

植物体超氧阴离子自由基不同检测方法的比较^{*}

汪承润^{**} 何 梅 李月云 姜传军 田刘敏 王勤英

(淮南师范学院生命科学系, 淮南, 232001)

摘 要 应用顺磁共振波谱仪(EPR)自旋捕获法、羟胺氧化法、二氢乙锭(DHE)荧光探针和硝基四氮唑蓝(NBT)原位显色法,分别检测了暴露于梯度镉(Cd)溶液2 d后的水稻幼苗根叶组织超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)的变化水平.结果表明,0—60 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd诱导了 $O_2^{\cdot-}$ 随着Cd剂量的增加而升高,高于此剂量范围则呈现下降趋势.4种方法的检测结果基本一致,但前两种方法更适用于定量 $O_2^{\cdot-}$ 的生成水平,而后两种显色方法仅能反映 $O_2^{\cdot-}$ 的变化趋势,难以精确定量.因此,可以选择性地应用4种方法揭示暴露于污染物的植物组织 $O_2^{\cdot-}$ 的响应水平.

关键词 活性氧自由基(ROS),顺磁共振波谱仪(EPR),羟胺氧化法,二氢乙锭(DHE)荧光探针,原位显色.

植物体内的活性氧(reactive oxygen species, ROS)通常存在超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)、过氧化氢(H_2O_2)、羟基自由基($OH\cdot$)、单线态氧(1O_2)、氢过氧基($HOO\cdot$)、脂质自由基($R\cdot$)、脂氧自由基($RO\cdot$)和脂质过氧自由基($ROO\cdot$)等类型.其中, $O_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 、 $OH\cdot$ 和 1O_2 等活性氧可以相互转化,通过协同作用,形成一个复杂的反应网络.在叶片等含有叶绿素的组织和细胞中,在光照条件下,ROS主要产生于叶绿体和过氧化物酶体,而在根部等不含叶绿素的组织和细胞中以及黑暗条件下的绿色组织,ROS主要来源于线粒体^[1-3].

大量研究表明,当生物体遭受污染物胁迫时,体内活性氧的产生将大大增加,当超出生物体的抗氧化防御能力时,能够氧化不饱和脂肪酸、蛋白质和核酸分子,导致膜脂质过氧化、酶蛋白失活、DNA损伤,甚至细胞坏死等^[4-6].因此,活性氧的大量产生和积累可作为生物体氧化胁迫的信号^[7].ROS也因此被认为是污染物致毒的重要途径和机制.近年来的研究结果还表明,活性氧还参与细胞的信号转导和生理响应的诱导,是植物组织细胞的一类重要的信号分子^[8].因此,研究植物体活性氧自由基的测定和定量方法对污染物致毒的早期预警及其微观机理的揭示都具有重要的理论意义.

由于生物体活性氧的寿命极其短暂,如 $O_2^{\cdot-}$ 在水溶液中的存活时间为1 s, $\cdot OH$ 的寿命则仅为 10^{-6} s,加之组织中活性氧的浓度极低,导致其定性和定量极为困难. $O_2^{\cdot-}$ 是生物体最初生成的自由基,又是氧自由基的前体,可以转化成其它种类氧自由基^[8].因此,对 $O_2^{\cdot-}$ 的捕获和测定尤显重要.

研究发现, $O_2^{\cdot-}$ 可以与1,2-二羟基苯-3,5-二磺酸钠(Tiron)快速反应生成一种称之为“Tiron 半醌自由基”的自旋加合物,比较稳定,可在室温下应用电子顺磁共振波谱仪(EPR)进行检测,从而解决了生理条件下水溶液中寿命极其短暂的 $O_2^{\cdot-}$ 的定性和定量问题^[9].EPR自旋捕捉技术要求的实验条件比较严格,而且需要EPR这样昂贵的实验仪器,一般研究者很难具备,限制了其推广和普及.王爱国等^[10]报道, $O_2^{\cdot-}$ 与羟胺反应生成 NO_2^- , NO_2^- 在对-氨基苯磺酸和 α -萘胺作用下生成粉红色的偶氮染料,该溶液在波长530 nm下有显著性吸收值,根据标准曲线可以计算出样品中的 $O_2^{\cdot-}$ 含量.这种羟胺氧化法利用普通的紫外分光光度计即可完成测定.除此之外,植物组织 $O_2^{\cdot-}$ 还可应用特异性荧光探针(Dihydroethidium, DHE)或普通的捕获剂如氯化硝基四氮唑蓝(NBT)进行原位捕获和显色.DHE被活细胞摄入后,在细胞内 $O_2^{\cdot-}$ 作用下脱氢产生溴化乙锭,后者进一步与胞内DNA或RNA结合产生红色荧

