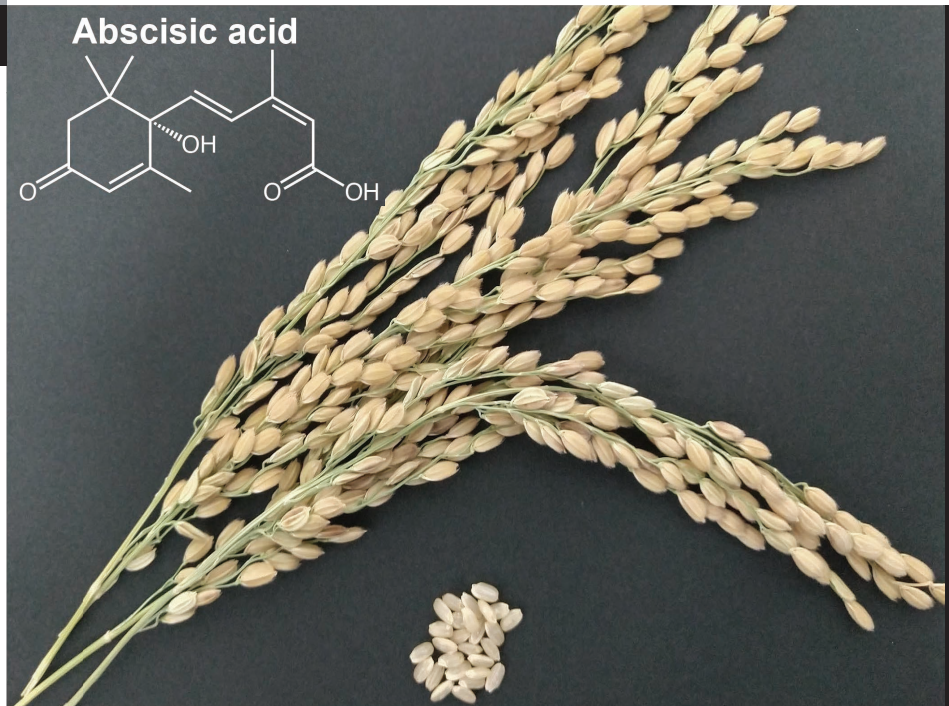


## 利用质谱成像技术可视化糙米中脱落酸的分布

Shuichi Shinma<sup>1,2,3</sup>, Hiromi Saito<sup>1</sup>, Kaoru Nakagawa<sup>4</sup>, Takushi Yamamoto<sup>4</sup>



### ■ 摘要

植物激素作为生化信使，可使植物适应外界环境条件并调节生长发育。这些激素只需微量就极具效力，能影响多种生理过程。然而，直接可视化这些激素并不容易，而质谱成像技术被认为是解决这一问题的有效手段。本文介绍了 iMScope™ QT 对植物激素脱落酸的分布进行可视化研究的应用，该技术可实现高灵敏度和高分辨率的质谱成像。

### 1. 引言

植物激素是参与植物生长、发育和环境反应的化学物质。这些激素在体内微量合成，并作用于远端部位，从而调控植物的生理过程。通常，植物激素分为以下几类：

1. 脱落酸：脱落酸在胁迫条件下调节种子休眠，减少蒸腾作用，并控制对水分胁迫的反应。

2. 生长素：生长素在调节植物伸长、生长和方向性方面发挥重要作用。它们能根据光照和重力调整植物方向，促进新组织形成和细胞伸长。
3. 赤霉素：参与植物生长发育过程，包括种子萌发、茎秆伸长、开花及果实成熟。
4. 细胞分裂素：促进细胞分裂并影响新组织的形成、芽的生长以及延缓叶片衰老。
5. 乙烯：参与果实成熟、抑制落果、落叶以及某些胁迫响应。

