

# 一种毫克级的超痕量植物激素油菜素内酯的高效定量分析方法

辛培勇<sup>1</sup>, 闫吉军<sup>1</sup>, 程淑静, 褚金芳<sup>1,2</sup>

(1.中国科学院遗传与发育生物学研究所 国家植物研究中心(北京), 北京 100101; 2.中国科学院大学, 北京 100049)

**摘要:** 油菜素甾醇类化合物(Brassinosteroids, BRs)是一类重要的内源性植物激素, 广泛参与植物整个生长发育过程, 在提高农作物产量和品质方面具有巨大的应用潜力。植物内源 BRs 的发现、鉴定以及定量分析是进行生理研究的基础。从化学结构与理化性质出发, 设计一种基于离子交换结合反相机理的高效分离纯化方法, 结合高灵敏的衍生化试剂, 建立一套毫克级的植物内源 BRs 的定量分析方法。方法基质效应在 94%-102%, 方法的回收率大于 91%, 检出限分别在 3.4-8.9 fg, 仅需 10 mg FW 样品中便可完成检测, 攻克了 BRs 高灵敏度定量分析的技术难题, 为国内外生物学家在 BRs 分子作用机理领域深入研究提供了关键性技术支持。

**关键词:** 油菜素内酯; 硼亲和作用; 超痕量分析; 微量植物材料; LC-MS/MS

## A milligram-level efficient quantitative analysis method for ultra-trace plant hormone brassinosteroids

XIN Peiyong<sup>1</sup>, YAN Jijun<sup>1</sup>, CHENG Shujing<sup>1</sup>, CHU Jinfang<sup>1,2</sup>

(1.National Centre for Plant Gene Research (Beijing), Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; 2.University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract:** Brassinosteroids (BRs) are a class of important endogenous plant hormones that play diverse essential roles in plant growth and development, and have great potential for improving crop yield and quality. The discovery, identification, and quantitative analysis of endogenous BRs in plants are the basis for physiological research. Starting from the chemical structure and physicochemical properties, an efficient separation and purification method based on ion exchange combined with the reversed-phase mechanism has been designed, and combined with highly sensitive derivatization reagents, an milligram-level efficient quantitative analysis method for

ultra-trace plant hormone BRs has been established. The matrix effects of the method were 94% - 102%, the recoveries were greater than 91%, and the LODs were 3.4 - 8.9 fg, respectively. The detection of BRs can be completed with only 10 mg FW samples, thus providing technical support for biologists to conduct more in-depth research in the field of BRs molecular mechanism.

**Keywords:** Brassinosteroids; boronate affinity; ultratrace analysis; micro amount of plant materials; LC-MS/MS

## 1 引言

油菜素内酯(Brassinosteroids, BRs), 又称油菜素甾醇, 是继生长素、细胞分裂素、赤霉素、脱落酸、乙烯之后被确认的第六大类植物激素<sup>[1]</sup>。BRs 作为一类重要的植物内源激素, 通过调控自身生长发育和调节植物对外界环境的应答而广泛参与植物的生长发育过程<sup>[2-3]</sup>。因此, BRs 的生物合成、代谢及其作用机理一直是植物学家研究的热点问题。深入了解 BRs 生理学作用, 对于调控植物的生长、促进农业的发展、解决粮食危机等问题都有十分重要的意义<sup>[4]</sup>。BRs 在植物体内的含量和变化直接影响其生长发育, 因此, BRs 准确的定性定量分析对研究其作用的分子机理具有非常重要的意义。

然而, 与其它经典植物激素相比, BRs 的分析仍存在一些困难。首先, BRs 在植物中的浓度极低, 范围从 0.01 到 100 ng/g FW 不等, 远低于其它植物激素<sup>[5]</sup>。其次, 由于 BRs 是中性的甾醇类化合物, 缺乏可离子化的功能基团, 与其它酸性和碱性植物激素相比, 基质效应对 BRs 检测的影响更为显著。在使用液相色谱-电喷雾质谱检测时, 干扰物可能会导致分离效果不佳, 并且产生离子抑制效应, 进而导致灵敏度低, 直接检测 BRs 往往需耗费大量材料<sup>[6]</sup>。近年来, 随着质谱技术的发展, BRs 的定量分析技术有了很大的进展, 然而方法的灵敏度、适用性及简便性仍然无法满足日益发展的分子生物学研究的需求。

