

技术与方法 Techniques and Methods

基于核磁共振的水稻根细胞内pH值的测定方法

刘于*

浙江大学生命科学院, 杭州310058

摘要: 采用³¹P-核磁共振技术(³¹P-NMR)建立了无损伤测定水稻根系细胞内pH值的方法。通过测定水稻根系细胞内磷酸盐化学位移间接确定细胞液泡及细胞质内pH, 计算得到正常水培条件下水稻根系细胞液泡及细胞质内pH分别为5.43±0.05和7.45±0.04。另外, 用该方法还测定了磷饥饿条件下水稻根细胞内pH的变化。

关键词: ³¹P-核磁共振; 水稻根; 细胞pH值

NMR-Based Measurement of Intracellular pH in Rice Roots

LIU Yu*

College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China

Abstract: A ³¹P nuclear magnetic resonance (³¹P-NMR) method to measure noninvasively intracellular pH in rice roots was described in this paper. The cytoplasmic and vacuolar pH values (pH_c and pH_v) were estimated indirectly from the chemical shift of phosphate (Pi) present in the cytoplasm and vacuole of rice roots. Using the ³¹P-NMR method, pH_c and pH_v of the rice roots in hydroponic culture were obtained at 5.43±0.05 and 7.45±0.04, respectively. And, changes of intracellular pH in rice root under phosphorus starvation condition were also determined.

Key words: ³¹P-NMR; rice roots; intracellular pH

植物细胞内pH值是植物细胞内物理环境最基本的指标之一, 是控制植物细胞内生物化学反应的重要调节因素之一(柳参奎等2004)。通常, 大多数植物细胞胞质内pH相对稳定地维持在中性左右, 液泡内pH波动在5.0~6.5范围内(Kurkdjian和Guern 1989; 周文彬和邱保胜2004)。细胞内pH值的测定可以为研究植物抗逆或转基因功能鉴定等提供重要参数。胞内pH值的测定方法主要有弱酸弱碱分布法、核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)法、微电极法和荧光染料法等(周文彬和邱保胜2004)。但是, 弱酸弱碱分布法和微电极法需要破坏组织, 无法避免各种损伤或破坏所导致的细胞内部生理和代谢变化以及由此产生的测定结果的偏差; 荧光染料或绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)法由于观察手段有限, 很难活体检测pH或只局限于少量细胞层染色, 无法对活体根组织整体测定, 同时, 染色方法还可能对活体细胞的功能有影响。因此, 准确无损伤测定植物细胞内pH对于深入研究植物细胞代谢与细胞内pH值的关系及其可能机制有重要意义。

NMR技术是一种在生理条件下无损伤性研究

活细胞等生物样品的主要手段(Shanks 2001), 能在接近生理状态下动态地研究生命现象。活体(*in vivo*) NMR研究可非损伤地测定细胞内pH值(Moon和Richards 1973; Roberts等1980; 乔娟等2005), 非破坏性地间接测定细胞内K⁺、Mg²⁺等游离离子浓度(黄荣清等2004)。Roberts等(1980)和Roby等(1987)利用³¹P NMR方法测定植物细胞内的磷, 并通过磷的不同位移计算出液泡及细胞质内的pH, 该方法为无损伤测定不同胁迫条件下植物根系细胞内pH的变化提供了一条重要的途径。此方法的研究对象主要为悬浮细胞, 而很少应用在植物根系原位细胞内的分析上。本研究尝试将NMR技术应用于测定水稻根系细胞内的pH, 在国内尚属首次。同时, 也第一次报道了磷饥饿胁迫条件下植

