评述

质谱成像及其在植物内源性分子原位表征中的应用进展

何慧欣, 陈路路, 秦亮, 刘亚琴, 王晓东*

中央民族大学生命与环境科学学院, 生物成像与系统生物学研究中心, 北京 100081

* 联系人, E-mail: Xiaodong@muc.edu.cn

收稿日期: 2017-06-12; 接受日期: 2017-06-29; 网络版发表日期: 2017-08-21

国家自然科学基金(批准号: 21605164)、中央民族大学一流大学一流学科项目基金(批准号: 2015MDTD08C)和中央民族大学本科创新项目基金(批准号: SHSY2016120002)资助

摘要 质谱成像作为一种新型分子影像技术,可在组织或细胞水平上同时获得样本表面多种分子组成、丰度及原位空间分布信息。近年来,随着该技术的不断发展与完善,质谱成像正逐渐成为质谱分析领域的研究前沿与热点。目前,该技术已被广泛应用于诸多领域:如基础医学、药学、微生物学、动物学等。值得注意的是,在植物学研究领域,质谱成像技术也正逐渐受到重视并被广泛应用。本文基于多种质谱成像方法及相关技术流程,综述了该技术在植物内源性分子原位表征中的应用进展,尤其是在药用植物有效成分成像表征中的应用,并对质谱成像技术现有缺点与不足、潜在价值与应用前景进行了总结与展望。

关键词 质谱成像, 内源性分子, 原位表征, 空间分辨率, 药用植物

质谱成像(mass spectrometry imaging, MSI)是目前应用广泛的一种新型分子可视化技术,其基本原理为:利用激光或离子束照射组织切片使其表面分子离子化,然后通过质谱仪检测离子化分子的质荷比(ratio of mass to charge, m/z),再由成像软件将测得的质谱数据转化成相应像素点并重构出目标化合物在组织表面的空间分布图像。该技术基于质谱快速、灵敏及准确的特性,与免疫组化、荧光标记、核磁共振等传统成像方法相比具有以下优势:(i)样品处理过程较简单,无需放射性同位素或荧光标记;(ii)具有较高的检测灵敏度及较强的分子鉴定能力,可检测组织中低丰度生物分子、区分结构相似化合物并提供待测分子结构

信息;(iii)能同时获得组织切片表面多种分子组成、丰度及原位空间分布信息^[1-3]。基于上述优点,MSI技术正逐渐成为质谱分析研究领域的前沿与热点之一,并被广泛应用于诸多领域。例如,在基础医学研究中,MSI技术可提供生物样本病理过程中内源性分子的变化信息^[4],有助于筛选、发现与疾病相关的新型生物标志物^[5];在药学领域中,MSI能快速实现生物体内药效评价及药物有效成分代谢过程动态监测^[6];在微生物学领域,MSI可用于单细胞^[7]和亚细胞分析^[8]、微生物代谢过程及微生物与有机体相互作用(如根瘤固氮过程及机理)^[9]等方面的研究。

常规MSI技术操作流程包括4个基本步骤^[10]:(i)

引用格式: 何慧欣, 陈路路, 秦亮, 等. 质谱成像及其在植物内源性分子原位表征中的应用进展. 中国科学: 生命科学, 2017, 47: 1043–1064
He H X, Chen L L, Qin L, et al. Mass spectrometry imaging for *in situ* analysis of endogenous molecules in plants (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2017, 47: 1043–1064, doi: 10.1360/N052017-00015

样本选择与制备. 主要涉及材料选取、冷冻固定、样本切片、洗涤干燥步骤等; (ii) 解吸电离. 可通过激光或离子束照射样本切片实现表面分子的解吸电离, 电离方式与MSI信号强度及空间分辨率密切相关; (iii) 质谱数据采集. 样本表面待测分子离子化后, 在电场或负压的作用下进入质谱源后部分, 经质量分析器到达检测器完成离子信号的记录, 最后在计算机辅助下以谱图形式呈现, 从而完成数据采集. 该步骤的核心部分是质量分析, 质谱常用质量分析器有: 飞行时间(time-of-flight, TOF)、离子阱(ion trap, IT)、四级杆(quadrupole)、静电场轨道阱(orbitrap)、傅里叶变换离子回旋共振(Fourier transform ion cyclotron resonance, FTICR)等. 不同质量分析器具有不同的特点, 其适用检测对象也不尽相同. 例如, 高灵敏性TOF对于生物大分子表征(如蛋白质、多肽、多糖)具有较强适用性, 而高分辨率FTICR则对于小分子化合物具有明显偏好性; (iv) 图像重构与数据分析. 在特定软件(如Bruker *FlexImaging*等)辅助下质谱数据被转化重构并最终以前以图像形式呈现, 重构的离子图像可表征组织切片表面分子的空间分布情况. 除二维图像外, 连续获取样本截面分子原位图像可进一步重构出样本三维离子分布图像, 三维图像的获取方法主要可分为两种^[11], 通过样品剥离直接进行三维成像, 或通过对连续组织切片进行成像, 结合多个二维图像从而组成连续组织切片的三维图像^[12]. 此外, 根据分子图像的分布信息, 针对不同区域的分子分布情况, 结合统计学方法可进一步完成基于质谱成像表征的数据分析.

近年来, 随着MSI的不断发展与完善, 该技术正被逐渐应用于植物学相关研究领域, 如分析植物组织切片表面代谢物的分布及变化^[13], 原位表征植物体内多肽与蛋白质^[14]等. 其中, MSI技术在药用植物研究方面也得到了一定的应用, 初步展示了该技术较传统影像方法具有明显优势^[10]. 目前, MSI技术发展迅速, 针对植物领域不同研究方向, 所采用的MSI技术也不尽相同. 因此, 深入了解各种MSI技术之间的差异及各自优势是充分应用MSI高效、准确研究植物生理生化功能的前提.

1 质谱成像方法

随着质谱技术的发展与新型离子源的陆续开发,

目前科学家已构建出多种质谱成像方法^[15], 根据电离方式不同主要可分为三类: 基质辅助激光解析电离质谱成像(matrix assisted laser desorption ionization mass spectrometry imaging, MALDI-MSI)、解吸电喷雾离子化质谱成像(desorption electrospray ionization mass spectrometry imaging, DESI-MSI), 以及二次离子质谱成像(secondary ion mass spectrometry imaging, SIMS imaging). 其中, MALDI-MSI利用激光与基质完成能量的传递从而实现样本表面待测分子的离子化, 通常用于检测蛋白质、多肽、多糖等生物大分子及脂类、核苷类物质等中等分子量生物分子; DESI-MSI技术可在常压环境下使用, 无需基质辅助, 样本前处理简便, 适用于分析小分子化合物; SIMS imaging的空间分辨率最高可达50 nm, 可用于检测ppm级物质, 主要用于样本表面元素和小分子成像分析.

1.1 MALDI-MSI

MALDI-MSI是目前发展较为成熟的成像技术. 该技术无需复杂样本前处理, 通过基质辅助实现待测分子的离子化, 离子化过程中产生较少的离子碎片, 可实现对较宽质量范围内的多种化合物分子的快速分析, 空间分辨率可达10 μm , 灵敏度高达fmol级. 目前MALDI-MSI普遍适用于生物组织表面蛋白质、多肽、脂类、能量代谢产物等多种生物分子原位成像表征^[16].

MALDI-MSI技术基本流程^[17]如下: 首先在冷冻切片机内进行组织切片的制备, 然后选择合适的化学基质, 在特定基质喷涂技术的辅助下将基质喷涂于组织切片表面, 之后使用激光直接照射扫描切片, 由于基质与组织切片表面分子形成共结晶, 因此基质吸收的能量可有效传递给待测分子并实现其离子化, 离子化分子在电场或负压的作用下进入质谱源后部分, 经质量分析器分析后被质谱检测器检测并记录, 最后通过特定软件重构呈现待测分子在组织表面的空间分布图像(图1). 在MALDI-MSI分析中, 图像质量很大程度上取决于基质体系的建立及优化, 因此基质的选择与喷涂至关重要. 目前常用的基质包括芥子酸(sinapic acid, SA)^[18,19]、 α -氰基-4-羟基肉桂酸(α -cyano-4-hydroxycinnamic acid, CHCA)^[20,21]、2,5-二羟基苯乙酮(2,5-dihydroxyacetophenone, DHAP)^[22-24]、2,5-二羟基苯甲酸(2,5-dihydroxybenzoic acid, DHB)^[25,26]、9-氨

图1 MALDI-MSI流程图

基吡啶(9-aminoacridine, 9-AA)^[27,28]、2-巯基苯并噻唑(2-mercaptobenzothiazole, 2-MBT)^[29,30]、1,5-二氨基萘(1,5-diaminonaphthalene, DAN)^[31]等。其中, SA, DHAP适用于高分子质量生物分子检测, 如蛋白质、糖蛋白、低聚糖等; 而CHCA, 2-MBT通常适用于检测中等分子量分析物, 如多肽、脂类分子等; DHB, DAN和9-AA则适用于检测低分子量的脂类分子、能量代谢产物等。近年来, 多种新型基质如姜黄素(curcumin)^[32]、多羟基黄酮(hydroxyflavones)^[33]、槲皮素(querctetin)^[34]、*N*-萘基乙二胺盐酸盐(*N*-naphthylethylenediamine dihydrochloride)^[35]等的发现, 极大地扩大了MALDI-MSI可检测的分子种类, 扩展了该技术的潜在应用范围。针对基质的喷涂方式, 传统喷涂方法包括手动气喷雾(airbrush)^[36]、电喷雾(electrospray)^[37]、基质升华(sublimation)^[38]等。手动气喷雾方法具有操作简便、快速的特点, 但手动喷涂往往导致基质涂层均匀度较差, 而且容易引起样本表面分子位移现象; 电喷雾喷涂法虽然重现性较好, 但操作相对繁琐费时; 基质升华技术在操作过程中无需加入有机溶剂, 重结晶形成的基质晶体颗粒较小且均一度较好, 但该方法通常需要基质的沸点低于其熔点, 因此并不适用于所有基质, 极大地

制约了其适用范围。近年来, 为了提高基质喷涂技术的重现性及基质结晶分布的均一性, 扩大MALDI-MSI的检测范围, 许多研究在新型基质喷涂技术方面取得了一定进展, 例如, Wang等人^[39-41]开发了电场辅助基质喷涂方法(matrix coating assisted by an electric field, MACEF), 该技术适用于各类生物分子成像表征, 具有无特定偏好性的特点, 可普遍增强MALDI-MSI对于脂类、能量代谢物、多肽、蛋白质等生物分子的成像能力^[41]。相比于传统常规喷涂方式, 利用该技术可直接原位表征大约1000多种脂类分子^[40]、50多种核苷类/能量代谢相关分子^[40]、近250种蛋白质分子^[39], 使得MALDI-MSI可成像表征的生物分子数量提高了5~10倍, 极大地拓宽了MALDI-MSI研究范围^[41,42]。Li等人^[43]构建出电喷雾沉积装置(electrospray deposition device)用于基质喷涂, 该装置可精准地控制基质颗粒大小, 可成功将基质结晶颗粒大小减小到1 μm 左右, 极大地提高了MALDI-MSI潜在的成像空间分辨率。此外, 该技术还适用于沉降纳米颗粒基质。

MALDI-MSI的优势在于, 空间分辨率可达10 μm , 灵敏度高达fmol级, 具有较广质量检测范围, 但该技术仍有一定的不足, 如高度依赖于真空条件, 无法实

现在线分析且不适用于大体积样本的原位检测; 需要基质辅助, 易产生基质离子信号峰, 而基质离子化容易对被分析物产生离子干扰效应, 这种干扰效应在低分子量检测区域尤为明显。以上不足极大地限制了MALDI-MSI技术更为广泛的应用, 尤其对于植物内源性小分子代谢产物研究的适用性并不理想。

1.2 DESI-MSI

DESI作为一种常压敞开式离子化技术首次由Cooks研究组^[44]提出, 并于2006年第一次应用于质谱成像^[45]。该技术利用微型喷雾器耦合高电压(4~5 kV)并在雾化气体辅助下将溶剂以一定流速(0.5~10 $\mu\text{L}/\text{min}$)喷射形成带电微液滴, 进而喷射至组织样本表面, 实现待测分子的离子化过程(图2)^[46]。DESI-MSI完全继承了DESI技术的优势特点: 即不依赖于真空环境, 可在常压下开展; 无需基质辅助, 避免了基质离子化产生的干扰, 降低了离子抑制效应, 同时也避免了基质喷涂过程中被分析物位移现象。但是与MALDI-MSI等其他成像方法相比, DESI-MSI技术的空间分辨率较低, 一般情况下仅为100~200 μm ; 且该成像方法对蛋白质等生物大分子的灵敏度相对较低。这些不足极大地限制了DESI-MSI技术更为广泛的应用。

