

УДК 577.37

**КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ pH
ПРИ ГЕНЕРАЦИИ ПОТЕНЦИАЛОВ ВОЗБУЖДЕНИЯ
В СТЕБЛЕ ВЫСШЕГО РАСТЕНИЯ МЕТОДОМ СПЕКТРОФЛУОРИМЕТРИИ**

© 2012 г.

Л.А. Катичева, Е.К. Акинчиц, В.А. Воденев

Нижегородский госуниверситет им. Н.И. Лобачевского

kbf@bio.unn.ru

Поступила в редакцию 06.02.2012

Определены количественно изменения pH апопласта стебля высшего растения при генерации переменного потенциала. Для изучения динамики pH был использован pH -чувствительный флуоресцентный зонд FITC-dextran. Регистрацию флуоресценции загруженного зондом растения осуществляли методом спектрофлуориметрии. Показано, что флуоресцентный анализ изменения pH при формировании переменного потенциала имеет ряд преимуществ по сравнению с ранее используемым методом потенциометрии, в частности – отсутствие инерционности и возможность оценки pH в глубинно расположенных слоях клеток.

Ключевые слова: флуоресцентный анализ, переменный потенциал, FITC-dextran, pH .

Введение

В настоящее время одним из наиболее широко применяемых методов изучения структуры и функций биологических объектов является флуоресцентный анализ. Данный метод позволяет неинвазивно и с высоким разрешением визуализировать внутреннюю структуру на клеточном и субклеточном уровнях. При этом регистрация флуоресценции может осуществляться не только с поверхностных, но и с глубинно расположенных слоев. Важным преимуществом метода является также то, что помимо изучения структуры он позволяет исследовать протекающие в организмах физиологические процессы. Все перечисленные преимущества флуоресцентного анализа определяют популярность его применения при проведении эксперимента *in vivo* [1, 2].

Одной из областей применения флуоресцентного анализа является исследование электрических сигналов у живых организмов. Актуальность изучения параметров электрических реакций при этом связана с тем, что именно на их генерации и распространении базируются процессы передачи и обработки информации. В случае животных флуоресцентный анализ сейчас широко применяется в исследованиях процессов, протекающих в нейрональных клетках, в частности, при изучении генерации и передачи электрического сигнала, структуры синапсов и механизмов синаптической передачи, организации ЦНС и др. [1, 3, 4]. При этом широко применяются иончувствительные флуоресцент-

ные зонды, требующие предварительной загрузки в исследуемый объект, или специфические генетически кодируемые биосенсоры – флуоресцентные белки. В то же время применение флуоресцентных зондов или белков для анализа природы электрических реакций у растений осуществлялось лишь в единичных работах [5, 6].

Известно, что электрические реакции у высших растений представлены двумя типами ответов: потенциалом действия (ПД) при повреждающем раздражении и переменным потенциалом (ВП) – при повреждающем. Несмотря на то, что факт их существования открыт достаточно давно, параметры генерации и распространения ПД и ВП остаются малоизученными, что в первую очередь связано с методическими трудностями. Клетки высших растений имеют сравнительно небольшие размеры, интегрированы в сложные структуры тканей и органов и, за счет связывающих их между собой плазмодесм, образуют единую электропроводящую структуру – симпласт [7]. Такие особенности существенно ограничивают применение ряда традиционных методов электрофизиологии, в частности фиксации потенциала. Поэтому особенно актуальным является поиск новых методов исследования, которые можно применить к решению задач в области биоэлектrogenеза растений. Одним из путей преодоления таких методических сложностей в изучении электрических явлений у растений является использование флуоресцентных зондов, позволяющих регистрировать сдвиги ионных концентраций при одновременной регистрации электрической активности [8].