收稿 2015-03-09 修定 2015-04-27

资助 国家自然科学基金项目(31400224)和浙江大学实验技术研究项目(2013-15)。

致谢 浙江大学生命科学院植物生理学与生物化学国家重点实验室吴平教授(已故)帮助建立NMR测试平台。

* 通讯作者(E-mail: liuyu_zju@zju.edu.cn; Tel: 0571-88206177)。

物细胞内的pH变化, 为植物细胞应对磷胁迫响应机制的研究提供了重要的原位数据。

材料与方法

1 水稻根系灌流装置

该装置由核磁管(5 mm)、毛细管(0.5和0.3 mm)、双通道蠕动泵(Ismatec, 瑞士)、空气泵、聚四氟乙烯管(内径0.8 mm)及一些连接小管组成(图1)。重水(D_2O)溶液装入2根0.5 mm毛细管, 10 mmol·L⁻¹亚甲基二磷酸(methylenediphosphoric acid, MDP)溶液装入0.3 mm毛细管, 毛细管两端烧封后

放入5 mm的核磁管内; 称量0.05~0.07 g水稻根系放入核磁管, 连接在蠕动泵上的两根聚四氟乙烯管, 排空气泡后, 一根插入到核磁管底部, 另一根在根系上层, 使灌流液液面维持不动, 然后用胶带将聚四氟乙烯管固定在核磁管口上; 灌流液流速为3 mL·min⁻¹。此外, 将空气泵管插入灌流液烧杯中以增加灌流液中的溶解氧。灌流液组成成分为: 5 mmol·L⁻¹葡萄糖、10 mmol·L⁻¹硝酸钾、0.5 mmol·L⁻¹硝酸钙、1 mmol·L⁻¹氯化钾、0.5 mmol·L⁻¹硫酸镁、0.2 mmol·L⁻¹磷酸二氢钾、2 mmol·L⁻¹2-(*N*-吗啉)乙磺酸一水合物(MES), pH 5.5 (Stefanovic等2011)。

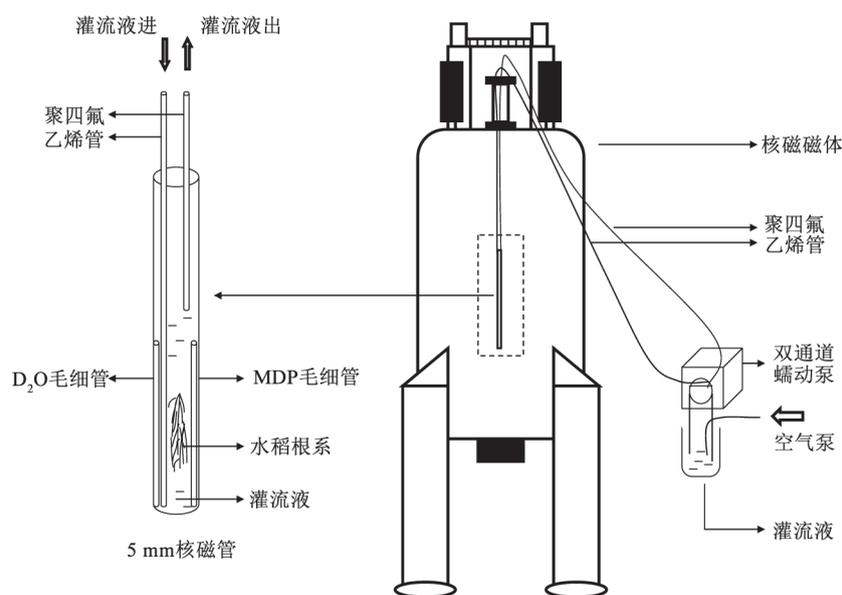


图1 水稻根系灌流装置图

Fig.1 Perfusion system of rice roots

2 ³¹P-NMR波谱测定

采用600 MHz超导核磁共振波谱仪(AVANCE III, Bruker, 瑞士), 配备5 mm BBFO探头采集波谱。参数设置如下: ³¹P共振频率242.9 MHz, 单脉冲门控去偶方式测定, 脉冲倾斜角为30°, 脉冲宽度3.96 μs, 采样时间0.33 s, 数据点16 k, 谱宽24 kHz, 扫描4 500次, 线增宽因子20 Hz, 采样温度298 K。将85% H₃PO₄的化学位移(δ)规定为0 ppm, 并以此作为相对标准。D₂O锁场, 不匀场, 以10 mmol·L⁻¹MDP外标作为确定 δ 的参考标准(Quiquampoix等1993)。采用Bruker TopSpin 3.2和MestReNova 8.1软件处理图谱及数据。