植物激素的平衡与调节对植物生长、繁殖及胁迫响应至关重要。其中，脱落酸（ABA）在胁迫响应中发挥着尤为重要的作用。

在种子发育过程中，ABA 含量在种子形态完成时达到峰值。在本研究中，我们对临近收获的成熟期水稻种子中的 ABA 分布进行了质谱成像（MSI）分析。

1 大阪大学研究生院工学研究科生物技术系  
2 大阪大学岛津 Omics 创新研究实验室  
3 大阪大学前沿跨学科研究机构  
4 株式会社岛津制作所

## 2. 实验

### 2-1 试剂

脱落酸 (ABA)、吉拉德试剂 T (GirT)、吉拉德试剂 P (GirP)、2,5-二羟基苯甲酸 (DHB)、1,5-二氨基萘 (1,5-DAN) 及猪明胶购自默克公司 (德国达姆施塔特)。甲醇 (MeOH, LCMS 级)、乙腈 (ACN, LCMS 级) 和三氟乙酸 (TFA) 购自富士胶片和光纯药工业株式会社 (日本大阪)。

### 2-2 样品信息

取 2023 年于日本冈山县种植的 Hinohikari (*Oryza sativa* L. cv. Hinohikari) 水稻, 用镊子将其稻壳剥下, 制成糙米样品。

### 2-3 MSI 测量样品制备

将制备好的糙米样品包埋于 10% 明胶中, 并迅速在  $-80^{\circ}\text{C}$  下冷冻。将包埋样本置于冷冻切片机 (CM1950, Leica) 中, 制备厚度为  $15\ \mu\text{m}$  的切片。将制备好的切片收集在冷冻膜 (Cryofilm type2C (9), SECTION-LAB) 上, 并在室温下置于硅胶管中干燥。在 ITO 涂层载玻片的导电表面贴上导电胶带 (3M), 用于 MSI 测量。



图 1 iMScope™ QT 成像质谱显微镜

### 2-4 衍生化与基质添加

取等量的 ABA 标准溶液与 GirT 溶液或 GirP 溶液 ( $5\ \text{mg/mL}$ , MeOH/H<sub>2</sub>O/TFA: 80/20/2, v/v/v) 混合, 并在室温下反应 30 分钟。此外, 使用等量的 DHB 溶液 ( $30\ \text{mg/mL}$ , 70% MeOH) 混合物作为 GirT 衍生化 ABA (GirT-ABA)。对于 MSI 测试样品, 使用喷枪 (GSI Creos) 将 GirT 溶液均匀喷涂在样品表面 ( $200\ \mu\text{L/片}$ ), 并在  $25^{\circ}\text{C}$  的室内静置 30 分钟。在减压干燥器中干燥 10 分钟后, 用喷枪 ( $300\ \mu\text{L/片}$ ) 喷涂 DHB 溶液 ( $30\ \text{mg/mL}$ , 70% MeOH)。

### 2-5 质谱

采用 iMScope QT 进行测量 (图 1)。使用 DHB 作为外标进行质量校准。GirT-ABA 在  $m/z$  378.24 处检测为  $[\text{M}]^+$ 。因此, 在正离子模式下, 在  $m/z$  350-400 的质量范围内获得了该标准品的质谱图。以  $m/z$  378.24 作为前体离子, 经氦气解离后获得 MS/MS 谱图。作为对照实验, 将等量的 ABA 标准溶液与 DAN 溶液 ( $10\ \text{mg/mL}$ , 70% ACN) 混合, 并在负离子模式下进行分析。此时, 未衍生化的 ABA 在  $m/z$  263.13 处检测为  $[\text{M-H}]^-$ , 并在  $m/z$  250-300 质量范围内获取质谱图。对于 MSI 测量, 像素尺寸为  $25\ \mu\text{m} \times 25\ \mu\text{m}$ , 其他条件如表 1 所示。测量后, 使用分析软件 IMAGEREVEAL™ MS (岛津制作所) 进行分析 (图 2)。

表 1 MSI 分析参数

| MS 分析条件    |  |
|------------|--|
| 离子种类       | 正离子模式  |
| $m/z$ 测量范围 | 350-400  |
| 累积次数       | 1  |
| DL 温度      | $250^{\circ}\text{C}$                            |
| 加热模块温度     | $450^{\circ}\text{C}$                            |
| 样品电压       | $4.50\ \text{kV}$                                |
| 检测器电压      | $2.10\ \text{kV}$ (标准品), $2.30\ \text{kV}$ (糙米)  |
| MS 级数      | 1 和 2  |
| CID 气      | $150\ \text{kPa}$ (MS1), $230\ \text{kPa}$ (MS2) |
| 激光辐照条件     |  |
| 辐照次数       | 80   |
| 重复频率       | 1000 Hz  |
| 辐照直径设定值    | 2  |
| 激光强度       | 65   |

