

基于超高效液相色谱-质谱联用系统的百草枯的定量检测

王琪¹, 唐惠儒¹

(1. 复旦大学人类表型组研究院生命科学学院, 上海 200438;)

摘要: 百草枯是一种成本效益高的除草剂, 在许多国家广泛使用, 可在光合组织中引发严重的氧化应激。研究植物抗除草剂或抗氧化应激机制需要确定植物经百草枯处理时的细胞百草枯水平。传统的同位素标记方法有可能对人类健康和环境造成问题。对于放射性同位素操作, 还需要特殊的操作空间和严格的环境检查。此外, 由于生产周期延长, 放射性标记的百草枯越来越难买到。在这里, 我们描述了一种使用高分辨超高效液相色谱 (UHPLC) -质谱 (MS/MS) 方法测定少量拟南芥组织或原生质体中百草枯水平的非放射性方法。该方法具有高度选择性和敏感性, 与同位素检测方法相比, 更具环境兼容性和技术可行性。

关键词: 百草枯; 超高效液相质谱联用; 拟南芥;

中图分类号: Q591

文献标识码: 期刊[J]

Determination of Paraquat in Arabidopsis Tissues and Protoplasts by UHPLC-MS/MS

Qi Wang¹, Huiru Tang¹

(1. Human phenome Institute, Fudan University, Shanghai 201203, China)

Abstract: Paraquat is a cost-effective herbicide, widely used in many countries, that can induce severe oxidative stress in photosynthetic tissues. Studying plant herbicide resistance or antioxidant stress mechanisms requires determining the cellular paraquat level when plants are treated by paraquat. The traditional isotopic labelling method has the potential risk to cause problems to both human health and the environment. For radioisotope manipulation, special operation spaces and strict environmental inspection are also required. In addition, the radiolabeled paraquat is increasingly hard to buy due to the extended production cycle. Here, we describe a nonradioactive method to determine the paraquat level in a small number of Arabidopsis tissues or protoplasts, using a high resolution ultra-high-performance liquid chromatography (UHPLC)-mass spectrometry (MS)/MS method. This method is highly selective and sensitive, and more environmentally compatible and technically feasible than the isotope detection method.

Keywords: Paraquat, UHPLC-MS/MS, Arabidopsis,

百草枯 (PQ, 1,1-二甲基-4,4-联吡啶二氯化物, 或通常称为甲基紫精) 是一种非选择性

除草剂，在许多国家广泛使用了半个多世纪。它作用于叶绿体，在几个小时内杀死植物。PQ 接受来自光系统 I 的电子并将其转移到分子氧中，从而产生剧毒活性氧 (ROS)，并在绿色组织中引起严重的氧化应激。在过去的几十年里，在田间发现了许多抗 PQ 的杂草。研究植物对 PQ 的抗性机制不仅有助于了解杂草如何进化出除草剂抗性，而且有助于理解植物抗氧化胁迫机制。在拟南芥中，已经报道了许多 PQ-抗性突变体，包括 *rmv1* (对甲基紫精 1 的抗性) (Fujita 等人, 2012)、*par1* (副四抗 1)、*atpdr11* (多效性耐药 11)、*rcd1* (激进化诱导的细胞死亡 1)、*pst1* (光自养盐耐受 1)、*par2* (百草枯抗性 2)、*pqt3* (百草枯抗性 3) 和 *atpqt11* (百草枯抗性 11)，以及负责该抗性的突变基因已被鉴定。迄今为止揭示的抗性机制可分为三类：PQ 的吸收和转运受损、PQ 的螯合增强和 ROS 清除能力增强。

之前的研究鉴定了一种新的 PQ 抗性突变体 *rtp1* (对百草枯 1 的抗性)，其中 MATE (多药和有毒化合物挤出) 家族蛋白 DTX6 被破坏。MATE 家族蛋白是一种具有独特底物特异性的转运蛋白。为了阐明 DTX6 的抗性机制，测量处理后细胞中的 PQ 水平是重要的。同位素标记方法已被用于追踪植物中的外源分子；然而，放射性标记的 PQ 越来越难以获得，放射性同位素的操作需要非常复杂的批准和检查程序。因此，我们建立了一种结合超高效液相色谱 (UHPLC) 和质谱 (MS) 系统测定细胞中 PQ 含量的非放射性方法。UHPLC-MS/MS 采用三重四极杆质谱的多重反应监测模式测定 PQ。它具有较高的选择性和灵敏度，在柱上可达到 10-15mol/L 的灵敏度。与传统的放射性标记相比，UHPLC-MS/MS 方法更环保，更易于实施。

