

## 保卫细胞液泡内 pH 调节的可逆解聚聚集体性质初探

李艳霞 孙鹏 朱果利

(中国农业大学生物学院,北京 100094)

**摘要** 为研究保卫细胞液泡(GCV)的 pH 在气孔保卫细胞渗透调节中的作用及蚕豆(*Vicia faba*)叶片气孔 GCV 中的颗粒物的性质,本实验采用激光共聚焦显微术配合 pH 荧光探针 BCECF AM 的荧光比值法对 ABA 诱导的气孔关闭过程进行观测,发现:蚕豆气孔关闭过程中 GCV 的 pH 升高约 0.5(pH5.3-5.8)。分别用 pH5.3 和 5.8 的 Mes/Tris 缓冲液调控离体开放态 GCV 的 pH,透射电镜( $4 \times 10^4$  倍)观察负染片说明:pH 5.3 对开放态 GCV 液所含颗粒物的线度及分布密度无实质影响;而 pH 5.8 的处理使取自开放态 GCV 液所含颗粒物的线度明显增大、分布密度显著减小;非特异性蛋白酶 Proteinase K 处理可使 GCV 中的颗粒物消失。基于 GCV 内颗粒物的线度、形状及对 pH 调控和对 Proteinase K 处理的响应,推测此种颗粒物是蛋白质。

**关键词** 保卫细胞;液泡内含颗粒物;气孔运动;pH

中图分类号 Q 94

文章编号 1007-4333(2005)05-0010-05

文献标识码 A

### Study on the property of granules that reversible disaggregate regulated by pH in guard cell vacuoles

Li Yanxia, Sun Peng, Zhu Guoli

(College of Biological Science, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

**Abstract** The ratio method of dual fluorescent emissions of chemical pH probe BCECF AM with single excitement under laser scanning confocal microscopy showed that there was a basification about 0.5 units of pH in the vacuoles of guard cells during stomatal closure that induced by ABA (open: pH 5.3, closed: pH 5.8). The pH of ectocytic saps of guard cell vacuoles were regulated by buffer of Mes/Tris at pH 5.3 or 5.8 respectively. The observations under electron microscope to negatively stained saps of guard cell vacuoles showed there was almost no effect of pH 5.3 to the dimension and distribution density of the particles from guard cell vacuoles of open stomata. However, pH 5.8 induced obvious increases in the dimension and distinct decreases in the distribution density of the particles from guard cell vacuoles of open stomata. The non-specific proteinase K could make a disappearance of the particles from the vacuoles of an open stomata. Basing on all of the above findings, We suppose that the particles from the vacuoles of an open stomata are protein.

**Key words** guard cells; granules in vacuole sap; stomatal movement; pH

气孔运动控制着绿色植物的蒸腾和光合作用 2 个重要生理过程。近百年来,气孔运动机理的研究一直是植物生理学研究的热点<sup>[1-3]</sup>。目前,被广泛接受的气孔运动机理是化学渗透调节假说(chemiosmotic hypothesis),由 Mitchell 首先提出<sup>[4]</sup>,用于解释线粒体和微生物中的氧化磷酸化及叶绿体

中的光合磷酸化过程:由于线粒体嵴和叶绿体类囊体膜上的 H<sup>+</sup> 泵的活动产生了跨膜质子梯度 H<sup>+</sup>, ATP 合成与 H<sup>+</sup> 趋动的 H<sup>+</sup> 跨膜运动相耦联。Zeiger 等<sup>[1]</sup>将该原理应用于气孔运动研究,建立了气孔运动的保卫细胞液泡膨压变化的化学渗透假说,认为在诱导气孔开放因子的作用下(如光照、低

收稿日期:2005-02-02

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39870075,39600090)

