

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.21.044

细胞内 pH 值测定方法的研究进展*

张思佳 段小红[△] 焦 阳 周 密

(第四军医大学口腔医学院口腔生物学教研室 陕西 西安 710032)

摘要:很多细胞的活动都对 pH 的变化十分敏感。pH 值的有效控制对维持正常的细胞生理活动十分重要。如何有效监测细胞内 pH 值是很多细胞生物学的重要研究内容之一,如在研究细胞内转运蛋白、Ca²⁺ 离子等的变化活动时均需要测定细胞内的 pH 值,其相关的研究已有 100 多年的历史。本文将介绍目前几种细胞内 pH 值的主要测定方法,包括:弱酸弱碱分布法、核磁共振法、微电极法、荧光探针法等;每一种方法将从相关方法、技术的原理、特点、应用、局限性和注意事项等着手,将各个方法的优缺点进行横向的比较。本文还将重点探讨免疫探针法的最新进展,将报道一种最新的基于碳纳米点技术和荧光染料结合的 pH 定量测定计,还将介绍 SNARF 的两种最新衍生染料 SNARF-F 和 SNARF-Cl 的性能及其应用。

关键词:细胞内 pH 值;荧光探针

中图分类号:Q-33;Q75;Q813 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)21-4164-04

Recent Progress in the Measurements of Intracellular pH*

ZHANG Si-jia, DUAN Xiao-hong[△], JIAO Yang, ZHOU Mi

(Department of Oral Biology, School of Stomatology, The Fourth Military Medical University, Shaanxi, Xi'an 710032, China)

ABSTRACT: Most cellular activities are sensitive to pH. It is important to keep a suitable pH for the normal cellular activities. Measurement of cytosolic pH is of interest in studying many processes, including transport proteins, Ca²⁺-related proteins, the correlational studies have begun more than a hundred years ago. There are many methods that have been used to determine intracellular pH, include pH-sensitive microelectrodes, nuclear magnetic resonance, and pH-sensitive fluorescent proteins. Here we review the technologies, characteristics, applications, limitations and precautions of each approach, and make a horizontal comparison of the advantages and disadvantages of each method. This review will also focus on providing the latest use of pH-sensitive fluorescent dyes to measure intracellular pH. We will report a new quantitative measurement of the pH based on combination of carbon nanotubes point technology and fluorescent dye. We will also introduce the performance and application of two latest SNARF derivative dyes, SNARF-F and SNARF-Cl.

Key words: Intracellular pH; Fluorescent probe

Chinese Library Classification: Q-33; Q75; Q813 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)21-4164-04

前言

细胞内的大多数活动都是 pH 敏感的,包括细胞体积调节、囊泡运输、细胞极化、纤维收缩以及支架的建立^[1-5]。细胞内 pH 的改变会影响细胞内的信号传递分子如 Ca²⁺、cAMP 的活动,并因此影响细胞内信号的传导^[6]。一百多年前就已经开始了对于细胞内 pH 值的测定方法的研究,各种方法也不断地改进和发展。细胞内 pH 值的测定方法主要有弱酸弱碱分布法、核磁共振法、微电极法,以及目前广泛应用的免疫荧光探针法等,本文将针对这些方法作一介绍,并重点介绍近几年免疫荧光法测定细胞内 pH 值的最新进展,以供同行参考。

1 弱酸弱碱分布法

此方法的原理为:弱酸(弱碱)只有在化合物形态时才具有

透膜性;它们并不改变细胞内的 pH 值,其在细胞内代谢也不活泼。弱电解质(通常为放射性示踪剂)在进入细胞后,经过长时间的交换和移动,最终在细胞内外达到分布平衡^[7]。

其一般测定步骤为:先用弱酸(弱碱)对细胞做一定时间的预处理,再用不含弱酸(弱碱)的培养液对细胞清洗数分钟,之后测定放射性强度,并参照之前测得的细胞体积,算得弱酸(弱碱)共轭酸碱对的浓度,再根据细胞外 pH 值和所使用的弱电解质的解离常数计算出细胞内 pH^[8]。

常用的弱酸有 DMO (5,5-dimethyl-oxazolidine dione)、丁酸(butyric acid),弱碱有甲胺(methylamine, MeA)、苄胺(benzylamine, BA)、烟碱(nicotine, Nic)等。

此法操作简单,分辨率适中,可以达到 0.1-0.2 个 pH 单位。同时,该方法可应用于体积较小的细胞。所需材料少,0.1-1 g 鲜重的细胞量即可满足测定需求。此法的不足之处在于实验所

* 基金项目:国家自然科学基金项目(31070835;81070819;81271116)