为进一步提高 BRs 检测的灵敏度和通量, 减少植物材料用量, 本案例将主要从 BRs 的结构特征及理化性质入手, 优化前处理条件。结合 BRs 特有的顺式邻二醇结构, 通过衍生化反应, 引入易电离的基团, 建立一套高通量、高灵敏度的 BRs 定量分析方法, 能够准确检测微量植物材料中超痕量激素 BRs 水平, 从而推进 BRs 相关领域研究的深入和发展。

## 2 材料与amp;方法

### 2.1 实验试剂与耗材

BRs 标准品购买于捷克 olchemim 公司；HPLC 级甲醇(Methanol, MeOH)与乙腈购于美国 Thermo Fisher Scientific 公司；2-甲氧基吡啶-5-硼酸(2-methoxypyridine-5-boronic acid, MPyBA)购自百灵威有限公司；乙酸(Acetic acid, HAc)购自美国 Sigma-Aldrich 公司；本实验所用水均由 MillQ 纯化水净化系统制备(电阻率>18.2 MΩ)。

## 2.2 实验仪器

ACQUITY 超高效液相色谱(ultra performance liquid chromatogram, UPLC) (美国 Waters 公司)系统串联装配有 ESI 电喷雾离子源的 QTrap 6500 三重四极杆串联线性离子阱混合模式质谱系统(美国 AB SCIEX 公司)。色谱柱采用 ACQUITY UPLC BEH C18 Column (1.7 μm, 2.1×50 mm) (美国 Waters 公司)；N-EVAP™ Models 112, 116 型氮吹系统(Organomation)；Mill-Q 型纯水仪(美国 Merck 公司)；MM 400 研磨仪(德国 Retsch 公司)；Vortex Genie 2 型涡旋混合器(美国 Scientific Industries 公司)；KQ 5200 超声波清洗器(昆山市超声仪器公司)。

## 2.3 样品前处理方法

将植物组织材料在液氮中研磨成粉末，准确称取样品量 10 mg，加入 80% MeOH 提取液与稳定同位素内标，混匀，超声提取 1 h，在 4°C 的条件下 20,000 rpm 的转速离心 15 min，收集上清液。采用 MCX SPE 进行样品前处理，洗脱液吹干后。采用乙腈复溶，加入衍生化试剂 MPYBA，40°C 反应 1 h。反应液用 0.2 μm 滤膜过滤，过滤后的溶液待注入 LC-MS/MS 系统进行检测。

## 2.4 液相方法

衍生化后的 BRs 用 UPLC-MS/MS 检测，色谱柱为 ACQUITY UPLC BEH C18 柱，柱温 30°C。液相方法见下表：

表 2.1 BRs 的液相洗脱梯度表

时间 (min: sec)	流速 (mL/min)	A %	B %
Initial	0.3	40	60
9.0	0.3	10	90
10.0	0.3	10	90
11.0	0.3	40	60

注：A 为 0.05%乙酸水溶液，B 为 0.05%乙酸乙腈溶液。

### 3 BRs 高效定量分析方法的创建

#### 3.1 定量分析方法设计

首先，传统的 BRs 提取主要是低温下过夜静置提取(通常大于 12h)，占用 BRs 定量分析的绝大部分时间。为了避免冗长的提取过程，采用超声辅助提取来代替传统的过夜静置提取，提取时间缩短到 1 h。其次，植物基质复杂，几乎无法直接检测提取液中 BRs。因此，须建立一套简单高效的纯化方法来降低基质干扰。BRs 缺乏可离子化的基团，基质中会对其造成离子抑制的多为易电离的碱性化合物。为达到更好的除杂效果，制定阳离子交换与反相作用混合除杂策略。整套前处理方案简便快捷，30 min 便可完成固相萃取，大幅提高了样品前处理通量。第三，由于 BRs 是中性的甾醇类化合物，缺乏可离子化的功能基团，质谱灵敏度低。为此，考虑到绝大多数 BRs 含有邻二羟基基团，可以与有机硼酸结合。为提高灵敏度，选取含氮碱性有机硼酸作为衍生试剂，进而大幅提高质谱响应。最后采用高选择性、高灵敏的 LC-MS/MS 技术，材料使用量降低至 10 mg FW，便可准确高效的检测超痕量植物激素 BRs。