3 标准曲线绘制

配制一系列不同pH (4.5~8.5)的KH₂PO₄溶液, 依次移入到核磁管内, 加入分别含有D₂O和MDP溶液的毛细管后, 盖上核磁管盖, 放入核磁波谱仪中进行测定, 以获得不同pH时的³¹P-NMR图谱, 得到 δ 。然后, 以pH为横坐标, 不同pH值时P_i的 δ 为纵坐标, 绘制标准曲线。

4 水稻培养及磷饥饿处理

粳稻日本晴(*Oryza sativa* L. ssp. *japonica* var. *Nipponbare*)种子用0.66%稀HNO₃处理16 h后破休眠, 37 °C催芽至露白, 浮在水稻营养液的尼龙网上培养5 d后, 转移到10 L正常水稻营养液(Ma等

2001)中培养10 d, 每3 d调一次pH值至5.5。磷饥饿处理时, 将10 d苗龄的水稻幼苗转移到完全缺磷的营养液中培养1、3、7 d, 再恢复为正常磷处理2 d, 其他营养元素不变。

实验结果

1 水稻根系³¹P-NMR谱图指认

参考相关文献(Aubert等1998; Espen等2004; Gout等2011), 对水稻根系的³¹P-NMR谱的谱峰进行了指认(图2)。水稻根系的³¹P-NMR谱主要由无机磷(液泡和细胞质)、磷酸葡萄糖、磷酸果糖和三磷酸核苷等共振峰组成。磷酸盐主要储存在液泡中, 因此液泡磷酸盐(vac-P_i)峰最高。

2 pH值的计算

在近中性条件下, 无机磷(H₂PO₄⁻和HPO₄²⁻)的pK_a约为7.2, 在³¹P谱中只能看到一个共振峰, δ为这两种无机磷离子相对浓度的平均权重(黄荣清等1998)。pH的改变会影响这两种离子的相对浓度, 从而改变P_i的δ。分析³¹P-NMR图谱中P_i的δ, 得出数值后, 利用亨德森-哈塞尔巴尔赫(Henderson-

Hasselbach)方程式计算pH值。Henderson-Hasselbach方程式如下:

$$\text{pH}_i = \text{p}K_1 + \log_{10} \left(\frac{\delta_{\text{P}_i} - \delta_{\text{HPO}_4^{2-}}}{\delta_{\text{H}_2\text{PO}_4^-} - \delta_{\text{P}_i}} \right) \quad (1)$$

其中, pK₁为P_i的表观解离常数, δ_{HPO₄²⁻}和δ_{H₂PO₄⁻}分别为磷酸根在碱性和酸性环境中δ的极值, δ_{P_i}为实验测定的Pi峰的δ。以pH为横坐标, 不同pH值时P_i的δ为纵坐标, 绘制标准曲线(图3), 将标准曲线的不同pH值及P_i的δ代入公式(1)。然后, 用Matlab 6.5软件计算得到公式:

$$\text{pH}_i = 6.753 + \log_{10} \left(\frac{\delta_{\text{P}_i} - 0.52}{3.02 - \delta_{\text{P}_i}} \right) \quad (2)$$

图2显示, 正常条件下水稻根系细胞液泡P_i的δ为0.64±0.01, 细胞质P_i的δ为2.60±0.03。由公式(2)计算得到液泡内pH值为5.43±0.05, 细胞质内pH值为7.45±0.04。本方法测定的细胞内pH值与已报道的有关文献数据一致(Kurkdjian和Guern 1989; 周文彬和邱保胜2004), 说明该方法结果可靠。