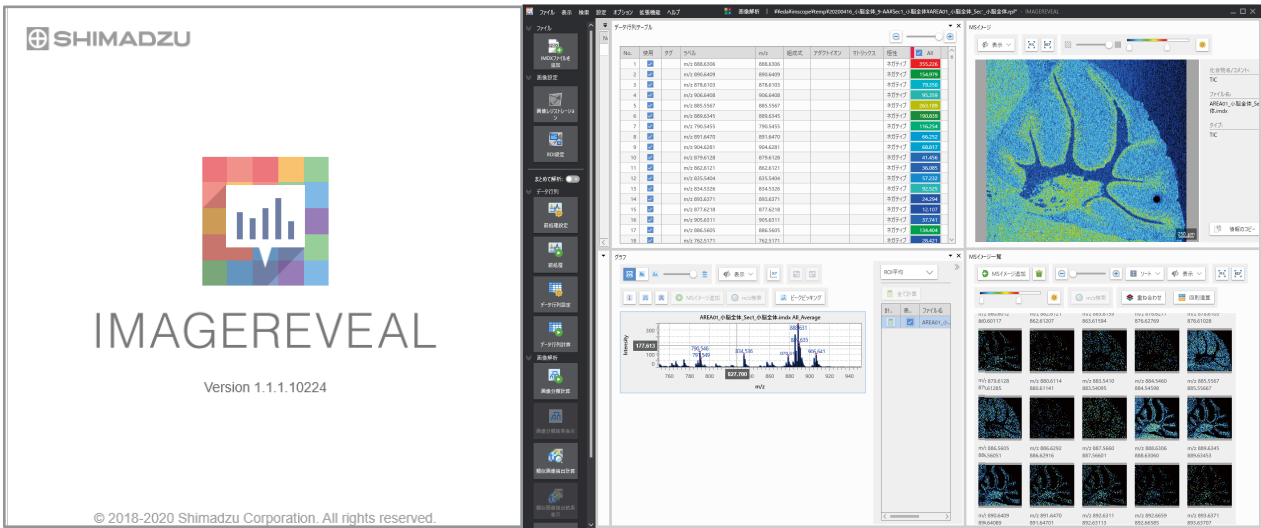


图 2 IMAGEREVEAL MS 质谱成像数据分析软件

### 3. 结果

正离子模式下 GirT-ABA 的质谱图如图 3A 所示。通过 GirT 衍生化, ABA 在正离子模式下的检测灵敏度显著提高。在本实验中, GirT-ABA 的  $[M]^+$  峰 ( $m/z$  378.24) 清晰可见。

以该峰为母离子的 MS/MS 谱图 (图 3B) 显示,  $m/z$  319.17 (GirT 去除三甲胺基团后的离子) 和  $m/z$  291.17 (比 GirT-ABA 少 87 Da) 为特征碎片离子。对照组中, GirP 衍生化 ABA 和未衍生化 ABA 在负离子模式下的峰强度显著低于 GirT-ABA (图 3C)。

