

基于电喷雾电离串联质谱技术的植物 脂质组学研究进展*

王 涛^{1, 2)} 钟秀丽¹⁾ 梅旭荣^{1)**} 张燕卿¹⁾

(¹⁾ 中国农业科学院农业环境与可持续发展研究所, 农业部旱作节水农业重点开放实验室, 北京 100081;

(²⁾ 云南瑞升烟草技术(集团)有限公司, 昆明 650106)

摘要 研究表明, 脂质不但参与植物的信号转导、小泡运输、细胞骨架重组等多种细胞过程, 而且在植物的生长发育和胁迫反应中具有重要作用。但是脂质本身的多样性、复杂性、以及分析手段的滞后限制了人们对脂质的深入认识。电喷雾电离串联质谱(ESI-MS/MS)技术作为一种直接进样的高通量分析技术, 能够在短时间内对大多数脂质的不同分子种进行定量分析, 极大地方便了人们了解植物因环境变化和生长发育引起的组织内脂质分子种的微量变化。近年来, 该技术在植物上的成功应用, 推动植物脂质组学研究取得了重要进展, 揭示出脂质在植物的逆境胁迫反应、防御反应中的多种功能, 促进了植物脂质代谢相关基因的鉴定。而且, 该技术与其他脂质分析技术结合, 促使人们在脂质的分布、运输、转化和新脂质种类的鉴定方面有了新的进展。概要介绍了 ESI-MS/MS 技术的特点, 重点综述了该技术在植物脂质组学研究中的应用进展, 并展望了该技术今后的发展方向。

关键词 植物脂质组学, 电喷雾电离串联质谱(ESI-MS/MS), 质谱, 软电离

学科分类号 Q5, O65

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00193

越来越多的证据表明, 脂质不仅是生物膜的骨架成分和生物体的能量供应者, 而且参与多种生命过程, 具有重要的生理功能。人类许多重大疾病都与脂质代谢紊乱有关, 如动脉硬化、糖尿病、肥胖症、阿尔茨海默症、癌症以及神经退行性疾病等^[1-2]。在植物中也已经发现, 脂质参与信号转导、小泡运输、细胞骨架重组等细胞过程, 而且在种子萌发、器官分化、生物和非生物胁迫反应中有重要作用^[3-4]。对细胞或生物体内的整体脂质进行系统分析, 揭示脂质的代谢调控与生物学功能, 对深入认识植物的多种生命过程的机制有重要意义。

随着基因组学、转录组学和蛋白质组学的快速发展以及功能基因组学研究的需要, 以对生物体或细胞内所有小分子代谢产物进行定性和定量分析为目标的代谢组学应运而生。脂质组学(lipidomics)是代谢组学的一个重要分支, 以所有脂类为研究对象。Han 和 Gross^[5]于 2003 年就提出了脂质组学的概念, 但是脂质组学的发展却远远滞后于基因组学和蛋白质组学。其原因之一是脂质分子结构的多样

性、复杂性, 以及相应分析手段的滞后阻碍了人们对生命体的整体脂质及其复杂的代谢网络和功能调控的系统研究^[2]。质谱技术是脂质组学研究中最核心的研究手段, 近年来, 生命分析化学的发展, 特别是软电离离子化技术和高分辨质谱技术在脂质分析中的应用, 为脂质组学的研究提供了强有力的技术支持。

电喷雾电离串联质谱(electrospray ionization tandem mass spectrometry, ESI-MS/MS)技术是目前脂质组学研究中应用较多的一种分析技术。1997 年 Brügger 等^[6]首次成功应用该技术完成了从中国仓鼠卵巢细胞(CHO 细胞)中提取几种磷脂的分析, 包括磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine, PC)、磷脂酰甘油(phosphatidylglycerol, PG)、磷脂酰乙醇胺

* 国家自然科学基金资助项目(30871447)。

** 通讯联系人。

Tel: 010-82109333, E-mail: meixr@163.com

收稿日期: 2010-04-09, 接受日期: 2010-06-08

(phosphatidylethanolamine, PE)、磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol, PI)、磷脂酸(phosphatidic acid, PA)等。由于动物和微生物脂质主要以磷脂为主, 因此 ESI-MS/MS 技术很快在动物和微生物脂质组学分析上得到应用。然而, 该技术在植物上的应用却滞后几年之久, 主要因为植物脂质中除了少量磷脂外, 更多的是难以分析的糖脂(表 1), 如单半乳糖甘油二酯(monogalactosyldiacylglycerol, MGDG)、双半乳糖甘油二酯(digalactosyldiacylglycerol, DGDG)、硫代异鼠李糖甘油二酯(sulfoquinovosyldiacylglycerol, SQDG)等^[7]。直到 2002 年, 时值在美国堪萨斯州