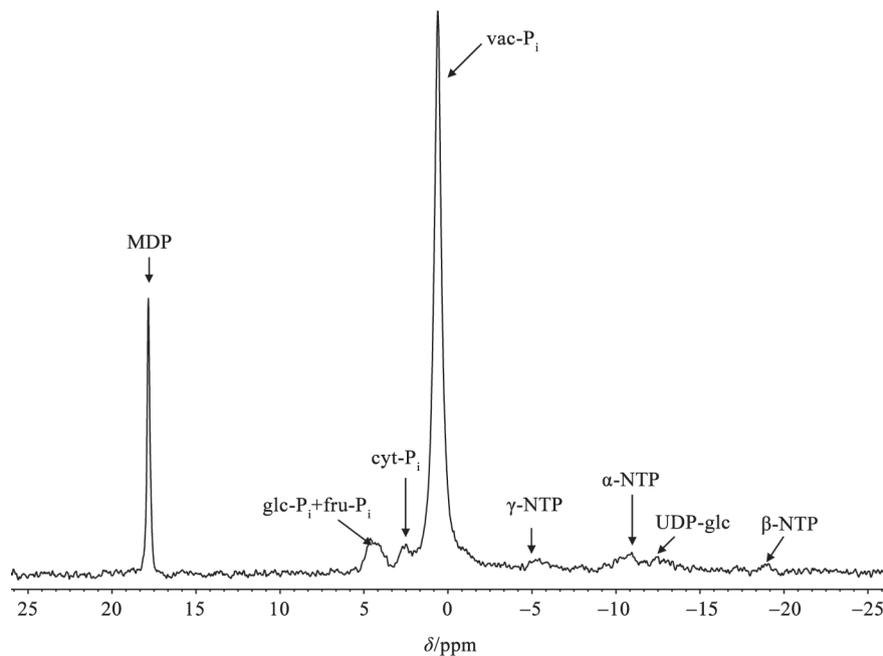
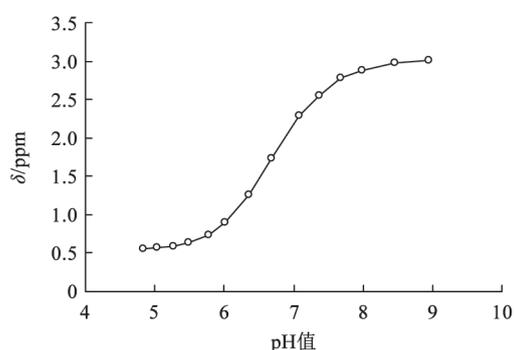


图2 水稻根系³¹P-NMR图谱

Fig.2 ³¹P-NMR spectra of rice roots

MDP: 参考物, 亚甲基二磷酸(methylenediphosphoic acid); glc-P_i: 6-磷酸葡萄糖(glucose 6-phosphate); fru-P_i: 6-磷酸果糖(fructose 6-phosphate); cyt-P_i: 细胞质磷酸盐(cytoplasmic phosphate); vac-P_i: 液泡磷酸盐(vacuolar phosphate); NTP: 三磷酸核苷(nucleoside triphosphate); UDP-glc: 尿苷二磷酸葡萄糖(uridine diphosphate glucose)。

图3 不同pH值时P_i的δ标准曲线Fig.3 Standard curve of P_i chemical shift (δ) under different solution pH

3 磷饥饿条件下水稻根系细胞内pH的变化

采用该方法测定了经不同时间磷饥饿处理后细胞内pH的变化,结果显示,液泡和细胞质内的pH在缺磷处理1 d后变化不大,但是在缺磷3和7 d后均显著降低。细胞质内pH在缺磷7 d后比正常生长时的pH降低了0.25左右(图4-A),而液泡内的pH则降低更多,降低了约0.5左右(图4-B)。恢复供磷2 d后,根组织细胞质内pH基本恢复到原来水平(图4-A),但是液泡内pH依然表现为降低状态(图4-B)。

讨 论

迄今为止,对于利用³¹P-NMR技术分析植物细胞液泡和胞质内pH值的研究仅有少量报道。其中,Espen等(2000)在研究缺铁条件下黄瓜(*Cucumis sativus*)代谢方面的变化时发现,在含0.1 mmol·L⁻¹ Fe-EDTA的水培液中生长5、10、15 d的黄瓜根细胞质内pH (pH_c)分别为7.66、7.69和7.69,液泡内pH (pH_v)分别为5.62、5.62和5.75。而在同样培养情况下,Zocchi等(2007)报道具有14 d苗龄的大豆