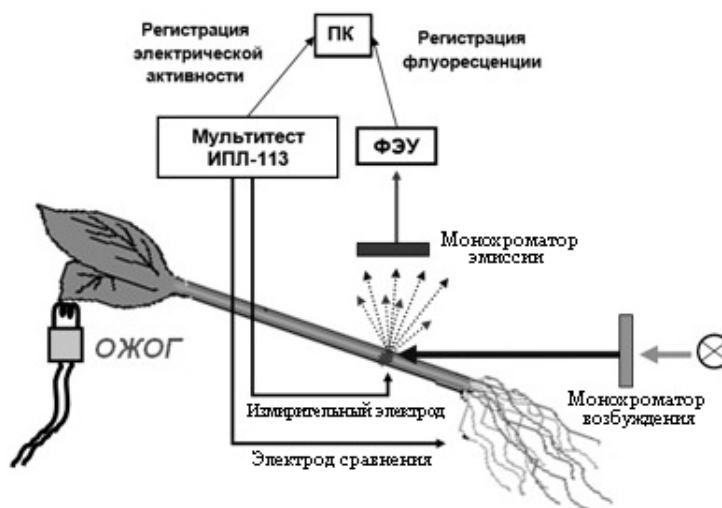


Рис. 1. Схема одновременной регистрации флуоресценции и электрической активности растения при нанесении раздражения (ФЭУ – фотоэлектронный умножитель; ПК – персональный компьютер)

Цель данной работы – изучение механизма генерации переменного потенциала у высшего растения, в частности оценка изменения величины pH с помощью флуоресцентного анализа при генерации ВП в стебле проростков тыквы.

Экспериментальная часть

Исследования проводили на проростках тыквы (*Cucurbita pepo* L.) возраста 15–20 дней. Проростки выращивали в климатической камере KBW-240, Binder, 16-часовой световой период, температура 23°C. В качестве субстрата использовали керамзит; питательным раствором служила 50%-ная среда Хогланда–Арнона [8].

Для регистрации изменений pH был использован pH-чувствительный зонд флуоресцеинизотиоцианат-декстран (FITC-dextran) [9, 10]. Максимумы возбуждения и флуоресценции FITC-dextran составляют 493 и 520 нм соответственно. Увеличение интенсивности флуоресценции ($I_{фл}$) FITC-dextran соответствует сдвигу величины pH в щелочную сторону. Регистрацию флуоресценции зонда осуществляли с помощью спектрофлуориметра SHIMADZU RF-5301 PC. Для изучения зависимости параметров флуоресценции FITC-dextran от его концентрации и от величины pH использовали буферные растворы (Tris-MES, 20 мМ) с различным значением pH (от 4.5 до 8 с шагом 0.5 единицы). В кювету, содержащую 2 мл буферного раствора с определенным значением pH, добавляли 50 мкл раствора FITC-dextran. Конечная концентрация зонда составляла $2 \cdot 10^{-5}$ М и $5 \cdot 10^{-6}$ М.

Для загрузки растения зондом стебли проростков погружали в стандартный раствор, содержащий $5 \cdot 10^{-5}$ М FITC-dextran на 12–18 часов. Предварительно на стебле был удален уча-

сток эпидермиса. Непосредственно перед экспериментом проросток отмывали проточной водой для удаления зонда с поверхности.

Для изучения изменения величины pH при генерации ВП оценивали изменение параметров флуоресценции проростка, загруженного FITC-dextran. Растение располагали в камере спектрофлуориметра, возбуждающий свет падал на участок стебля, диаметр светового пятна составлял приблизительно 1 мм. Регистрацию флуоресценции зонда производили на длине волны 520 нм, соответствующей максимуму флуоресценции зонда. Возбуждение зонда осуществляли на длине волны 475 нм. Выбор длины волны возбуждающего света, отличающейся от максимума, был обусловлен необходимостью снижения доли рассеянного света при регистрации флуоресценции (рис. 1).

Для количественной оценки изменений pH производили последовательное снятие спектров возбуждения FITC-dextran во времени при регистрации флуоресценции от загруженного зондом проростка на длине волны 520 нм. Периодичность снятия спектра составляла 5 секунд.

Электрическую активность регистрировали внеклеточно с помощью Ag/AgCl макроэлектродов ЭВЛ-1М3. Измерительный электрод находился на расстоянии 3–5 мм базипетальной зоны регистрации флуоресценции, электрод сравнения – в корнях. В качестве усилителя использовали ИПЛ-113, соединенный с персональным компьютером. ВП индуцировали повреждающим воздействием в виде ожога семядольного листа с помощью спирали.

Каждая серия экспериментов включала 3–5 измерений. Каждое измерение проводилось на отдельном растении. В результатах представлены типичные записи отдельных измерений.