立大学工作的王学敏教授领导组建的堪萨斯脂质组学研究中心(Kansas Lipidomics Research Center, KLRC), 针对几种主要糖脂解决了电离和质谱分析过程中的技术难题后, 将 ESI-MS/MS 技术成功扩展到植物脂质组学的分析^[8]。正是由于该技术的推动, 植物脂质组学近年取得了重要进展。ESI-MS/MS 技术与反向遗传学技术的结合, 揭示出不同脂质分子种(如 PA)在胁迫反应、生长发育等多种生命过程中的重要功能。本文对 ESI-MS/MS 技术进行介绍, 并重点综述了基于该技术的植物脂质组学研究进展。

Table 1 The acyl lipid composition of plant leaves

表 1 不同种类植物叶片中酰基脂组成

植物	脂质种类(占酰基脂总量的百分比)							其他
	MGDG	DGDG	SQDG	PC	PG	PE	PI	
苜蓿	46	28	4	7	6	5	1	3
甜菜	26	14	9	24	9	12	5	1
玉米	42	31	5	6	7	3	1	2
大麦	43	26	5	11	6	4	1	4
黑麦草	39	29	4	10	7	5	2	4
蚕豆	38	30	6	7	6	4	2	7

1 ESI-MS/MS 技术分析脂质

1.1 电喷雾电离离子化过程

电喷雾电离(ESI)技术出现于 20 世纪 80 年代末。ESI 是将含有待测组分的溶液通过高电压的针尖喷射出来, 带电的雾滴再被加热使溶剂蒸发, 最后待测组分分子形成气相的分子离子, 再进入到质量分析器中进行检测。ESI 技术最显著的特征在于它是一种“软”电离, 即使可以使生物分子在无碎片断裂的情况下进行离子化, 被分析物碎片最少, 有利于样品混合物的解析。另一个优点是不需要对被分析物进行衍生化、需要的样品量少、节省了分析步骤、提高了检测效率。ESI 技术的出现使得质谱技术可以应用于非挥发性的脂类和生物大分子如多肽、蛋白质的分析。

被分析物在 ESI 的正负电离模式下的电离效率, 是影响 ESI-MS/MS 技术分析精度的重要因素之一。在待测的混合物样品中, 加入两性缓冲剂后, 能形成阳离子或阴离子加合物, 以增强待测样品的电离效率。脂质分析中常用的缓冲剂有甲酸

铵、乙酸铵、氢氧化铵、乙酸钠等。为得到完整的植物脂质组信息, 通常将提取的脂质样品分成两份, 一份加入乙酸钠, 以促进 MGDG 和 DGDG 的钠加合物的生成, 用于分析 MGDG 和 DGDG; 另一份加入乙酸铵, 用于分析 SQDG 和所有的磷脂^[8-9]。

1.2 质谱分析过程

ESI-MS/MS 方法分析脂质通常使用的是三重四极杆串联质谱仪(triple quadrupole tandem mass spectrometry), 这种质谱仪有三个四极质量分析器, 第一个四极质量分析器(MS1)和第三个四极质量分析器(MS2)用于质量分离, 第二个四极质量分析器用于碰撞活化解离(collision-activated dissociation, CAD)。脂质分析通常采用前体离子扫描(precursor ion scanning, Pre)和中性丢失扫描(neutral loss scanning, NL)两种扫描模式。在前体离子扫描模式中, MS1 进行全扫描, 第二个四极质量分析器进行碰撞诱导解离(所有离子通过), 由 MS2 选择特定的碎片离子(特定的离子基团)进行扫描, 检测器得到的是能够断裂出由 MS2 选定的子离子的分

子离子, 即前体离子. 前体离子扫描模式检测到的脂质分子, 通常是含有同一种极性头部基团的同一类型的脂质. 在中性丢失扫描模式中, 首先选定一中性碎片, MS1 和 MS2 同时扫描, 二者保持恒定的质量差(中性丢失质量), 检测所有能丢失这一中性碎片的裂解反应. 因此, 如果选择中性丢失质量为 a , 当质量为 x 的离子经过第一个质量分析器, 通过碰撞池如果能产生质量为 $x-a$ 的离子, 即可以检测到. 表 2 给出了应用 ESI-MS/MS 分析脂质时,

不同种类脂质通常采用的扫描模式. 在脂质分析实验中, 可以执行一系列的前体离子扫描和中性丢失扫描, 以获得整个脂质分子的质谱图, 然后用同位素重叠的方法加以校正^[10], 再将其峰面积与标准样品峰面积做比较, 从而得到脂质的浓度等信息^[7]. 目前, 应用 ESI-MS/MS 技术已经能够对植物中 8 类脂质的 156 个分子种进行定量分析^[11], 同一类脂质中分子种的鉴定是依据脂质分子结构中脂肪酸酰基链的碳原子数和不饱和双键数的不同.