空间分辨率的提高是目前DESI-MSI面临的技术挑战之一, 研究表明, DESI-MSI空间分辨率的改善主要取决于溶剂的组成及流速。近年来, 研究者在提高DESI-MSI空间分辨率方面取得了一定的进展, 如Kertesz和Van Berkel^[47]通过从薄层色谱板表面采样, 成

功使图像分辨率提高至40 μm ; Dahlia研究组^[48]通过缩短质谱扫描间隔, 减慢成像扫描速率, 并使用*N,N*-二甲基甲酰胺/乙醇(1/2, 体积比)溶剂体系与相对较慢的流速(1.5 $\mu\text{L}/\text{min}$), 有效将空间分辨率提升至35 μm , 极大地提高了成像图像的质量。此外, Roach等人^[49]研究表明, 使用纳流电喷雾解吸电离(nanospray desorption electrospray ionization, nano-DESI)可明显提高空间分辨率, 利用该技术可获得图像空间分辨率为100 μm 的质谱成像结果^[50]; Laskin等人^[51]通过液桥(liquid bridge)原理引入双毛细管(初级毛细管耦合纳流电喷雾毛细管)将nano-DESI MSI空间分辨率提升至12 μm 以上。

迄今, DESI-MSI技术应用研究的主要对象为动物组织。例如, 该技术已被成功用于多种癌症诊断与肿瘤分级^[52], 药物分子及其代谢产物在动物组织中的分布^[53]等方面的研究。尽管, DESI技术已被报道可用于检测植物组织表面部分小分子化合物如色素、生物碱、农药等^[54], 然而, DESI-MSI方法在植物学领域的成像应用相对较少, 主要原因是DESI产生的电喷雾难以穿透植物表面细胞壁、角质层、蜡质层等, 从而难以产生稳定、可靠的质谱信号, 因此限制了该成像技术对植物组织样本的检测与分析。

1.3 SIMS imaging

SIMS是最早应用于质谱成像的离子化技术, 其基本原理^[55]是利用高能初级离子在真空条件下加速并撞击组织切片, 初级离子的动能传递给组织表面待测分子, 从而使其离子化(即二次离子, 图3)^[56,57]。该技术

图2 DESI-MSI原理图

图3 SIMS成像原理图^[56]

通常用于分析生物样本表面的元素、小分子药物及代谢产物。此外,纳米二次离子质谱技术(nanoscale secondary ion mass spectrometry, Nano-SIMS)通过纳米探针直接扫描^[58]或利用配备气体团簇离子枪的飞行时间二次离子质谱(time-of-flight secondary ion mass spectrometry, TOF-SIMS)产生的具有轻刻蚀性的气体团簇离子可对样品表面进行溅射剥离从而进行三维成像分析^[59]。

在SIMS imaging研究中,高能初级离子将能量传递给组织表面待测分子,决定了待测分子的离子化效率,起着至关重要的作用。目前常用的高能初级离子主要为镓离子(Ga^+)、铯离子(Cs^+)、金离子(Au^+)、铍离子(Be^+)、铋离子(Bi^+ , Bi^{3+})、氧离子(O_2^+)等^[60]。其中, Ga^+ 为较早使用的一次离子束,然而该离子源在正负离子模式下对生物分子的离子化效率均较低,因而引入 Cs^+ 离子源增强负离子模式下的离子化效率。 Au 源初级离子相较于传统的 Ga^+ , In^{3+} 对胆固醇、脂肪酸、磷脂、磷脂酰肌醇、甘油三酯等具有良好适用性,扩大了SIMS imaging的检测范围,但在离子化效率方面仍有不足^[61]。相比而言, Bi 源初级团簇离子具有较强的离子强度,数据采集速度更快,且空间分辨率可达200 nm^[62]。 O_2^+ 为双原子气态一次离子束,通常作为TOF-SIMS imaging的剥离源用于三维成像分析,适用于正离子模式^[63]。

与MALDI-MSI, DESI-MSI等其他成像方法相比, SIMS imaging具有更高的分辨率,最高可达50 nm,使得该技术可用于亚细胞水平的研究^[64]。但由于SIMS

imaging技术高度依赖于高能初级离子与高真空环境,因此易造成被分析物源内裂解,使得最终无法获得完整分子图像。近年来,如 Au ^[65], Ar ^[66], CO_2 ^[67]团簇离子束等新型离子束的运用,减少了组织表面被分析物源内裂解现象,降低了裂解碎片质谱信号。同时,有研究表明在组织切片表面喷涂一层金属原子^[68,69]或化学基质^[70],可在一定程度上扩展SIMS imaging的适用范围,使其可用于脂类、多肽等生物分子的研究。

1.4 其他类型质谱成像方法

除上述常用成像方法外,诸多研究^[71,72]直接利用激光实现被分析物表面分子的解吸电离,即激光解吸电离质谱成像(matrix-free laser desorption ionization mass spectrometry imaging, LDI-MSI)。该技术无需添加基质,避免了基质离子化在低分子量区产生的干扰效应,适用于药物、缓激肽等小分子化合物的检测^[73]。此外,随着新型离子化技术的不断开发与构建,近年来涌现出其他多种质谱成像方法,如激光消融电喷雾电离质谱成像(laser ablation electrospray ionization mass spectrometry imaging, LAESI-MSI)^[74]、空气动力辅助离子化质谱成像(air flow assisted ionization mass spectrometry imaging, AFAI-MSI)^[75]、激光消融电感耦合等离子体电离质谱成像(laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry imaging, LA-ICP-MSI)^[76]和低温等离子体电离质谱成像(low temperature plasma ionization mass spectrometry imaging, LTP-MSI)^[77]。LAESI-MSI是一种结合激光与电喷雾的常压敞开式成像方法,其基本原理是利用中红外线消融解吸被分析样本表面,由电喷雾喷射出带电微液滴从而实现其表面待测分子的离子化。该技术以水为基质,操作简便,适用于极性、不稳定分子的检测^[78]。此外,LAESI-MSI可通过中红外线连续照射对样本表面进行激光消融从而实现三维成像分析^[79]。AFAI-MSI利用高流速空气增强带电液滴与空气分子的相互作用,提高带电液滴中溶剂的蒸发效率,从而促进分子离子化的形成过程,提高离子化效率^[75]。LA-ICP-MSI采用紫外线使被分析物表面消融脱落形成离子束,然后穿过ICP(8000 K),产生可供检测的离子。该技术具有样本制备过程简便,可同时检测多种元素,检出限低等优点^[80]。LTP-MSI则利用电场放电作用使气体(如 He , Ar , 空气)产生低温等离子体,等离子体喷射至样本表面,从而实现被分析物

的解吸电离. 与其他常压敞开式离子化技术相比, 该技术产生的低温等离子体不易造成样本(如皮肤组织)热损伤, 可用于产品质量控制、食品安全等^[81].

综上所述, 尽管MSI技术普遍具有快速高效、无需放射性同位素或荧光标记、可对组织表面多种生物分子同时进行成像分析等优势, 但是不同成像方法具有各自的特点(表1), 在实际应用过程中, 应针对不同样本组织、被分析物质种类, 选择合适的成像技术.

2 质谱成像技术在植物内源性分子原位表征中的应用

MSI技术可在无任何特异性标记情况下对生物组织样本进行多位点检测、多维数据获取, 可直接提供目标化合物分子结构和空间分布信息. 近年来, 随着质谱技术的进一步发展与完善, MSI所能应用的对象已从动物样本组织扩展到了植物样本组织, 许多研究运用MSI技术成功地对植物内源性分子进行了原位表征(表2). 目前, MSI技术主要可用于研究植物体内元素分布、初级或次级代谢物变化、响应生物/非生物胁迫和防御机理等方面; 同时, 该技术还可用于原位表征药用植物有效成分.

由于植物与动物组织在结构组成上存在差异, 如细胞壁、液泡与叶绿体为植物特有的细胞结构, 许多

木本植物往往具有韧皮部与木质部等, 使得适用于动物样本的常规制备方法不能很好地直接应用于植物组织样本制备. 目前, 适用于植物组织切片制备的方法主要有: 低温切片和转印技术^[2]. 其中, 低温切片技术指在-20℃条件下使用冷冻切片机进行切片, 切片时一般可对组织样本进行适当前处理, 如将植物样本组织浸泡于特定包埋试剂(如4%多聚甲醛溶液^[99]、2%羧甲基纤维素^[163]、纯水、凝胶^[101]), 加入液氮冷冻后再进行切片; 坚硬干燥的植物组织可附着于黏合载体上以便切割并维持原有组织形态^[164]. 低温切片时需考虑植物组织的形状, 如根、茎、果实等组织形状规则, 通常适用于常规切片技术制备合适组织切片; 相比而言, 叶片、花瓣等脆弱薄层组织往往难以适用常规制片技术, 并且由于表面蜡质层存在往往导致样品表面其他待测分子离子化效率大大降低^[96]. 针对这种不足, 可通过转印技术即利用外界压力将新鲜薄层植物组织细胞内容物原位转印至其他吸附材料表面, 如聚四氟乙烯、薄层色谱板、多孔硅、纳米氧化铝等, 再对其表面进行质谱成像分析^[61]. 然而, 转印技术的局限性在于: 立体样品被挤压至二维平面的同时易引起样品表面分子的空间位移, 不适用于高分辨率MSI实验, 在一定程度上限制了该技术的广泛应用.

针对MSI研究产生的大量数据, 采用恰当的统计学分析方法有助于从海量信息中获取关于组织样本

表1 不同质谱成像方法特性

方法	电离源	真空条件	分辨率	特点
MALDI-MSI	红外(IR)或紫外(UV)	中度真空或高度真空	红外(IR): 150 μm 紫外(UV): 10~250 μm	需基质辅助解吸电离, 检测范围广
DESI-MSI	带电微液滴	常压	12~200 μm	运用转印技术或纳米二次离子质谱技术可提高空间分辨率
SIMS imaging	初级离子束	高度真空	50 nm~5 μm	需高电压、高真空, 分辨率高, 易产生碎片离子
LDI-MSI	红外(IR)或紫外(UV)	中度真空或高度真空	≥10 μm	无需基质
LAESI-MSI	红外与带电微液滴耦合	常压	300~500 μm	样品中需含一定水分
AFAI-MSI	带电液滴	常压	300~500 μm	敞开式环境下远距离样品的离子化效率及其检测灵敏度高
LA-ICP-MSI	紫外与电感耦合等离子体(ICP)	常压	≥10 μm	灵敏度高, 可用于元素分析
LTP-MSI	He, Ar或空气, 电场	常压	200 μm	气体在电场放电下产生低温等离子体, 对样品损伤小