2011年9月21日收稿.

^{*} 国家自然科学基金项目(20877032);污染控制与资源化研究国家重点实验室开放基金项目(PCRRF10020);安徽省自然科学基金面上项目(1208085MB17);安徽省高校省级自然科学基金重点项目(KJ2012Z381)资助.

^{**} 通讯联系人, E-mail: chengrunwang@163.com

光. 细胞内 $O_2^{\cdot-}$ 越多, 生成的红色荧光就越强, 反之则较弱. 因此, DHE 可用于检测植物组织细胞内 $O_2^{\cdot-}$ [11]. NBT 显色法的原理是 NBT 与细胞内 $O_2^{\cdot-}$ 反应生成蓝色甲脎的斑点, 可原位显示 $O_2^{\cdot-}$ 的存在, 而且其斑点密度与 $O_2^{\cdot-}$ 含量相关, 是研究植物叶片组织 $O_2^{\cdot-}$ 的常规方法 [12].

本实验以水稻幼苗作为受试植物, 探讨镉诱导下水稻根叶组织 $O_2^{\cdot-}$ 产量的变化, 在此基础上比较 4 种不同检测方法的异同点和可行性, 为准确测定植物组织 $O_2^{\cdot-}$ 提供方法借鉴和参考.

1 材料和方法

1.1 生化试剂

氯化硝基四氮唑蓝(NBT)、SOD 酶标准品购自 Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA); 1,2-二羟基苯-3,5-二磺酸钠(Tiron)购自 Alfa Aesar (英国); Dihydroethidium (DHE) 购自威格拉斯生物技术有限公司(北京); α -萘胺、亚硝酸钠、2-(N-环己氨基)乙磺酸、Tween-20、 NH_4Cl 、 $CdCl_2$ 、对-氨基苯磺酸、叠氮钠、Tris 等购自上海国药化学试剂公司.

1.2 水稻幼苗的培养和污染暴露

水稻种子(*O. sativa*)为“丰乐两优六号”, 购自淮南种子公司. 种子用 0.1% 次氯酸钠溶液消毒后, 自来水浸泡 48 h, 然后转移至石英砂表面继续催芽, 种子发芽后补充适量 Hoagland 营养液. 幼苗长至高 4 cm 左右时开始染毒. 实验组包括对照组、10、20、30、60、100 $\mu mol \cdot L^{-1}$ $CdCl_2$ (由 Hoagland 营养液稀释 $CdCl_2$ 母液而成), 每个处理组设 3 个平行, 各平行中幼苗数相等. 培养条件为: 15 h 光照, 光照强度 220 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, 26 $^{\circ}C$; 9 h 黑暗, 22 $^{\circ}C$, 湿度 75%—80%, 连续曝气. 染毒 48 h 后立即取样开展下述实验.

1.3 应用顺磁共振波谱法(EPR)捕获和定量根叶组织 $O_2^{\cdot-}$

水稻根叶组织 $O_2^{\cdot-}$ 的 EPR 捕获和定量参照相关文献报道进行 [13-14]. 称取 0.5 g 新鲜水稻根或者叶片, 液氮下速磨成粉末状, 立即在 $O_2^{\cdot-}$ 捕获剂 (50 $mmol \cdot L^{-1}$ 2-(N-环己氨基)乙磺酸, pH 8.6, 10 $mmol \cdot L^{-1}$ 1,2-二羟基苯-3,5-二磺酸钠(Tiron), 0.5% (V/V) Tween-20) 中匀浆. 4 $^{\circ}C$ 和 10000 $\times g$ 条件下离心 15 min. 用注射器针头取适量上清液注入一端封闭的毛细管, 用 EMX 10/12 型 EPR 谱仪 (Bruker 公司) 测定 $O_2^{\cdot-}$ 信号. 检测条件是: 中心磁场 3476 G; 扫描宽度 50 G; 调制频率 100 kHz; 微波功率 20 mW; 调制幅度 1.0 G; 扫描次数 1 次. 获得的信号强度用于表征自由基含量.

