅石.

2.2 植硅石中有效沉积硅的有机组分筛选及其化学性质鉴定

显微观察与 NCM 结果均显示, 在植硅石各类有机组分中, 有两种组分, 分别是来自于 HF 提取液的酸性蛋白质以及从有机混合物中分离得到的碱性蛋白质能够与硅液产生反应, 诱导其中的硅发生沉淀, 这种含硅的沉淀物与甲基红作用后

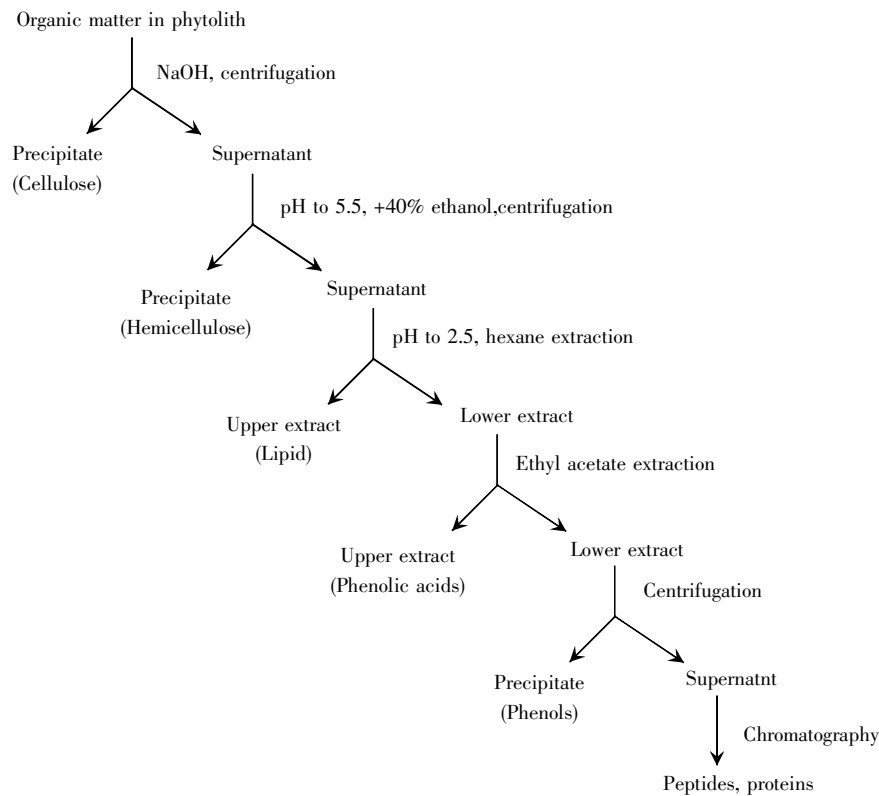


图 1 植硅石各类有机成分的分离及提取步骤

Fig.1 Scheme for extract and isolation of the organic compositions from silica phytoliths

被特异染上红色(图 2), 而细胞壁中的纤维素、半纤维素、脂类、酚酸等其它组分没有沉积硅的作用。

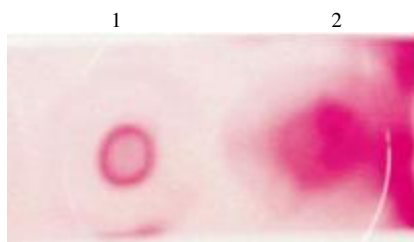


图 2 NCM 上 HF 提取物(1)和 NaOH 提取物(2)对硅的沉积

Fig.2 Extracts of HF (1) and NaOH (2) inducing SiO₂ deposition on NCM

X-射线能谱检测 HF 提取物与硅酸反应后结果, 显示沉积物中含有大量硅元素 (图 3)。电镜观察沉淀物为大量的球形颗粒(图 4)。

为了进一步确认诱导硅沉积的有机质的化学成分及其性质, 对碱性蛋白质和酸性蛋白质进行了可见-紫外光谱扫描和蛋白质染色检测; 此外对酸性蛋白质还进行了多胺染色检测和电泳分析。光谱扫描采用岛津 UV-2201 记录式分光光度计 (UV-2201 UV-Vis Recording Spectrophotometer) 对