作者简介:张思佳(1990-),男,口腔医学专业八年制博士生,电话:15829685368, E-mail: zhangsijia111@gmail.com

△ 通讯作者:段小红, E-mail: xhduan@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2013-04-08 接受日期:2013-04-30)

需时间较长,并且该方法不能直接测定细胞内 pH 值的短期变化。弱酸(如 DMO)还会因为被细胞分解而使测定结果偏高。此外,这是一种创伤较大的方法,阻止结构的破坏会使细胞内 pH 值发生变化^[9]。

2 核磁共振法

核磁共振法多采用 ^{31}P NMR、 ^{19}F NMR 和 ^1H NMR 等^[10,11]。但对细胞内 pH 值的测定更多采用的是 ^{31}P NMR 技术^[1,12,13]。

其基本原理在于:在施加强磁场后,细胞内的无机磷库, ^{31}P 频谱发生依赖于 pH 值变化的化学位移;参考标准参数值绘制标准曲线^[14]。

其一般步骤为:先将待测细胞离心,之后混入高氯酸,提取上清液以检测细胞内的无机磷含量;加入碳酸氢钾,将溶液 pH 值调至中性备用,实验中再根据要求调至不同的 pH 值;分别取上清液于 NMR 专用管中以备测定,用 ^{31}P 的 NMR 分别测得在不同 pH 值条件下 Pi 峰的化学位移和相对应的活体细胞内 Pi 峰的化学位移;参照标准曲线得到细胞内 pH 值。如核磁共振谱清晰度不够时可适当降低细胞培养液中锰离子浓度^[15]。

核磁共振法测定细胞内 pH 值具有以下优势:易于观察组织细胞内 pH 值的异质性;对细胞无损伤(忽略放射性元素的影响),可避免因细胞内部的新陈代谢影响以及由此产生的对于测定结果的影响;这种方法还可检测细胞内糖酵解途径的活性和细胞能态(energy status)等方面的信息^[14],还可获得细胞内 ATP、磷酸肌酸、磷酸单酯、双磷酸双酯、磷酸双酯等多种含磷化合物的信息^[16]。其灵敏度可以达到 0.06 个 pH 单位^[17]。

此法的主要局限性在于:时间分辨率较低,需要长时间维持细胞稳定生理状态;细胞敏感性低,需要较高的细胞浓度;当细胞内 pH 值偏碱性时会对测定结果的准确性产生较大影响^[18]。因此,此法在研究细胞群体或器官部分的 pH 值变化时较为适宜。

3 微电极法

目前微电极法主要有玻璃电极、金属电极和液膜微电极 3 种。微电极主要是由 H^+ 离子交换载体构成,用于测量电极插入部位的 H^+ 离子电动势。其中 H^+ 选择性液膜微电极的性能较好,现已广泛使用。微电极的直径小于 1 m,穿过细胞膜达到细胞质^[19]。

微电极可由 2 根微电极或 1 根双腔微电极组成,其中一个为 pH 值敏感电极,另一个为参比电极。在测定胞内 pH 值时,先将微电极插入待测细胞,然后读取两电极间的电位差数值,再参考标准值曲线绘制所测 pH 值的线性函数^[20]。

微电极法检测细胞内 pH 的特征包括:具有较高的时间分辨率,能够持续记录细胞内 pH 值变化,适合各种条件下使用;具有较高精确度且很容易校准,其测定 pH 值可精确到 0.02-0.05 个 pH 单位;该方法在测定细胞内 pH 值的同时还可测定细胞膜电位。所以,在需要持续记录或研究 pH 值的瞬时变化时采用微电极较优,其适合实验室的日常常规使用^[21]。

微电极法不足之处在于:技术操作难度大;待测细胞的直径一般需要超过 50 m^[14]。所以,该方法在操作时需考虑待测细胞的胞径。

与此同时,在此方法的基础上进而衍生出了细胞液提取

法,原理为使用玻璃微电极测定提取细胞液的 pH 值。此法主要用于细胞较多时 pH 值的测定。此方法操作简单,需将待测细胞磨压碾碎,所以导致最终抽提的细胞上清液中可能混有其它成分,从而带来较大的误差。

4 荧光探针法

荧光探针技术经过不断的发展,目前已经比较成熟,在测定细胞内 pH 值中被广泛使用。这种方法能够给出细胞内 pH 值的二维甚至于三维地图,其精度值达到 0.01 个 pH 单位、200 nm 的空间精确度和毫秒级的时间精确度^[22]。