表 2 不同质谱成像方法应用于植物内源性分子原位表征研究

年份	作者	样品类型	被分析物类型	文献
MALDI-MSI				
2005	Mullen等人	大豆(<i>Glycine max</i> (Linn.) Merr.)植物叶、茎	甲基磺草酮、噻菌酯	[82]
2006	Kondo等人	拟南芥(<i>Arabidopsis thaliana</i>)	CLV3编码蛋白	[83]
2007	Robinson等人	小麦(<i>Triticum aestivum</i>)茎	低聚糖	[84]
2007	Li等人	草莓(<i>Fragaria×ananassa</i> Duch.)果皮	糖类、柠檬酸	[85]
2007	Burrell等人	小麦种子	氨基酸、糖类、磷酸化代谢产物	[86]
2008	Shroff等人	拟南芥叶	芥子油苷	[87]
2008	Li等人	百合(<i>Lilium brownie</i>)花瓣	GABA、谷氨酸盐、糖类	[88]
2009	Anderson等人	向日葵(<i>Helianthus annuus</i> L.)茎	烟噻磺隆	[89]
2009	Cavatorta等人	桃子(<i>Amygdalus persica</i> L.)果实	脂转运蛋白	[90]
2010	Goto-Inoue等人	茄子(<i>Solanum melongena</i> L.)果实	GABA、氨基酸、糖类	[91]
2010	Jung等人	白杨(<i>Populus alba</i>)茎	纤维素	[92]
2010	Ibanez等人	烟草(<i>Nicotiana tabacum</i> L.)叶	生物碱、糖类	[93]
2011	Hsiao等人	叶下珠(<i>Phyllanthus urinaria</i> L.)叶	天然色素	[94]
2011	Lunsford等人	杨木(<i>Populus simonii</i>)茎	纤维素、半纤维素	[95]
2012	Poth等人	矮牵牛(<i>Petunia hybrida</i> (J. D. Hooker) Vilmorin)花	环蛋白	[96]
2012	Peukert等人	大麦(<i>Hordeum vulgare</i> L.)谷粒、烟草根	脂类	[97]
2012	Taira等人	辣椒(<i>Capsicum annuum</i>)	辣椒素	[98]
2012	Horn等人	棉花(<i>Gossypium hirsutum</i>)	脂类	[99]
2012	Franceschi等人	苹果(<i>Malus domestica</i>)	黄酮醇、二氢查儿酮类化合物	[100]
2013	Ye等人	苜蓿(<i>Medicago sativa</i>)/根瘤菌	氮固定过程代谢物	[101]
2013	Weidner等人	木槿(<i>Hibiscus syriacus</i> L.)花粉	代谢物	[102]
2013	Horn等人	鳄梨(<i>Butyrospermum parkii</i> Kotschy)中果皮	脂类	[103]
2014	Li等人	甘草(<i>Glycyrrhiza uralensis</i>)根茎	黄酮类、黄酮苷类、皂苷类化合物	[104]
2014	Berisha等人	葡萄(<i>Vitis vinifera</i> L.)	氨基酸、糖类、花青素	[105]
2014	Marques等人	鬼臼(<i>Diosma versipellis</i> (Hance) M. Cheng)根茎	生物碱	[106]
2014	Velickovic等人	土豆(<i>Solanum tuberosum</i> L.)、苹果、油桃(<i>Prunus persica</i> var. <i>nectarina</i>)角质层	角质、软木脂	[107]
2014	Seaman等人	萝卜(<i>Raphanus sativus</i> L.)	胆碱、胆碱磷酸	[108]
2014	Peukert等人	大麦谷粒	己糖、蔗糖、果聚糖	[109]
2014	Korte和Lee	玉米(<i>Zea mays</i>)幼叶	小分子代谢物	[31]
2014	Bencivenni等人	番茄(<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.)果实	脂转运蛋白	[110]
2014	Araujo等人	桉树(<i>Eucalyptus robusta</i>)茎	木质素、低聚物	[111]
2015	Soares等人	黎檬(<i>Citrus limon</i> (L.) Burm. f.)叶、茎	橙皮苷和芦丁	[112]
2015	Yoshinaga等人	日本扁柏(<i>Chamaecyparis obtusa</i>)、日本柳杉(<i>Cryptomeria japonica</i> (L. f.) D. Don)	松柏苷	[113]
2015	Wang等人	水仙(<i>Narcissus tazetta chinensis</i>)球茎内生真菌	肽类	[114]

续表2

年份	作者	样品类型	被分析物类型	文献
MALDI-MSI				
2015	Takahashi等人	拟南芥幼苗根	代谢物	[115]
2015	Bhandari等人	油菜(<i>Brassica napus</i> L.)、小麦种子、 水稻(<i>Oryza sativa</i>)	代谢物	[116]
2015	Shroff等人	拟南芥叶	芥子油苷	[117]
2015	Kusari等人	金丝桃属(<i>Hypericum</i> L.)植物叶	金丝桃素	[118]
2015	Korte等人	玉米叶	氨基酸、甘油酯	[119]
2015	Klein等人	水稻、大豆叶	代谢物	[120]
2015	Klein等人	玉米幼苗叶	代谢物	[120]
2015	Gemperline 和Li	蒺藜苜蓿(<i>Medicago truncatula</i>)根、根瘤	代谢物	[121]
2015	Gemperline 等人	蒺藜苜蓿根、根瘤	代谢物	[9]
2015	Dalisy等人	亚麻(<i>Linum usitatissimum</i> L.)种子、种子荚	木脂素和生氰糖苷	[122]
2016	Wang等人	人参(<i>Panax quinquefolius</i> L.)根	人参皂苷	[123]
2016	Velickovic等人	小麦、大麦	多糖	[124]
2016	Lange等人	雷公藤	代谢物	[125]
2016	Eckelmann 等人	火棘(<i>Pyracantha fortuneana</i>)	美登素类化合物	[126]
2016	Duenas等人	玉米叶	脂类化合物	[127]
2016	Sturtevant等人	拟南芥种子	磷脂酰胆碱、磷脂酰肌醇	[128]
2016	Nakamura等人	番茄果实	代谢物	[129]
2016	Beck和Stengel	银杏(<i>Ginkgo biloba</i> L.)叶	黄酮、黄酮苷	[130]
2016	Gemperline 等人	蒺藜苜蓿根	多肽、蛋白质	[131]
2016	Li等人	白芍(<i>Cynanchum otophyllum</i>)根	单宁及单帖糖苷	[132]
DESI-MSI				
2009	Lane等人	红藻(<i>Rhodophyta</i>)	代谢物	[133]
2011	Thunig等人	贯叶连翘(<i>Hypericum perforatum</i> L.)叶、花瓣 与曼陀罗(<i>Datura stramonium</i> L.)叶	贯叶金丝桃素、金丝桃素、阿托 品、东莨菪碱、糖类	[134]
2011	Li等人	大麦叶	羟氰苷	[135]
2011	Muller等人	枫香树(<i>Liquidambar formosana</i>)叶	叶绿素降解产物	[136]
2015	Tata等人	土豆芽块茎	糖苷生物碱	[61]
2015	Mohana等人	红果榿木(<i>Dysoxylum binectariferum</i> (Roxb.) Hook. f. ex Bedd.)幼苗	生物碱	[137]
2015	Janfelt	大麦叶	代谢物	[138]
2015	Hemalatha等人	罗勒属(<i>Ocimum</i>)植物叶	代谢物	[139]
2015	Cabral和Ifa	银杏叶、草莓	小分子化合物	[140]
2016	Mohana等人	红果榿木幼苗	生物碱	[141]
2016	Garrett等人	咖啡豆胚乳	绿原酸、蔗糖	[142]
2016	Dong等人	葡萄茎	有机酸	[143]

续表2

年份	作者	样品类型	被分析物类型	文献
SIMS imaging				
2008	Saito等人	日本扁柏	日柏酮、日柏醇、扁柏脂素	[144]
2010	Seyer等人	豌豆(<i>Pisum sativum</i> L.)种子、拟南芥种子	黄酮类化合物	[145]
2011	Moore等人	水稻根	硅、砷元素	[146]
2012	Saito等人	枫树(<i>Acer palmatum</i>)	创愈木基木质素、紫丁香基木质素	[147]
2013	Moore等人	水稻稻粒	砷元素	[148]
2015	Jenčić等人	大麻(<i>Cannabis sativa</i> L.)叶	大麻酚类化合物	[149]
LDI-MSI				
2009	Holscher等人	拟南芥、金丝桃属植物叶、花瓣	次级代谢物	[150]
2010	Hamm等人	葡萄藤	二苯乙烯类化合物	[151]
2011	Hsiao等人	叶下珠叶	代谢物	[94]
2012	Korte等人	拟南芥花瓣	黄酮类化合物	[99]
2015	Holscher等人	小果野蕉(<i>Musa acuminata</i> Colla)茎	代谢物	[152]
LAESI-MSI				
2008	Nemes等人	单药花(<i>Aphelandra squarrosa</i> Nees)叶	初级和次级代谢物	[153]
2009	Nemes等人	单药花、白鹤芋(<i>Spathiphyllum kochii</i> Engl. & K.Krause)叶	代谢物	[154]
2011	Shrestha等人	洋葱(<i>Allium cepa</i>)球茎、酸橙(<i>Citrus aurantium</i> L.)叶	花青素	[155]
2013	Vaikkinen等人	鳄梨果皮	极性和非极性化合物	[156]
2015	Li等人	盾叶天竺葵(<i>Pelargonium peltatum</i> (L.) Ait.)叶	黄酮苷	[157]
2015	Etalo等人	蝴蝶兰(<i>Phalaenopsis aphrodite</i> Rchb. F.)花瓣、番茄叶	代谢物	[158]
LA-ICP-MSI				
2013	da Silva和Arruda	向日葵叶	硒和硫元素	[159]
2015	Oliveira和Arruda	大豆叶片	铁元素	[160]
2016	Promchan等人	水稻稻粒	钙、铜、铁等元素	[161]
LTP-MSI				
2014	Maldonado等人	红辣椒	辣椒素	[77]
2015	Gamboa-Becerra等人	红辣椒	脂类、生物碱等化合物	[162]

待测分子的有效信息。目前, MSI常用的数据分析方法主要有主成分分析法(principal component analysis, PCA)^[1]、偏最小二乘法-判别式分析(partial least squares-discriminate analysis, PLS-DA)^[165]、正交偏最小二乘法-判别式分析(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA)^[166]、聚类分析(cluster analysis)^[167]等。其中, PCA是MSI最为常用的数据处理方法之一, 其步骤为, 首先将MSI原始数据导入数据分

析软件(如Excel, SPSS等), 通常以 m/z 为自变量, 峰强度为因变量, 对其进行归一化或其他数据标准化处理, 将处理后的数据代入公式计算相关系数矩阵, 由相关系数矩阵计算特征量与特征向量并确定主成分及其个数, 随后将标准化后的指标变量转换主成分, 最后对各个主成分进行综合评价如计算主成分载荷、得分等。该方法能够有效对MSI产生的大量数据降维并压缩数据。但在PCA分析过程中, 当组间差异较小而组内

差异较大时则难以得出正确结论。相比而言, PLS-DA 基于偏最小二乘法回归, 通过人为加入分组变量可强化组间差异, 从而获得正确结论。该分析方法通常以归一化后的峰面积或峰强度数据为 X 矩阵, 以不同样本组织的类别为 Y 矩阵, 通过交叉验证的方式拟合得到主成分, 随后根据 X 、 Y 矩阵中各主成分的得分对 X 、 Y 数据进行相关性分析, 最后作图即可得 PLS-DA 得分图。然而 PLS-DA 法对互相具有相关性且与分类无关的数据处理效果不佳, 因此, 在 PLS-DA 的基础上提出了一种新型多元统计数据分析方法——OPLS-DA, 该方法在数据处理过程中将 X 矩阵中与 Y 正交的变量剔除, 随后对去除正交变量的 X 矩阵进行 PLS-DA 分析。OPLS-DA 分析方法通过去除自变量 X 中与分类变量 Y 无关的变化使分类信息主要集中在一个主成分中, 从而使数据模型更为简单且易于解释, 其判别效果及主成分得分图的可视化效果更加明显。聚类分析是利用多元统计分析技术对数据进行分类的方法, 该方法的主要步骤为, 将 MSI 原始数据导入 Excel 软件并对数据进行预处理包括数据数量、类型、特征的选择, 随后定义距离函数以衡量 MSI 数据点间的相似度, 将 MSI 数据通过划分方法或层次方法分到不同组别中, 最后评估输出聚类分析图像。该方法可对差异数据进行同源聚类, 最终得到的聚类图可展示 MSI 研究中各样本间的关系。目前, MSI 研究通常结合多种统计学分析方法进行数据处理, 例如, He 等人^[167]将细胞膜脂类 MSI 数据导入 SAS、SPSS 进行统计分析, 采用 PLS-DA 法评估控制组和癌细胞组之间的差异, 并用相关性和聚类分析研究饱和与不饱和脂类间的相关性, 从而成功研究了膜脂的变化情况与癌症类型间的相关性。Goto 等人^[168]将归一化处理后的 MSI 数据导入 SIMCA 软件进行 PCA、OPLS-DA 分析, 通过 PCA 法分析基于光谱变化的样本分组, 并利用 OPLS-DA 筛选发现 3 种磷脂酰肌醇可作为前列腺癌潜在的生物标志物。综上所述, 多种统计学分析方法的综合运用对于 MSI 数据有效信息的提取具有十分重要的作用与意义。

2.1 MSI 用于表征植物体内元素分布研究

植物体内化学元素的分布不仅反映了植物自身的特征, 而且从一定程度上反映了生长环境对植物的影响。因此, 对于植物体内化学元素分布的示踪表征, 不仅有助于深层次了解植物营养元素吸收运输过程及

