



(21) 申请号 202211101538.2

(22) 申请日 2022.09.09

(71) 申请人 中国科学院地球化学研究所

地址 550081 贵州省贵阳市观山湖区林城  
西路99号

(72) 发明人 程建中 江明华 李心清 章同坤  
李欢 胡维

(74) 专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569  
专利代理师 黄明光

(51) Int. Cl.

A01G 31/00 (2018.01)

A01G 7/06 (2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

(54) 发明名称

一种碳同位素标记物及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明属于同位素标记技术领域,具体涉及一种碳同位素标记物及制备方法和应用。本发明提供的碳同位素标记物的制备方法,包括以下步骤:将植株移栽至营养液培养,得到营养液培养植株;将所述营养液培养植株进行饥饿处理后依次进行标记培养和自然培养;所述标记培养为将饥饿处理后的植株置于 $^{13}\text{CO}_2$ 气氛中进行标记光合作用;所述自然标记为将标记培养后的植株置于空气气氛中进行自然光合作用;重复饥饿处理、标记培养和自然培养的步骤,得到碳同位素标记物。将植株移栽到营养液中避免土壤呼吸作用对植株吸收 $^{13}\text{CO}_2$ 的不利影响;进行饥饿处理能够保证标记培养过程最大限度的利用 $^{13}\text{CO}_2$ ;本发明能够制备得到高 $^{13}\text{C}$ 丰度的碳同位素标记物。

1. 一种碳同位素标记物的制备方法,包括以下步骤:  
将植株移栽至营养液培养,得到营养液培养植株;  
将所述营养液培养植株进行饥饿处理后依次进行标记培养和自然培养;所述标记培养为将饥饿处理后的植株置于 $^{13}\text{CO}_2$ 气氛中进行标记光合作用;所述自然标记为将标记培养后的植株置于空气气氛中进行自然光合作用;  
重复饥饿处理、标记培养和自然培养的步骤,得到碳同位素标记物。
2. 根据权利要求1所述制备方法,其特征在于,单次饥饿处理的时间为20~40min。
3. 根据权利要求1所述制备方法,其特征在于,标记光合作用的时间为1~3天。
4. 根据权利要求1所述制备方法,其特征在于,自然光合作用的时间为2~3天。
5. 根据权利要求1~4任一项所述制备方法,其特征在于,所述重复的次数为4~5次。
6. 根据权利要求1所述制备方法,其特征在于,所述营养液包括霍格兰营养液。
7. 按照权利要求1~6任一项所述制备方法制备得到的碳同位素标记物,所述碳同位素标记物中碳同位素为 $^{13}\text{C}$ , $^{13}\text{C}$ 的丰度为7000~15000‰。
8. 权利要求7所述碳同位素标记物在制备不同 $^{13}\text{C}$ 丰度标记物中的应用。
9. 根据权利要求8所述应用,其特征在于,制备不同 $^{13}\text{C}$ 丰度标记物的方法包括以下步骤:  
将所述碳同位素标记物和未标记的植株物理混合,得到不同 $^{13}\text{C}$ 丰度标记物。
10. 根据权利要求9所述应用,其特征在于,所述混合前还包括将碳同位素标记物和未标记的植株分别进行干燥;  
所述干燥的温度为40~60℃,所述干燥的时间为24~48h。

## 一种碳同位素标记物及其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于同位素标记技术领域,具体涉及一种碳同位素标记物及其制备方法和应用。

### 背景技术

[0002] 碳同位素标记与示踪技术是研究光合碳在植物、土壤和微生物之间的循环和转化的重要手段。 $^{13}\text{C}$ 稳定同位素由于不具有放射性,可安全进行试验与检测,已被广泛应用于碳的生物地球化学过程研究中。目前,制备碳同位素标记物的方法主要有 $^{13}\text{C}$ 自然丰度法、脉冲标记、连续标记。但是现有的方法得到的碳同位素标记物的碳同位素丰度比较低, $\delta^{13}\text{C}$ 值大多在50‰,大大限制了碳同位素标记物的应用。

### 发明内容

[0003] 有鉴于此,本发明提供了一种碳同位素标记物及其制备方法和应用,按照本发明提供的制备方法能够制备得到高 $^{13}\text{C}$ 丰度的碳同位素标记物。

[0004] 为了解决上述技术问题,本发明提供了一种碳同位素标记物的制备方法,包括以下步骤:

[0005] 将植株移栽至营养液培养,得到营养液培养植株;