Результаты и их обсуждение

Ожог семядольного листа вызывает генерацию и распространение ВП (рис. 2). Как видно из рисунка, формирование электрической реакции сопровождается увеличением интенсивности флуоресценции FITC-dextran. Это говорит об изменении величины pH в щелочную сторону. За счет наличия в составе используемого pH -чувствительного зонда молекулы дектрана, он не способен проникнуть через мембрану внутрь клеток растения, а распределяется по апопласту проростка. Избирательная локализация FITC-dextran в апопласте была также предварительно показана нами с помощью метода конфокальной микроскопии [8]. Таким образом, увеличение $I_{фл}$ FITC-dextran указывает на временное повышение pH апопласта, что может быть обусловлено изменением транспорта H^+ через плазмалемму.

Особый интерес представляет количественный анализ изменений pH при формировании электрической реакции. Однако при загрузке зонда в растение его конечную концентрацию определить невозможно, а, следовательно, нельзя использовать абсолютные значения $I_{фл}$ FITC-dextran для количественного определения изменения pH . Для решения данной проблемы традиционно используется ратиометрический метод, основанный на отношении интенсивности флуоресценции на двух длинах волн возбуждающего света. Отношение слабо зависит от изменения концентрации зонда, которое будет однонаправлено влиять на $I_{фл}$ при разных дли-

нах волн возбуждающего света. В случае с FITC-dextran используют отношение $I_{фл}$ на длине волны 520 нм при возбуждении на 493 нм к $I_{фл}$ при возбуждении на 460 нм (I_{493}/I_{460}) [9]. При изучении зависимости данного отношения от pH среды были использованы различные концентрации зонда. Как видно из рис. 3, зависимость отношения интенсивности флуоресценции зонда от pH среды практически идентична при использованных нами концентрациях зонда. Данная зависимость носит линейный характер в диапазоне от 5 до 7 единиц pH .

С помощью ратиометрического метода нами была зарегистрирована величина pH апопласта проростка тыквы в состоянии покоя и при генерации электрической реакции на повреждение. При отсутствии внешнего воздействия величина pH составила 5.80 ± 0.01 . Такие значения pH являются типичными для апопласта растений [11]. Количественный анализ изменения pH при генерации ВП показал, что pH апопласта во время формирования электрической реакции увеличивается на 0.1 единицы pH . Полученные нами результаты согласуются с данными литературы [11], в которых при измерении pH потенциометрическим методом с использованием pH -чувствительных электродов также показано, что генерация ВП сопровождается защелачиванием апопласта.

Подобное изменение величины pH в апопласте может говорить об изменении транспорта протонов через мембрану, вероятнее всего связанного с временным угнетением активности H^+ -АТФазы при генерации ВП [8]. Однако в

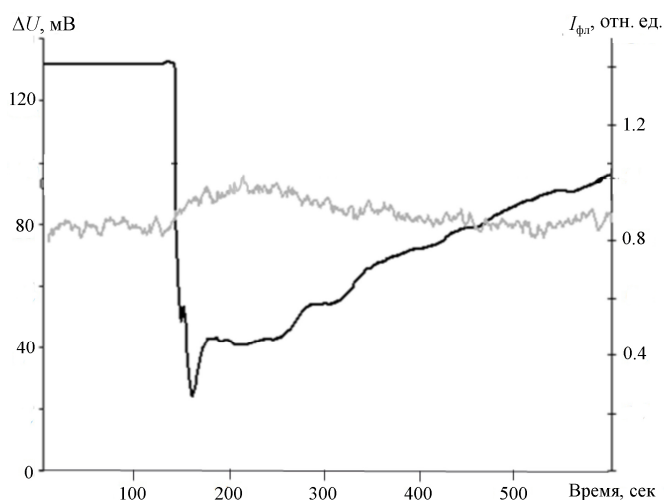


Рис. 2. Изменения интенсивности флуоресценции FITC-dextran ($I_{фл}$) и разности потенциалов (ΔU) электрической активности при генерации ВП

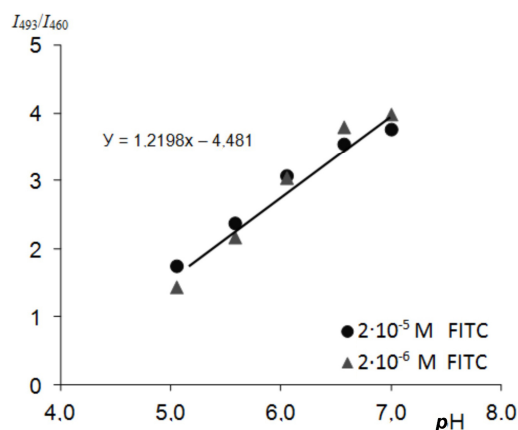


Рис. 3. Зависимость отношения интенсивности флуоресценции при возбуждении светом с длиной волны 493 нм к интенсивности флуоресценции при возбуждении светом с длиной волны 460 нм (I_{493}/I_{460}) от величины pH среды. Регистрация флуоресценции осуществлялась на длине волны 520 нм

некоторых работах подобное изменение величины pH связывают с выходом ионов Cl⁻ из клетки [11]. Выявление природы изменений pH при генерации ВП требует дальнейшего анализа.