调控机制、细胞代谢和生长发育等营养学、生理学功能, 同时可从植物毒理学角度研究植物与环境之间的相互作用关系。目前, 用于研究元素分布的成像技术主要有 LA-ICP-MSI 和 SIMS imaging 等。如 Oliveira 和 Arruda^[160]使用 LA-ICP-MSI 表征转基因大豆和非转基因大豆叶片中铁元素(Fe)的空间分布。该研究优化了射频功率、载气及辅助气流量、动态反应池流速、反应池抑制参数、激光光斑直径、强度、频率和扫描速度等参数, 以 ^{13}C 为内标解决了激光消融过程中信号波动导致的数据不稳定或不准确的问题, 采用 H_2 为动态反应池反应气消除了 $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}$ 、 $^{40}\text{Ca}^{16}\text{O}$ 等因素对 Fe 元素分析产生的干扰, 从而获得了准确可靠的 Fe 元素定量图像。该研究表明, LA-ICP-MSI 适宜用于定性定量分析微量元素的空间分布情况。鉴于 LA-ICP-MSI 对于微量元素的适用性, Promchan 等人^[161]将水稻稻粒嵌于树脂中, 运用 LA-ICP-MSI 技术研究其钙(Ca)、铜(Cu)、铁、钾(K)、镁(Mg)、磷(P)、锌(Zn) 8 种必要元素的空间分布情况, 并结合线性鉴别分析成功对水稻稻粒按照来源与类型进行分类。该研究结果表明, LA-ICP-MSI 可用于研究水稻稻粒元素组成及分布, 这对于种子发育、水稻优良品种培育具有一定意义。目前, 传统分析技术由于分辨率或灵敏度不足难以在细胞、亚细胞水平上研究植物体内微量元素的含量与空间分布, 鉴于 SIMS imaging 具有高灵敏度和高空间分辨率的特性, 近年来, 许多研究利用 SIMS imaging 在植物体内微量元素原位表征中取得了一定的进展。例如, Moore 等人^[146]将 Nano-SIMS imaging 技术与超速高压冷冻、透射电子显微镜结合使用, 从细胞和亚细胞水平上研究了水稻根部砷元素(As)和硅元素(Si)的分布情况。实验结果显示, 尽管 As 和 Si 是通过相同转运蛋白在质膜中运输, 但水稻根部的液泡对 As 具有隔离效果, 该研究为控制水稻中重金属元素 As 的含量提供了理论依据。

2.2 MSI 用于植物内源性小分子代谢物原位表征研究

MSI 技术可同时表征生物组织样本表面多种分子的空间分布特征, 且普遍适用于研究小分子化合物如氨基酸、糖类、脂类等, 因此诸多 MSI 技术已被应用于植物表面小分子代谢物的原位表征。

DESI-MSI 可直接对植物组织样本表面进行检测

与分析,通常用于研究花瓣、叶片、胚乳等娇嫩组织在生长发育与应激反应过程中代谢变化情况。例如, Garrett等人^[142]以咖啡豆胚乳为研究对象,采用干法、半干法、湿法采后处理策略分别对咖啡豆进行前处理,利用DESI-MSI分析了不同处理方法后咖啡豆胚乳中绿原酸和蔗糖的分布情况,实验结果显示,奎宁酸和阿魏酰奎宁酸主要分布于胚乳外部,而咖啡酰奎宁酸主要分布于胚乳内部,这种分布差异可能与咖啡豆生长发育过程中胚乳各部分功能不同相关,该研究有助于进一步分析咖啡豆生长发育过程中代谢产物变化情况,同时与其他用于研究植物组织中代谢物定量或分布的技术(如显微荧光分析、高效液相色谱、高级线性混合像元分解分析)相比,DESI-MSI无需对组织进行分离提取、染色等流程,可直接对咖啡组织中特定化合物进行成像分析,在植物内源性小分子代谢物原位表征中具有优势。由于植物组织的特殊性易导致DESI-MSI直接分析时信号强度不稳定,因此可通过转印技术将植物组织细胞内容物转印至其他吸附材料表面的空隙中,使多种待测物质集中于单个像素点,增加单位体积内待测分子的浓度,从而保证DESI-MSI获得信号的稳定性^[169],提高了该成像技术对于低丰度植物内源性化合物的表征能力,获取更为全面的代谢物空间分布图像,以便进一步广谱研究代谢物在植物生长发育、响应胁迫过程所发挥的作用等。目前,多种新型吸附材料已被应用于DESI-MSI转印技术,例如, Hemalatha等人^[139]以姜黄(*Curcuma longa* L.)根茎、长春花(*Catharanthus roseus*)花瓣、金凤花(*Caesalpinia pulcherrima* (L.) Sw.)花瓣、槟榔(*Areca catechu* L.)叶为研究对象,将植物组织细胞内容物通过液压球磨机转印至新型转印材料静电纺尼龙-6纳米纤维毡上并进行成像分析。该材料具有较大的表面积、孔隙率及较多的分析物作用位点等优势,广泛适用于多种生物组织材料如叶片、花瓣、根茎等,可鉴定与保存多种化合物,扩展了DESI-MSI的应用范围。

近年来,新型基质及基质喷涂方法的不断发现与构建推动了MALDI-MSI在生物小分子领域的研究进展,使得该技术在植物表面小分子代谢物原位表征中的应用更为广泛。例如, Horn等人^[170]以DHB为基质,结合MALDI-MSI与高通量脂质组学分析方法,检测了棉籽中甘油三酯类成分的含量,其研究结果发现,棉籽中脂肪酸的遗传修饰与甘油三酯类的含量变化和

空间分布情况有关,表明棉籽中甘油三酯的生合成途径具有组织特异性。该研究表明,与传统色谱法定量分析相比, MALDI-MSI提供的脂质分布图像有助于探索生物组织表面不同部位代谢物的潜在功能。除了用于常规脂质的成像分析外,许多研究在糖类、二萜酮类化合物的原位表征中取得了一定的进展,例如, Veličković等人^[124]以DHB/dimethylaniline为基质,使用MALDI-MSI技术对酶降解后的谷粒胚乳中木聚糖、葡聚糖的分布情况进行检测与分析,首次获得了这两种细胞壁多糖在几种小麦、大麦胚乳中的分布情况,揭示了谷类植物细胞壁的异质性,对于进一步了解木聚糖、葡聚糖结构与功能的关系具有一定意义。目前,尽管MALDI-MSI已逐步被广泛应用于植物组织内源性次级代谢产物原位表征中,但由于植物组织表面存在的蜡质层往往导致其表面待测分子离子化效率降低而难以被检测,因而许多研究通过去除植物组织表面蜡质层增加MALDI-MSI对于其表面分子的检测能力,例如, Kusari等人^[118]以金丝桃属植物为研究对象,使用胶带去除叶片表面蜡质层后采用高分辨率MALDI-MSI技术对其叶片中二萜酮类化合物金丝桃素及其潜在前体化合物的分布、定位、动态变化进行研究。该研究以在金丝桃素生物合成途径研究方面有了一定的突破,为进一步研究金丝桃素生物合成途径提供了理论依据。

SIMS imaging的空间分辨率最高可达50 nm,可精确地分析代谢物分布差异。Saito等人^[144]利用TOF-SIMS imaging表征日本扁柏古树中日柏酮、日柏醇、扁柏脂素等代谢物的分布图像,其研究结果表明,TOF-SIMS imaging不仅可用于区分植物的边材和心材,也可呈现木材中多种化学成分空间分布图像;鉴于SIMS imaging对于小分子代谢物的适用性,该作者对日本枫树木质部中木质素的分布进行了成像分析^[147],表明TOF-SIMS imaging解决了大部分分析方法无法方便、准确地从细胞水平上研究木质素在植物组织中分布情况的难题,在评估转基因植物、纸浆与纸制品中木质素变化情况以及表征木质素在植物中的异质性等方面具有广泛的应用前景。

此外,近年来新型质谱成像方法也正逐步被应用于植物代谢物的研究。LAESI-MSI技术与SIMS imaging, MALDI-MSI等成像方法相比,虽在空间分辨率方面不具有优势,但该技术无需复杂样本前处理可直接

对活体组织进行成像分析, 在植物组织样本在线检测分析方面具有一定优势。目前, 该技术通常与其他技术结合用于植物组织表面代谢物的原位表征。例如, Nemes等人^[153]以单药花属花条蓝花蕉叶为研究对象, 结合使用LAESI-MSI与扫描电子显微镜, 对其中代谢物进行分析, 深入研究了一些生物合成途径(如山柰酚合成途径)的具体过程, 其研究表明, 两种技术相结合可提供生物组织代谢物和外源性物质的三维分布图像。然而, 传统LAESI-MSI技术对于非极性分子的灵敏度相对较低, 许多研究通过优化实验条件以扩大该技术的适用范围, 如Vaikkinen等人^[156]使用加热辅助LAESI-MSI技术对鳄梨果皮进行成像分析, 通过加热氮气流增强低极性待测分子的离子化效率, 与传统LAESI-MSI相比, 该技术对于极性和非极性待测分子均具有良好的适用性, 可显著提高LAESI-MSI对中性脂类的检测能力。除了LAESI-MSI外, 近年来, LTP-MSI在植物组织表面代谢物原位表征方面也取得了一定进展, 例如, Maldonado-Torres等人^[77]将低温等离子体(low temperature plasma, LTP)探针与四级杆质量分析器耦合使用, 获得了红辣椒中辣椒素的空间分布图像, 表明LTP-MSI具有发现挥发性和半挥发性代谢物的潜力。

2.3 MSI用于植物多肽、蛋白质原位表征研究

由于大多数多肽、蛋白质的分子量超出了质谱的质量检测范围, 使得MSI技术对这类物质的灵敏度相对较低。目前用于鉴定植物内源性多肽、蛋白质的成像方法主要为MALDI-MSI, 例如, Cavatorta等人^[90]对3种桃属植物果肉和果皮中过敏原含量进行比较分析, 发现果皮中脂转运蛋白PruP3(一种桃属过敏源)显著多于果肉, 从而阐明了桃子皮与果实的致敏差异。该研究表明, 相较于免疫组化等其他分析方法, 该技术可同时多种蛋白质进行快速成像分析, 且无需对每种蛋白质进行特异性抗体分析, 同时避免了免疫组化交叉反应导致的假阳性结果, 这些优势使得MSI在生物组织中生物分子的原位表征具有优势。鉴于MSI对于某些蛋白质的鉴定能力较弱, 通常将MALDI-MSI技术与其他色谱联用技术耦合, 从而检测、鉴定蛋白质在植物组织中的分布情况, 如Bencivenni等人^[110]采用液相色谱质谱联用技术研究鉴定了4种番茄非特异性脂转运蛋白亚型, 并运用MALDI-MSI技术验证了它

们的存在与主要分布部位。该研究为番茄脂转运蛋白在植物生长发育过程中结构与功能的进一步研究提供了理论基础。MALDI-MSI除了可用于研究蛋白质的空间分布情况外, 在多肽的原位表征中也取得了一定的应用进展, 例如, Poth等人^[96]以CHCA为基质, 通过MALDI-MSI技术首次详细报道了矮牵牛叶片中环肽空间分布情况, 对于进一步研究茄科植物进化起源与环肽编码基因具有一定意义。此外, 还可通过改进MALDI-MSI实验条件增加MALDI-MSI对于蛋白质与多肽的适用性, 如Gemperline等人^[131]运用MALDI-MSI技术分析了蒺藜苜蓿中的内源性多肽和蛋白质, 通过使用CHCA和DHB两种基质扩大了肽/蛋白质片段的检测范围, 检测到上百种多肽和蛋白质的碎片信号, 实验结果显示, 在发育期和成熟期蒺藜苜蓿中多肽、蛋白质的含量与分布均不同, 其研究表明, MALDI-MSI具有较高的检测灵敏度及较强的分子鉴定能力, 对于植物组织中多种低丰度蛋白质、多肽具有一定适用性, 在原位表征植物内源性肽和蛋白质方面展现了显著优势, 为进一步研究野生型蒺藜苜蓿多肽、蛋白质含量与分布提供了理论依据。