[0006] 将所述营养液培养植株进行饥饿处理后依次进行标记培养和自然培养;所述标记培养为将饥饿处理后的植株置于 $^{13}\text{CO}_2$ 气氛中进行标记光合作用;所述自然标记为将标记培养后的植株置于空气气氛中进行自然光合作用;

[0007] 重复饥饿处理、标记培养和自然培养的步骤,得到碳同位素标记物。

[0008] 优选的,单次饥饿处理的时间为20~40min。

[0009] 优选的,标记光合作用的时间为1~3天。

[0010] 优选的,自然光合作用的时间为2~3天。

[0011] 优选的,所述重复的次数为4~5次。

[0012] 优选的,所述营养液包括霍格兰营养液。

[0013] 本发明还提供了上述技术方案所述制备方法制备得到的碳同位素标记物,所述碳同位素标记物中碳同位素为 $^{13}\text{C}$ , $^{13}\text{C}$ 的丰度为7000~15000‰。

[0014] 本发明还提供了上述技术方案所述碳同位素标记物在制备不同 $^{13}\text{C}$ 丰度标记物中的应用。

[0015] 优选的,制备不同 $^{13}\text{C}$ 丰度标记物的方法包括以下步骤:

[0016] 将所述碳同位素标记物和未标记的植株物理混合,得到不同 $^{13}\text{C}$ 丰度标记物。

[0017] 优选的,所述混合前还包括将碳同位素标记物和未标记的植株分别进行干燥;

[0018] 所述干燥的温度为40~60℃,所述干燥的时间为24~48h。

[0019] 本发明提供了一种碳同位素标记物的制备方法,包括以下步骤:将植株移栽至营养液培养,得到营养液培养植株;将所述营养液培养植株进行饥饿处理后依次进行标记培

养和自然培养;所述标记培养为将饥饿处理后的植株置于 $^{13}\text{CO}_2$ 气氛中进行标记光合作用;所述自然标记为将标记培养后的植株置于空气气氛中进行自然光合作用;重复饥饿处理、标记培养和自然培养的步骤,得到碳同位素标记物。本发明将植株移栽到营养液中能够避免土壤呼吸作用产生的 $^{12}\text{CO}_2$ 对植株吸收 $^{13}\text{CO}_2$ 产生不利的影响,从而提高 $^{13}\text{C}$ 同化效率;本发明在标记培养前进行饥饿处理能够保证标记培养过程最大限度的利用 $^{13}\text{CO}_2$ 提高植株中 $^{13}\text{C}$ 丰度。按照本发明的制备方法能够制备得到高 $^{13}\text{C}$ 丰度的碳同位素标记物。

### 具体实施方式

[0020] 本发明提供了一种碳同位素标记物的制备方法,包括以下步骤:

[0021] 将植株移栽至营养液培养,得到营养液培养植株;

[0022] 将所述营养液培养植株进行饥饿处理后依次进行标记培养和自然培养;所述标记培养为将饥饿处理后的植株置于 $^{13}\text{CO}_2$ 气氛中进行标记光合作用;所述自然标记为将标记培养后的植株置于空气气氛中进行自然光合作用;

[0023] 重复饥饿处理、标记培养和自然培养的步骤,得到碳同位素标记物。

[0024] 本发明将植株移栽至营养液培养,得到营养液培养植株。在本发明中,所述营养液优选包括霍格兰营养液。在本发明中,所述植株优选包括烟草、玉米或水稻,更优选为烟草。本发明对所述移栽的方式无特殊要求,采用本领域常规的方式即可。本发明将植株移栽至营养液中培养能够避免土壤呼吸作用产生的 $^{12}\text{CO}_2$ 被植株利用降低 $^{13}\text{C}$ 的丰度。

[0025] 得到营养液培养植株后,本发明将所述营养液培养植株进行饥饿处理后依次进行标记培养和自然培养;所述标记培养为将饥饿处理后的植株置于 $^{13}\text{CO}_2$ 气氛中进行标记光合作用;所述自然标记为将标记培养后的植株置于空气气氛中进行自然光合作用。在本发明中,所述饥饿处理优选包括以下步骤:

[0026] 将营养液培养植株置于透明密封箱后在真空条件下进行饥饿光合作用。

[0027] 在本发明中,所述透明密封箱顶端优选设置排气口,所述透明密封箱侧面优选设置进气口。本发明对所述透明密封箱的形状和尺寸无特殊要求,只要能够使植株处于透明密封箱中即可。在本发明的实施例中,所述透明密封箱优选为长度为50cm,宽度为30cm,高度为40cm的长方体。在本发明中,所述真空条件的真空度优选为-0.01~-0.05Mpa,更优选为-0.02~-0.03Mpa。本发明优选利用真空泵由所述排气口抽取透明密封箱中空气形成真空条件。在本发明中,所述饥饿光合作用的时间优选为20~40min,更优选为20~30min。在本发明中,单次饥饿处理的时间与饥饿光合作用的时间一致。