Заключение

Таким образом, полученные в настоящей работе результаты указывают на возможность количественной оценки изменения pH при генерации потенциалов возбуждения у высших растений с помощью метода флуоресцентного анализа. Метод флуоресцентного анализа в исследовании электрических сигналов у высших растений не только решает ряд методических трудностей, встречающихся на пути подобного исследования, но и имеет существенные преимущества в сравнении с другими методами, в частности потенциометрическим, среди которых стоит выделить отсутствие инерционности и регистрация изменения pH в глубинно расположенных слоях клеток стебля, а не в омывающем его растворе.

Список литературы

1. Dani A., Huang B. New resolving power for light microscopy: applications to neurobiology // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2010. V. 20. № 5. P. 648–652.
2. Blancaflor E.B., Gilroy S. Plant cell biology in the new millennium: new tools and new insights // *American J. Bot.* 2000. V. 87. P. 1547–1560.
3. Martin J.R. In Vivo brain imaging: fluorescence or bioluminescence, which to choose? // *J. Neurogenet.* 2008. V. 22. № 3. P. 285–307.
4. Fields R.D., O'Donovan M.J. Imaging nervous system activity // *Curr. Protoc. Neurosci.* 2001. Ch. 2. U. 2, 3.
5. Lewis B.D., Karlin-Neumann G., Davis R.W., Spalding E.P. Ca²⁺-activated anion channels and membrane depolarizations induced by blue light and cold in *Arabidopsis* seedlings // *Plant Physiol.* 1997. V. 114. № 4. P. 1327–1334.
6. Fisahn J., Herde O., Willmitzer L., Pena-Cortes H. Analysis of the Transient Increase in Cytosolic Ca²⁺ during the Action Potential of Higher Plants with High Temporal Resolution: Requirement of Ca²⁺ Transients for Induction of Jasmonic Acid Biosynthesis and PINII Gene Expression // *Plant Cell Physiol.* 2004. V. 45. № 4. P. 456–459.
7. Опритов В.А., Пятыхин С.С., Ретивин В.Г. Биоэлектrogenез у высших растений. М.: Наука, 1991. 216 с.
8. Воденев В.А., Акинчиц Е.К., Орлова Л.А., Сухов В.С., Балалаева И.В. Регистрация изменений внеклеточного pH методом конфокальной микроскопии при генерации потенциалов возбуждения у высшего растения // *Цитология.* 2010. V. 52. P. 549–554.
9. Hedrich R., Niemanis S., Savchenko G., et al. Changes in apoplastic pH and membrane potential in leaves in relation to stomatal responses to CO₂, malate, abscisic acid or interruption of water supply // *Planta.* 2001. V. 213. № 4. P. 594–601.
10. Hoffman B., Cosegarten H. FITC-dextran for measuring apoplast pH and apoplastic pH gradients between various cell types in sunflower leaves // *Physiol. Plant.* 1995. V. 95. P. 327–335.
11. Zimmermann M.R., Felle H.H. Dissection of heat-induced systemic signals: superiority of ion fluxes to voltage changes in substomatal cavities // *Planta.* 2009. V. 229. P. 539–547.

QUANTITATION OF PH CHANGES IN A HIGHER PLANT STEM AT GENERATION OF EXCITATION POTENTIALS USING THE SPECTROFLUORIMETRIC METHOD

L.A. Katicheva, E.K. Akinchits, V.A. Vodeneev

Quantitative changes of pH values in higher plant stem apoplast at generation of the variation potential (VP) have been determined. A pH-sensitive fluorescent probe FITC-dextran was used for the analysis of pH dynamics. The registration of fluorescence of FITC-dextran loaded plant was carried out by the spectrofluorimetric method. It is shown that the fluorescence analysis of pH changes at VP generation has a number of advantages over potentiometric methods, in particular, the lack of inertia and the possibility of pH estimation in deep cell layers.

Keywords: fluorescence analysis, variation potential, FITC-dextran, pH.