2.4 MSI用于植物响应生物/非生物胁迫机理研究

植物在受到外界环境胁迫时, 其新陈代谢过程发生相应改变。MSI技术可用于检测植物代谢物变化情况, 有助于植物响应胁迫机理的研究。目前用于研究植物响应生物/非生物胁迫机理的MSI技术主要有IR-LDI-MSI, MALDI-MSI, DESI-MSI, SIMS imaging等。例如, Ibáñez等人^[93]利用IR-LDI-MSI获得了烟草防御烟草疫霉的代谢产物图像, 采用主成分分析法检测了生物碱类和酚醛物质(亚精胺、尼古丁、酪胺、苯乙胺、分支酸), 游离脂肪酸和氧化脂类(亚麻酸、棕榈酸、氧化脂类), 糖类(己糖、己二糖)和植物激素等代谢物的变化信息, 系统地阐明了烟草胁迫响应所导致的代谢物差异。除上述多种小分子代谢物外, 芥子油苷在植物抗植食性昆虫的防御过程中发挥着重要作用, 然而, 关于芥子油苷在植物组织中空间分布情况的研究由于缺乏技术的开发而鲜有报道。近年来, 随着质谱成像技术的不断发展与完善, 许多研究在芥子油苷对于植物抗植食性昆虫的响应机理研究中取得了一定进展。例如, Shroff等人^[87]研究了棉铃虫对拟南芥叶片不同部位的食性差异。该研究以9-AA为基质, 使

用MALDI-MSI技术检测发现叶片中脉部位芥子油苷含量较高,并通过高效液相色谱验证了实验结果的准确性,揭示了芥子油苷参与植物防御的作用机理.该研究表明,拟南芥叶片中芥子油苷及其他防御代谢产物的空间分布情况的研究在进一步评估它们的防御作用与揭示植物防御作用机理方面具有重要作用.另外, γ -氨基丁酸在植物生长发育过程中尤其在抗酸性胁迫、氧化应激等方面发挥着至关重要的作用,然而关于该物质响应胁迫的作用机制尚不明确.针对这一问题,许多研究通过MSI原位表征该物质在植物组织中分布情况,为 γ -氨基丁酸作用机理的阐明提供了一定的理论依据,如Goto-Inoue等人^[91]利用MALDI-MSI鉴定了茄子中 γ -氨基丁酸,初步揭示了 γ -氨基丁酸调节植物发育、防御、响应胁迫的机理.鉴于DESI-MSI对于小分子代谢物的适用性,许多研究利用该技术进行植物响应生物/非生物胁迫机理研究方面,例如,Lane等人^[133]将红藻样本附着于聚四氟乙烯载体表面,并利用DESI-MSI对其代谢物进行了成像分析,实验结果发现热带红藻在抵抗病原微生物时,其表面代谢物参与调控杀除真菌的化学防御,该结果对于揭示次级代谢物内在生态适应性具有一定意义.此外,SIMS imaging植物响应胁迫机理的研究方面也取得了一定的进展,例如,Seyer等人^[145]通过将豌豆种子和拟南芥种子包覆于聚酯树脂中突破了质谱成像无法分析微小而坚硬的生物材料的局限性,使用TOF-SIMS imaging成功观测到生物组织中黄酮类代谢物的分布差异,发现一些黄酮类分子在种皮中含量高于子叶,表明种皮中黄酮在花色素沉淀、植物抵御细菌与昆虫的过程中发挥着重要作用.

2.5 MSI用于药用植物有效成分分析研究

MSI技术能同时提供样本表面多种分子组成、丰度及原位空间分布信息,成像分析无需复杂样本处理过程,与传统成像方法相比,该项技术在药用植物研究方面凸显优势,利用MSI技术对药用植物活性成分成像表征已逐渐成为质谱领域的研究新趋势之一.目前,该技术已用于多种药用植物的有效成分原位分析,如叶下珠^[94]、甘草^[104]、黄芩^[126]、鬼臼^[106]、火棘^[126]、红果榿木^[137]、人参^[123,171]、白芍^[132]等.

叶下珠含黄酮类、木脂素类、生物碱类、鞣质等多种成分,具有显著的抗乙型肝炎病毒活性并对肝

脏具有一定保护作用,且毒副作用较低,是一种极具价值的天然药材^[172].目前,由于传统MALDI-MSI的检测范围有限,导致其对于叶下珠表面寡糖类等小分子的适用性不强,因此许多研究通过将改进MALDI离子化技术扩大其检测范围,例如,Hsiao等人^[94]通过对传统MALDI和ESI离子化技术进行改进,构建了新型质谱成像(双源-TOF-MSI),并对损伤的叶下珠叶进行成像分析,其研究结果表明双源-TOF-MSI能同时适应正负离子检测,可全面分析叶下珠叶片表面脂类、寡糖类、代谢物分子的空间分布情况,为叶下珠药效成分的研究奠定了一定基础.甘草及其活性成分具有抗炎、抗变态反应的药理活性,甘草黄酮类化合物、甘草多糖和甘草酸是其抗炎、抗变应性炎症的活性成分^[173],然而由于技术限制使得对于其活性成分原位表征的研究鲜有报道.近年来,随着新型MSI技术的不断开发与构建,许多研究在甘草活性成分原位表征方面有所突破,例如,Li等人^[104]将AP-MALDI-MSI与静电场轨道阱检测器结合使用,获得了甘草根茎表面分子结构信息与高分辨率图像(10 μm),检测到根中多种组织特异性代谢产物:如游离黄酮、黄酮苷类、皂苷等,有助于进一步研究黄酮和皂苷的生物合成途径.黄芩含有丰富的黄酮类化合物,具有治疗冠心病、肝炎、高血压、急性肠炎等多种疾病的功效,Feng等人^[174]运用等离子体辅助LDI-MSI技术原位表征黄芩有效成分,结果发现黄芩中两种活性物质黄芩素和汉黄芩素主要分布于根上表皮,为进一步研究传统中药活性物质的空间分布情况提供了理论基础.鬼臼属植物的主要活性成分为木脂素类和黄酮类化合物,具有抗肿瘤、抗病毒、抗辐射、抗氧化等生物活性^[175],然而关于鬼臼活性物质空间分布情况的研究鲜有报道.目前,由于MALDI-MSI对于某些代谢小分子的检测能力较弱,许多研究将MALDI-MSI与其他多种分析鉴定方法相结合对鬼臼活性物质进行原位表征,例如,Marques等人^[106]以鬼臼根状茎为研究对象,采用低温切片方法制备组织样本切片,通过MALDI-MSI对其进行成像分析,并结合UPLC-TOF-MS技术、转录组学中基因测序拼接技术及生物信息学等分析方法,原位表征了阿朴啡生物碱、木兰碱、紫堇块茎碱、刺果番荔枝碱等化合物,对于阐明鬼臼根中生物碱合成、代谢途径具有一定意义.美登木素生物碱具有抗肿瘤活性与较强的细胞毒性,可用于乳腺癌的治疗.近年来,关于美登木素

生物碱在多种植物中的原位表征研究中已有一定进展: 例如, Eckelmann等人^[126]对火棘组织中美登木素生物碱进行了成像分析, 研究表明, MSI可用于快速表征药用植物中有效成分并有助于深入研究美登木素生物碱的生物合成途径和生态作用. 罗希吐碱是一种色酮生物碱, 具有抗炎、抗肿瘤、免疫调节等活性, 研究表明, 红果榿木富含罗希吐碱^[176]. 鉴于DESI-MSI技术可在常压环境下开展, Mohana和Kumara^[137]使用DESI-MSI技术表征红果榿木在种子发育阶段罗希吐碱及相关化合物的含量分布, 实验发现罗希吐碱在种子发育成熟阶段不断积累, 在子叶组织、胚芽、种皮中含量依次下降, 其研究结果揭示了红果榿木在种子发育阶段色原烷生物碱的动态变化模式. 基于MSI的特性, 该技术在指导药用植物组织中皂苷类成分的原位快速分析与鉴定方面取得了一定进展, 例如, Taira等人^[171]通过MALDI-MSI技术获得了人参根中人参皂苷(Rb₁, Rb₂与Rf)的分布图像, 其研究结果表明人参根不同部位中人参皂苷的含量具有差异性, 且原人参二醇型人参皂苷和原人参三醇型人参皂苷含量也有一定差异. 鉴于MSI原位快速分析与鉴定皂苷类成分的特点, 该技术在人参品种鉴别方面具有广阔应用前景, 例如, Wang等人^[123]通过MALDI-MSI表征人参、西洋参、田七人参3种人参根部皂苷含量与分布, 实验结果显示, 不同品种人参中人参皂苷的含量与分布存在差异, 可用于区分人参种类, 表明MSI技术在药用植物品种鉴定方面具有潜在应用价值. 白芍为毛茛科草本植物芍药的干燥根, 具有养血柔肝、敛阴止痛、止汗调经等功效, 民间常用于治疗头痛、眩晕、肋痛腹痛、四肢挛痛、月经不调、自汗盗汗等疾病, 同时也是自身免疫病、肝炎及肝硬化治疗中重要的组方之一. 尽管目前白芍中主要化学成分及其药理

作用的研究已相对透彻, 但对于其活性成分在白芍中的空间分布鲜有报道, 大大限制了该药用植物的有效利用. 虽然常规的组织化学染色方法可用于研究多种单宁的空间分布情况, 但无法区分单宁与其他酚类成分, 降低了结果的准确性. Li等人^[132]利用高分辨率MALDI-MSI技术对白芍根进行研究, 引入大气压扫描探针(atmospheric-pressure scanning microprobe)技术, 可将激光光斑直径降至5 μm, 首次从细胞水平上表征了单宁及单萜糖苷在白芍中的原位空间分布情况, 为进一步研究白芍中单宁及单萜糖苷的生物合成途径、储存与运输过程提供了一定的理论依据.

3 总结与展望

综上所述, 由于质谱成像技术能在提供分子结构信息的同时表征组织表面分子的空间分布信息, 因此该项技术已被广泛应用于诸多研究领域, 如基础医学、药学、微生物学、动物学、植物学等. 尽管如此, 该技术仍然存在一些不足: 样品制备过程中容易引起待测分子的降解或移位; 离子抑制现象使得低丰度化合物离子化效率降低; 图像分辨率与质谱检测灵敏度之间存在权衡矛盾; 大多数MSI技术与生物样本活体在线分析兼容性较差. 同时, 植物组织样本结构的特殊性(如细胞壁、角质层、蜡质层)进一步限制了MSI技术对于植物样本深层次内源性分子的充分表征, 影响了MSI技术在植物学领域广泛的应用. 可以预见, 随着样品制备技术的不断改进与完善、新型离子化技术的不断开发与优化、新型质谱检测手段的陆续构建与集成, 将会极大地削弱或解决上述MSI所存在的不足, 并促进质谱成像技术更为广泛、全面的应用, 尤其是在植物研究领域将具有极其广阔的应用前景.