Table 2 Precursor and neutral loss scans for lipid species from plants^[9,11]

表 2 前体离子扫描和中性丢失扫描模式检测植物细胞中脂质^[9,11]

检测的脂质	检测的离子	扫描模式	极性	扫描电压 /V	扫描时间 /min
PC/ LysoPC	[M+H] ⁺	Pre 184 ⁺	+	40	1.5
PE/ LysoPE	[M+H] ⁺	NL 141	+	28	3
PA/PG/ LysoPG	[M-H] ⁻	Pre153 ⁻	-	-57	4
PI	[M-H] ⁻	Pre 241 ⁻	-	-58	3
PS	[M-H] ⁻	NL 87	-	-34	4
SQDG	[M-H] ⁻	Pre225 ⁻	-	-60	4
MGDG	[M+Na] ⁺	Pre243 ⁺	+	50	5
DGDG	[M+Na] ⁺	Pre 243 ⁺	+	84	5

ESI-MS/MS 法应用于脂质组分析的优势是离子扫描快, 定量容易, 而且样品的前处理简单, 节省了分析的时间. 另外, 该方法获得的谱图信息针对性强, 分析相对简单. 其不足之处在于过于依赖碰撞能量的大小以及被测脂质分子的结构, 而且由于样品未经纯化处理, 所含杂质较多, 对结果分析可能会造成一定的影响. 对一些功能上很重要但在样品中浓度较低的脂质, 或者分析复杂样品中的脂质分子时, 也可以引入高效液相色谱 (high-performance liquid chromatography, HPLC) 系统, 先将不同种类的脂质分开, 然后再用 ESI-MS/MS 对同一种类脂质中的不同分子种进行检测, 此方法提高了脂质分析的选择性和灵敏度, 而且可避免质量数重叠和脂质分子种之间相互干扰. 但是引入 HPLC 会导致分析的时间相对较长, 样品在过柱过程中会有部分损失^[12].

2 基于 ESI-MS/MS 技术的植物脂质组学研究进展

2.1 揭示出磷脂酶 D 家族不同成员在多种生命过程中的重要功能与作用机理

美国密苏里大学圣路易斯分校王学敏教授领导

的 Danforth 植物科学中心课题组与堪萨斯脂质组学研究中心合作, 将 ESI-MS/MS 脂质分析技术与反向遗传学手段相结合, 揭示出磷脂酶 D (phospholipase D, PLD) 家族成员及其产物(不同的 PA 分子种)在植物的冻害胁迫反应、磷素亏缺反应、激素反应和生长发育等多种过程中的重要功能.

2.1.1 冻害胁迫反应. Welti 等^[8]发现 *PLDα* 基因被反义抑制后拟南芥的抗冻性较野生型显著增强. 他们应用 ESI-MS/MS 技术对冻害胁迫处理后的野生型和 *PLDα* 缺失型植株进行细胞膜脂质组学分析, 揭示了 *PLDα* 负调节拟南芥抗冻性的机制. 冻害胁迫下 *PLDα* 基因缺失植株叶片中细胞膜 PC 被水解的量仅是野生型的一半, 同时 PA 生成的量也是野生型的一半. PC 是有利于生物膜稳定的磷脂, 而 PA 在冰冻及 Ca^{2+} 存在条件下促进质膜和叶绿体膜形成脂质六角形 II 相位, 破坏了膜的脂质双分子层结构, 导致膜的稳定性降低. 所以, *PLDα* 基因被抑制引起膜组成的变化, 提高了细胞膜的稳定性, 增强了植物的抗冻性. 该结果的报道是 ESI-MS/MS 技术成功应用于植物脂质组学分析的第 1 篇发表论文. 2004 年 Li^[13]等发现 *PLD* 基因家

族的另一个成员 *PLD δ* 也参与植物的冻害胁迫反应, 对植物的抗冻性起正调节作用. 应用 ESI-MS/MS 技术对冻害胁迫处理后的拟南芥 *PLD δ* 基因敲除突变体、过表达突变体和野生型植株进行脂质组分析发现, 冻害胁迫下 *PLD δ* 的激活对细胞膜磷脂水解的贡献不大, 但是 *PLD δ* 超表达植株比野生型产生较多的不饱和 PA 分子种. 已有研究表明 *PLD δ* 水解底物磷脂产生的 PA 可以减轻 H_2O_2 对细胞的损伤, 而 *PLD δ* 抑制型植株对 H_2O_2 的敏感性提高^[14]. 冻害胁迫下植物的 H_2O_2 含量增加, *PLD δ* 基因缺失植株抗冻性下降. 这些结果揭示出 *PLD δ* 不是通过其磷脂降解功能影响植物的抗冻性, 而是通过产物 PA 的信号转导功能提高植物对活性氧伤害的抵抗力, 从而提高植物的抗冻性. Li 等^[15]后来的研究发现, 在冻害后恢复阶段, *PLD δ* 的激活减缓了质体与非质体中脂质的大量降解是该基因对植物抗冻性起正调节作用的另一种作用机制.

