

# 棉酚及其他萜类化合物在棉花叶子及胚珠中的空间分布研究

IMS-010

**摘要：** 本文应用成像质谱显微镜 iMScope QT 对棉酚、半棉酚和半棉酚酮等萜类化合物在棉花叶子和胚珠中的空间分布进行了分析，得到了三种化合物的空间分布信息，为棉酚等萜类物质的合成转化机制研究提供了线索，本例也可作为植物内源性代谢产物空间分布分析的参考。

**关键词：** 成像质谱显微镜 iMScope QT 棉花 棉酚 空间分布

萜类化合物是一类多样化的代谢产物。植物在不同环境下会合成不同类型的萜类化合物，这些化合物可吸引传粉者与种子传播者，并抵御病原体和植食性昆虫的侵害。不同细胞类型会在特定器官中合成萜类化合物。棉花植株的叶子、茎及种子的腺体中积累了包括棉酚、半棉酚酮在内的多种非挥发性萜类化合物，然而，这些化合物在棉花内部具体分布的直接可视化证据仍然缺乏。

岛津成像质谱显微镜 iMScope QT，前端搭载高分辨光学显微镜以及大气压基质辅助激光解吸电离源，后端为 Q-TOF 质谱仪，既可以对样品进行形态

学上的细微观察，又可以得到样品中特定部位化合物的分布及含量信息。本文应用岛津成像质谱显微镜 iMScope QT 对棉酚、半棉酚和半棉酚酮在棉花叶子和胚珠中的空间分布进行了研究，发现棉酚、半棉酚、半棉酚酮均主要分布于腺体中，且胚珠中棉酚的含量高于叶子。除此之外，还观察到半棉酚酮在叶子中分布较多，但在胚珠中的含量很少。以上结果为棉酚及前体分子的合成转化机制的研究提供参考，同时表明成像质谱显微镜是同时进行显微观察及化合物质谱成像研究的可靠的研究手段。

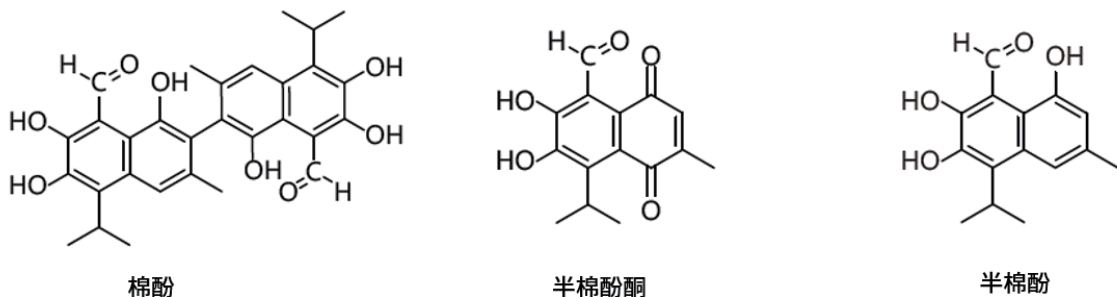


图1 棉酚、半棉酚和半棉酚酮的结构式

## 实验部分

### 1.1 仪器

成像质谱显微镜 iMScope QT

### 1.2 仪器参数

分析模式：正离子模式

像素间距：5 μm\*5 μm

激光能量：40-50 (范围 0-100)

扫描频率：2000 Hz

检测器电压：2.40 kV

激光器：355 nm YAG 激光器

激光照射直径：5 μm

激光照射次数：700 shots

扫描范围：m/z 150-650

### 1.3 试剂与样品

基质： $\alpha$ - 氰基 -4- 羟基肉桂酸 (CHCA)

样品：新鲜棉花植株

标准品：棉酚、半棉酚、半棉酚酮详细信息如表 1 所示

表 1 标准品信息表

名称	缩写	分子式	分子量 <sub>MONO</sub> (Da)
棉酚	G	C <sub>30</sub> H <sub>30</sub> O <sub>8</sub>	518.1941
半棉酚	HG	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	260.1049
半棉酚酮	HGQ	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>	274.0841

### 1.4 样品前处理

标准品：称取标准品加入甲醇配制为 1 mg/mL 溶液，取 1  $\mu$ L 标准品溶液和 1  $\mu$ L CHCA ( $\alpha$ - 氰基 -4- 羟基肉桂酸) 基质溶液 (10 mg/mL) 依次点靶，自然干燥后送入质谱分析。