参考文献

- 1 Spengler B. Mass spectrometry imaging of biomolecular information. *Anal Chem*, 2015, 87: 64–82
- 2 Bjarnholt N, Li B, D'Alvise J, et al. Mass spectrometry imaging of plant metabolites—principles and possibilities. *Nat Prod Rep*, 2014, 31: 818–837
- 3 Thierry-Lavenant G, Zavalin A I, Caprioli R M. Targeted multiplex imaging mass spectrometry in transmission geometry for subcellular spatial resolution. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2013, 24: 609–614
- 4 Aichler M, Walch A. MALDI imaging mass spectrometry: current frontiers and perspectives in pathology research and practice. *Lab Invest*, 2015, 95: 422–431
- 5 Addie R D, Balluff B, Bovée J V M G, et al. Current state and future challenges of mass spectrometry imaging for clinical research. *Anal Chem*,

- 2015, 87: 6426–6433
- 6 He J, Tang F, Luo Z, et al. Air flow assisted ionization for remote sampling of ambient mass spectrometry and its application. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2011, 25: 843–850
- 7 Gong X, Zhao Y, Cai S, et al. Single cell analysis with probe ESI-mass spectrometry: detection of metabolites at cellular and subcellular levels. *Anal Chem*, 2014, 86: 3809–3816
- 8 Watrous J D, Dorrestein P C. Imaging mass spectrometry in microbiology. *Nat Rev Micro*, 2011, 9: 683–694
- 9 Gemperline E, Jayaraman D, Maeda J, et al. Multifaceted investigation of metabolites during nitrogen fixation in medicago via high resolution MALDI-MS imaging and ESI-MS. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2015, 26: 149–158
- 10 Boughton B A, Thinagaran D, Sarabia D, et al. Mass spectrometry imaging for plant biology: a review. *Phytochem Rev*, 2016, 15: 445–488
- 11 Xiong X, Xu W, Eberlin L S, et al. Data processing for 3D mass spectrometry imaging. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2012, 23: 1147–1156
- 12 Anderson D M G, Van de Plas R, Rose K L, et al. 3-D imaging mass spectrometry of protein distributions in mouse neurofibromatosis 1 (NF1)-associated optic glioma. *J Proteomics*, 2016, 149: 77–84
- 13 Jorge T F, Rodrigues J A, Caldana C, et al. Mass spectrometry-based plant metabolomics: metabolite responses to abiotic stress. *Mass Spec Rev*, 2016, 35: 620–649
- 14 Grassl J, Taylor N L, Millar A H. Matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry imaging and its development for plant protein imaging. *Plant Methods*, 2011, 7: 21
- 15 Li B, Dunham S J B, Dong Y, et al. Analytical capabilities of mass spectrometry imaging and its potential applications in food science. *Trends Food Sci Technol*, 2016, 47: 50–63
- 16 Sturtevant D, Lee Y J, Chapman K D. Matrix assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry imaging (MALDI-MSI) for direct visualization of plant metabolites *in situ*. *Curr Opin Biotech*, 2016, 37: 53–60
- 17 Prideaux B, Via L E, Zimmerman M D, et al. The association between sterilizing activity and drug distribution into tuberculosis lesions. *Nat Med*, 2015, 21: 1223–1227
- 18 Schey K L, Hachey A J, Rose K L, et al. Maldi imaging mass spectrometry of pacific white shrimp l. Vannamei and identification of abdominal muscle proteins. *Proteomics*, 2016, 16: 1767–1774
- 19 Arena S, Salzano A M, Scaloni A. Identification of protein markers for the occurrence of defrosted material in milk through a MALDI-TOF-MS profiling approach. *J Proteomics*, 2016, 147: 56–65
- 20 O’Kennedy K, Fox G, Manley M. Zein characterisation of south african maize hybrids and their respective parental lines using MALDI-TOF MS. *Food Analyt Methods*, 2016, 10: 1661–1668
- 21 Bradshaw R, Denison N, Francese S. Development of operational protocols for the analysis of primary and secondary fingermark lifts by MALDI-MS imaging. *Anal Methods*, 2016, 8: 6795–6804
- 22 Jovanović M, Peter-Katalinić J. Negative ion MALDI-TOF MS, ISD and PSD of neutral underivatized oligosaccharides without anionic dopant strategies, using 2,5-DHAP as a matrix. *J Mass Spectrom*, 2016, 51: 111–122
- 23 Chendo C, Phan T N T, Marque S R A, et al. Mass spectrometry of nitroxide-terminated poly(4-vinylpyridine): a case of unwanted reactive MALDI. *Int J Mass Spectrometry*, 2016, 405: 50–58
- 24 Wenzel T, Sparbier K, Mieruch T, et al. 2,5-Dihydroxyacetophenone: a matrix for highly sensitive matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric analysis of proteins using manual and automated preparation techniques. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2006, 20: 785–789
- 25 Kirmess K M, Knochenmuss R, Blanchard G J, et al. MALDI ionization mechanisms investigated by comparison of isomers of dihydroxybenzoic acid. *J Mass Spectrom*, 2016, 51: 79–85
- 26 Evans M, Gallagher J A, Ratcliffe I, et al. Determination of the degree of polymerisation of fructans from ryegrass and chicory using MALDI-TOF mass spectrometry and gel permeation chromatography coupled to multiangle laser light scattering. *Food Hydrocolloids*, 2016, 53: 155–162
- 27 Sugiura Y, Katsumata Y, Sano M, et al. Visualization of *in vivo* metabolic flows reveals accelerated utilization of glucose and lactate in penumbra of ischemic heart. *Sci Rep*, 2016, 6: 32361
- 28 Ly A, Buck A, Balluff B, et al. High-mass-resolution MALDI mass spectrometry imaging of metabolites from formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Nat Protoc*, 2016, 11: 1428–1443
- 29 Rivas D, Ginebreda A, Pérez S, et al. MALDI-TOF MS Imaging evidences spatial differences in the degradation of solid polycaprolactone diol in water under aerobic and denitrifying conditions. *Sci Total Environ*, 2016, 566-567: 27–33
- 30 Fernández R, Garate J, Lage S, et al. Identification of biomarkers of necrosis in xenografts using imaging mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2016, 27: 244–254

- 31 Korte A R, Lee Y J. MALDI-MS analysis and imaging of small molecule metabolites with 1,5-diaminonaphthalene (DAN). *J Mass Spectrom*, 2014, 49: 737–741
- 32 Francese S, Bradshaw R, Flinders B, et al. Curcumin: a multipurpose matrix for MALDI mass spectrometry imaging applications. *Anal Chem*, 2013, 85: 5240–5248
- 33 Wang X, Han J, Chou A, et al. Hydroxyflavones as a new family of matrices for MALDI tissue imaging. *Anal Chem*, 2013, 85: 7566–7573
- 34 Wang X, Han J, Pan J, et al. Comprehensive imaging of porcine adrenal gland lipids by MALDI-FTMS using quercetin as a matrix. *Anal Chem*, 2014, 86: 638–646
- 35 Hou J, Chen S, Zhang N, et al. Organic salt NEDC (N-naphthylethylenediamine dihydrochloride) assisted laser desorption ionization mass spectrometry for identification of metal ions in real samples. *Analyst*, 2014, 139: 3469–3475
- 36 Reich R F, Cudzilo K, Levisky J A, et al. Quantitative MALDI-MS n analysis of cocaine in the autopsied brain of a human cocaine user employing a wide isolation window and internal standards. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2010, 21: 564–571
- 37 Altelaar A F M, van Minnen J, Jiménez C R, et al. Direct molecular imaging of *Lymnaea stagnalis* nervous tissue at subcellular spatial resolution by mass spectrometry. *Anal Chem*, 2005, 77: 735–741
- 38 Hankin J A, Barkley R M, Murphy R C. Sublimation as a method of matrix application for mass spectrometric imaging. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2007, 18: 1646–1652
- 39 Wang X, Han J, Hardie D B, et al. The use of matrix coating assisted by an electric field (MCAEF) to enhance mass spectrometric imaging of human prostate cancer biomarkers. *J Mass Spectrom*, 2016, 51: 86–95
- 40 Wang X, Han J, Hardie D B, et al. Metabolomic profiling of prostate cancer by matrix assisted laser desorption/ionization-Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry imaging using matrix coating assisted by an electric field (MCAEF). *Biochim Biophys Acta*, 2017, 1865: 755–767
- 41 Wang X, Han J, Yang J, et al. Matrix coating assisted by an electric field (MCAEF) for enhanced tissue imaging by MALDI-MS. *Chem Sci*, 2015, 6: 729–738
- 42 Baker T C, Han J, Borchers C H. Recent advancements in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging. *Curr Opin Biotech*, 2017, 43: 62–69
- 43 Li S, Zhang Y, Liu J, et al. Electrospray deposition device used to precisely control the matrix crystal to improve the performance of MALDI MSI. *Sci Rep*, 2016, 6: 37903
- 44 Takáts Z, Wiseman J M, Gologan B, et al. Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization. *Science*, 2004, 306: 471–473
- 45 Wiseman J M, Ifa D R, Song Q, et al. Tissue imaging at atmospheric pressure using desorption electrospray ionization (DESI) mass spectrometry. *Angew Chem Int Ed*, 2006, 45: 7188–7192
- 46 Vickerman J C. Molecular imaging and depth profiling by mass spectrometry—sims, maldi or desi? *Analyst*, 2011, 136: 2199–2217
- 47 Kertesz V, Van Berkel G J. Improved imaging resolution in desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2008, 22: 2639–2644
- 48 Campbell D I, Ferreira C R, Eberlin L S, et al. Improved spatial resolution in the imaging of biological tissue using desorption electrospray ionization. *Anal Bioanal Chem*, 2012, 404: 389–398
- 49 Roach P J, Laskin J, Laskin A. Nanospray desorption electrospray ionization: an ambient method for liquid-extraction surface sampling in mass spectrometry. *Analyst*, 2010, 135: 2233–2236
- 50 Cole L M, Clench M R. Mass spectrometry imaging for the proteomic study of clinical tissue. *Prot Clin Appl*, 2015, 9: 335–341
- 51 Laskin J, Heath B S, Roach P J, et al. Tissue imaging using nanospray desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem*, 2012, 84: 141–148
- 52 Ifa D R, Eberlin L S. Ambient ionization mass spectrometry for cancer diagnosis and surgical margin evaluation. *Clin Chem*, 2016, 62: 111–123
- 53 Cardoso-Palacios C, Lanekoff I. Direct analysis of pharmaceutical drugs using nano-DESI MS. *J Anal Methods Chem*, 2016, 2016: 1–6
- 54 Gerbig S, Brunn H E, Spengler B, et al. Spatially resolved investigation of systemic and contact pesticides in plant material by desorption electrospray ionization mass spectrometry imaging (DESI-MSI). *Anal Bioanal Chem*, 2015, 407: 7379–7389
- 55 Hofmann J P, Rohnke M, Weckhuysen B M. Recent advances in secondary ion mass spectrometry of solid acid catalysts: large zeolite crystals under bombardment. *Phys Chem Chem Phys*, 2014, 16: 5465–5474
- 56 Behrens S, Kappler A, Obst M. Linking environmental processes to the *in situ* functioning of microorganisms by high-resolution secondary ion mass spectrometry (NanoSIMS) and scanning transmission X-ray microscopy (STXM). *Environ Microbiol*, 2012, 14: 2851–2869
- 57 Heyman H M, Dubery I A. The potential of mass spectrometry imaging in plant metabolomics: a review. *Phytochem Rev*, 2015, 15: 297–316