样品在 190~800 nm 范围内摄谱。结果显示碱性蛋白质样品有两个吸收峰, 分别位于 210、310 nm, 说明样品中含有肽和未除净的酚类物质; 酸性蛋白质样品也有两个吸收峰, 分别在 210、260 nm 处, 表明样品中含有肽和蛋白质。

蛋白质染色检测得到了与光谱扫描一致的结果。检测前需要先沉淀样品中的蛋白质。按照 Bensadon 和 Weinsezn 的方法^[9], 以 3:0.025 的比例 (样品: 2%脱氧胆酸钠, V:V) 分别将两种蛋白质加进脱氧胆酸钠溶液中, 在微型漩涡混合仪上充分混合 15 min, 加进 1/4 样品体积的 24%三氯乙酸, 混合后在冰箱的冷冻室中放置 15 min, 17 000×g 下离心 30 min, 沉淀物即为蛋白质。蛋白质染色检测参照汪家政方法^[20]进行。在 NCM 上点样 2~3 次(每次 2 μL), 晾干。将 NCM 在氨基黑 10B 染色液(0.1%氨基黑 10B, 25%异丙醇, 10%乙酸)中浸 1 min, 再在氨基黑 10B 脱色液(25%异丙醇, 10/5 乙酸)中浸 30 min。以 BSA(牛血清蛋白质)为标样。结果显示碱性样品不被染色, 表明不含蛋白质, 酸性样品被染成蓝色, 表明含有蛋白质(图 5)。

酸性蛋白质样品中多胺的检测如下: 在 NCM 上点样 2~3 次 (每次 2 μL), 晾干。选择亚精胺作标

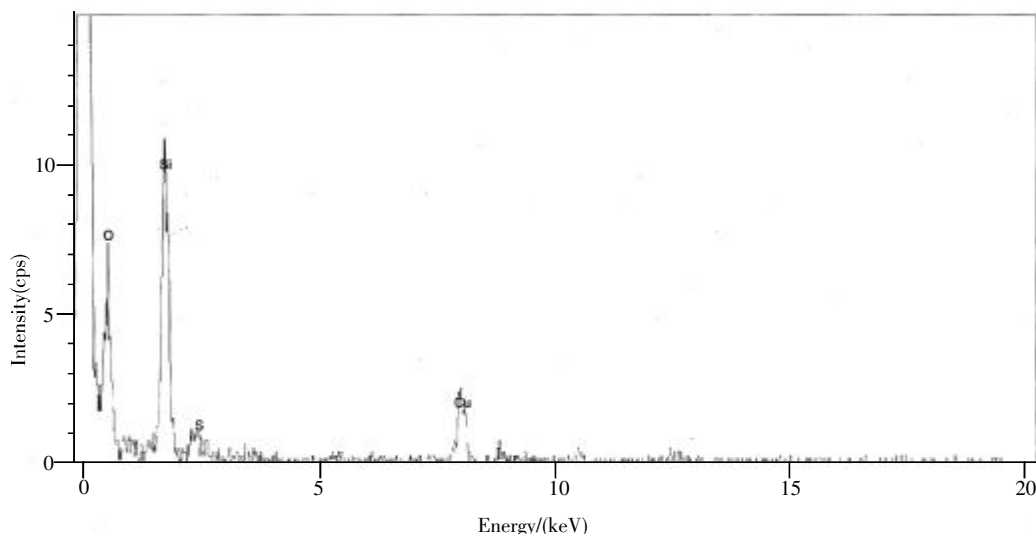


图3 X-射线能谱检测沉淀物含有硅
Fig.3 Silicon detection of the precipitation by energy dispersive X-ray analysis



图4 HF 提取物与硅酸反应形成的颗粒状硅沉淀(×1 000)
Fig.4 Particles of silica precipitation from reaction of HF extract and silicic acid (×1 000)



图6 HF 提取物中多胺的检测
1: HF 提取物; 2: 亚精胺(标样).
Fig.6 Polyamine detecting in HF extract
1: HF extract; 2: Spermidine (standard sample).



图5 氨基黑 10B 检测 HF 提取物中的蛋白质
1: HF 提取物; 2: BSA(标样).
Fig.5 Protein detecting in HF extract by ammonia black 10B
1: HF extract; 2: BSA(Standard sample).