1.4 应用羟胺氧化法测定根叶组织 $O_2^{\cdot-}$ 含量

$O_2^{\cdot-}$ 羟胺氧化法参照王爱国等方法进行 [10,15]. 取 1 g 新鲜叶片, 液氮下研磨成粉状, 并立即在提取液 (250 $mmol \cdot L^{-1}$ 磷酸缓冲液, pH 8.0, 含 10 $\mu mol \cdot L^{-1}$ 磷酸吡哆醛, 1 $mmol \cdot L^{-1}$ Na_2EDTA , 5 $mmol \cdot L^{-1}$ DTT) 中匀浆, 4 $^{\circ}C$ 下, 10000 $\times g$ 离心 25 min. 上清液立即用于 $O_2^{\cdot-}$ 的测定. 分别取 1 $mmol \cdot L^{-1}$ NH_4Cl (1 mL) 和 50 $mmol \cdot L^{-1}$ 磷酸缓冲液 (pH 7.8) (0.5 mL), 加入 0.5 mL 粗酶液, 25 $^{\circ}C$ 孵育 60 min. 再分别加入 17 $mmol \cdot L^{-1}$ 对氨基苯磺酸 (1 mL) 和 7 $mmol \cdot L^{-1}$ α -萘胺 (1 mL), 25 $^{\circ}C$ 继续孵育 20 min, 在 530 nm 波长下比色. 以亚硝酸钠作为底物, 按上述方法制备标准曲线, 根据标准曲线换算出 $[NO_2^-]$, 再计算出 $O_2^{\cdot-}$ 的含量, 结果以 $nmol \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$ Pr 表示.

1.5 应用特异性荧光探针捕获根尖组织 $O_2^{\cdot-}$

水稻根尖组织 $O_2^{\cdot-}$ 的荧光检测参照 Yamamoto 等方法 [16] 进行, 略加改进. 剪取染毒后的水稻根尖 (1 cm), 立即浸入 5 $\mu mol \cdot L^{-1}$ DHE (10 $mmol \cdot L^{-1}$ Tris-HCl, pH 7.5 配制), 37 $^{\circ}C$ 避光染色 30 min. 用 10 $mmol \cdot L^{-1}$ Tris-HCl (pH 7.5) 避光洗涤 15 min $\times 2$ 次, 切取 0.5 cm 根尖, 排列于载玻片上, 在荧光显微镜下 (490 nm 激发光和 520 nm 发射光) 拍摄图片. 为检测该探针的特异性, 取 100 $\mu mol \cdot L^{-1}$ $CdCl_2$ 处理组的根尖, 置于 35 $mg \cdot L^{-1}$ SOD 酶溶液中于室温下孵育 30 min, 清洗后转移至 DHE 染液, 后续步骤同上.

1.6 应用 NBT 原位显色法捕获叶片组织 $O_2^{\cdot-}$

叶片组织 $O_2^{\cdot-}$ 的原位显色分析参照 Romero-Puertas 等方法 [12] 进行. 取对照组和 Cd 处理组叶片, 立即浸入 $O_2^{\cdot-}$ 显色液 (0.1% NBT (W/V), 10 $mmol \cdot L^{-1}$ 叠氮钠, 50 $mmol \cdot L^{-1}$ Tris-HCl 缓冲液, pH 6.5), 真空抽滤 2 min, 间歇 3 min, 4 次循环. 取出叶片, 培养箱内光照, 直至深蓝色斑点出现. 再应用 90% 乙醇

煮沸脱色, 拍摄照片. 为验证该方法的可行性, 剪取 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd 处理组叶片, 用 SOD 酶液 ($35\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 同上抽滤, 洗净后转移至 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 显色液, 后续步骤同上.