这项技术的基本原理是:细胞能够荷载上荧光染料,并且荧光随着 pH 的变化而变化。荧光素分子能够吸收一定波长的光子并跃迁入激发态,之后能量会以较长波长的光发散出来。

近年来,出现了很多关于采用 pH 值敏感的荧光染料测定细胞内 pH 值的研究报道。pH 值荧光染料有很多种,每种染料又有不同的工作 pH 区间(见表 1),广泛采用的有 2',7'-bis(carboxyethyl)-5-(6)-Carboxyfluorescein 2',7'-二(羧乙基)-5(6)-羧基荧光黄(BCECF)和 Carboxy seminaphthorhodafluor 羧化半萘罗丹明类荧光探针(carboxy SNARF-1)。

BCECF(见图 1)^[23]是一种近乎理想的细胞内 pH 值测定染料,因为它 6.98 的 pKa 值和 6.0-8.0 的 pH 工作区间使其可以满足大多数的细胞。此方法的原理是:BCECF-AM 是一种亲脂性的非荧光分子,其首先通过扩散进入细胞;之后,AM 基团在细胞内酯酶的帮助下发生水解,生成荧光亲水性的 BCECF 分子,其荧光强度是和细胞内的 pH 值变化相关的;最后,采用特定的仪器,如激光共聚焦显微镜或流式细胞仪,用于检测细胞内的荧光强度^[24,25],再参照不同厂家给出的校准曲线,得出被测细胞内的 pH 值。该方法使用时需注意,根据被测材料的不同,应相应调整荧光染料的浓度、实验温度和实验时间^[26]。该方法不受细胞浓度和细胞大小的限制,操作相对简单,能够实时监测细胞内 pH 值变化,具有较高的时间分辨率,可以同时测定细胞内多个位点的 pH 值,并且重复性较好。所以,该方法已经得到了大范围使用^[23,24,27-29]。

但该方法仍存在需要改进的地方。首先,该方法不能用于细胞膜电位的测定。并且,因游离的 BCECF 分子具有较高的亲电性,其与细胞内其他的分子发生螯合,如转运蛋白 Ca-AT-Pase,使得荧光光谱偏移,进而引起测得的 pH_i 产生系统误差。而离子载体尼日利亚菌素(nigericin)细胞内反应性低,现已用于活体校准^[1]。然而,尼日利亚菌素只能使细胞内外 pH 值达到一个相对的平衡,这个平衡并不稳定,pH_i 很难被维持在一个稳定的水平,进而导致系统误差。与此同时,染料与细胞分子的螯合反应还会改变细胞的原本结构,增加染料损失,处理不慎还可能污染细胞。所以,在离体校准时应尽量接近细胞内环境^[14]。

有研究表明,与 BCECF 相比,SNARF 性能较好。因与 SNARF 相比较,BCECF 在细胞质中更易螯合,增加了染料的浪费、同时增大了实验误差^[25,30]。目前,有研究报道 SNARF 的两种衍生染料 SNARF-F 和 SNARF-Cl,其在实验中显示出典型的吸收和荧光红移,并与传统 SNARF 相比具有更高的细胞透性,并且 SNARF 方法中典型的 pH 相关的双发射特性得到了保留。SNARF-F 的低 pKa(7.38)使其更加适合对细胞内 pH

值的测定^[31]。与此同时,显微技术与荧光的结合可以更高精度得测定细胞内的 pH 值^[25]。

因对于实验精度的更高要求,荧光染料的研究仍在不断的发展^[32]。目前,有报道一种基于碳纳米点技术和荧光染料结合的 pH 定量测定计。碳纳米传感器配以两种荧光染料,其显示出很好的生物相容性和细胞扩散性,并已经完成了在海拉细胞和氧化应激状态下的实验^[33]。随着纳米技术的进展,一种光诱导电子转移技术的 pH 纳米传感器已经可以用于细胞器内的 pH 值的测定,但其 pH 值的测定仍是使用共聚焦荧光显微镜和光谱学的分析^[34]。

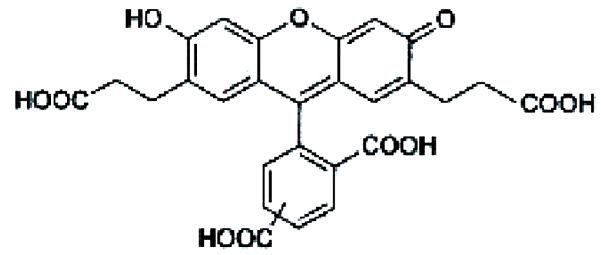


图 1 BCECF 分子结构

Fig.1 Structure of the molecule: BCECF

表 1 细胞内酸碱指示剂和其应用范围

Table 1 Intracellular pH indicator and its application range

荧光指示剂 (fluorescence indicator)	工作 pH 范围 (Working range)
SNAFL	7.2-8.2
SNARF	7.0-8.0
HPTS (pyranine)	7.0-8.0
BCECF	6.0-8.0
Oregon green dyes	4.2-5.7
Rhodols (包括 NERF)	4.0-6.0
LysoSensor probes	3.5-8.0*
pH-sensitive GFP mutants	5.1-8.1