作者简介:李艳霞,硕士研究生;朱果利,副教授,通讯作者,主要从事植物细胞生长与运动研究,E-mail:glzhu@mail.cau.edu.cn

CO<sub>2</sub>等),保卫细胞(GC)质膜上的质子泵被激活,将胞内质子泵出,使质膜处于超极化状态。GC质体外钾离子在超极化质膜电势的作用下通过内向钾离子通道进入GC。同时,在超极化质膜电势的推动下质体外中的氯离子通过同向共运输载体进入GC。该假说虽已被广泛接受,但仍存在一些问题如:1)钾库问题。目前普遍的观点是与GC相邻的胞壁中不足以存放能通过化学渗透机制引起气孔运动的K<sup>+</sup>,因而认为该钾库可能是与GC相邻的表皮细胞的液泡;但是当受到使气孔开放的诱导条件作用时,GC内质子泵出,使GC质膜处于超极化状态的同时也使与GC相邻的表皮细胞的质膜发生超极化反应。因此,从热力学的角度来考虑,胞壁中的钾离子倾向于同时进入GC和相邻的表皮细胞,而不是由相邻表皮细胞的液泡进入GC;因而寻找支持化学渗透假说的钾库仍是一项艰巨的工作。2)从化学渗透假说估计的引起气孔运动的跨GC膜的离子流过大,以及化学渗透假说不能合理解释气孔关闭过程等<sup>[2,3,5]</sup>。

本课题组发现蚕豆叶片气孔保卫细胞液泡(GCV)中有若干种颗粒物,分布密度在气孔运动过程中发生可逆变化,该分布密度的可逆变化与推动蚕豆叶气孔运动的GC渗透压的变化方向一致,据此笔者提出了“GCV渗透调节的高聚颗粒物可逆解聚模型”<sup>[5]</sup>,该模型为气孔保卫细胞液泡的渗透调节的多条途经假说提供了新证据<sup>[6]</sup>。目前关于GCV中颗粒物性质与功能的研究在以上工作之外尚无相关的报道。本实验旨在继续探讨GCV pH在气孔保卫细胞渗透调节的信号链中的作用及蚕豆GCV中颗粒物的性质。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

清洗消毒后的蚕豆(*Vicia faba* L.)种子浸种12 h,25℃催芽2~3 d,播种于人造土壤(草碳土与蛭石体积比为2:1)中。使用“土壤水势自动反馈控制滴灌滴头”将土壤水势控制在-0.023~0.002 MPa;生长室中每天光照12 h,早8:00—20:00;光子亮照度(PAR)约为200 μmol/(m<sup>2</sup>·s),金属卤化物灯;昼夜温度23.2/16.2℃;相对湿度50%。3~4周龄的蚕豆苗供实验用。

### 1.2 荧光染料 BCECF AM 的孵育及气孔关闭过程中 GCV 内 pH 的跟踪测定

3~4周龄植株蚕豆叶片,充分光照使气孔开

放,选取生长良好、完全展开的第3、4对(从下端数起)叶片,撕取下表皮置于缓冲液中(10 mmol Mes/Tris,pH 6.1),用毛笔刷去叶肉细胞,向该缓冲液加入 BCECF AM,使其最终浓度为20 μmol/L。室温避光孵育30 min,将具有众多开放态气孔的表皮条置于直径3 cm的薄底小培养皿中,向培养皿中加入ABA诱导气孔关闭(ABA处理浓度10<sup>-5</sup> mol/L,处理30 min左右)。在激光共聚焦显微镜(FluoroView300,Olympus)下,用488 nm光激发,记录气孔关闭过程中保卫细胞液泡内的发射荧光比值(520 nm/640 nm,使pH敏感和不敏感的波长比值),与标准曲线<sup>[7,9]</sup>相比较,求出气孔关闭过程GCV中pH的变化。

### 1.3 GCV 的染色

表皮材料在缓冲液(10 mmol Mes/Tris,pH 6.1)中用毛笔刷去叶肉细胞,用0.03%中性红溶液染色1~2 min。染色效果以在光镜(Olympus BX-FLA,目镜×10,物镜50×/0.50)的自然透射光下明显观察到GCV的形态为宜。