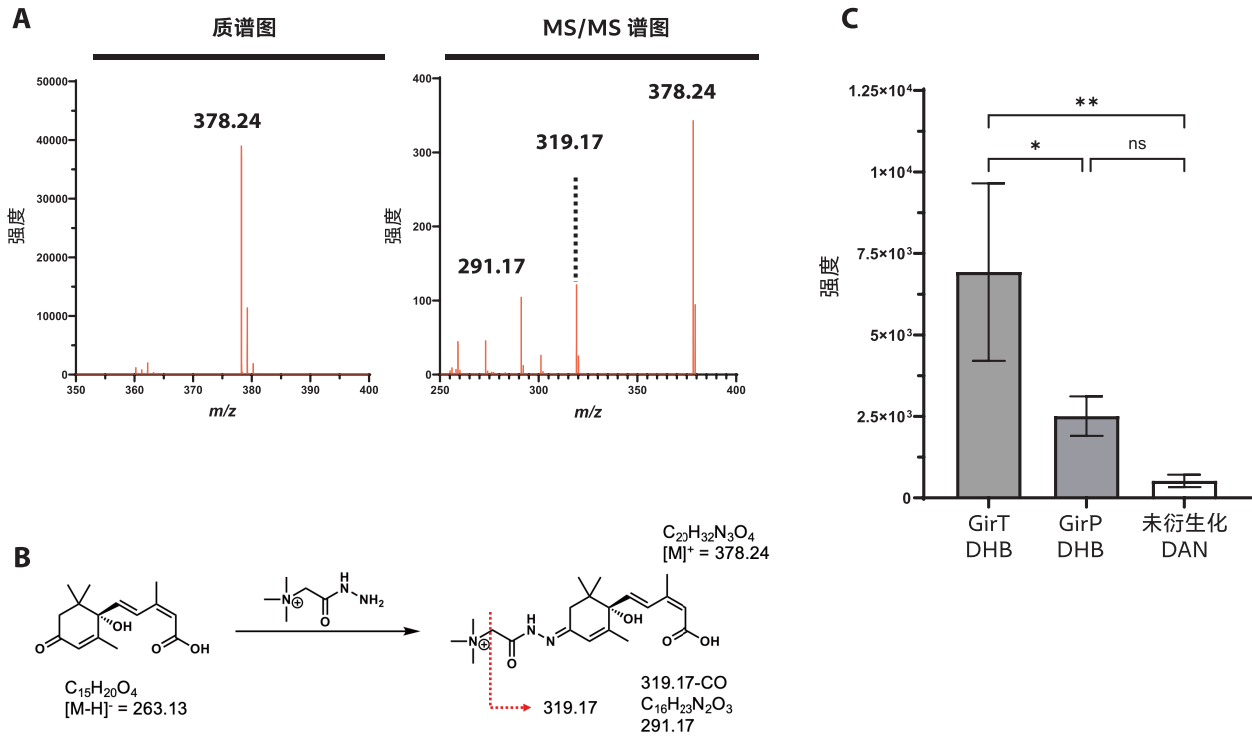


图 3 ABA 等效物的测量结果

(A) 正离子模式下 GirT-ABA 的质谱及 MS/MS 谱图; (B) GirT-ABA 的 MS/MS 解离模式; (C) GirT-ABA、GirP-ABA 与未衍生化 ABA 的离子强度对比 ( $n=3$ , 误差线: 标准差, t 检验)。使用 DHB 在正离子模式下测量 GirT-ABA 和 GirP-ABA, 使用 1,5-DAN 在负离子模式下测量未衍生化的 ABA。

根据标准品的测量结果，对 2023 年产于日本冈山县的 3 粒 Hinohikari 糙米样品进行切片处理，并在组织上进行 GirT 衍生化，随后进行 MSI 测量。图 4A 展示了糙米中 GirT-ABA 的成像结果，图 4B 为对应的质谱及产物离子谱，图 4C 为胚与胚乳的离子强度对比。

质谱成像结果显示，GirT-ABA 主要富集于胚中，其质谱及 MS/MS 谱图与标准品一致（碎片离子  $m/z$  291.17 和 319.17 见图 3B）。

离子强度比较表明，胚与胚乳间存在显著差异，证实 ABA 在糙米胚中累积。

#### 4. 结论

本研究通过吉拉德试剂 T 衍生化结合 IMScope QT 质谱成像技术，成功实现了糙米中脱落酸的可视化。未来，结合组织衍生化与质谱成像技术，有望进一步可视化多种植物激素的分布。