5 总结

NMR 基本上是最少侵入细胞的方法,但其对 pH 值测定的低敏感度和技术步骤上的复杂,限制了它的应用;微电极法可以同时测定 H^+ 离子和 H^+ 相关离子的变化,但它对细胞具有侵入性,同时,它对实验细胞的大小也有一定的要求^[1,35]。荧光染料法相比于前三种方法,可以测定数个细胞或大量细胞的 pH 值,与此同时,它也可以用来测定细胞内其他离子的活动情况^[1]。

参考文献(References)

- [1] Loiselle F, Casey J. Measurement of Intracellular pH [M]. Membrane Transporters in Drug Discovery and Development: Humana Press, 2010
- [2] Busa WB, Nuccitelli R. Metabolic regulation via intracellular pH[J]. The American journal of physiology, 1984, 246(4 Pt 2): R409-438
- [3] M Ritter, E Wall, D Haussinger, et al. Effects of bradykinin on cell volume and intracellular pH in NIH 3 T 3 fibroblasts expressing the ras oncogene[J]. FEBS letters, 1992, 307(3): 367-370
- [4] Edmonds BT, Murray J, Condeelis J. pH regulation of the F-actin binding properties of Dictyostelium elongation factor 1 alpha [J]. The Journal of biological chemistry, 1995, 270(25): 15222-15230
- [5] W Hao, Z Luo, L Zheng, et al. AP 180 and AP-2 interact directly in a complex that cooperatively assembles clathrin[J]. The Journal of biological chemistry, 1999, 274(32): 22785-22794
- [6] Tracey Speake, Austin C. Elliott. Modulation of calcium signals by intracellular pH in isolated rat pancreatic acinar cells [J]. The Journal of physiology, 1998, 506(2): 415-430
- [7] AK, J J. Intracellular pH: measurement and importance in cell activity [J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1989, 40: 271-303
- [8] Spanswick R M, Miller A G. Measurement of the Cytoplasmic pH in Nitella translucens: Comparison of Values Obtained by Microelectrode and Weak Acid Methods [J]. Plant physiology, 1977, 59(4): 664-666
- [9] K Miyao. The measurement of intracellular pH by DMO method and the buffering capacity of the tissue after acid infusion [J]. Nihon seirigaku zasshi . Journal of the Physiological Society of Japan, 1967, 29 (1):18-28
- [10] Harper JL, Smith RAJ, Bedford JJ, et al. Synthesis, acidity and ^{19}F NMR characteristics of imidazoles bearing 1-fluorinated substituents with potential application as probes for intracellular pH determination [J]. Tetrahedron, 1997, 53(24): 8211-8224
- [11] Gil S, Zaderenzo P, Cruz F, et al. Imidazol-1-ylalkanoic acids as extrinsic 1H NMR probes for the determination of intracellular pH, extracellular pH and cell volume[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 1994, 2(5): 305-314
- [12] Kintner DB, Anderson MK, Fitzpatrick JH Jr, et al. sup ^{31}P -MRS-Based Determination of Brain Intracellular and Interstitial pH: Its Application to In Vivo H^+ Compartmentation and Cellular Regulation during Hypoxic/Ischemic Conditions [J]. Neurochemical Research, 2000, 25(9/10):1385-1396
- [13] V V Kupriyanov, B Xiang, J Sun, et al. Effects of regional hypoxia and acidosis on Rb (+) uptake and energetics in isolated pig hearts: (87) Rb MRI and (31) P MR spectroscopic study [J]. Biochimica et biophysica acta, 2002, 1586(1): 57-70
- [14] CJ S. Measurement of intracellular pH: comparison between ion-sensitive microelectrodes and fluorescent dyes. In: Egginton S, Taylor EW, Raven JA (eds). Regulation of Tissue pH in Plants and Animals:

- A Reappraisal of Current Techniques [M]. Cambridge, New York: Cambridge University Press, 1999
- [15] Hesse SJ, Ruijter GJ, Dijkema C, et al. Measurement of intracellular (compartmental) pH by ^{31}P NMR in *Aspergillus niger* [J]. Journal of biotechnology, 2000, 77(1): 5-15
- [16] Martin J-B, Foray M-F, Klein G, et al. Identification of inositol hexaphosphate in ^{31}P -NMR spectra of *Dictyostelium discoideum* amoebae. Relevance to intracellular pH determination[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 1987, 931(1): 16-25
- [17] Qiao Juan, Huang Rong-qing, Xiao Bing-kun, et al. Determination of Intracellular pH in cos-7 Cells by Using Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2005, 9: 1298-1300
- [18] Y Seo, M Murakami, H Watari, et al. Intracellular pH determination by a ^{31}P -NMR technique. The second dissociation constant of phosphoric acid in a biological system [J]. Journal of biochemistry, 1983, 94(3): 729-734
- [19] P. Y. D. Wong, S. J. Huang. Intracellular pH measurement in primary monolayer cultures of rat epididymal cells [J]. Pflügers Archiv European journal of physiology, 1989, 413(4): 414-421
- [20] Zhang Zu-xun. Ultramicroelectrode Voltammetry[M]. Science Press. 2000
- [21] Y N Antoneko, A A Bulychev. Measurements of local pH changes near bilayer lipid membrane by means of a pH microelectrode and a protonophore-dependent membrane potential. Comparison of the methods[J]. Biochimica et biophysica acta, 1991, 1070 (1): 279-282
- [22] Slavik J. Applications of fluorescent probes in cellular biology - Measurement of intracellular pH[J]. J Lumin, 1997, 72(4): 575-577
- [23] Rochon Philippe, Jourdain Merc  , Mangalaboyi Jacques, et al. Evaluation of BCECF fluorescence ratio imaging to properly measure gastric intramucosal pH variations in vivo [J]. Journal of biomedical optics, 2007, 12(6): 064014
- [24] Franck P, Petitpain N, Cherlet M, et al. Measurement of intracellular pH in cultured cells by flow cytometry with BCECF-AM [J]. Journal of biotechnology, 1996, 46(3): 187-195
- [25] Molich A, Heisler N. Determination of pH by microfluorometry: intracellular and interstitial pH regulation in developing early-stage fish embryos (*Danio rerio*)[J]. The Journal of experimental biology, 2005, 208(Pt 21): 4137-4149
- [26] Boens No I, Qin Wenwu, Basari Nikola, et al. Photophysics of the fluorescent pH indicator BCECF [J]. The journal of physical chemistry, 2006, 110(30): 9334-9343
- [27] Liang Earvin, Liu Puchun, Dinh Steven. Use of a pH-sensitive fluorescent probe for measuring intracellular pH of Caco-2 cells[J]. International journal of pharmaceutics, 2007, 338(1-2):104-109
- [28] Pinar Ozkan, Raj Mutharasan. A rapid method for measuring intracellular pH using BCECF-AM [J]. Biochimica et biophysica acta, 2002, 1572(1):143-148
- [29] Alvarez-Leefmans Francisco J, Herrera-Pérez José J, Márquez Martín S, et al. Simultaneous measurement of water volume and pH in single cells using BCECF and fluorescence imaging microscopy[J]. Biophysical journal, 2006, 91(2): 608-618
- [30] Li Bing-Bing, Gao Zhi-Hui, Zhou Xiao-Yan, et al. A confocal technique applicable to studies of cellular pH-related signaling in plants [J]. Journal of integrative plant biology, 2008, 50(6): 682-690
- [31] Nakata Eiji, Nazumi Yoshihiro, Yukimachi Yoshihiro, et al. Synthesis and photophysical properties of new SNARF derivatives as dual emission pH sensors [J]. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 2011, 21(6): 1663-1666
- [32] Yapici Nazmiye B, Mandalapu Srinivas Rao, Chew Teng-Leong, et al. Determination of intracellular pH using sensitive, clickable fluorescent probes[J]. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 2012, 22 (7): 2440-2443
- [33] Shi Wen, Li Xiao-hua, Ma Hui-min. A tunable ratiometric pH sensor based on carbon nanodots for the quantitative measurement of the intracellular pH of whole cells [J]. Angewandte Chemie (International ed. in English), 2012, 51(26): 6432-6435
- [34] María J Marín, Francisco Galindo, Paul Thomas, et al. Localized Intracellular pH Measurement Using a Ratiometric Photoinduced Electron-Transfer-Based Nanosensor [J]. Angewandte Chemie (International ed. in English), 2012, 51(38): 9657-9661
- [35] Wray. S. Smooth muscle intracellular pH: measurement, regulation, and function [J]. American journal of physiology, Cell physiology, 1988, 254(2): C213-225