[0028] 本发明经过饥饿处理能够最大限度的消耗透明密封箱空气中的二氧化碳,促使标记培养时最大限度的利用 $^{13}\text{CO}_2$ 。

[0029] 在本发明中,所述标记培养优选为由所述进气口向真空条件的透明密封箱中注入 $^{13}\text{CO}_2$ ,进行标记光合作用。本发明对所述 $^{13}\text{CO}_2$ 的注入量无特殊限定,只要能够满足植株的光合作用即可。在本发明的实施例中,所述 $^{13}\text{CO}_2$ 的注入量优选为200~2000mL,更优选为300~1000mL。在本发明中,所述标记光合作用的时间优选为1~3天,更优选为2~2.5天。在本发明中,单次标记培养的时间优选与标记光合作用的时间一致。

[0030] 本发明经过标记培养能够通过标记光合作用使植株吸收 $^{13}\text{CO}_2$ 从而使 $^{13}\text{C}$ 在植株中富集,得到高丰度 $^{13}\text{C}$ 同位素标记物。

[0031] 在本发明中,所述自然培养优选为将标记培养后植株置于空气中进行自然光合作用;本发明优选将标记培养后的植株由透明密封箱移除置于空气气氛中。在本发明中,所述自然光合作用的时间优选为2~3天,更优选为2~2.5天。在本发明中,单次自然培养的时间与自然光合作用的时间一致。本发明在标记培养后进行自然培养的目的是为了让植物能充分利用CO<sub>2</sub>进行生长,增加标记物生物量。

[0032] 本发明重复饥饿处理、标记培养和自然培养的步骤,得到碳同位素标记物。在本发明中,所述重复的次数优选为4~5次,更优选为5次。

[0033] 本发明还提供了上述技术方案所述制备方法制备得到的碳同位素标记物,所述碳同位素标记物中碳同位素为<sup>13</sup>C,<sup>13</sup>C的丰度为7000~15000‰,优选为8000~12000‰。

[0034] 本发明还提供了上述技术方案所述碳同位素标记物在制备不同<sup>13</sup>C丰度标记物中的应用。

[0035] 在本发明中,所述制备不同<sup>13</sup>C丰度标记物的方法优选包括以下步骤:

[0036] 将所述碳同位素标记物和未标记的植株物理混合,得到不同<sup>13</sup>C丰度标记物。

[0037] 在本发明中,所述混合前还优选包括将碳同位素标记物和未标记的植株分别进行干燥。在本发明中,干燥所述碳同位素标记物的温度优选为40~60℃,更优选为45~50℃;干燥所述碳同位素标记物的时间优选为24~48h,更优选为30~40h。在本发明中,干燥所述未标记的植株的温度优选为40~60℃,更优选为45~50℃;干燥所述未标记的植株的时间优选为24~48h,更优选为30~40h。

[0038] 在本发明中,干燥后碳同位素标记物和干燥后未标记的植株的质量比优选根据如式1所示公式算得到:

$$[0039] \quad \delta = \frac{m_1 \times \delta_1 + m_2 \times \delta_2}{m_1 + m_2} \quad \text{式 1};$$

[0040] 其中, $\delta$ 为所需碳同位素标记物中<sup>13</sup>C的丰度, $m_1$ 为干燥后碳同位素标记物的质量, $\delta_1$ 为干燥后碳同位素标记物中<sup>13</sup>C丰度, $m_2$ 为干燥后未标记的植株的质量, $\delta_2$ 为干燥后未标记的植株中<sup>13</sup>C丰度。

[0041] 在本发明中,本发明对所述混合无特殊限定,只要能够使碳同位素标记物和未标记的植株物理混合均匀即可。

[0042] 在本发明中,所述混合后还优选包括:将混合后植株破碎后过筛,得到不同<sup>13</sup>C丰度标记物。本发明对所述破碎无特殊要求采用本领域常规的破碎方式即可。在本发明中,所述过筛用筛网的孔径优选为40~80目,更优选为60目。