棉花叶子：剪切部分叶子用导电双面胶固定在 ITO 载玻片上，叶子背面向上。

胚珠：胚珠使用 10% 明胶水溶液包埋，-80°C 冰冻后使用冰冻切片机制作切片，切片厚度为 10  $\mu$ m，将切片贴在导电 ITO 载玻片上。

基质涂敷：使用 iMLayer 基质升华装置涂敷 CHCA 基质，加热温度设定为 250°C，膜厚设定为 0.7  $\mu$ m。升华完成后将载玻片放置在含有甲醇蒸汽的密封容器内进行基质重结晶，时间为 5 min。



图 2 棉花植株

## ■ 结果与讨论

### 2.1 标准品测试结果

在正离子及负离子模式下分别测试棉酚、半棉酚、半棉酚酮的标准品，均检测到显著离子峰，其中负离子模式下基质背景干扰更少，因此选择负离子模式进行后续样品的质谱采集。标准品质谱图见图 3。

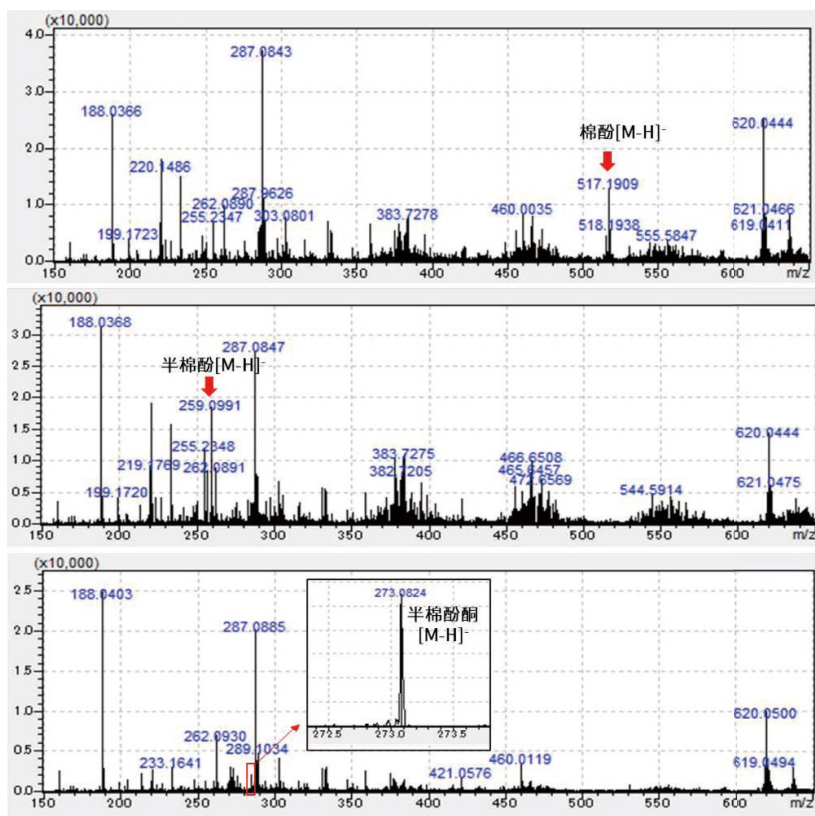


图3 标准品在负离子模式下采集的质谱图

## 2.2 棉花叶子和胚珠的质谱成像结果

使用5倍物镜拍摄棉花叶片和胚珠的光学图像，并使用iMScope QT进行质谱数据采集。所获取的数据通过数据处理软件IMAGEREVEAL MS进行分析。叶子和胚珠分别选取五个腺体作为感兴趣区域(ROI)进行分析。棉酚、半棉酚和半棉酚酮的信号强度如表2所示。化合物空间分布见图4和图5。

结果表明，棉酚、半棉酚和半棉酚酮主要分布在棉花叶子和胚珠的腺体中。研究发现，棉酚和半棉酚在胚珠中的含量高于叶子，且两者的含量相对相似；而半棉酚酮在叶片中的含量远高于胚珠。