### 1.4 离体 GCV 内含颗粒物形态及分布密度的 pH 调控

在显微操作系统 Narishge ONM-1 的协助下用充满硅油的玻璃毛细针管吸取GCV液,然后适当加压将GCV液挤出并展铺在包被有聚乙烯甲醛(Formvar)膜的铜网上。该铜网倒扣在1滴10 mmol Mes/Tris缓冲液上(pH 5.3~5.8)4 min,进行常规电镜负染及观测。

### 1.5 负染与电镜观察

采用 Smith<sup>[10]</sup>方法:将载有来自1.4处理的样品的铜网倒扣在1滴1%(体积分数)的醋酸铀中染色1 min,用滤纸从铜网的边沿吸去染液,重复3次后将铜网放入干燥器中。用透射电镜(Hitachi H-7500)观察样品,放大倍数4×10<sup>4</sup>。

### 1.6 GCV 内含颗粒物对蛋白酶 K (Protease K) 处理的反应

负染前将载有来自1.4处理的样品的铜网倒扣于1滴蛋白酶K溶液上(2 mg/mL,溶剂为10 mmol Mes/Tris,pH 6.1)。用不含蛋白酶K的缓冲液作对照。样品和对照均于37℃下保温约3.5 h。每隔20 min更换酶液1次,然后取出,吸干酶液,用双蒸水冲洗数次,同法进行负染与电镜观察(见1.4和1.5节)。

## 1.7 GCV内含颗粒物平均线度及分布密度的估计

在电镜观察下 GCV 中可见颗粒物的分布密度用方程(1)估算<sup>[5]</sup>

$$N_s = N_0 / [(S / S_G) \cdot V_m] \quad (1)$$

式中:  $N_s$  为估计的 GCV 内含颗粒物分布密度, 个/L;  $N_0$  为特定面积上测算的颗粒数量;  $S$  为单张电镜照片 ( $4 \times 10^4$  倍) 的面积,  $m^2$ ;  $S_G$  为从 GCV 中取出的液体在 Formvar 包裹的铜网上复盖的总面积,  $m^2$ ;  $V_m$  为毛细管尖中取出的 GCV 液体的容积,  $m^3$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 气孔关闭过程中 GCV pH 的变化

本实验用 pH 荧光探针 (BCECF AM) 的发射荧光比值法揭示了 ABA ( $20 \mu\text{mol/L}$ ,  $10 \text{mmol/L}$

Mes/Tris, pH 6.1) 诱导的蚕豆叶片气孔关闭过程中 GCV pH 的变化。GCV 光切片水平扫过 GCV 的中部, 在所有的切片中 GCV 都显示了较强的 BCECF 的绿色荧光。各时刻 GCV 的 pH 由该时刻发射荧光的比值 ( $520 \text{nm}/640 \text{nm}$ ) 与标准曲线比较而确定。图 1 显示了蚕豆气孔关闭过程中 GCV 的荧光图和相应的透射图以及在同一时间坐标上的 GCV pH 的动力学曲线。在气孔由开到关的过程中 GCV 的 pH 经历了约 0.5 单位的碱化。从 ABA 处理到 GCV 内 pH 开始上升需约 10 min, 而完成这 0.5 单位 pH 的上升需另外 10 min, 总共约 20 min。GCV pH 开始上升前约 7 min 时 488 nm 激发光开始扫描, 每 min 1 次。图 1 显示伴随 GCV pH 的升高, 液泡体积减小, 气孔逐渐关闭。