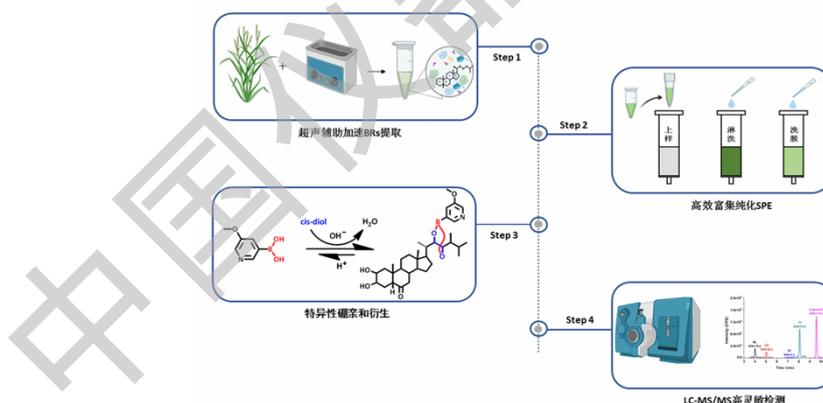


图 3.1 BRs 高效定量分析方法的创建

#### 3.2 BRs-MPYBA 衍生产物质谱方法建立

BRs 为多羟基化的甾醇类化合物，疏水性较强，质子亲和势低，在 ESI 源内不易离子化，检测灵敏度低。由于绝大多数 BRs 化合物都含有邻二羟基，可以与有机硼酸发生特异性酯化反应，为此选取 MPYBA 进行衍生，衍生产物进行质谱 MRM 参数优化。具体参数见表 3.1。

表 3.1 BRs 衍生产物 MRM 参数

分析物	母离子 (Da)	子离子 (Da)	入口电压 (V)	去簇电压 (V)	碰撞能量 (eV)	碰撞室出口电压 (V)
BL-MPyBA	598.3	136.1	10	100	75	12
		154.1	10	100	65	12
		178.1	10	100	57	12
CS-MPyBA	582.4	136.1	10	100	75	12
		564.1	10	100	52	12
		178.1	10	100	60	12
TE-MPyBA	566.3	136.1	10	100	70	12
		154.1	10	100	67	12
		178.1	10	100	60	12
TY-MPyBA	566.3	136.1	10	100	73	12
		154.1	10	100	68	12
		178.1	10	100	60	12
6-deoxoCS-MPyBA	568.4	136.1	10	100	75	12
		154.1	10	100	70	12
		178.1	10	100	65	12

### 3.3 方法学验证

为了评估整套定量分析方法的灵敏度和稳定性，本案例进行了一系列的方法学考察，包括线性方程、检出限、定量限、回收率、基质效应、重现性。结果显示，方法的回收率在 90%以上，基质效应在 94.3%-102%之间，表明了方法的除杂效果令人满意，大量基质的去除也为灵敏度的提高打下了基础。同时，RSD 均小于 12.0%，体现了方法稳定的重现性。具体方法学考察参数及结果如表 3.2-3.3。

表 3.2 方法的线性范围、线性回归方程、R<sup>2</sup>、检出限和定量限

分析物	线性范围 (pg)	线性回归方程	R <sup>2</sup>	检出限 (pg)	定量限 (pg)
D <sub>3</sub> -BL	0.2-500	y = 48552x - 253198	0.9980	5.6	18.6
D <sub>3</sub> -CS	0.2-500	y = 45373x - 231695	0.9976	3.4	11.3
D <sub>3</sub> -6-deoxoCS	0.2-500	y = 13457x + 14817	0.9999	8.9	29.8

注：R<sup>2</sup> 为线性相关系数的平方，y 为内标峰面积，x 为相应内标量。

表 3.3 方法的基质效应、回收率和重现性

分析物	基质效应 (%, n = 3)	回收率 (%, n = 3)	重现性 (%, n = 3)
D <sub>3</sub> -BL	97.1 ± 6.05	91.4 ± 8.22	2.4
D <sub>3</sub> -CS	94.3 ± 1.70	91.2 ± 5.23	3.6
D <sub>3</sub> -6-deoxoCS	102 ± 3.30	91.1 ± 5.05	12.0