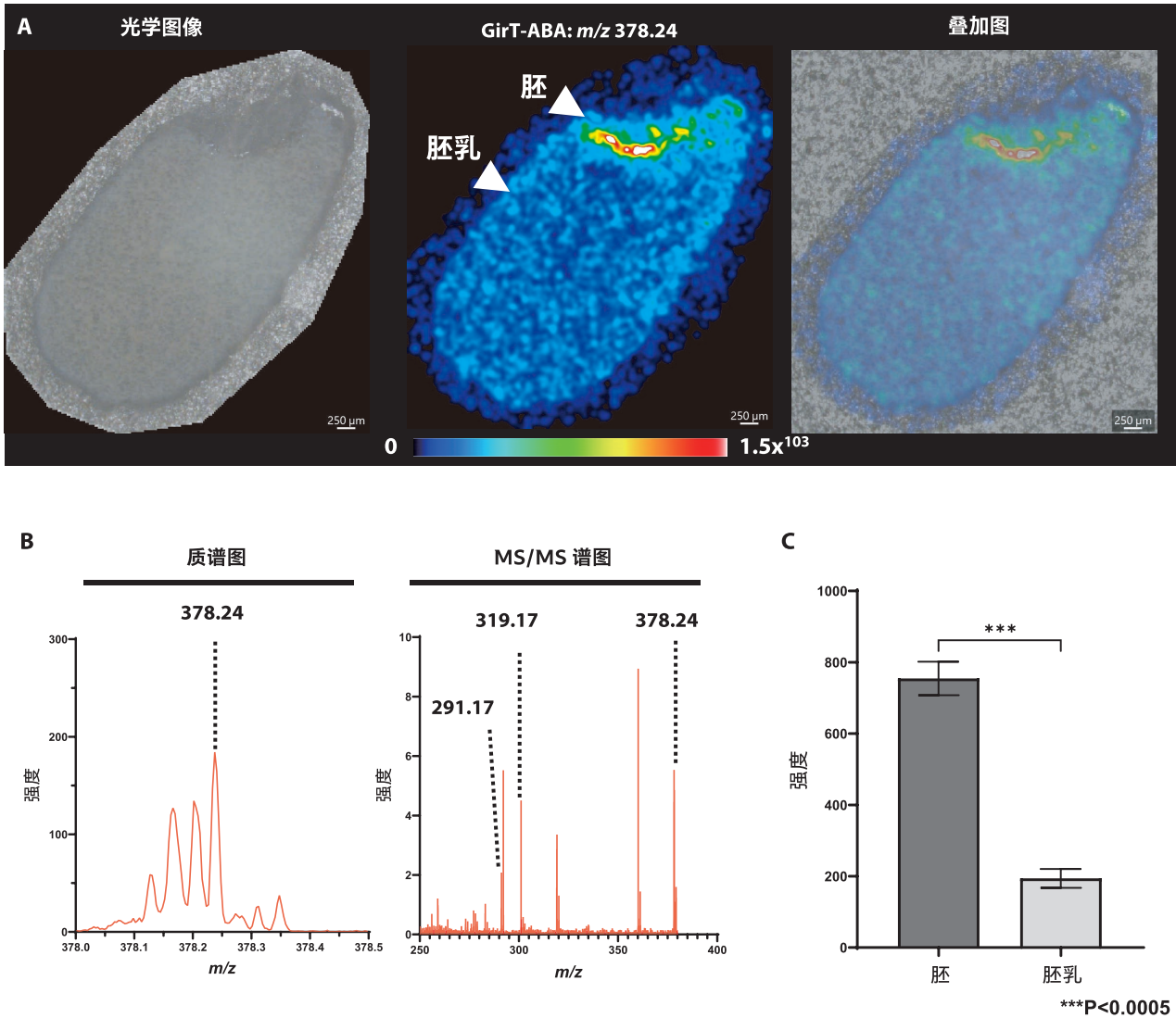


图 4 糙米中 GirT-ABA 的 MSI 分析结果。  
 (A) 成像结果（从左至右依次为光学图像、 $m/z$  371.24 分布图、叠加图），比例尺：250  $\mu\text{m}$ ；  
 (B) 糙米切片的质谱图和 MS/MS 谱图；  
 (C) 胚与胚乳的离子强度对比 ( $n=3$ , 误差线：标准差, t 检验)。胚与胚乳之间存在显著差异。

#### 参考文献 >

- Enomoto H, Sensu T, Yumoto E, Yokota T, Yamane H. Derivatization for detection of abscisic acid and 12-oxo-phytodienoic acid using matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. 32, 1565 (2018)

岛津应用云



iMScope 和 IMAGEREVEAL 是岛津制作所或其附属公司在日本和 / 或其他国家 / 地区的商标。



岛津企业管理（中国）有限公司  
 岛津（香港）有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话：800-810-0439  
 400-650-0439

#### 免责声明：

\* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售；  
 \* 本资料中的所有信息仅供参考，不予任何保证。  
 如有变动，恕不另行通知。

第一版发行日：2025 年 3 月

› 请填写调查问卷

## 相关产品 某些产品可能更新为更新的型号。



› iMScope QT  
成像质谱显微镜



› IMAGEREVEAL MS  
质谱成像数据分析软件

## 相关解决方案

› 生命科学

› 食品与营养

› 价格咨询

› 产品咨询

› 技术服务/支持咨询

› 其他咨询