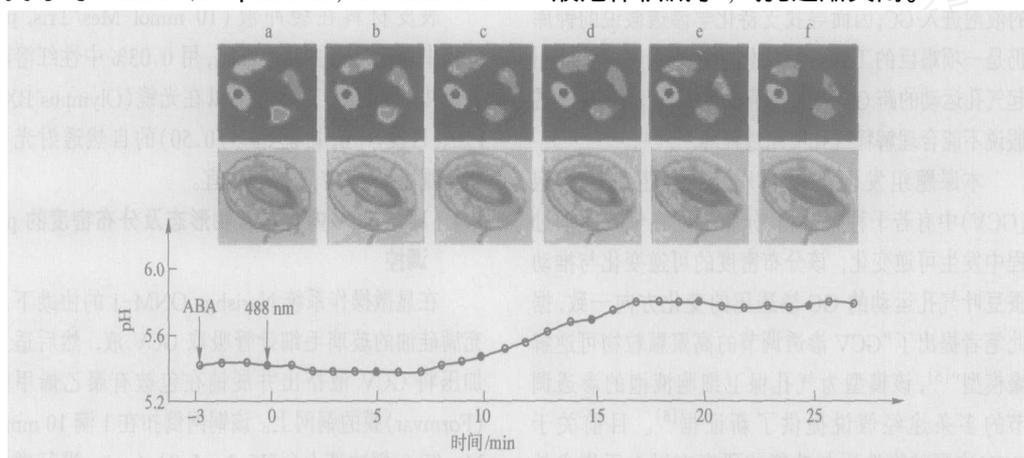


图 1 ABA 诱导的蚕豆气孔关闭过程中保卫细胞液泡中 pH 的动态变化

Fig. 1 Dynamic pH change of guard cell vacuole during stomatal closure induced by ABA

### 2.2 离体 GCV 液内含颗粒物对 pH 调控的响应

气孔关闭过程中 GCV 的 pH 发生了变化, 开放态气孔 GCV 的 pH 约为 5.3, 而关闭态为 5.8 左右<sup>[5]</sup>。用 pH 5.3 和 5.8 的缓冲液 ( $10 \text{mmol}$  Mes/Tris, pH 5.3 或 5.8) 分别对离体 GCV 液进行 pH 调控。电镜 (HITACHI H-7500,  $4 \times 10^4$  倍) 观测结果表明: 未经 pH 调控的开放态气孔 GCV 的内含颗粒物的分布密度为  $(3.0 \sim 9.5) \times 10^{22} \text{L}^{-1}$ , 线度约为  $10 \sim 80 \text{nm}$  (图 2A, 细胞数 = 6, 总观测数 = 9)。经 pH 5.3 处理 4 min (图 2B, 细胞数 = 3, 总观测数 = 8) 的开放态气孔 GCV 液所含颗粒物的线度及分布密度与未经缓冲液处理的开放态气孔 GCV 的图片 (图 2A) 所显示的颗粒物线度及分布密度很接近。来自开放态气孔 GCV 内含颗粒物经 pH 5.8 的缓冲液处理 4 min (图 2C, 细胞数 = 3, 总观测数 = 6) 所含颗粒物的线度明显增大, 分布密度显著减小: 未经

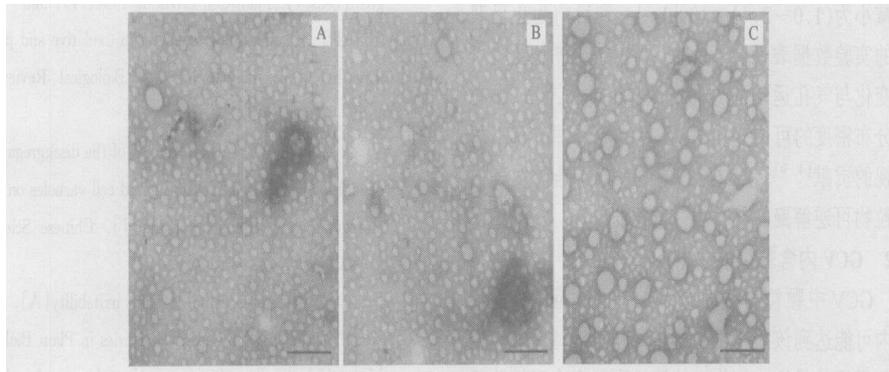
pH 调控的负染结果 (图 2A) 颗粒物的线度约为  $10 \sim 80 \text{nm}$ , pH 5.8 调控后 (图 2C) 颗粒物的线度显著增大, 约为  $30 \sim 150 \text{nm}$ , 而分布密度则比 pH 调控前减小了许多 (pH 5.8 调控前  $N_s (3.0 \sim 9.5) \times 10^{22} \text{L}^{-1}$ , 调控后  $N_s$  减小到  $(1.0 \sim 2.4) \times 10^{20} \text{L}^{-1}$ )。