1 材料与amp;方法

1.1 植物材料收集

用 70%乙醇对拟南芥种子进行表面杀菌，然后在标准长日照生长条件 (16:8 小时光/暗周期) 下在垂直的 1/2 Murashige 和 Skoog 方形平板 (1%琼脂) 上生长 10 天。将盘子水平放置，然后在黑暗中放置两天，让下胚轴快速向上生长。之后，将盘子再次放回长日照条件下再生长两天。用移液管将 10 mL 10 μ M 百草枯缓慢加入培养皿中，使百草枯均匀分布在培养基表面。将平板水平放置在黑暗中 6 小时。然后，分别收获根和叶。用蒸馏水将材料冲洗三次，用纸巾擦干，然后称重。将材料冷冻在液氮中，并将其储存在 -80 $^{\circ}$ C 下进行百草枯测定。

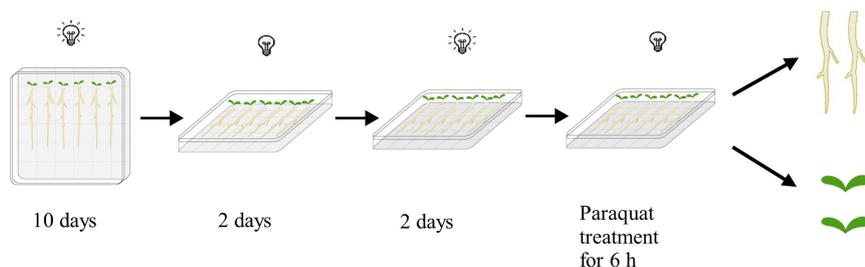


Figure 1 幼苗生长及百草枯处理过程示意图

1.2 百草枯的提取

1) 使用 1×10^6 – 2×10^6 原生质体或 20–30 mg 植物组织在 2 mL 离心管中提取百草枯。将原生质体在液氮中冷冻 1 分钟，然后在室温水浴中解冻 2 分钟（进行三次冻融循环）以使原生质体破裂。对于植物组织，将材料在液氮中研磨成粉末后再进行此步骤。

2) 在每个试管中加入 800 μ L 百草枯提取液（甲醇：0.5M HCl 水溶液=6:4）。

3) 将每个样品在冰浴共超声处理 20 分钟（打开 1 分钟，关闭 1 分钟）。

4) 将样品放入 60°C 的水浴中 30 分钟，然后冷却至室温。

5) 在 4°C 下以 $13500 \times g$ 离心 10 分钟，收集上清液。

6) 重复步骤 2 至 5 步，并将两次上清液合并在一起。

7) 氮气保护下蒸发有机溶剂，并将干燥的样品储存在 -80°C 下，直到测定。

1.3 百草枯的 LC-MS/MS 的检测

使用由岛津 Exion LCAD 与配有电喷雾电离的 SCIEX 6500+ QTRAP 质谱仪组成的 UHPLC-MS/MS 系统测定百草枯及敌草快。将 1 μ L 样品注射到系统中，并在 Waters BEH HILIC 柱(1.7 mm 粒径, 2.13100 mm)上分离。LC 流动相由溶剂 A (100mM NH₄Ac 和 0.5% 甲酸在水中 [pH9.3])和溶剂 B (乙腈)。流动相流速为 0.4 mL/min，进行线性梯度洗脱程序(7 min)。

在 LC-MS/MS 系统上采用正检测模式(ESI+)和多反应监测模式进行检测。对于离子源中的气体参数，离子气体 1、离子气体 2 和幕气分别设置为 55、55 和 35 psi，温度设置为 500°C。将离子喷雾电压设定为 5500 V。监测每种分析物的两个多重反应转变以定量和确认百草枯(186.0-171.0 用于定量; 93.2-171.3 用于确认)。解簇电位(DP)和碰撞能(CE)的电压是化合物特有的参数。百草枯和敌草快的 DP 和 CE 值分别设定为 100 和 60, 25 和 17。其他参数按建议设置为默认值。

2 数据分析及结果

用 UHPLC-MS/MS 直接计算百草枯的色谱峰面积。百草枯的峰面积表示柱上分析物的量。由于进样体积为 1 μ L，样品总体积为 100 μ L，将色谱峰面积乘以 100，得到样品中分析