(*Glycine max* cv. A2012)根系细胞中pH_c和pH_v分别为7.55和5.76。此外,Gout等(2011)在使用³¹P-NMR谱图分析植物细胞对缺碳的早期响应中发现,悬铃木(*Acer pseudoplatanus*)和拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)悬浮培养细胞在碳源存在的条件下,胞质和液泡中的pH值分别为7.40和5.20。为了更加准确地获得培养的细胞或者某个组织中胞质和呈酸性环境的细胞器内的pH值,Culcasi等(2015)研发出了一系列α-氨基磷酸酯(α-aminophosphonates)化合物,并选用其中的DEPMPH和mito-DEP-C4检测了D66绿藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)细胞胞质中的pH值。实验结果显示,黑暗厌氧条件下培养的细胞pH_c为6.97和6.98,对照内源Pi探针得到的pH_c为7.02;当细胞在光照条件下培养时,Pi、DEPMPH和mito-DEP-C4作为检测探针得到的pH值分别为7.20、7.14和7.13。本研究中,以正常水培条件下生长15 d的水稻根系为材料,采用³¹P-NMR方法,计算得到了水稻根系细胞内pH_c和pH_v分别为7.45±0.04和5.43±0.05,说明水稻根部组织胞质内pH值接近中性,液泡内pH在5.0~6.5范围之内,这与有关文献(Kurkdjian和Guern 1989;周文彬和邱保胜2004)所报道的大多数植物细胞胞质和液泡内的pH数值相吻合。

磷饥饿条件下水稻根系细胞内pH的变化(图4)表明,植物长时间缺磷后,植物pH调控系统可能下调,导致pH值的降低,是植物对于低磷胁迫的一种应答响应,是植物为提高磷的吸收利用等的一系列生理、分子过程的细胞内反应或生理应急反应;这与柳参奎等(2004)认为细胞内pH调控系统是植物在长期的进化过程中获得的抗逆机制的理论一致。在逆境下,提高细胞内pH调控系统的调控

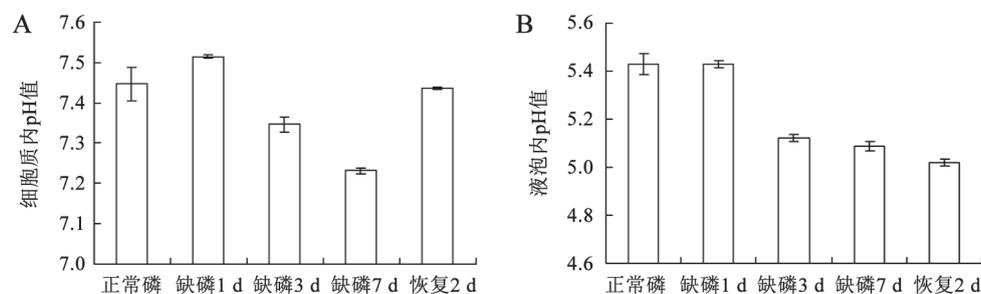


图4 磷饥饿条件下水稻根系细胞内pH值的变化

Fig.4 Changes of intracellular pH values in rice roots under phosphorus starvation

n=3。

能力能够提高植物的抗性。

总之, 直接利用³¹P-NMR技术测定植物根系细胞内pH, 优点在于无损伤、技术简单及不需要培养大量愈伤组织来获得植物细胞。此方法为研究野生型与突变体的根系细胞内pH值的差异及在不同胁迫条件下的细胞内pH变化提供了一条方便而有效的途径。此外, 借助该方法, 在国内首次研究了低磷胁迫对水稻根系组织细胞内pH的影响, 发现长时间缺磷后水稻根系组织细胞液泡及细胞质内pH均明显下降; 在恢复供磷后, 细胞质内pH值会恢复到原来的水平。这将为进一步研究低磷胁迫与细胞内pH的变化间的关系提供很好的参考。