### 2.3 蛋白酶 K 处理

非特异性蛋白酶 (proteinase K)<sup>[11]</sup> 处理蚕豆 (*V. faba* L) 叶片气孔 GCV 内含颗粒物的负染图: 图 3A (对照 1) 为开放态气孔 GCV 内含物的负染结果 (未经任何处理, 细胞数 = 3, 总观测数 = 8)。图 3B 为开放态气孔 GCV 液经  $2 \text{mg/mL}$  proteinase K 37 处理 3.5 h 后的负染图 (缓冲液  $10 \text{mmol}$  Mes/Tris, pH 6.1, 细胞数 = 4, 总观测数 = 9)。图 3C (对照 2): 经不含 proteinase K 的缓冲液 ( $10 \text{mmol}$  Mes/Tris, pH 6.1, 细胞数 = 3, 总观测数 = 7) 37 处理

3.5 h 的负染图, 该图显示了与图 2 类似的结果: 颗粒物线度明显增大而分布密度显著下降, 颗粒物的形态变化可能是受所用缓冲液的 pH (6.1) 调控的

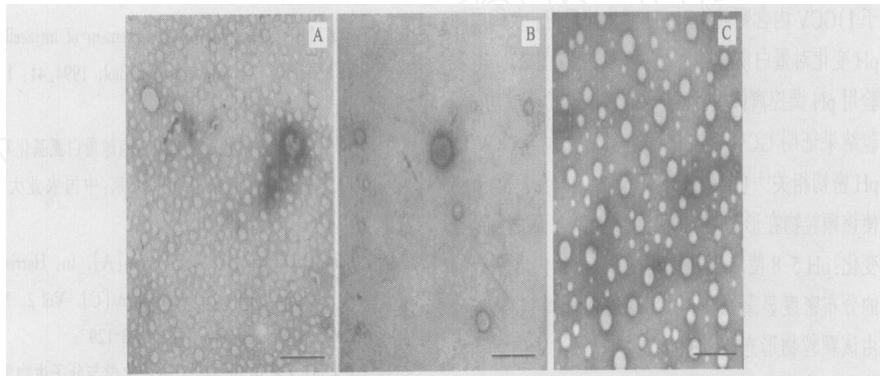
结果(与 pH 5.8 调控的结果相似)。观测结果表明 proteinase K 的处理(图 3B)几乎完全除去了 GCV 内含颗粒物。



- A 未经 pH 处理的负染图(对照)  
B 经 pH 5.3 处理 4 min (10 mmol/L Mes/ Tris pH 5.3) 的负染图  
C 经 pH 5.8 处理 4 min (10 mmol/L Mes/ Tris pH 5.8) 的负染图

图 2 GCV 内含颗粒物对 pH 5.3 和 5.8) 调控的响应(图中标尺为 250 nm)

Fig. 2 Response of particles in GCV to pH, Bar = 250 nm



- A 取自开放态气孔 GCV 液的内含物负染图(对照 1)  
B 取自开放态气孔 GCV 液经蛋白酶 K 处理 3.5 h 内含物负染图  
C 取自开放态气孔 GCV 液仅经缓冲液处理 3.5 h 的内含物的负染图(对照 2)

图 3 Proteinase K 处理 GCV 液内含物的结果(图中标尺为 250 nm)