物的总量。

百草枯外排测定结果如图 2A 所示。在每个时间点取样相同数量的原生质体用于百草枯测定。原生质体中百草枯的含量由其色谱峰面积表示。将时间点 0 的百草枯水平设置为 100%，并根据图 2B 中的公式计算其他时间点百草枯的相对水平。

根吸收测定结果如图 2C 所示。通过将百草枯的色谱峰面积除以材料的量，即拟南芥材料（如根和叶）的重量，获得组织中百草枯水平的归一化值。比较了不同样品中百草枯的含量。

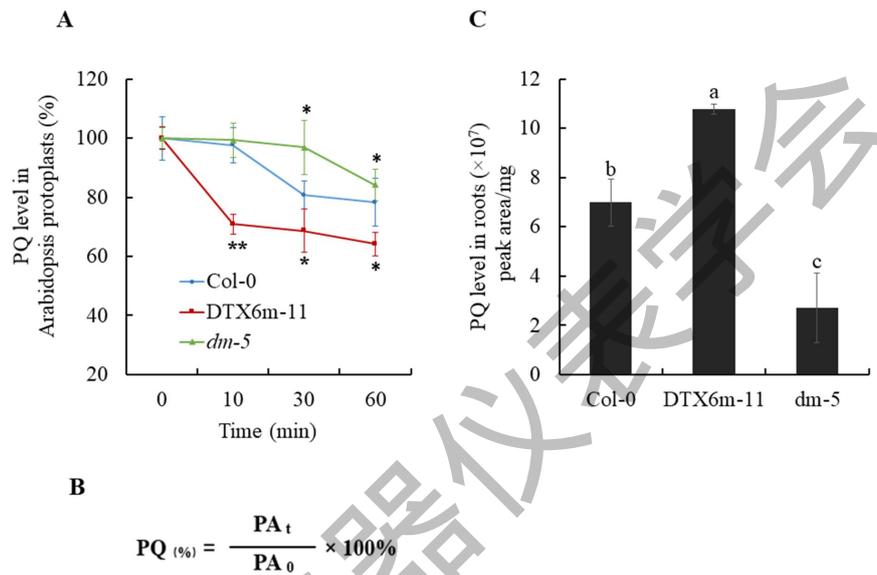


Figure 2 UHPLC-MS/MS 法测定原生质体和植物组织中的百草枯含量。

(A) 拟南芥叶片原生质体的百草枯的流出测定。原生质体中百草枯的含量由其色谱峰面积表示。每个时间点至少确定三个重复。将时间点 0 的百草枯水平设置为 100%，并使用图 2 (B) 中给出的公式计算其他时间点百草枯的相对水平。所示的样品是 Col-0 (野生型对照)、DTX6m-11 (DTX6m 过表达系) 和 dm-5 (dtx5-dtx6 双突变体)。数值为平均值±标准差 (n=3)。通过 Student t 检验分析 Col-0 和其他材料之间差异的显著性。PQ, 百草枯。 **P≤0.01; *P≤0.05。(B) 拟南芥原生质体不同时间点百草枯相对含量的计算公式。PA_t: 各时间点百草枯的峰面积; PA₀: 百草枯在时间点 0 的峰面积。(C) 使用拟南芥根进行百草枯吸收测定。在黑暗中用 10μM 百草枯处理拟南芥 6 小时, 组织中的百草枯水平定义为百草枯的色谱峰面积除以组织的新鲜重量。数值为平均值±标准差 (n=3)。进行双尾方差分析以显示差异的显著性。

以上方法及结果发表在 Molecular Plant^[1]和 bioprotocol^[2]上。

参考文献:

- [1]Lv Z, Zhao M, Wang W, et al. Changing Gly311 to an acidic amino acid in the MATE family protein DTX6 enhances Arabidopsis resistance to the dihydropyridine herbicides. Mol Plant. 2021;14(12):2115-2125. doi:10.1016/j.molp.2021.09.002
- [2]Zhao M, Wang Q, Shi M, Sun Z, Tang H, Ge X. Determination of Paraquat in Arabidopsis Tissues and Protoplasts by UHPLC-MS/MS. Bio-protocol. 2023;13(7):1-8. doi:10.21769/BioProtoc.4642

中国仪器仪表学会