2.1.2 磷素亏缺与激素反应. Li 等^[16]应用 ESI-MS/MS 技术分析了磷素亏缺条件下拟南芥植株地上和地下部分的 140 种极性脂质的变化. 结果表明, 磷素亏缺条件下, 磷脂含量下降而糖脂含量上升. 其中, 根中磷脂减少的量远高于地上部分. 研究还发现 *PLD ζ* s 参与植物的磷素亏缺反应. 在磷素亏缺条件下, *PLD ζ* s 水解 PC, 为细胞代谢提供无机磷, 产生的甘油二酯(diglyceride, DAG)用于 DGDG 的生物合成. Zhang 等^[17]的研究揭示出 *PLD α 1* 参与脱落酸(ABA)诱导叶片保卫细胞中 NADPH 氧化酶激活的过程. 正常条件下, ABA 处理能够提高叶片保卫细胞中 NADPH 氧化酶的活性, 促进活性氧(reactive oxygen species, ROS)的生成. 但是 ABA 处理拟南芥 *pld α 1* 突变体, 却不能够提高叶片保卫细胞中 NADPH 氧化酶的活性. *PLD α 1* 水解磷脂的产物是 PA, 应用 ESI-MS/MS 技术对植株叶片中的 PA 进行质谱分析发现, ABA 处理后, *pld α 1* 突变体与野生型叶片中 PA 的产生量、变化幅度以及分子种显著不同. 在 *pld α 1* 突变体和野生型拟南芥保卫细胞中加入 16:0~18:2 PA 后, 能激活 NADPH 氧化酶的活性, 而加入 16:0~18:2 PC 却没有这种作用. 这些结果表明 ABA 处理激活了 *PLD α 1*, 产生了特定的 PA 分子种, 进而激活了 NADPH 氧化酶.

2.1.3 生长发育. Davaiah 等^[18]应用 ESI-MS/MS 技术对 *PLD α 1* 基因敲除型和野生型拟南芥种子进行脂质组分析, 发现 *PLD α 1* 基因突变的植株种子中

PA、溶血磷脂酰胆碱(lysophosphatidylcholine, lysoPC)、溶血磷脂酰乙醇胺(lysophosphatidylethanolamine, lysoPE)的含量显著低于野生型, 表明 *PLD α 1* 在种子的细胞膜脂质降解中起主要作用. 之后, Davaiah 等^[19]在另一研究中报道, 拟南芥 *PLD α 1* 基因被敲除后, 拟南芥种子在正常储存条件和各种逆境下的萌发力和油脂的稳定性均提高. 应用 ESI-MS/MS 技术对 *PLD α 1* 基因缺失型与野生型植株的种子进行脂质分析发现, *PLD α 1* 基因缺失型种子中不饱和脂肪酸减少的量和脂质氧化物积累的量均低于野生型. 而且, *PLD α 1* 基因抑制型植株的种子比 *PLD α 1* 基因缺失型植株的种子寿命更长. 由此提出, 削弱 *PLD α 1* 基因的表达是提高油脂稳定性和种子质量与寿命的一条途径. Hong 等^[20]对 *PLD ϵ* 基因敲除和过表达植株进行分析发现, *PLD ϵ* 对拟南芥植株的生长有正调节作用. 应用 ESI-MS/MS 技术对这两种基因型植株进行脂质分析证实, 与质膜结合的 *PLD ϵ* 水解 PE 产生的 PA 对拟南芥植株的生长起正调节作用.

2.1.4 PA 的功能. PLDs 是植物中广泛分布的酶类, 在拟南芥上已经确认了 12 个 *PLD* 基因, 即 *PLD α (3)*、 *β (2)*、 *γ (3)*、 *δ* 、 *ϵ* 和 *PLD ζ (2)*^[13]. 这些 *PLD* 酶各具独特的域结构、激活条件和底物特异性^[21]. 从上述分析可见, 除了 *PLD α* 在冻害胁迫下和 *PLD δ* 在冻害后的恢复阶段是通过磷脂水解功能影响植物的抗冻性外, 多数 *PLDs* 通过产物 PA 参与细胞信号转导作用进而调控植物的胁迫反应和生长发育过程. 而且, 每种 *PLD* 基因被反义抑制或者敲除后, 它的生物学功能不能够被其他 *PLDs* 代替. 因为每一种 *PLD* 的激活, 都会水解膜磷脂生成 PA, 但生成的 PA 分子种以及各分子种的量均有差异. 这些结果证明不同的 PA 分子种在植物的环境胁迫反应和生长发育过程中具有独特的功能. 进一步阐明不同 PA 分子种的信号转导作用机制, 将为揭示植物细胞如何应对不同胁迫类型和胁迫强度做出精确转导的机制提供重要信息. ESI-MS/MS 脂质组学分析技术无疑会在解决这一焦点问题上继续发挥推动作用.