[0043] 按照本发明的方法能够准确的得到任意<sup>13</sup>C丰度的碳同位素标记物。

[0044] 为了进一步说明本发明,下面结合实施例对本发明提供的技术方案进行详细地描述,但不能将它们理解为对本发明保护范围的限定。

[0045] 制备高<sup>13</sup>C丰度的碳同位素标记物

[0046] 实施例1

[0047] 将烟草幼苗移植于霍格兰(Hoagland's)营养液中,然后将其置于一个长为50cm,宽为30cm,高为40cm的透明玻璃密箱中,利用真空泵由排气口抽取透明密封箱中空气使透明密封箱中真空度为-0.02Mpa形成真空条件;将烟草幼苗在真空条件下进行30min饥饿光合作用;饥饿光合作用后由进气口向透明密封箱中通入500mL<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>气体进行2天标记光合作用

用;将标记光合作用后的植株从透明密封箱中取出置于空气中进行2.5天自然光合作用;重复饥饿光合作用、标记光合作用和自然光合作用的步骤5次,得到 $^{13}\text{C}$ 丰度为10526.35‰的碳同位素标记物。

[0048] 实施例2

[0049] 按照实施例1的方法制备得到高 $^{13}\text{C}$ 丰度的碳同位素标记物,不同之处参照表1中的条件参数;实施例2得到 $^{13}\text{C}$ 标记物中 $^{13}\text{C}$ 丰度为8103.24‰。

[0050] 表1实施例1、2制备碳同位素标记物的条件参数

实施例	真空度 (MPa)	饥饿处理 时间 (min)	$^{13}\text{CO}_2$ 体 积 (mL)	标记光合 作用时间 (天)	自然光合 作用时间 (天)	重复 次数 (次)
实施例 1	-0.02	30	500	2	2.5	5
实施例 2	-0.03	20	300	1	3	4

[0052] 制备不同 $^{13}\text{C}$ 丰度的碳同位素标记物

[0053] 实施例3

[0054] 利用同位素质谱仪MAT252检测未标记烟草中 $^{13}\text{C}$ 丰度为-23.78‰,标准样品为PDB国际通用标准(Pee Dee Belemnite标准)。

[0055] 将实施例1制备得到的 $^{13}\text{C}$ 标记的烟草50℃干燥40h,得到干燥 $^{13}\text{C}$ 标记烟草( $^{13}\text{C}$ 丰度为10526.35‰);将未标记烟草50℃干燥40h,得到干燥未标记烟草( $^{13}\text{C}$ 丰度为-23.78‰);

[0056] 将干燥 $^{13}\text{C}$ 标记烟草和干燥未标记烟草混合、研磨后过60目筛,得到不同丰度的 $^{13}\text{C}$ 标记物;其中,实施例1中干燥 $^{13}\text{C}$ 标记烟草和干燥未标记烟草的质量比为1:60。

[0057] 实施例4

[0058] 利用同位素质谱仪MAT252检测未标记烟草中 $^{13}\text{C}$ 丰度为-23.78‰,标准样品为PDB国际通用标准(Pee Dee Belemnite标准)。

[0059] 将实施例1制备得到的 $^{13}\text{C}$ 标记的烟草50℃干燥40h,得到干燥 $^{13}\text{C}$ 标记烟草;将未标记烟草50℃干燥40h,得到干燥未标记烟草;

[0060] 将干燥 $^{13}\text{C}$ 标记烟草和干燥未标记烟草混合、研磨后过60目筛,得到不同丰度的 $^{13}\text{C}$ 标记物;其中,实施例1中干燥 $^{13}\text{C}$ 标记烟草和干燥未标记烟草的质量比为1:120。

[0061] 利用同位素质谱仪MAT252、pH计和元素分析仪(Elementar vario MACRO cube)检测实施例3、4得到的 $^{13}\text{C}$ 标记物中 $^{13}\text{C}$ 丰度( $\delta^{13}\text{C}$ )、pH值、有机碳(OC)和总氮(TN)性能参数,其结果列于表2。

[0062] 表2  $^{13}\text{C}$ 标记物的性能参数

实施例	pH	OC (%)	TN (%)	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)
实施例3	5.66	39.00	1.62	144.26
实施例4	5.70	40.03	1.58	67.01

[0064] 由表2可知,将高 $^{13}\text{C}$ 丰度的碳同位素标记烟草与天然丰度烟草样品按照一定比例混合,可获得不同 $^{13}\text{C}$ 丰度的烟草植株样品;并且不同 $^{13}\text{C}$ 丰度的烟草植株样品中 $^{13}\text{C}$ 丰度不同外其他性能基本没有变化,说明采用本发明标记方法不会影响样品的其他物理化学性质。

[0065] 尽管上述实施例对本发明做出了详尽的描述,但它仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部实施例,人们还可以根据本实施例在不经创造性前提下获得其他实施例,这些实施例都属于本发明保护范围。