Fig. 3 Vacuoles sap of guard cells treated with Protease K, Bar = 250 nm

### 3 结论与讨论

#### 3.1 GCV 气孔运动过程中 pH 的作用

前人已报道的工作说明气孔运动过程中保卫细胞(胞质或液泡)的 pH 有 0.1 ~ 0.5 单位的变化<sup>[5, 12~14]</sup>, 但没有指出该 pH 变化诱导的 GCV 中颗粒物可逆解聚与 GCV 的渗透调节。

笔者用激光共聚焦成像系统 (fluoview 300, OL YMPUS) 配合化学荧光探针 BCECF AM 的单光激发双发射光比值法的工作证实: 在蚕豆气孔开放过程(关闭态 开放态)中 GCV 经历了 0.5 pH 单位的酸化<sup>[5, 7~8]</sup>。本实验证实: ABA (20 μmol/L, 溶于

10 mmol/L Mes/ Tris, pH 6.1) 诱导的蚕豆叶片气孔关闭过程(开放态 关闭态)中 GCV 的 pH 有约 0.5 pH 单位的碱化。这些结果说明了在蚕豆气孔运动(开放, 关闭)过程中 GCV 有约 0.5 pH 单位的变化, 实验数据表明 GCV 内颗粒物的可逆解聚与 GCV pH 变化之间可能有某种联系<sup>[5]</sup>(图 1, 2)。用电镜观测经 pH 调控(10 mmol Mes/ Tris pH 5.3, 或 5.8)的 GCV 内含颗粒物的负染样本, 说明与开放态气孔 GCV 相对应的 pH 5.3 不能使取自开放态气孔 GCV 内含颗粒物的线度和分布密度有实质变化, 而对应于关闭态气孔 GCV 的 pH 5.8 的调控则使取自开放态气孔 GCV 内含颗粒物的线度和分布

密度有显著变化(图2)。pH 5.8 调控前颗粒物的线度为 10 ~ 80 nm, 分布密度为  $(3.0 \sim 9.5) \times 10^{22} \text{ L}^{-1}$ , 调控后线度增加为 30 ~ 150 nm, 分布密度显著减小为  $(1.0 \sim 2.4) \times 10^{20} \text{ L}^{-1}$ 。到目前为止已获得的实验数据表明:1) GCV 颗粒物分布密度的可逆变化与气孔运动的方向一致(图 1,2), 且该颗粒物分布密度的可逆变化对 GCV 的渗透调节有不可忽视的贡献<sup>[4,9]</sup>。2) GCV 的 pH 可能是诱发其内颗粒物可逆解聚的信号链中重要的一环。

### 3.2 GCV 内含颗粒物性质分析

GCV 中颗粒物线度约为 15 ~ 250 nm, 植物细胞内可能达到该线度的颗粒有聚合的蛋白体, 淀粉粒和无机盐晶体。植物中的淀粉颗粒存在于细胞质内的叶绿体及淀粉体(白色体)中, 不会大量出现于 GCV 中, 同时从形态学的角度可基本排除 GCV 的颗粒物是无机盐晶体; 因而 GCV 中的颗粒物可能是蛋白体。该颗粒物可能是蛋白体的实验证据来自于 1) GCV 内含颗粒物对 pH 变化的反应: 众所周知 pH 变化对蛋白质构像有重要影响<sup>[15]</sup>(图 2)。本实验用 pH 调控离体蚕豆 GCV 内含颗粒物获得成功, 实验结果证明 GCV 颗粒物可逆解聚行为与 GCV 的 pH 密切相关<sup>[4]</sup>(图 2,3)。不同的 pH(5.3 及 5.8) 使该颗粒物在形态(分布密度, 线度)方面发生显著变化: pH 5.8 使取自开放态气孔 GCV 内含颗粒物的分布密度显著减小, 而其线度明显增加(图 2)。由该颗粒物形态与 pH 的关系推测 GCV 内含颗粒物有可能是蛋白质。2) Proteinase K 处理。蛋白酶 K 是一非特异性蛋白酶<sup>[16]</sup>, 经常用于去除核酸提取物中蛋白质的污染, 是一种广谱蛋白酶。蛋白酶 K(2 mg/mL 于 10 mmol Mes/ Tris 中, pH 6.1) 对 GCV 内含颗粒物的处理结果显示: 用蛋白酶 K 于 37 °C 处理 3.5 h 后 GCV 内含颗粒物被完全降解(图 3B); 而对照(图 3C)用不含蛋白酶 K 的缓冲液(10 mmol Mes/ Tris, pH 6.1) 处理得到了用高于关闭态 GCV pH 临界值(pH 5.8)的预期结果: 该颗粒物的线度显著上升, 而密度明显下降(图 3C)。蛋白酶 K 的处理结果(图 3B)说明蚕豆(*V. faba* L.) 叶片气孔 GCV 中的颗粒物可能是蛋白质。