参考文献

- 黄荣清, 杜泽涵, 杨志刚, 冯锐, 李光玉, 颜贤忠(1998). ³¹P核磁共振观察 γ -干扰素对Molt-4细胞作用后含磷代谢物及pH变化. 分析测试学报, 17 (2): 57~59
- 黄荣清, 骆传环, 杜泽涵, 肖炳坤(2004). 白血病细胞的³¹P核磁共振分析及用于无损游离镁离子测定. 分析化学, 32 (2): 129~133
- 柳参奎, 张欣欣, 程玉祥(2004). “植物细胞内pH调控系统”是适应环境逆境的一个耐性机制? 分子植物育种, 2 (2): 179~186
- 乔娟, 黄荣清, 肖炳坤, 骆传环, 吴德雨, 赵焱, 杨建云(2005). Cos-7细胞内pH的³¹P核磁共振测定. 分析化学, 33 (9): 1298~1300
- 周文彬, 邱保胜(2004). 植物细胞内pH值的测定. 植物生理学通讯, 40 (6): 724~728
- Aubert S, Curien G, Bligny R, Gout E, Douce R (1998). Transport, compartmentation, and metabolism of homoserine in higher plant cells. *Plant Physiol*, 116 (2): 547~557
- Culcasi M, Thétiot-Laurent S, Atteia A, Pietri S (2015). Mitochondrial, acidic, and cytosolic pHs determination by ³¹P NMR spectroscopy: design of new sensitive targeted pH probes. *Methods Mol Biol*, 1265: 135~147
- Espen L, Dell'Orto M, De Nisi P, Zocchi G (2000). Metabolic responses in cucumber (*Cucumis sativus* L.) roots under Fe-deficiency: a ³¹P-nuclear magnetic resonance *in-vivo* study. *Planta*, 210 (6): 985~992
- Espen L, Nocito FF, Cocucci M (2004). Effect of NO₃⁻ transport and reduction on intracellular pH: an *in vivo* NMR study in maize roots. *J Exp Bot*, 55 (405): 2053~2061
- Gout E, Bligny R, Douce R, Boisson AM, Rivasseau C (2011). Early response of plant cell to carbon deprivation: *in vivo* ³¹P-NMR spectroscopy shows a quasi-instantaneous disruption on cytosolic sugars, phosphorylated intermediates of energy metabolism, phosphate partitioning, and intracellular pHs. *New Phytol*, 189 (1): 135~147
- Kurkdjian A, Guern J (1989). Intracellular pH: measurement and importance in cell activity. *Annu Rev Plant Physiol*, 40: 271~303
- Ma JF, Goto S, Tamai K, Ichii M (2001). Role of root hairs and lateral roots in silicon uptake by rice. *Plant Physiol*, 127 (4): 1773~1780
- Moon RB, Richards JH (1973). Determination of intracellular pH by ³¹P magnetic resonance. *J Biol Chem*, 248: 7276~7278
- Quiquampoix H, Loughman BC, Ratcliffe RG (1993). A ³¹P-NMR study of the uptake and compartmentation of manganese by maize roots. *J Exp Bot*, 44 (12): 1819~1827
- Roberts JKM, Ray PM, Wade-Jardetzky N, Jardetzky O (1980). Estimation of cytoplasmic and vacuolar pH in higher plant cells by ³¹P NMR. *Nature*, 283: 870~872
- Roby C, Martin JB, Bligny R, Douce R (1987). Biochemical changes during sucrose deprivation in higher plant cells. Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance studies. *J Biol Chem*, 262 (11): 5000~5007
- Shanks JV (2001). *In situ* NMR systems. *Curr Issues Mol Biol*, 3 (1): 15~26
- Stefanovic A, Arpat AB, Bligny R, Gout E, Vidoudez C, Bensimon M, Poirier Y (2011). Over-expression of *PHO1* in *Arabidopsis* leaves reveals its role in mediating phosphate efflux. *Plant J*, 66 (4): 689~699
- Zocchi G, De Nisi P, Dell'Orto M, Espen L, Gallina PM (2007). Iron deficiency differently affects metabolic responses in soybean roots. *J Exp Bot*, 58 (5): 993~1000