1.7 数据处理

$\text{O}_2^{\cdot-}$ 信号强度应用 SPSS 13.0 和 Origin 7.5 软件进行数据处理. 应用单因素方差分析法 (one-way ANOVA) 进行显著性分析, $P<0.05$ 表示差异显著, $P<0.01$ 表示差异极显著.

2 结果与讨论

2.1 EPR 自旋捕获法和羟胺氧化法定量 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 结果的比较

$\text{O}_2^{\cdot-}$ 与 Tiron 反应形成稳定的“Tiron 半醌自由基”自旋加合物, 经 EPR 检测, 呈现 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的特征性波谱^[10,16]. 本实验结果表明, 在 $0\text{--}60\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 剂量范围内, 根叶组织 $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Tiron-EPR 的信号强度均随 Cd 剂量的增加而升高; 在 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 剂量组, 该信号强度虽然呈现下降趋势, 但仍然显著高于对照组 (图 1, 图 2A). 羟胺氧化法检测结果也表明, $0\text{--}60\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 外源 Cd 诱导了根叶 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 产量呈现增长趋势 (图 2B), 而 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd 则导致 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的下降. 同时也发现, Tiron 捕获剂本身也出现了较小的 EPR 信号, 这可能是该捕获剂捕获了溶剂中溶解的氧所致^[14]. 在图 2 中, 尽管相同剂量组中根叶之间 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 含量相差程度不同, 但 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的增长趋势相同. 相关性分析结果亦表明, 两种检测方法所得到的叶片组织 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 之间高度相关 ($r=0.988, P<0.01$), 根部 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 之间也高度相关 ($r=0.984, P<0.01$). 因此, 这两种检测方法的结果是一致的, 存在线性关系.

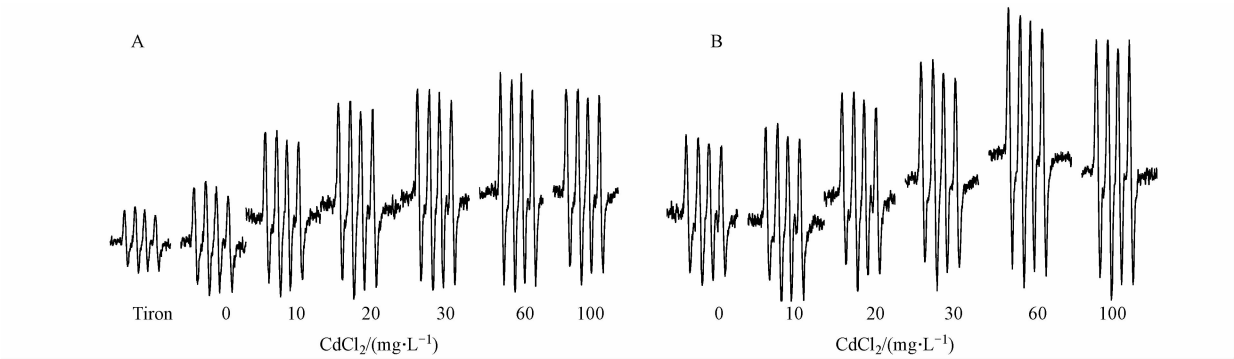


图 1 暴露于梯度 Cd 的水稻叶(A)和根(B)组织 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的 Tiron-EPR 信号

Fig. 1 $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Tiron-EPR signals in leaves (A) and roots (B) of rice seedlings exposed to concentrations of Cd