2.2 促进了脂质代谢相关基因的鉴定

在脂质合成过程中, 棕榈酸(16:0)、硬脂酸(18:0)等脂肪酸先在质体中合成后, 再与酰基载体蛋白(acyl carrier protein, ACP)结合, 之后 18:0-ACP 在硬脂酰基-酰基载体蛋白脱氢酶(stearoyl-ACP desaturases)的作用下转化成 18:1-ACP, 再在

质体或内质网中进一步合成磷脂、糖脂等复杂脂质。SSI2 基因是编码硬脂酰基-酰基载体蛋白脱氢酶的基因。拟南芥 *ssi2* 突变体植株中 18:0-ACP 向 18:1-ACP 的转化过程出现中断, 导致叶片中脂质总量下降, 质体与非质体的脂质组成均发生显著变化^[21]。 *sfd1* 和 *sfd4* 突变体是 *ssi2* 突变体经随机突变产生的。 *sfd1* 和 *sfd4* (也称 *fad6*) 基因的突变导致了 *ssi2* 突变体的许多表型被消除, 表明 *sfd1* 和 *sfd4* 抑制了 *ssi2* 的表达^[23]。应用 ESI-MS/MS 技术对 *ssi2 sfd1* 和 *ssi2 sfd4* 双突变体的脂质谱分析的结果发现, *ssi2 sfd1* 双突变体植株中脂质的含量和 18:1 脂肪酸的百分摩尔含量得到恢复, *ssi2 sfd4* 植株中 18:1 脂肪酸含量很高, 含有 18C 酰基的多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acids, PUFAs) 水平下降。而且, *sfd1* 和 *sfd4* 突变体中含有 16:3 脂肪酸支链的脂质含量下降。这些结果表明 *SFD1* 和 *SFD4* 基因是调控脂质合成的基因。通过 DNA 测序鉴定出 *SFD4* 基因为 ω 6-脂肪酸脱氢酶基因, *SFD1* 基因为二羟基丙酮磷酸盐还原酶基因^[23-24]。Maeda 等^[25]发现, 低温处理下维生素 E- 缺失 2(*vte2*) 突变体的 PUFAs 组成与野生型显著不同, 亚麻酸(18:3)水平低而亚油酸(18:2)水平高。进一步的脂质组学分析发现, 这些变化是由于在低温胁迫下, *vte2* 突变体内质网中的磷脂合成途径中双烯酸(dienoic acid)向三烯酸(trienoic acid)的转化减少所致。在 *vte2* 突变体中导入内质网脂肪酸脱氢酶突变基因 *fad2* 和 *fad6* 后, 则抑制了 *vte2* 突变体这些表型的出现。这些结果表明拟南芥质体内合成的维生素 E 调节低温胁迫下内质网中 PUFAs 的代谢, *VTE2* 是调控脂质代谢途径的重要基因。

2.3 揭示出脂质代谢在防御反应中的作用

ssi2 突变体表现出水杨酸(salicylic acid, SA)信号转导途径组成型激活, 从而对多种病原菌和昆虫的抗御性增强^[23]。 *SFD1* 基因突变使 *ssi2* 突变体对多种病原菌的抗性消除, 而且系统获得抗性(systemic acquired resistance, SAR)这一可诱导的对广谱病原菌的抗御机制也被抑制。 *SSI2* 和 *SFD1* 已被确认为脂质代谢的重要基因, *sfd1* 和 *ssi2* 突变体的研究结果揭示出脂质在植物防御信号转导中发挥着重要作用。大量的研究已经证实, 游离脂肪酸氧化产生的羟脂(如茉莉酸)参与调节植物的发育和防御反应等多种过程^[26]。Buseman 等^[27]应用 ESI-TOF-MS 与 ESI-MS/MS 技术结合, 揭示出拟南芥的极性脂质 PG、MGDG 和 DGDG 等含有羟酯链。这些脂

质含有的羟酯主要是 12- 氧 - 植物二烯酸(12-oxophytodienoic acid, OPDA)和十六碳的植物二烯酸(dinor-oxophytodienoic acid, dnOPDA)。在未损伤的叶片中, 含有羟酯的极性脂质的水平极低, 但是在受到伤害的 15 min 内含有 2 个羟酯链的糖脂含量迅速增加 200~1 000 倍, 证实了这些含羟酯的糖脂是质体内羟酯生物合成的初级产物, 与植物的防御反应关系密切。Yang 等^[28]应用 ESI-MS/MS 技术对腐生真菌灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)侵染后的拟南芥植株进行脂质组分析发现, PG 和 DGDG 的水平下降, 推测这些极性脂质的水解可能为真菌诱导下茉莉酸(jasmonic acid, JA)的形成提供前体物质。对灰葡萄孢菌侵染和未侵染的拟南芥 *AtPLAI* 基因缺失突变体与野生型进行脂质分析发现, *AtPLAI* 基因参与未被病原菌侵染过的拟南芥基础 JA 的生物合成, 影响拟南芥植株对灰葡萄孢菌的抗性, 但是 *AtPLAI* 基因的缺失并不影响灰葡萄孢菌诱导下 JA 和游离亚麻酸的合成以及质体内脂质的水解。