- 58 Wu K, Jia F, Zheng W, et al. Visualization of metallodrugs in single cells by secondary ion mass spectrometry imaging. *J Biol Inorg Chem*, 2017, 22: 653–661
- 59 Lin W C, Chang H Y, Abbasi K, et al. 3D *in situ* ToF-SIMS imaging of perovskite films under controlled humidity environmental conditions. *Adv Mater Interfaces*, 2017, 4: 1600673
- 60 Bich C, Touboul D, Brunelle A. Cluster TOF-SIMS imaging as a tool for micrometric histology of lipids in tissue. *Mass Spec Rev*, 2014, 33: 442–451
- 61 Tata A, Perez C J, Hamid T S, et al. Analysis of metabolic changes in plant pathosystems by imprint imaging DESI-MS. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2015, 26: 641–648
- 62 Nishinomiya S, Toshin K, Shishido R, et al. TOF-SIMS imaging of polyester/melamine resin with bismuth cluster ions. *Surf Interface Anal*, 2016, 48: 1114–1118
- 63 Clark P A, Hagenhoff B, Kersting R, et al. Applications of tof-sims for imaging and depth profiling commercial materials. *J Vacuum Sci Technol B*, 2016, 34: 03H135
- 64 Svatos A. Mass spectrometric imaging of small molecules. *Trends Biotech*, 2010, 28: 425–434
- 65 Touboul D, Halgand F, Brunelle A, et al. Tissue molecular ion imaging by gold cluster ion bombardment. *Anal Chem*, 2004, 76: 1550–1559
- 66 Wehbe N, Mouhib T, Delcorte A, et al. Comparison of fullerene and large argon clusters for the molecular depth profiling of amino acid multilayers. *Anal Bioanal Chem*, 2014, 406: 201–211
- 67 Tian H, Maciążek D, Postawa Z, et al. CO₂ cluster ion beam, an alternative projectile for secondary ion mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2016, 27: 1476–1482
- 68 Cuyper E, Flinders B, Boone C M, et al. Consequences of decontamination procedures in forensic hair analysis using metal-assisted secondary ion mass spectrometry analysis. *Anal Chem*, 2016, 88: 3091–3097
- 69 Dunham S J B, Comi T J, Ko K, et al. Metal-assisted polyatomic SIMS and laser desorption/ionization for enhanced small molecule imaging of bacterial biofilms. *Biointerphases*, 2016, 11: 02A325
- 70 Körsgen M, Pelster A, Vens-Cappell S, et al. Molecular ME-ToF-SIMS yield as a function of DHB matrix layer thicknesses obtained from brain sections coated by sublimation/deposition techniques. *Surf Interface Anal*, 2016, 48: 34–39
- 71 Kang N, Lee J M, Jeon A, et al. Design and synthesis of new mass tags for matrix-free laser desorption ionization mass spectrometry (LDI-MS) based on 6,11-dihydrothiochromeno[4,3-b]indole. *Tetrahedron*, 2016, 72: 5612–5619
- 72 Moreno-García P, Grimaudo V, Riedo A, et al. Towards matrix-free femtosecond-laser desorption mass spectrometry for *in situ* space research. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2016, 30: 1031–1036
- 73 Peterson D S. Matrix-free methods for laser desorption/ionization mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev*, 2007, 26: 19–34
- 74 Nemes P, Vertes A. Laser ablation electrospray ionization for atmospheric pressure molecular imaging mass spectrometry. *Methods Mol Biol*, 2010, 656: 159–171
- 75 Luo Z, He J, Chen Y, et al. Air flow-assisted ionization imaging mass spectrometry method for easy whole-body molecular imaging under ambient conditions. *Anal Chem*, 2013, 85: 2977–2982
- 76 Sussulini A, Wiener E, Marnitz T, et al. Quantitative imaging of the tissue contrast agent [Gd(DTPA)]²⁻ in articular cartilage by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Contrast Media Mol Imag*, 2013, 8: 204–209
- 77 Maldonado-Torres M, López-Hernández J F, Jiménez-Sandoval P, et al. ‘Plug and Play’ assembly of a low-temperature plasma ionization mass spectrometry imaging (LTP-MSI) system. *J Proteomics*, 2014, 102: 60–65
- 78 Beach D G, Walsh C M, Cantrell P, et al. Laser ablation electrospray ionization high-resolution mass spectrometry for regulatory screening of domoic acid in shellfish. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2016, 30: 2379–2387
- 79 Bartels B, Svatoš A. Spatially resolved *in vivo* plant metabolomics by laser ablation-based mass spectrometry imaging (MSI) techniques: LDI-MSI and LAESI. *Front Plant Sci*, 2015, 6: 471
- 80 Van Acker T, Van Malderen S J M, Van Heerden M, et al. High-resolution laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry imaging of cisplatin-induced nephrotoxic side effects. *Anal Chim Acta*, 2016, 945: 23–30
- 81 Gong X, Shi S, Gamez G. Real-time quantitative analysis of valproic acid in exhaled breath by low temperature plasma ionization mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2017, 28: 678–687
- 82 Mullen A K, Clench M R, Crosland S, et al. Determination of agrochemical compounds in soya plants by imaging matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2005, 19: 2507–2516
- 83 Kondo T, Sawa S, Kinoshita A, et al. A plant peptide encoded by CLV3 identified by *in situ* MALDI-TOF MS analysis. *Science*, 2006, 313: 845–848

- 84 Robinson S, Warburton K, Seymour M, et al. Localization of water-soluble carbohydrates in wheat stems using imaging matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *New Phytol*, 2007, 173: 438–444
- 85 Li Y, Shrestha B, Vertes A. Atmospheric pressure molecular imaging by infrared MALDI mass spectrometry. *Anal Chem*, 2007, 79: 523–532
- 86 Burrell M, Earnshaw C, Clench M. Imaging matrix assisted laser desorption ionization mass spectrometry: a technique to map plant metabolites within tissues at high spatial resolution. *J Exp Bot*, 2007, 58: 757–763
- 87 Shroff R, Vergara F, Muck A, et al. Nonuniform distribution of glucosinolates in *Arabidopsis thaliana* leaves has important consequences for plant defense. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 6196–6201
- 88 Li Y, Shrestha B, Vertes A. Atmospheric pressure infrared MALDI imaging mass spectrometry for plant metabolomics. *Anal Chem*, 2008, 80: 407–420
- 89 Anderson D M G, Carolan V A, Crosland S, et al. Examination of the distribution of nicosulfuron in sunflower plants by matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry imaging. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2009, 23: 1321–1327
- 90 Cavatorta V, Sforza S, Mastrobuoni G, et al. Unambiguous characterization and tissue localization of Pru P 3 peach allergen by electrospray mass spectrometry and MALDI imaging. *J Mass Spectrom*, 2009, 44: 891–897
- 91 Goto-Inoue N, Setou M, Zaima N. Visualization of spatial distribution of γ -aminobutyric acid in eggplant (*Solanum melongena*) by matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry. *Anal Sci*, 2010, 26: 821–825
- 92 Jung S, Chen Y, Sullards M C, et al. Direct analysis of cellulose in poplar stem by matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2010, 24: 3230–3236
- 93 Ibáñez A J, Scharte J, Bones P, et al. Rapid metabolic profiling of *Nicotiana tabacum* defence responses against *Phytophthora nicotianae* using direct infrared laser desorption ionization mass spectrometry and principal component analysis. *Plant Methods*, 2010, 6: 14
- 94 Hsiao C H, Hong C W, Liu B H, et al. Comprehensive molecular imaging of photolabile surface samples with synchronized dual-polarity time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2011, 25: 834–842
- 95 Lunsford K A, Peter G F, Yost R A. Direct matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric imaging of cellulose and hemicellulose in *Populus* tissue. *Anal Chem*, 2011, 83: 6722–6730
- 96 Poth A G, Mylne J S, Grassl J, et al. Cyclotides associate with leaf vasculature and are the products of a novel precursor in *Petunia* (Solanaceae). *J Biol Chem*, 2012, 287: 27033–27046
- 97 Peukert M, Matros A, Lattanzio G, et al. Spatially resolved analysis of small molecules by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric imaging (MALDI-MSI). *New Phytol*, 2012, 193: 806–815
- 98 Shu T, Shimma S, Osaka I, et al. Mass spectrometry imaging of the capsaicin localization in the capsicum fruits. *Int J Biotechnol Wellness Industries*, 2012, 1: 1633–1639
- 99 Horn P J, Korte A R, Neogi P B, et al. Spatial mapping of lipids at cellular resolution in embryos of cotton. *Plant Cell*, 2012, 24: 622–636
- 100 Franceschi P, Dong Y, Strupat K, et al. Combining intensity correlation analysis and MALDI imaging to study the distribution of flavonols and dihydrochalcones in golden delicious apples. *J Exp Bot*, 2012, 63: 1123–1133
- 101 Ye H, Gemperline E, Venkateshwaran M, et al. MALDI mass spectrometry-assisted molecular imaging of metabolites during nitrogen fixation in the *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* symbiosis. *Plant J*, 2013, 75: 130–145
- 102 Weidner S, Schultze R D, Enthaler B. Matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry of pollen grains and their mixtures. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2013, 27: 896–903
- 103 Horn P J, James C N, Gidda S K, et al. Identification of a new class of lipid droplet-associated proteins in plants. *Plant Physiol*, 2013, 162: 1926–1936
- 104 Li B, Bhandari D R, Janfelt C, et al. Natural products in *Glycyrrhiza glabra* (licorice) rhizome imaged at the cellular level by atmospheric pressure matrix-assisted laser desorption/ionization tandem mass spectrometry imaging. *Plant J*, 2014, 80: 161–171
- 105 Berisha A, Dold S, Guenther S, et al. A comprehensive high-resolution mass spectrometry approach for characterization of metabolites by combination of ambient ionization, chromatography and imaging methods. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2014, 28: 1779–1791
- 106 Marques J V, Dalisay D S, Yang H, et al. A multi-omics strategy resolves the elusive nature of alkaloids in *Podophyllum* species. *Mol Biosyst*, 2014, 10: 2838–2849
- 107 Veličković D, Herdier H, Philippe G, et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging: a powerful tool for probing the molecular topology of plant cutin polymer. *Plant J*, 2014, 80: 926–935
- 108 Seaman C, Flinders B, Eijkel G, et al. “Afterlife Experiment”: use of MALDI-MS and SIMS imaging for the study of the nitrogen cycle within plants. *Anal Chem*, 2014, 86: 10071–10077
- 109 Peukert M, Thiel J, Peshev D, et al. Spatio-temporal dynamics of fructan metabolism in developing barley grains. *Plant Cell*, 2014, 26: 3728–3744

- 110 Bencivenni M, Faccini A, Zecchi R, et al. Electrospray MS and MALDI imaging show that non-specific lipid-transfer proteins (LTPs) in tomato are present as several isoforms and are concentrated in seeds. *J Mass Spectrom*, 2014, 49: 1264–1271
- 111 Araújo P, Ferreira M S, de Oliveira D N, et al. Mass spectrometry imaging: an expeditious and powerful technique for fast *in situ* lignin assessment in *Eucalyptus*. *Anal Chem*, 2014, 86: 3415–3419
- 112 Soares M S, da Silva D F, Forim M R, et al. Quantification and localization of hesperidin and rutin in *Citrus sinensis* grafted on *C. limonia* after *Xylella fastidiosa* infection by HPLC-UV and MALDI imaging mass spectrometry. *Phytochemistry*, 2015, 115: 161–170
- 113 Yoshinaga A, Kamitakahara H, Takabe K. Distribution of coniferin in differentiating normal and compression woods using MALDI mass spectrometric imaging coupled with osmium tetroxide vapor treatment. *Tree Physiol*, 2016, 36: 643–652
- 114 Wang W X, Kusari S, Sezgin S, et al. Hexacyclopeptides secreted by an endophytic fungus *Fusarium solani* N06 act as crosstalk molecules in *Narcissus tazetta*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99: 7651–7662
- 115 Takahashi K, Kozuka T, Anegawa A, et al. Development and application of a high-resolution imaging mass spectrometer for the study of plant tissues. *Plant Cell Physiol*, 2015, 56: 1329–1338
- 116 Bhandari D R, Wang Q, Friedt W, et al. High resolution mass spectrometry imaging of plant tissues: towards a plant metabolite atlas. *Analyst*, 2015, 140: 7696–7709
- 117 Shroff R, Schramm K, Jeschke V, et al. Quantification of plant surface metabolites by matrix-assisted laser desorption-ionization mass spectrometry imaging: glucosinolates on *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant J*, 2015, 81: 961–972
- 118 Kusari S, Sezgin S, Nigutova K, et al. Spatial chemo-profiling of hypericin and related phytochemicals in *Hypericum* species using MALDI-HRMS imaging. *Anal Bioanal Chem*, 2015, 407: 4779–4791
- 119 Korte A R, Yandea-Nelson M D, Nikolau B J, et al. Subcellular-level resolution MALDI-MS imaging of maize leaf metabolites by MALDI-linear ion trap-Orbitrap mass spectrometer. *Anal Bioanal Chem*, 2015, 407: 2301–2309
- 120 Klein A T, Yagnik G B, Hohenstein J D, et al. Investigation of the chemical interface in the soybean-aphid and rice-bacteria interactions using MALDI-mass spectrometry imaging. *Anal Chem*, 2015, 87: 5294–5301
- 121 Gemperline E, Li L. Maldi-ms-assisted molecular imaging of metabolites in legume plants. *Methods Mol Biol*, 2015, 1203: 29–40
- 122 Dalisay D S, Kim K W, Lee C, et al. Dirigent protein-mediated lignan and cyanogenic glucoside formation in flax seed: integrated omics and MALDI mass spectrometry imaging. *J Nat Prod*, 2015, 78: 1231–1242
- 123 Wang S, Bai H, Cai Z, et al. MALDI imaging for the localization of saponins in root tissues and rapid differentiation of three *Panax* herbs. *Electrophoresis*, 2016, 37: 1956–1966
- 124 Veličković D, Saulnier L, Lhomme M, et al. Mass spectrometric imaging of wheat (*Triticum* spp.) and barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars: distribution of major cell wall polysaccharides according to their main structural features. *J Agric Food Chem*, 2016, 64: 6249–6256
- 125 Lange B M, Fischedick J T, Lange M F, et al. Integrative approaches for the identification and localization of specialized metabolites in *Tripterygium* roots. *Plant Physiol*, 2017, 173: 456–469
- 126 Eckelmann D, Kusari S, Spiteller M. Occurrence and spatial distribution of maytansinoids in *Putterlickia pyracantha*, an unexplored resource of anticancer compounds. *Fitoterapia*, 2016, 113: 175–181
- 127 Dueñas M E, Klein A T, Alexander L E, et al. High spatial resolution mass spectrometry imaging reveals the genetically programmed, developmental modification of the distribution of thylakoid membrane lipids among individual cells of maize leaf. *Plant J*, 2017, 89: 825–838
- 128 Sturtevant D, Dueñas M E, Lee Y J, et al. Three-dimensional visualization of membrane phospholipid distributions in *Arabidopsis thaliana* seeds: a spatial perspective of molecular heterogeneity. *Biochim Biophys Acta*, 2017, 1862: 268–281
- 129 Nakamura J, Morikawa-Ichino T, Fujimura Y, et al. Spatially resolved metabolic distribution for unraveling the physiological change and responses in tomato fruit using matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry imaging (MALDI-MSI). *Anal Bioanal Chem*, 2017, 409: 1697–1706
- 130 Beck S, Stengel J. Mass spectrometric imaging of flavonoid glycosides and biflavonoids in *Ginkgo biloba* L.. *Phytochemistry*, 2016, 130: 201–206
- 131 Gemperline E, Keller C, Jayaraman D, et al. Examination of endogenous peptides in *Medicago truncatula* using mass spectrometry imaging. *J Proteome Res*, 2016, 15: 4403–4411
- 132 Li B, Bhandari D R, Römpf A, et al. High-resolution MALDI mass spectrometry imaging of gallotannins and monoterpene glucosides in the root of *Paeonia lactiflora*. *Sci Rep*, 2016, 6: 36074
- 133 Lane A L, Nyadong L, Galhena A S, et al. Desorption electrospray ionization mass spectrometry reveals surface-mediated antifungal chemical defense of a tropical seaweed. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 7314–7319
- 134 Thunig J, Hansen S H, Janfelt C. Analysis of secondary plant metabolites by indirect desorption electrospray ionization imaging mass spectrometry. *Anal Chem*, 2011, 83: 3256–3259