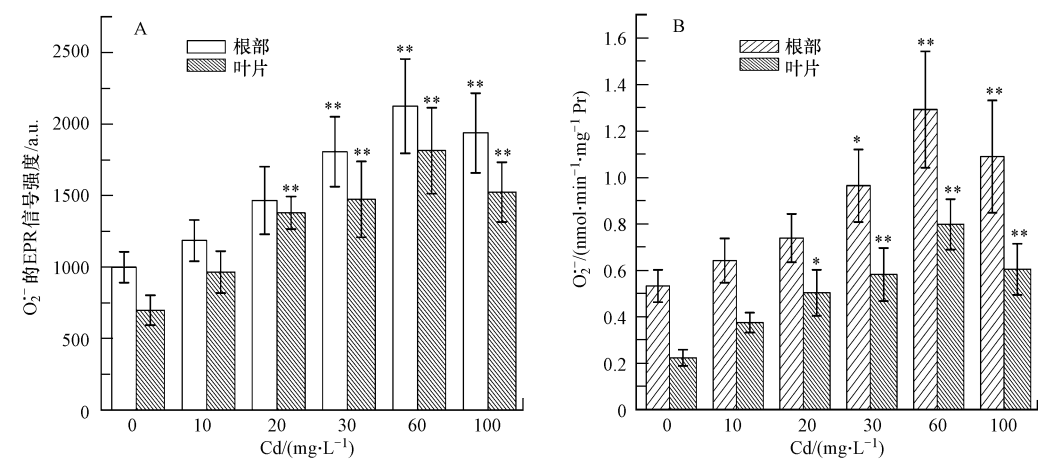


图 2 Tiron-EPR (A) 和羟胺氧化法(B)测定水稻根叶组织 $\text{O}_2^{\cdot-}$

($n=3$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$)

Fig. 2 $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Tiron-EPR signal intensities (A) and hydroxylamine-oxidized $\text{O}_2^{\cdot-}$ production (B) in roots and leaves of rice seedlings exposed to concentrations of Cd

2.2 DHE、NBT 原位显色法与 EPR 自旋捕获法和羟胺氧化法定量 O₂^{·-} 的比较

DHE 可用于检测植物组织细胞内 O₂^{·-} 的产生水平^[11,16]. 由图 3A 可见,在 0—60 mg·L⁻¹ 剂量范围内,DHE 与根尖组织 O₂^{·-} 反应后的荧光强度基本呈现上升趋势,而 100 mg·L⁻¹ 剂量组的荧光强度低于 60 mg·L⁻¹. 同时也发现,根尖组织 O₂^{·-} 的 DHE 荧光强度与根尖组织 O₂^{·-} 的 EPR 信号强度和羟胺氧化法的检测结果也基本一致. 在本实验中,经过 SOD 酶预处理后的 100 mg·L⁻¹ 剂量组的荧光强度明显减弱,证明了根尖组织 DHE 荧光强度与其 O₂^{·-} 产量大小有关.

NBT 原位显色法常用于检测植物组织暴露于污染物后的 O₂^{·-} 变化水平^[12]. 本研究结果表明,叶片上蓝色斑点的密度与叶片 O₂^{·-} 的 EPR 信号强度和羟胺氧化法的检测结果也基本一致(图 3B). 然而,这两种显色方法只能从整体上显示各处理组 O₂^{·-} 信号强度的变化趋势,而不能精确定量.

Cd 等重金属能够通过 ROS 的作用机制介导植物体的氧化胁迫与损伤^[12,17-18]. 本实验结果也证明,20—100 mg·L⁻¹ Cd 诱导了水稻幼苗根叶组织 O₂^{·-} 的显著性升高. 与此同时,本实验所应用的 4 种检测方法均能从不同水平上揭示和反映 Cd 诱导水稻幼苗根叶组织 O₂^{·-} 的产生水平,其中 Tiron-EPR 自旋捕获法为研究植物体暴露于污染物后 O₂^{·-} 的产生、代谢和作用机制提供了一个新的研究平台和手段.