### 参 考 文 献

- [1] Zeiger E, Bloom A J, Hepler P K. Ion transport in stomatal guard cells: A chemiosmotic hypothesis[J]. *What's New in Plant Physiology*, 1978, 9: 29-32
- [2] Tallman G. The chemiosmotic model of stomatal opening revisited [J]. *Plant Sci*, 1992, 11: 35-37
- [3] Meidner H, Edwards M. Osmotic and turgor pressures of guard cells[J]. *Plant Cell Environ*, 1996, 19: 503
- [4] Michell P. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation [J]. *Biological Reviews*, 1966, 41: 445-502
- [5] Ye Q, Zhu G L, Lou C H. Effects of the disaggregation of high-polymerized particles in guard cell vacuoles on osmoregulation of stomatal opening [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2003, 48: 453-456
- [6] Lou C H. Integrated action in plant irritability[A]. In: Kung S D, Yang S F, eds. *Discoveries in Plant Biology* [C]. Volume . Singapore, New Jersey, London, Hong Kong: World Scientific, 1998. 317-347
- [7] James-kracke M R. Quick and accurate method to convert BCECF fluorescence to pHi: calibration in three different types of cell preparations[J]. *Cell Physiol*, 1992, 151: 596-603
- [8] Boyer M J, Hedley D W. Measurement of intracellular pH. Measures [J]. *Methods Cell Biol*, 1994, 41: 135-148
- [9] 叶清. 蚕豆叶片气孔保卫细胞液泡蛋白亚基化对气孔开放的渗透调节作用[D]. 北京: 中国农业大学, 2001
- [10] Smith D G. Bacterial Appendages[A]. In: Harris J R ed. *Electron Microscopy of Proteins* [C]. Vol 2, New York: Academic Press, 1982. 128-129
- [11] 吴士良, 王武康, 王尉平. 生物化学与分子生物学实验教程[M]. 苏州: 苏州大学出版社, 2001. 96
- [12] Helen R I, Christoph A G, Roger W P. Changes in cytosolic pH and calcium of guard cells precede stomatal movements[J]. *Plant Biology*, 1992, 89: 1790-1794
- [13] Blatt M R, Armstrong F. K<sup>+</sup> channels of stomatal guard cells: abscisic-acid-evoked control of the outward rectifier mediated by cytoplasmic pH[J]. *Planta*, 1993, 191: 330-341
- [14] Gehring C A, Irvng H R, Mcconchie R, et al. Jasmonates induce intracellular alkalization and closure of *paphiopedium* guard cells[J]. *Annals of Botany*, 1997, 80: 485-489
- [15] Voet D, Voet J G, Pratt C W. *Fundamentals of Biochemistry* [M]. New York: John Wiley & Sons Inc, 1999. 152-292
- [16] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南 [M]. 第 3 版. 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础, 等译. 北京: 科学出版社, 2002. 1655-1656