2.4 脂质的分布、运输与转化特性

Devaiah 等^[28]应用 ESI-MS/MS 技术对拟南芥的叶片、花、花梗、角果、根和种子等不同器官中各类极性脂质的 140 多个分子种进行分析, 发现了不同器官之间脂质分子种的显著差异, 揭示出不同的脂质代谢存在器官特异性。Wanjie 等^[29]应用 ESI-MS/MS 技术对伸长期和成熟期的棉花纤维细胞的脂质提取物进行脂质谱分析, 比较了细胞快速伸长和次生细胞壁加厚过程中细胞膜脂质组成的变化。应用 ESI-MS/MS 技术的研究还发现脂滴(lipid droplet)具有脂质运输功能。脂滴又被称作脂肪滴(adiposome), 主要是中性脂质的集合体, 外部被单层磷脂与蛋白质包围。蛋白质组学分析曾提出脂滴可能作为动态的器官系统(dynamic organelle system)参与细胞中膜运输以及脂质的包装和分配^[30]。Bartz 等^[30]应用 ESI-MS/MS 与 NMR 等技术结合的方法对脂质体的脂质组成进行分析, 发现脂滴中大约 10%~20% 的中性脂质为醚脂, 脂质体中除了中性脂质外, 磷脂在重量上仅占 1%~2%, 但却包含 160 多种分子种。其中最丰富的磷脂种类为 PC, 其次是 PE、PI 以及连接了一个乙醚的 PC(ePC)。这些结果表明, 脂质体在脂质代谢和脂质运输过程中发挥着重要作用。Fauconnier 等^[31]发现土豆储存过程中产生脂肪酸的氢过氧化物主要是由亚油酸形成的 9-S- 氢过氧化物(9-hydroperoxide, 9-HPOD)。

应用 ESI-MS/MS 技术分析脂质的变化, 发现 PC、PE、PI、MGDG、DGDG 的含量均下降, 这些复杂脂质中亚油酸减少的量与 9-HPOD 和 colneleic acid 生成的量相关性很好, 揭示出土豆储存过程中脂质的转化途径。

2.5 新脂质的鉴定发现

通过与其他质谱技术相结合, ESI-MS/MS 在新脂质的鉴定中发挥了作用。Fauconnier 等^[32]应用 ESI-MS/MS 技术与 ESI-TOF-MS 技术结合, 从土豆块茎中鉴定出 1-16 : 0, 2-colneleic phosphatidylinositol (PI), 这是首次鉴定出含有 colneleic acid 的磷脂。Moreau 等^[33]应用 ESI-MS/MS、HPLC-ESI-MS 和 HPLC-APCI-MS 技术结合, 证实了 DGDG 是燕麦粒中最丰富的糖脂, 并从燕麦粒中鉴定出 5 种新的糖脂: 2 种新的 DGDG 交内酯(双 - 和三 - 交内酯), 2 种三半乳糖甘油二酯(trigalactosyldiacylglycerol, TriGDG)交内酯(单 - 和双 - 交内酯)和 1 种四面 DGDG (tetragalactosyldiacylglycerol, TetraGDG)交内酯(单 - 交内酯), 并发现燕麦粒中糖脂交内酯占到糖脂总量的 29%, 这是首次在自然界极性脂质中发现单 - 和双 - 交内酯。

3 展 望

ESI-MS/MS 技术, 作为一种能直接进样分析的高通量分析技术, 样品需要量少, 前处理简单, 而且能在短时间内完成主要脂类分子种的测定, 为研究者提供丰富的样品信息, 因而特别适用于检测因环境变化和生长发育引起的组织内脂质分子种的微量变化。该技术在植物脂质分析上的应用已经并将继续推动植物脂质组学的发展, 深入揭示脂质代谢在植物的逆境胁迫反应、防御反应和激素刺激以及生长发育等生命过程中的作用。另外, ESI-MS/MS 技术与反向遗传学技术的结合, 在揭示脂质代谢的途径、脂质代谢关键基因及其作用机理和细胞信号转导机制方面显出了勃勃生机。

虽然目前应用 ESI-MS/MS 技术已经能够对植物脂质组学, 特别是极性脂质分子种进行高通量分析, 但仍需要对 ESI-MS/MS 技术进行各种扫描模式的方法开发, 以进一步扩大分析脂质的范围, 如分析鞘脂类(sphingolipid)、三酰甘油(triacylglycerol)、磷酸肌醇(phosphoinositides)、N-酰基磷脂酰乙醇胺(N-acyl phosphatidyl ethanolamine)、游离脂肪酸