### 3.4 方法的广泛应用

以水稻为植物材料，采用本案例方法检测其不同部位内源 BRs 的含量。对于不同的组织部位，仅在 10 mg 的微量植物样品中同时定量多种内源 BRs。所建方法的超高灵敏度、微量植物样品、精准定量等优势，攻克了长期以来困扰植物学家的内源油菜素内酯的高效、高灵敏定量及定性分析难题，技术水平进入国际领先行列。该方法已为国内外 60 多个课题组提供高质量分析数据近 5000 份，在 Science、Nature Biotechnology 等高水平杂志上发表相关论文近 20 篇，方法效果得到相关领域科学家的高度认可<sup>[7-11]</sup>。在 2023 年，与英国约翰英纳斯中心 Enrico Coent 团队合作在水生植物丝叶狸藻中检测 BRs 含量水平。因藻类植物基质与常见模式植物差异大且更为复杂，本方法表现出令人满意的除杂效果，实现复杂样品中 BRs 的精准定量，助力其探究 BRs 在构建细胞壁中调控细胞间生长协调机制。顶端弯钩是植物演化过程中所形成的特殊结构，起着保护茎顶端分生组织的作用，然而弯钩发育分子机制仍不清楚。与广州大学黎家团队合作，利用本方法分析拟南芥 BRs 生物合成缺失突变体中 BRs 含量变化，助力其探究 BRs 调控顶端弯钩的形成机制。

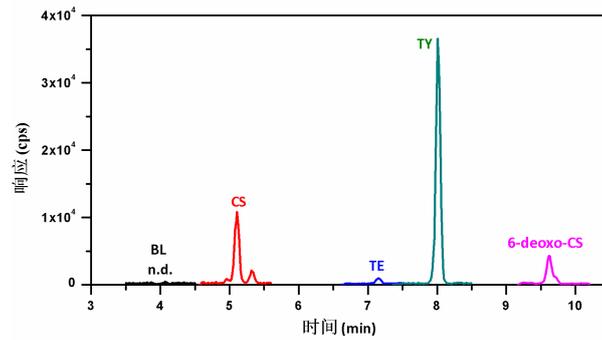


图 3.2 水稻花序组织 BRs 检测 UPLC-MS/MS 谱图

## 4 结语

本案例选择阳离子结合反相固相萃取富集纯化植物内源超痕量激素 BRs，优化衍生条件，结合 LC-MS/MS 技术，建立一套高通量、高灵敏的定量分析方法。前处理操作步骤简单，大幅提高了 BRs 分析的通量。同时，方法的灵敏度高，仅在 10 mg FW 植物材料中便可完成 BRs 检测，从而为生物学家在 BRs 分子作用机理领域进行更深入的研究提供技术支撑与保障。

### 参考文献:

- [1] Shamsul H and Aqil A. Brassinosteroids: a class of plant hormone[M]. Dordrecht, Springer Netherlands. 2003, pp 1-44.
- [2] Davies P J. The plant hormones: their nature, occurrence, and functions[M]. Dordrecht, Springer Netherlands, 2010, pp 1-12.
- [3] Nolan T M, Vukasinovic N, Hsu C W. et al. Brassinosteroid gene regulatory networks at cellular resolution in the Arabidopsis root[J]. Science, 2023, 379, 1314.
- [4] Yang Y Z, Chu C C, Qian Q. et al. Leveraging brassinosteroids towards the next green revolution [J]. Trends in plant science, 2024, 29, 86-98.
- [5] Song L, Liu J, Cao B L. et al. Reducing brassinosteroid signalling enhances grain yield in semi-dwarf wheat [J]. Nature, 2023, 617, 118-124.
- [6] Ding J, Mao L J, Wang S T. et al. Determination of endogenous brassinosteroids in plant tissues using solid-phase extraction with double layered cartridge followed by

high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Phytochem. Anal.*, 2013, 24, 386-394.

- [7] Bellow R K, Lee K, Kennaway R. et al. Brassinosteroid coordinates cell layer interactions in plants via cell wall and tissue mechanics[J]. *Science*, 2023, 380, 1275-1281.
- [8] Cao J; Liang Y X; Yan T T. et al. The photomorphogenic repressors BBX28 and BBX29 integrate light and brassinosteroid signaling to inhibit seedling development in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 2022, 34, 2266-2285.
- [9] Zhang J J, Chen W Y, Li X P. et al. Jasmonates regulate apical hook development by repressing brassinosteroid biosynthesis and signaling [J]. *Plant Physiology*, 2023, 193, 1561-1579.
- [10] Liang T, Shi C, Peng Y. et al. Brassinosteroid-activated BRI1-EMS-SUPPRESSOR 1 inhibits flavonoid biosynthesis and coordinates growth and UV-B stress responses in plants[J]. *Plant Cell*, 2020, 32, 3224-3239.
- [11] Zhang Y C, Yu Y, Wang C Y. et al. Overexpression of microRNA OsmiR397 improves rice yield by increasing grain size and promoting panicle branching [J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31, 848-852.