- 135 Li B, Bjarnholt N, Hansen S H, et al. Characterization of barley leaf tissue using direct and indirect desorption electrospray ionization imaging mass spectrometry. *J Mass Spectrom*, 2011, 46: 1241–1246
- 136 Müller T, Oradu S, Ifa D R, et al. Direct plant tissue analysis and imprint imaging by desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem*, 2011, 83: 5754–5761
- 137 Mohana Kumara P, Srimany A, Ravikanth G, et al. Ambient ionization mass spectrometry imaging of rohitukine, a chromone anti-cancer alkaloid, during seed development in *Dysoxylum binectariferum* Hook.f (Meliaceae). *Phytochemistry*, 2015, 116: 104–110
- 138 Janfelt C. Imaging of plant materials using indirect desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Methods Mol Biol*, 2015, 1203: 91–97
- 139 Hemalatha R G, Naik H R, Mariappa V, et al. Rapid detection of Fusarium wilt in basil (*Ocimum* sp.) leaves by desorption electrospray ionization mass spectrometry (DESI MS) imaging. *RSC Adv*, 2015, 5: 50512–50522
- 140 Cabral E C, Ifa D R. Desi imaging of small molecules in biological tissues. *Methods Mol Biol*, 2015, 1203: 63–77
- 141 Mohana Kumara P, Srimany A, Arunan S, et al. Desorption electrospray ionization (DESI) mass spectrometric imaging of the distribution of rohitukine in the seedling of *Dysoxylum binectariferum* Hook. F. *PLoS ONE*, 2016, 11: e0158099
- 142 Garrett R, Rezende C M, Ifa D R. Revealing the spatial distribution of chlorogenic acids and sucrose across coffee bean endosperm by desorption electrospray ionization-mass spectrometry imaging. *LWT-Food Sci Tech*, 2016, 65: 711–717
- 143 Dong Y, Guella G, Franceschi P. Impact of tissue surface properties on the desorption electrospray ionization imaging of organic acids in grapevine stem. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2016, 30: 711–718
- 144 Saito K, Mitsutani T, Imai T, et al. Discriminating the indistinguishable sapwood from heartwood in discolored ancient wood by direct molecular mapping of specific extractives using time-of-flight secondary ion mass spectrometry. *Anal Chem*, 2008, 80: 1552–1557
- 145 Seyer A, Einhorn J, Brunelle A, et al. Localization of flavonoids in seeds by cluster time-of-flight secondary ion mass spectrometry imaging. *Anal Chem*, 2010, 82: 2326–2333
- 146 Moore K L, Schröder M, Wu Z, et al. High-resolution secondary ion mass spectrometry reveals the contrasting subcellular distribution of arsenic and silicon in rice roots. *Plant Physiol*, 2011, 156: 913–924
- 147 Saito K, Watanabe Y, Shirakawa M, et al. Direct mapping of morphological distribution of syringyl and guaiacyl lignin in the xylem of maple by time-of-flight secondary ion mass spectrometry. *Plant J*, 2012, 69: 542–552
- 148 Moore K L, Hawes C R, McGrath S P, et al. High resolution SIMS analysis of arsenic in rice. *Surf Interface Anal*, 2013, 45: 309–311
- 149 Jenčič B, Jeromel L, Ogrinc Potočnik N, et al. Molecular imaging of cannabis leaf tissue with MeV-SIMS method. *Nucl Instruments Methods Phys Res Sect B*, 2016, 371: 205–210
- 150 Holscher D, Shroff R, Knop K, et al. Matrix-free UV-laser desorption/ionization (LDI) mass spectrometric imaging at the single-cell level: distribution of secondary metabolites of *Arabidopsis thaliana* and *Hypericum species*. *Plant J*, 2009, 60: 907–918
- 151 Hamm G, Carré V, Poutaraud A, et al. Determination and imaging of metabolites from *Vitis vinifera* leaves by laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2010, 24: 335–342
- 152 Holscher D, Fuchser J, Knop K, et al. High resolution mass spectrometry imaging reveals the occurrence of phenylphenalenone-type compounds in red paracytic stomata and red epidermis tissue of *Musa acuminata* ssp. *zebrina* cv. “Rowe red”. *Phytochemistry*, 2015, 116: 239–245
- 153 Nemes P, Barton A A, Li Y, et al. Ambient molecular imaging and depth profiling of live tissue by infrared laser ablation electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem*, 2008, 80: 4575–4582
- 154 Nemes P, Barton A A, Vertes A. Three-dimensional imaging of metabolites in tissues under ambient conditions by laser ablation electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem*, 2009, 81: 6668–6675
- 155 Shrestha B, Patt J M, Vertes A. *In situ* cell-by-cell imaging and analysis of small cell populations by mass spectrometry. *Anal Chem*, 2011, 83: 2947–2955
- 156 Vaikkinen A, Shrestha B, Nazarian J, et al. Simultaneous detection of nonpolar and polar compounds by heat-assisted laser ablation electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem*, 2013, 85: 177–184
- 157 Wang H, Dai B, Liu B, et al. Coumarins as new matrices for matrix-assisted laser-desorption/ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometric analysis of hydrophobic compounds. *Anal Chim Acta*, 2015, 882: 49–57
- 158 Etalo D W, De Vos R C, Joosten M H, et al. Spatially resolved plant metabolomics: some potentials and limitations of laser-ablation electrospray ionization mass spectrometry metabolite imaging. *Plant Physiol*, 2015, 169: 1424–1435
- 159 da Silva M A O, Arruda M A Z. Laser ablation (imaging) for mapping and determining Se and S in sunflower leaves. *Metallomics*, 2013, 5: 62–67
- 160 Oliveira S R, Arruda M A Z. Application of laser ablation (imaging) inductively coupled plasma mass spectrometry for mapping and quantifying Fe in transgenic and non-transgenic soybean leaves. *J Anal At Spectrom*, 2015, 30: 389–395
- 161 Promchan J, Günther D, Siripinyanond A, et al. Elemental imaging and classifying rice grains by using laser ablation inductively coupled plasma

- mass spectrometry and linear discriminant analysis. *J Cereal Sci*, 2016, 71: 198–203
- 162 Gamboa-Becerra R, Ramírez-Chávez E, Molina-Torres J, et al. MSI.R scripts reveal volatile and semi-volatile features in low-temperature plasma mass spectrometry imaging (LTP-MSI) of chilli (*Capsicum annuum*). *Anal Bioanal Chem*, 2015, 407: 5673–5684
- 163 Yoshimura Y, Zaima N, Moriyama T, et al. Different localization patterns of anthocyanin species in the pericarp of black rice revealed by imaging mass spectrometry. *PLoS ONE*, 2012, 7: e31285
- 164 Kim S H, Kim J, Lee Y J, et al. Sample preparation of corn seed tissue to prevent analyte relocations for mass spectrometry imaging. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2017, 28: 1729–1732
- 165 Mirnezami R, Spagou K, Vorkas P A, et al. Chemical mapping of the colorectal cancer microenvironment via MALDI imaging mass spectrometry (MALDI-MSI) reveals novel cancer-associated field effects. *Mol Oncol*, 2014, 8: 39–49
- 166 Paine M R L, Kim J, Bennett R V, et al. Whole reproductive system non-negative matrix factorization mass spectrometry imaging of an early-stage ovarian cancer mouse model. *PLoS ONE*, 2016, 11: e0154837
- 167 He M, Guo S, Li Z. *In situ* characterizing membrane lipid phenotype of breast cancer cells using mass spectrometry profiling. *Sci Rep*, 2015, 5: 11298
- 168 Goto T, Terada N, Inoue T, et al. The expression profile of phosphatidylinositol in high spatial resolution imaging mass spectrometry as a potential biomarker for prostate cancer. *PLoS ONE*, 2014, 9: e90242
- 169 Li B, Hansen S H, Janfelt C. Direct imaging of plant metabolites in leaves and petals by desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Int J Mass Spectrometry*, 2013, 348: 15–22
- 170 Horn P J, Sturtevant D, Chapman K D. Modified oleic cottonseeds show altered content, composition and tissue-specific distribution of triacylglycerol molecular species. *Biochimie*, 2014, 96: 28–36
- 171 Taira S, Ikeda R, Yokota N, et al. Mass spectrometric imaging of ginsenosides localization in *Panax ginseng* root. *Am J Chin Med*, 2010, 38: 485–493
- 172 Lin S Y, Wang C C, Lu Y L, et al. Antioxidant, anti-semicarbazide-sensitive amine oxidase, and anti-hypertensive activities of geraniin isolated from *Phyllanthus urinaria*. *Food Chem Toxicol*, 2008, 46: 2485–2492
- 173 Rebhun J F, Glynn K M, Missler S R. Identification of glabridin as a bioactive compound in licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) extract that activates human peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ). *Fitoterapia*, 2015, 106: 55–61
- 174 Feng B, Zhang J, Chang C, et al. Ambient mass spectrometry imaging: plasma assisted laser desorption ionization mass spectrometry imaging and its applications. *Anal Chem*, 2014, 86: 4164–4169
- 175 Li M, Zhou L, Yang D, et al. Biochemical composition and antioxidant capacity of extracts from podophyllum hexandrum rhizome. *BMC Complement Altern Med*, 2012, 12: 263
- 176 Mohanakumara P, Sreejayan N, Priti V, et al. *Dysoxylum binectariferum* Hook.f (Meliaceae), a rich source of rohitukine. *Fitoterapia*, 2010, 81: 145–148

Mass spectrometry imaging for *in situ* analysis of endogenous molecules in plants

HE HuiXin, CHEN LuLu, QIN Liang, LIU YaQin & WANG XiaoDong

Centre for Imaging & Systems Biology, College of Life and Environmental Sciences, Minzu University of China, Beijing 100081, China

Mass spectrometry imaging (MSI), an emerging technology for molecular imaging in biological tissue, enables simultaneous examination and characterization of the spatial distributions and relative abundances of endogenous and exogenous compounds directly from the surface of a thinly cut tissue slice, such as proteins, peptides, lipids, metabolites, and drugs. In the past decade, MSI has been widely applied in a broad range of fields, including basic medical science, pharmaceutical science, microbiology, and zoology. MSI has been applied to investigate plant biology because it can be used for *in situ* label-free molecular imaging. This review provides an overview of MSI technology, describes the standard operating procedures of different types of MSI, and outlines the applications of MSI for *in situ* analysis of endogenous molecules in plant tissue, particularly in medicinal plant materials. Finally, the technical limitations and challenges of MSI are summarized, which must be addressed to allow for effective and widespread application of MSI in plants. Further improvements in MS technology will enhance the overall performance of MSI in plant studies.

mass spectrometry imaging, endogenous molecule, *in situ* analysis, spatial resolution, medicinal plant

doi: [10.1360/N052017-00015](https://doi.org/10.1360/N052017-00015)