此外，我们对每个腺体进行了详细观察，以ROI-3为例(图4和图5)。叶片腺体的放大图像显示，腺体呈圆形，但大小有所不同。尺寸较大的腺体中化合物的含量更高(例如，ROI-3 > ROI-5)，而大小相似的腺体则显示出相对接近的化合物含量。胚珠腺体的放大图像揭示了其形状不规则且大小各异，部分腺体显示出空腔结构，这可能是由于切片位置造成的。在胚珠腺体中，这三种化合物的含量也存在差异，其中棉酚的高信号强度分布似乎受到限制。这些发现只有在高空间分辨率(如5 μm)下才能被精确测量。

表2 棉花叶子和胚珠中棉酚、半棉酚和半棉酚酮的质谱信号强度

化合物名称	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	叶子 ROI-1	叶子 ROI-2	叶子 ROI-3	叶子 ROI-4	叶子 ROI-5	叶子 平均	胚珠 ROI-1	胚珠 ROI-2	胚珠 ROI-2	胚珠 ROI-4	胚珠 ROI-5	胚珠 平均
棉酚	517.19	25625	28582	25377	23592	15094	23654	106175	221420	151898	101462	163324	148856
半棉酚	259.10	419	361	373	182	74	282	1505	1339	1776	844	3106	1714
半棉酚酮	273.08	17767	17378	16420	11280	4512	13471	138	65	172	77	271	145

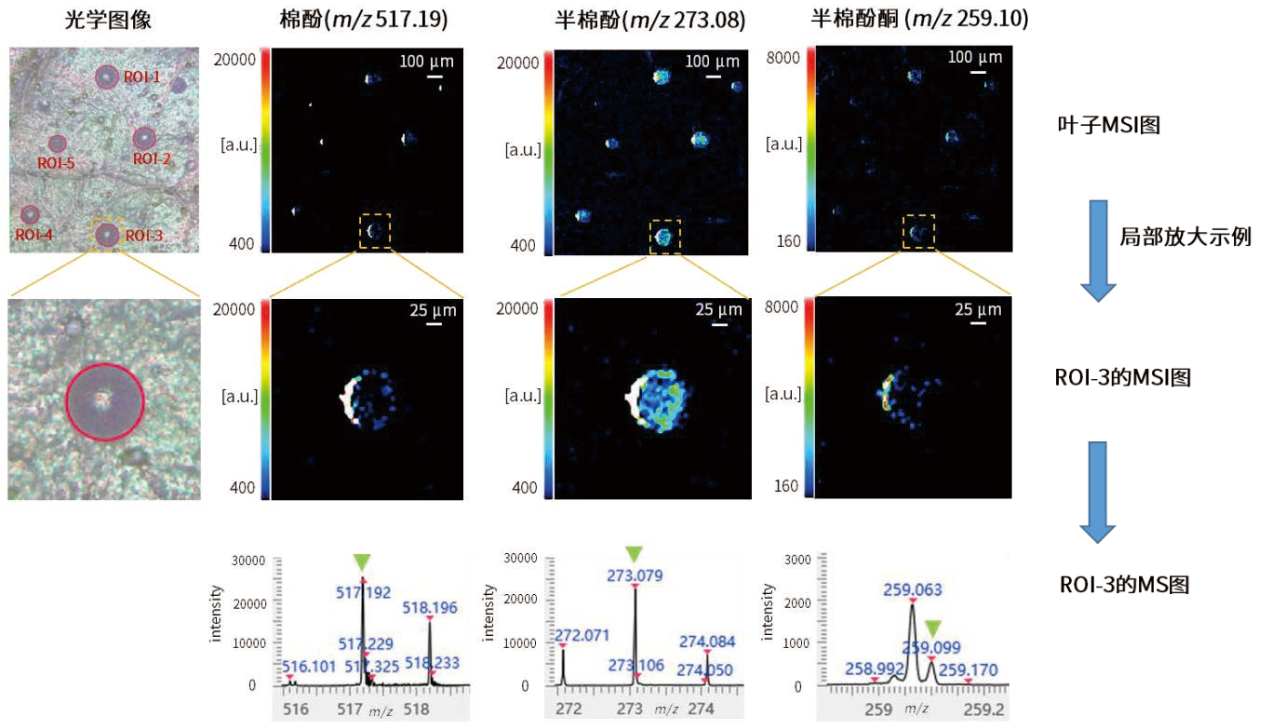


图4 棉酚、半棉酚和半棉酚酮在棉花叶子中的空间分布  
(上 - 叶子 MSI 图; 中 - 叶子 ROI-3 的 MSI 图; 下 - 叶子 ROI-3 的 MS 图)