(free fatty acid)和氧化脂类(oxylipins)等。另外, 目前 ESI-MS/MS 仍然局限于对已知分子质量、结构等信息的目标脂质的分析, 对结构未知的新型脂质的分析还比较困难, 因此, 应加强与其他质谱技术的结合, 以满足新型脂质鉴定的需要。此外, 由于脂质种类繁多, 脂质与脂质、脂质与蛋白质等生物分子相互作用复杂, 系统研究脂质的功能与作用机理, 还需要开发 ESI-MS/MS 技术与其他分析手段(如 GC、HPLC 等)的联用技术, 如将正相高效液相色谱(NPLC)、反相高效液相色谱(RPLC)与 ESI-MS/MS 技术联用, 以分析复杂混合物中的脂质分子种或痕量的脂质成分。

参 考 文 献

- [1] Watson A D. Lipidomics: a global approach to lipid analysis in biological systems. *J Lipid Res*, 2006, **47**(10): 2101-2111
- [2] 蔡潭溪, 刘平生, 杨福全, 等. 脂质组学研究进展. *生物化学与生物物理进展*, 2010, **37**(2): 121-128
Cai T X, Liu P S, Y F Q, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2010, **37**(2): 121-128
- [3] Wang X M. Lipid signaling. *Cur Opin Plant Biol*, 2006, **7**(3): 329-326
- [4] Wang X M, Devaiah S P, Zhang W H, *et al.* Signaling functions of phosphatidic acid. *Prog Lipid*, 2006, **45**: 250-278
- [5] Han X L, Gross R W. Global analyses of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples by ESI mass spectrometry: a bridge to lipidomics. *J Lipid Res*, 2003, **44**: 1071-1079
- [6] Brügger B, Erben G, Wieland F T, *et al.* Quantitative analysis of biological membrane lipids at the low picomole level by nano-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**(6): 2339-2344
- [7] Gunstone F D, Harwood J L, Dijkstra A J. *The Lipid Handbook* (third edition). Boca Raton: CRC Press, 2006: 123
- [8] Welti R, Li W Q, Li M Y, *et al.* Profiling membrane lipids in plant stress responses. Role of Phospholipase D α in freezing- induced lipid changes in *Arabidopsis*. *J Biol Chem*, 2002, **227** (35): 31994-32002
- [9] Wang X M, Li W Q, Li M Y, *et al.* Profiling lipid changes in plant response to low temperatures. *Physiol Plant*, 2006, **126**(1): 90-96
- [10] Han X L, Gross R W. Shotgun lipidomics electrospray ionization mass spectrometric analysis and quantitation of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples. *Mass Spectr*, 2005, **24**: 367-412
- [11] Welti R, Shah J, LeVine S, *et al.* High-throughput lipid profiling to identify and characterize genes involved in lipid metabolism, signaling, and stress response. In: Feng L, Prestwich G D, eds. *Functional Lipidomics*, Boca Raton: CRC Press, 2005: 307-322
- [12] Hou W M, Zhou H, Elisma F, *et al.* Technological developments in