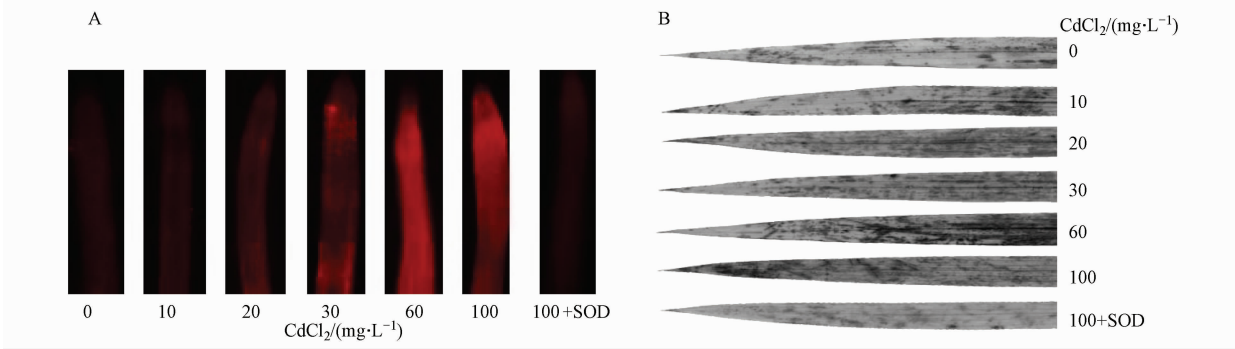


图 3 DHE 荧光探针(A)和 NBT 原位显色法(B)分别检测暴露于梯度 Cd 的水稻根和叶片组织 O₂^{·-} 的结果

Fig. 3 DHE-detected O₂^{·-} in root tips (A) and NBT-visualized O₂^{·-} production in leaves (B) of rice seedlings exposed to concentrations of Cd

2.3 注意事项

在应用 EPR 自旋捕获 O₂^{·-} 的过程中,需要注意如下事宜:在配制 Tiron 捕获剂时,尽量减少捕获剂暴露于空气的机会和时间,试剂配好后宜抽真空,并密封保存. 尽量减少液氮下研磨植物组织和应用捕获剂的匀浆时间,有条件最好在充满氮气的密封箱内研磨和匀浆植物样品. 在应用羟胺氧化法定量植物组织 O₂^{·-} 时,也应该尽量减少研磨、匀浆以及匀浆液暴露于空气的时间,最好应用新鲜提取液及时测定 O₂^{·-} 产物.

在应用 DHE 和 NBT 原位显色法检测植物根叶组织 O₂^{·-} 时,捕获剂最好现配先用,尽量减少暴露于空气的时间. DHE 探针见光易分解,务必避光染色和清洗. NBT 显色后的叶片应置于适宜强度的日光灯下光照一定时间,不宜在阳光下照射. 另外,在取样时,尽量采集生长周期和生长部位一致的叶片或根部组织,降低因生长周期和器官不同对实验结果的影响.

3 结论

应用 EPR 自旋捕获法、羟胺氧化法和 DHE 荧光探针法分别检测了暴露于梯度 Cd 溶液的水稻根尖组织 O₂^{·-} 产物的变化,其结果的变化趋势基本一致. 同时也发现,EPR 自旋捕获法、羟胺氧化法和 NBT 原位显色法检测上述各处理组水稻叶片 O₂^{·-} 的结果也基本一致. 因此,这 4 种方法能够从不同水平检测暴露于污染物的植物幼苗根叶组织 O₂^{·-} 的变化水平. 其中,DHE 荧光探针和 NBT 原位显色结果只能从整体上反映 O₂^{·-} 的变化趋势,不能精确定量 O₂^{·-} 的实际水平,而 EPR 自旋捕获法为研究植物体 O₂^{·-} 的产生、代谢和作用机制提供了一个新的研究平台和手段.