样. 将点有样品的 NCM 放入 2 mol/L NH₄SCN 和 200 mmol/L CoCl₂ 等量混合溶液中, 含胺者显示蓝圈. 结果表明酸性蛋白质样品中含有多胺(图 6).

综合分析图 2、图 5 和图 6 发现, 酸性蛋白质点在 NCM 上后, 样品自然扩散成外圈和中心点两部分. 外圈为多胺, 中心则是蛋白质. 被染成红色的硅沉积部位位于中心点, 与染成蓝色的蛋白

质存在部位相当吻合, 而含有多胺的蓝色外圈中没有硅沉积, 因此推测能够促进水稻植硅石中硅沉积的有机物质应该为酸性蛋白质.

为了初步了解 HF 提取物是否含有与硅藻蛋白相似相对分子质量的蛋白质, 对该样品进行尿素-SDS 凝胶电泳. 电泳时采用浓缩胶 5.0%, 分离胶 8%. 完成后将凝胶在 0.25%考马斯亮蓝 R-250 酸甲醇水中固定并染色 45 min, 脱色后拍照. 结果如图 7 所示, 出现了相对分子质量接近于 14.4 kD 的酸性蛋白质.

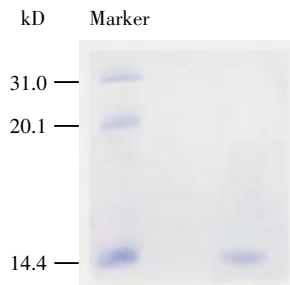


图7 酸性蛋白的尿素-SDS 凝胶电泳分析
Fig.7 SDS-PAGE of acidic proteins

酸性蛋白质诱导沉积的硅量在不同 pH 下也不相同(图8)。可以看出,这种沉淀的适宜 pH 值在 4.2 到 6.4 之间。偏酸或者偏碱都不利于硅的有效沉积。



图8 在不同 pH 下酸性蛋白对硅的沉积
从左至右 pH 值为: 3.2、4.2、5.2、6.4、7.2。

Fig.8 Effect of pH value on the amount of silica deposition induced by HF extract

pH from left to right: 3.2, 4.2, 5.2, 6.4, 7.2.

3 讨论

采用自然沉降法分离植硅石,从高等植物水稻中提取出能够催化硅酸聚合沉淀的两组有机化合物,它们分别是 HF 提取液中的酸性蛋白质和能够溶解于 NaOH 的肽与酚的混合物。证明了只有新鲜的植硅石才含有能够结合硅、诱导硅沉积的蛋白质,传统的湿灰化方法中强酸氧化分解了具有活性的蛋白质,因此无法进行硅沉积的机理研究。

HF 提取液中诱导硅沉积的酸性蛋白质相对分子质量大约为 14.4 kD。根据 Iler^[21]的研究, pH 在 3~6 之间,无定型 SiO₂ 的溶解度随 pH 升高而升高,而在 pH 7~8 之间溶解度最小。这也就是说在 pH 3~6 之间 pH 越高,硅的沉积量越小,而在 pH 7.2 时硅的沉积量最大。然而本试验完全不遵照这个规律, pH 4.2 的硅沉积量明显大于 pH 3.4 的沉积量,最大的沉积发生在 pH 为 4~6.5 的生理中性条件下, pH 7.2 时硅的沉积呈减少趋势。这表明水稻酸性蛋白质对硅沉积具有生物调节作用。

根据高等植物硅的生物矿化特点,我们曾假设水稻中硅的沉积与多酚聚合反应形成木质有关。这一假设得到了体外模拟结果的支持^[22]。本次试验则从水稻中分离得到了能够催化硅酸聚合的酚类物质和肽的混合物,而在此之前分离出的单纯的酚类并不能诱导硅沉积。这表明只有在活性肽存在下,酚类才能诱导硅沉积,也从另一方面证实了之前体外模拟结果在体内的可能性。

参考文献(References):

- [1] LINCOLN T, EDUARDO Z. Plant Physiology (Fifth Edition)[M]. Sunderland: Sinauer Associates Incorporated Publishers, 2010. 108.
- [2] HEATHER A C, CAROLE C P. Silica in plants: biological,

