

利用核磁共振磷谱测定细胞的 pH 值

李婷¹

(1.四川大学华西口腔医学院口腔疾病研究国家重点实验室, 四川成都 610041)

摘要: 以单磷酸腺苷为探针, 利用核磁共振磷谱建立了检测生物样品 pH 值的新方法, 并用于实际生物样品的分析。该方法除了简单、绿色、样品消耗少外, 还具有较好的重现性, 可以对样品进行无损分析, 在多种生物样品的研究中有很大的应用潜力。

关键词: 单磷酸腺苷; 核磁共振; 磷谱; pH

中图分类号: O633

文献标识码: A

pH detection in cell samples by ³¹P Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy

Li Ting¹

(1. State Key Laboratory of Oral Diseases, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: Using adenosine monophosphate as probe, a new method for detecting pH value of biological samples was established by using ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy. In addition to being simple, green and less sample consumption, the method has good reproducibility and can be used for non-destructive analysis of samples, and has great application potential in the study of various biological samples.

Keywords: Adenosine monophosphate; Nuclear magnetic resonance; Phosphorus spectrum; pH

核磁共振波谱 (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) 是一种简单、绿色并且具有高准确度和重现性的分析方法, 是一种能在生理条件下无损伤研究细胞、组织等生物样品的主要手段^[1,2]。用 NMR 技术测定细胞内 pH 值时, 可以避免因损伤或破坏细胞所引起的细胞内部生理及代谢等的变化, 减少由实验操作所产生的测定结果的不准确性。并且用核磁共振磷谱 (³¹P NMR) 技术测定 pH 的同时还能得到磷酸单酯、磷酸双酯、三磷酸腺苷、磷酸肌酸等多种小分子含磷化合物的信息, 对于研究细胞代谢的作用机制有着重要的应用价值^[3-5]。以

单磷酸腺苷 AMP 为探针^[6], 通过 Henderson-Hasselbach 方程拟合, 建立使用 ³¹P NMR 检测细胞 pH 值的新方法, 有望用于从复杂的生物样品中 pH 值的测定。

1 实验

1.1 仪器与试剂

AvanceII-600 MHz 核磁共振谱仪 (Bruker Company, Switzerland), 配备 5mm BBO 探头, 控温单元 BCU05; pH 计 (Mettler-Toledo Instruments Co., 上海, 中国)。

D₂O, 无水, 氘含量 99.8% (青岛腾龙微波科技有限公司); 2,2,3,3-氘代-(三甲基硅烷基)丙酸钠 (TMSP, 98%氘代率) 购自 Cambridge Isotope Laboratories 公司; 单磷酸腺苷, AMP (阿拉丁试剂公司)。

1.2 实验条件

³¹P NMR 试验参数: ³¹P 的共振频率为 242.93 MHz, 磷谱的宽度 sw 为 400 ppm, 中心频率 O1P 设置为 0 ppm, 采集-200 ppm 到 200 ppm 范围内的核磁共振信号。D1 设置为 6s, 采样次数 ns 为 64 次, 接收增益值 RG 设为 181, 时域点数 TD 为 256K。

表 1 核磁共振磷谱的主要试验参数

参数	³¹ P NMR
脉冲程序 (Pulprog)	zg30
谱宽 (Sweep width)	90 ppm
扫描次数 (Number of scans)	64
增益值 (Receiver gain)	181
脉冲延迟时间 (D1)	6 s
时域数据长度 (Time Domain)	256 K

1.3 试剂配制

TMSP 溶液的配制: 称取一定质量的 TMSP 粉末于聚乙烯管中, 加入一定体积的重水 (D₂O) 使之溶解, 浓度为 0.1M。

PBS 缓冲液的配制: 称取一定质量的 K₂PO₄•3H₂O 和 NaH₂PO₄•2H₂O 固体粉末溶解于去离子水中, 两种溶液的浓度均为 0.1M。通过 pH 计的调节, 使缓冲液的 pH 为值 7.42。

标准样品配制: 分别准确称取一定质量的若干含磷化合物粉末于 5 mm 核磁管中, 溶剂为 90 % H₂O+10 % D₂O, 包含 50 μL 0.1 M PBS 缓冲, 10 μL 重水溶解的 0.1 M TMSP, 其余加入一定体积的 H₂O, 使之总体积为 500 μL 转移至核磁管中备用。

细胞样品: HepG2.215 细胞样品由重庆医科大学肝病研究院提供, 该样品分析测试前保存于 -80 °C 的冰箱中。在分析前, 首先需要将样品提前解冻 2 小时, 加入 580 μL D₂O 和 20 μL TMSP, 然后用超滤离心机以 12000 g 转速离心 5 分钟, 取上清液 550 μL 转移至直径