参 考 文 献

- [1] Møller I M, Jensen P H, Hansson A. Oxidative modifications to cellular components in plants [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2007, 58: 459-481
- [2] Foyer C H, Noctor G. Redox sensing and signaling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria [J]. *Physiol Plant*, 2003, 119: 355-364
- [3] Taylor N L, Day D A, Millar A H. Targets of stress-induced oxidative damage in plant mitochondria and their impact on cell carbon/nitrogen metabolism [J]. *J Exp Bot*, 2004, 55: 1-10
- [4] Schützendübel A, Polle A. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization [J]. *J Exp Bot*, 2002, 53: 1351-1365
- [5] Stadtman E R, Levine R L. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins [J]. *Amino Acids*, 2003, 25: 207-218
- [6] Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance [J]. *Trends Plant Sci*, 2002, 7 (9): 405-410
- [7] Vranová E, Inzé D, Breusegem F V. Signal transduction during oxidative stress [J]. *J Exp Bot*, 2002, 53: 1228-1236
- [8] Schraudner M, Moeder W, Wiese C, et al. Ozone-induced oxidative burst in the ozone biomonitor plant, tobacco Bel W3 [J]. *Plant J*, 1998, 16(2): 235-245
- [9] 宋纯鹏, 梅慧生, 吴恩. 植物体内超氧化物自由基($O_2^{\cdot-}$)检测的 EPR 自旋捕捉技术[J]. *植物学通报*, 1991, 8(1): 58-62
- [10] 王爱国, 罗广华. 植物的超氧化物自由基与羟胺反应的定量关系[J]. *植物生理学通讯*, 1990(6): 55-57
- [11] Rodríguez-Serrano M, Romero-Puertas M C, Pazmiño D M, et al. Cellular response of pea plants to cadmium toxicity: cross talk between reactive oxygen species, nitric oxide, and calcium [J]. *Plant Physiol*, 2009, 150: 229-243
- [12] Romero-Puertas M C, Rodríguez-Serrano M, Corpas F J, et al. Cadmium-induced subcellular accumulation of $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 in pea leaves [J]. *Plant Cell Environ*, 2004, 27: 1122-1134
- [13] Lynch D V, Thompson J E. Lipoxygenase-mediated production of superoxide anion in senescing plant tissue [J]. *FEBS Lett*, 1984, 173: 251-254
- [14] Wang C R, Gu X Y, Wang X R, et al. Stress response and potential biomarkers in spinach (*spinacia oleraceae* L.) seedlings exposed to soil lead [J]. *Ecotox Environ Safe*, 2011, 74: 41-47
- [15] Ke D S, Wang A G, Sun G C, et al. The effect of active oxygen on the activity of ACC synthase induced by exogenous IAA [J]. *Acta Bot Sin*, 2002, 44: 551-556
- [16] Yamamoto Y, Kobayashi Y, Devi S R, et al. Oxidative stress triggered by aluminum in plant roots [J]. *Plant Soil*, 2003, 255: 239-243
- [17] Garnier L, Simon-Plas F, Thuleau P, et al. Cadmium affects tobacco cells by a series of three waves of reactive oxygen species that contribute to cytotoxicity [J]. *Plant Cell Environ*, 2006, 29: 1956-1969
- [18] Rodríguez-Serrano M, Romero-Puertas M C, Zabalza A, et al. Cadmium effect on oxidative metabolism of pea (*Pisum sativum* L.) roots. Imaging of reactive oxygen species and nitric oxide accumulation *in vivo* [J]. *Plant Cell Environ*, 2006, 29: 1532-1544

Comparative study on different detection methods of superoxide radicals in plant tissues

WANG Chengrun* HE Mei LI Yueyun JIANG Chuanjun TIAN Liumin WANG Qinying

(School of Life Science, Huainan Normal University, Huainan, 232001, China)

ABSTRACT

Changes of superoxide anion radicals ($O_2^{\cdot-}$) in roots and leaves of rice seedlings exposed to Cd for two days were investigated using electron paramagnetic resonance (EPR) spin trapping technique, hydroxylamine oxidation method, dihydroethidium (DHE) fluorescent probing method as well as nitroblue tetrazolium (NBT) *in situ* localization, respectively. The results showed that $O_2^{\cdot-}$ production increased with the increase of extraneous Cd from 0 to $60\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, followed by a decline hereafter. The four methods showed consistent results in general while the former two methods are more suitable for quantification, and the latter two ones can only show the trend of $O_2^{\cdot-}$ production. Thus, these methods can be used selectively to reveal the change of $O_2^{\cdot-}$ production in plant tissues exposed to environmental pollutants.

Keywords: reactive oxygen species (ROS), electron paramagnetic resonance (EPR), hydroxylamine oxidation method, dihydroethidium (DHE) fluorescent probe, localization *in situ*.