- lipidomics. Brief Funct Genomic Proteomic, 2008, **7**(5): 395–409
- [13] Li W Q, Li M Y, Zhang W H, *et al.* The plasma membrane-bound phospholipase D δ enhances freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. Nat Biotech, 2004, **22**(4): 427–433
- [14] Zhang W H, Wang C X, Qin C B, *et al.* The oleate-stimulated phospholipase D, PLD δ and phosphatidic acid decrease H₂O₂-induced cell death in *Arabidopsis*. Pl Cell, 2003, **15**: 2285–2295
- [15] Li W Q, Wang R P, Li M Y, *et al.* Differential degradation of extraplastidic and plastidic lipids during freezing and post-freezing recovery in *Arabidopsis thaliana*. J Biol Chem, 2008, **283**(1): 461–468
- [16] Li M Y, Welti R, Wang X M. Quantitative profiling of *Arabidopsis* polar glycerolipids in response to phosphate starvation. Roles of PLD ζ 1 and PLD ζ 2 in phosphatidylcholine hydrolysis and digalactosyldiacylglycerol accumulation in phosphate-starved root. Plant Physiol, 2006, **142**(2): 750–761
- [17] Zhang Y Y, Zhu H Y, Zhang Q, *et al.* Phospholipase D α 1 and phosphatidic acid regulate NADPH oxidase activity and production of reactive oxygen species in ABA-mediated stomatal closure in *Arabidopsis*. Pl Cell, 2009, **21**: 2357–2377
- [18] Devaiah S P, Roth M R, Baughman E, *et al.* Quantitative profiling of polar glycerolipid species from organs of wild-type *Arabidopsis* and a phospholipase D α 1 knockout mutant. Phytochem, 2006, **67**: 1907–1924
- [19] Devaiah S P, Pan X Q, Hong Y Y, *et al.* Enhancing seed quality and viability by suppressing phospholipase D in *Arabidopsis*. Plant J, 2007, **50**: 950–957
- [20] Hong Y Y, Devaiah S P, Bahn S C, *et al.* Phospholipase D ϵ and phosphatidic acid enhance *Arabidopsis* nitrogen signaling and growth. Plant J, 2009, **58**: 376–387
- [21] Qin C B, Wang X M. The *Arabidopsis* phospholipase D family. characterization of a calcium-independent and phosphatidylcholine-selective PLD ζ 1 with distinct regulatory domains. Plant Physiol, 2002, **128**: 1057–1068
- [22] Shanklin J, Cahoon E B. Desaturation and related modifications of fatty acids. Ann R Plant, 1998, **49**: 611–641
- [23] Nandi A, Krothapalli K, Buseman C M, *et al.* *Arabidopsis sfd* mutants affect plastidic lipid composition and suppress dwarfing, cell death and the enhanced disease resistance phenotypes resulting from the deficiency of a fatty acid desaturase. Pl Cell, 2003, **15**: 2383–2398
- [24] Nandi, A, Welti, Shah J. The *Arabidopsis thaliana* dihydroxyacetone phosphate reductase gene Suppressor of fatty acid desaturase deficiency1 is required for glycerolipid metabolism and for the activation of systemic acquired resistance. Pl Cell, 2004, **16**: 465–477
- [25] Maeda H, Sage T L, Isaac G, *et al.* Tocopherols modulate extraplastidic polyunsaturated fatty acid metabolism in *Arabidopsis* at low temperature. Pl Cell, 2008, **20**: 452–470
- [26] Turner J G, Ellis C, Devoto A. The jasmonate signal pathway. Pl Cell, 2002, Suppl: 153–164
- [27] Buseman, C M, Tamura P, Sparks A A, *et al.* Wounding stimulates the accumulation of glycerolipids containing oxophytodienoic acid and dinor-oxophytodienoic acid in *Arabidopsis* leaves. Plant Physiol, 2006, **142**(1): 28–39
- [28] Yang W Y, Devaiah S P, Pan X Q, *et al.* AtPLAI is an LRR-containing acyl hydrolase involved in basal jasmonic acid production and *Arabidopsis* resistance to *Botrytis cinerea*. J Biol Chem, 2007, **282**(25): 18116–18128
- [29] Wanjie S W, Welti R, Moreau R A, *et al.* Identification and quantification of glycerolipids in cotton fibers: reconciliation with metabolic pathway predictions from DNA databases. Lipids, 2005, **40**(8): 773–785
- [30] Bartz R, Li W H, Venables B, *et al.* Lipidomics reveals adiposomes store ether lipids and mediate phospholipid traffic. J Lipid Res, 2007, **48**(4): 837–847
- [31] Fauconnier M L, Welti R, Blée E, *et al.* Lipid and oxylipin profiles during aging and sprout development in potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). Biochim Biophys Acta, 2003, **1633**: 118–126
- [32] Fauconnier M L, Williams T D, Marlier M, *et al.* Potato tuber phospholipids contain colneleic acid in the 2-position. FEBS Letters, 2003, **538**: 155–158
- [33] Moreau R A, Doehlert D C, Welti R, *et al.* The identification of mono-, di-, tri-, and tetragalactosyl- diacylglycerols and their natural estolides in oat kernels. Lipids, 2008, **43**(6): 533–548

Advances in ESI-MS/MS Approach-based Plant Lipidomics*

WANG Tao, ZHONG Xiu-Li, MEI Xu-Rong**, ZHANG Yan-Qing

⁽¹⁾ Key Laboratory of Dryland Farming and Water-Saving Agriculture, Ministry of Agriculture, Institute of Environment and Sustainable Development in Agriculture, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China;

⁽²⁾ Yunnan Reascend Tobacco Technology (Group) Co., Ltd, Kunming 650106, China)

Abstract As shown by many researches, various lipids are not only involved in many cellular processes, such as plant signal transduction, vesicular transport, and cytoskeletal rearrangements, but also play a pivotal role in mediating plant growth, development and stress responses. However, due to the diversity and complexity of lipids, and the limitation of analytical approach, its hard to have a deep understanding on lipids. Electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) is a direct-infusion, high-throughput analytical strategy. By utilizing this approach, most lipid molecular species can be quantified in a short time only need small samples, detection of minor changes in plant lipids induced by environmental changes and growth and development has thus been greatly facilitated. The successful application of this approach in plants has led to great progress in plant lipidomics in recent years. Functions of some lipids and lipid-hydrolyzing enzymes in plant stress and defense responses have been revealed, and several novel genes related to plant lipid metabolism have been identified, all owing to the facilitation of this approach. Moreover, some new discoveries related to lipid distribution, transport, and transformation and identification of new lipid species have been made through the ESI-MS/MS approach coupled with other lipid analyzing methods. The paper firstly gives a brief depiction on the characteristics of the ESI-MS/MS approach, then provides an overview of application advances of the approach in plant lipidomics, and offers some prospective options to its future development in the final part.

Key words plant lipidomics, ESI-MS/MS, mass spectrometry, soft ionization

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00193

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30871447).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-82109333, E-mail: meixr@163.com

Received: April 9, 2010 Accepted: June 8, 2010