- biochemical and chemical studies[J]. Annals of Botany, 2007, 100(7): 1383-1389.
- [3] MA J F, TAMAI K, YAMAJI N, *et al.* A silicon transporter in rice[J]. Nature, 2006, 440(7084): 688-691.
- [4] MA J F, YAMAJI N, MITANI N, *et al.* An efflux transporter of silicon in rice[J]. Nature, 2007, 448(7150): 209-212.
- [5] YAMAJI N, MITANI N, MA J F. A transporter regulating silicon distribution in rice shoots[J]. Plant Cell, 2008, 20(5): 1381-1389.
- [6] MITANI N, YAMAJI N, MA J. Identification of maize silicon influx transporters[J]. Plant and Cell Physiology, 2009, 50(1): 5-12.
- [7] CHIBA Y, MIYANO N, YAMAJI N, *et al.* HvLsi1 is a silicon influx transporter in barley[J]. Plant Journal, 2009, 57(5): 810-818.
- [8] MITANI N, YAMAJI N, AGO Y, *et al.* Isolation and functional characterization of an influx silicon transporter in two pumpkin cultivars contrasting in silicon accumulation[J]. Plant Journal, 2011, 66(2): 231-240.
- [9] MA J F, YAMAJI N. Silicon uptake and accumulation in higher plants[J]. Trends in Plant Science, 2006, 11(8): 392-397.
- [10] KRÖGER N, DEUTZMANN R, SUMPER M. Polycationic peptides from diatom biosilica that direct silica nanospheres formation[J]. Science, 1999, 286(5442): 1129-1132.
- [11] KRÖGER N, LORENZ S, BRUNNER E, *et al.* Self-assembly of highly phosphorylated silaffins[J]. Science, 2002, 298(5593): 584-586.
- [12] SHIMIZU K, CHA J, STUCKY G D, *et al.* Silicatein α : cathespin L-like protein in sponge biosilica[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, 1998, 95(11): 6234-6238.
- [13] PERRY C C, TUCKER T K. Model studies of colloidal silica precipitation using biosilica extracts from Equisetum telmateia[J]. Colloid and Polymer Science, 2003, 281(7): 652-664.
- [14] 房江育, 马雪泷. 水稻叶片硅体与稻壳硅体的物相和光学性质比较[J]. 激光生物学报(FANG Jiang-yu, MA Xue-long. Phase and optical property comparison of silica bodies in rice between the leaf and the husk[J]. Acta Laser Biology Sinica), 2006, 15(3): 241-244.
- [15] 中山大学生物系生化微生物学教研室. 生化技术导论[M]. 北京: 人民教育出版社 (Biochemical and Microbial Staff Room of Biology Department of Sun Yet-Sen University. Introduction to Biochemical Technique[M]. Beijing: People's Education Press), 1979. 90.
- [16] LICHTENTHALER H K, SCHWEIGER J. Cell wall bound ferulic acid, the major substance of the blue-green fluorescence emission of plants[J]. Journal of Plant Physiology, 1998, 152(2): 272-282.
- [17] SUN S, MURRAY C B, WELLER D, *et al.* Monodisperse FePt nanoparticles and ferromagnetic FePt nanocrystal superlattices[J]. Science, 2000, 287(5460): 1989-1992.
- [18] DAYANANDAN P, KAUFMAN P B, FRANKLIN C I. Detection of silica in plants[J]. American Journal of Botany, 1983, 70(7): 1079-1084.
- [19] BENSADOUN A, WEINSTEIN D. Assay of protein in the presence of interfering materials[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 70(1): 241-250.
- [20] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社(WANG Jia-zheng, FAN Ming. Protein Technical Manual [M]. Beijing: Science Press), 2001. 43-47.
- [21] ILER R K. The Chemistry of Silica: Solubility, Polymerization, Colloid and Surface Properties, and Biochemistry[M]. New York: John Wiley, 1979. 41-43.
- [22] FANG J, WANG H, CHEN Y, *et al.* Silicon nanospheres formation induced by peroxidase-catalyzed phenol polymerization[J]. Progress in Natural Science, 2003, 13(7): 501-504.