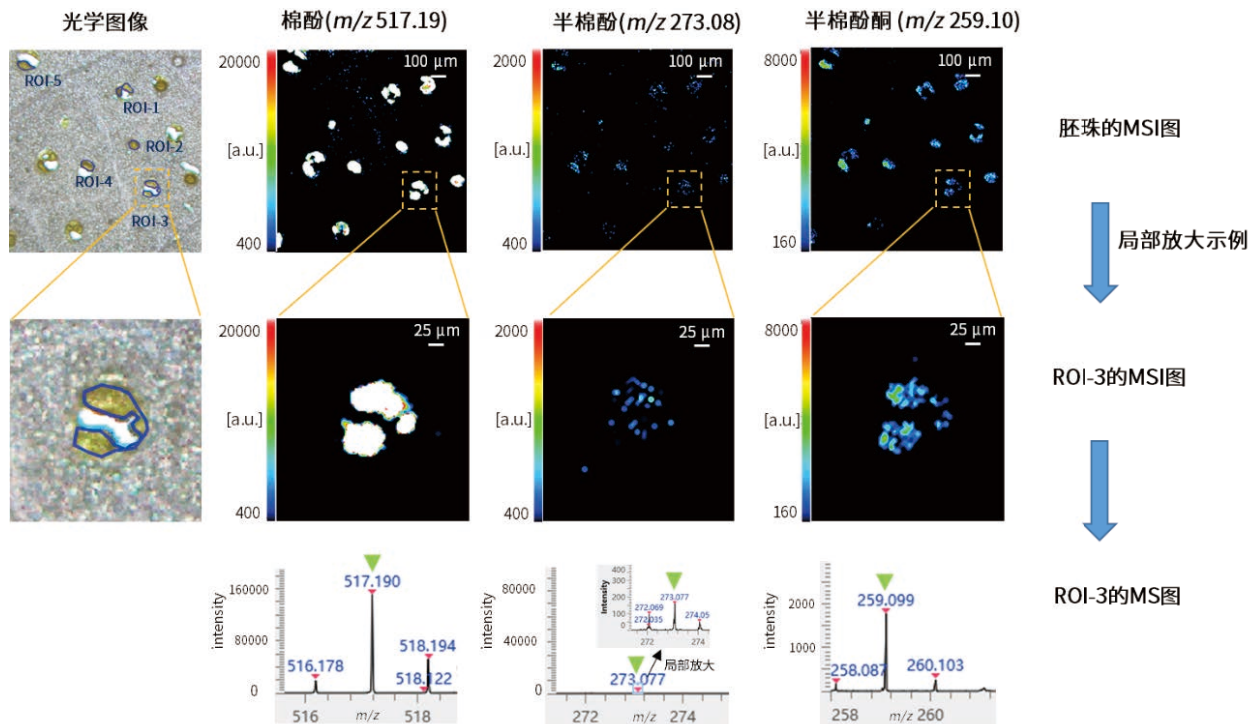


图5 棉酚、半棉酚和半棉酚酮在棉花胚珠中的空间分布  
(上 - 胚珠的 MSI 图; 中 - 胚珠 ROI-3 的 MSI 图; 下 - 胚珠 ROI-3 的 MS 图)

## ■ 结论

本文应用岛津成像质谱显微镜 iMScope QT 对棉花叶子及胚珠中棉酚、半棉酚以及半棉酚酮等三种萜类化合物的空间分布进行分析，得到了其 5  $\mu\text{m}$  高空间分辨水平的空间分布信息，为棉酚等萜类化合物的合成转化机制研究提供了线索，为植物内源性代谢产物的空间分布分析提供了参考。iMScope QT 可同时进行高分辨显微观察和质谱成像分析，避免了繁复的化合物提取前处理，可直接对植物内源代谢产物及各类活性分子进行原位可视化分析，为内源性代谢产物的可视化研究及其生理功能的探索提供新的探究方向和技术手段。

岛津应用云