为 5 mm 的核磁管中备用。

2 结果与讨论

2.1 pH 对 AMP 的 ^{31}P 化学位移影响

为了探究不同 pH 值条件下 AMP 的化学位移变化情况, 在 30 mL 的烧杯中分别加入一定质量的 AMP 标准样品, 溶剂为 90 % H_2O + 10 % D_2O , 包含 0.1M 的 PBS 缓冲 0.1 M TMS P 。通过加入 2 M HCl 或者 NaOH 溶液使样品的 pH 值在 2.5-9.5 pH 范围内变动, 经过充分混匀后, 取 500 μL 溶液转移至直径为 5 mm 的核磁管中备用。然后分别采集 2.5-9.5 pH 值变化范围内 AMP 的 ^{31}P 核磁谱图。经过多次实验结果如图 1 所示, AMP 的 ^{31}P 化学位移都随 pH 值的改变而变化, 并且随着 pH 值的增大都有往低场强方向漂移的趋势。

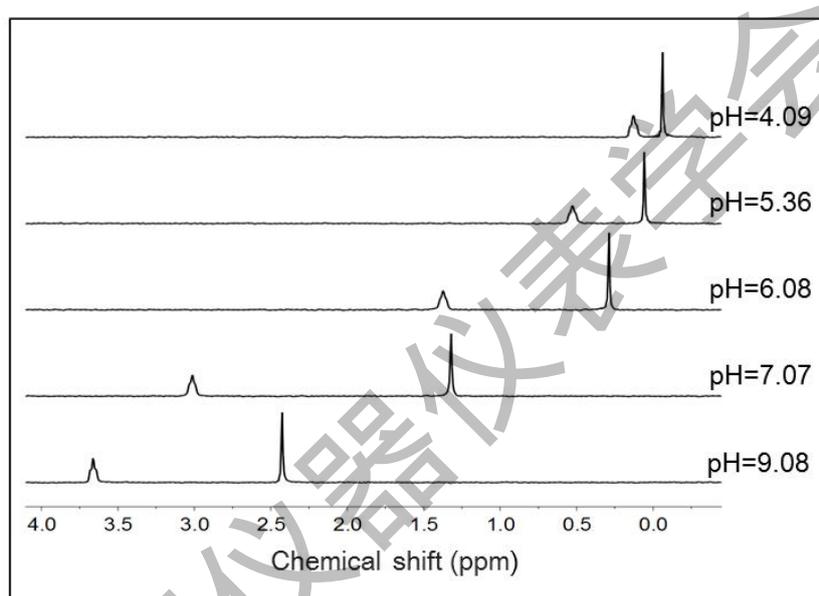


图 1 AMP 在不同 pH 条件下的 ^{31}P NMR 化学位移堆叠图。

2.2 AMP 的 ^{31}P NMR 随 pH 变化的标准曲线

pH 测定原理: 分析 ^{31}P NMR 图谱中磷原子的化学位移 δ , 得出相应数值后, 利用 Henderson Hasselbach 方程式^[7,8], 将各自的化学位移与不同的 pH 相关联, 拟合出相应的化学位移随 pH 变化的滴定曲线。Henderson-Hasselbach 方程式如下:

$$\text{pH} = \text{pKa} + \lg\left(\frac{\delta_{\text{obs}} - \delta_{\text{HA}}}{\delta_{\text{A}} - \delta_{\text{obs}}}\right) \quad (1)$$

其中, pKa 为表观解离常数, δ_{HA} 和 δ_{A} 分别为磷原子或氢原子在碱性和酸性环境中化学位移的极值, δ_{obs} 为实验测定的磷原子或氢原子化学位移, 那么根据公式即可算出样品的 pH。

在 ^{31}P NMR 实验中, AMP 唯一含有的磷显示出与 pH 值改变相关的化学位移变化。将所得数据进行了分析, 得到不同磷原子化学位移随 pH 变化的标准曲线, 如图 2 所示。表明 AMP 具备作为做 pH 探针分子的性质, 随 pH 改变的化学位移变化范围比较大 ($\delta_{\text{A}} - \delta_{\text{HA}} = 3.56$ ppm)。从 ^{31}P NMR 随 pH 变化的标准曲线中, 表 2 总结了 AMP 所对应的 pKa 值和化学位移变化极值。可以看出, AMP 的 pKa 在正常的生理范围内, 有利于用于进一步的生物样品的

研究。

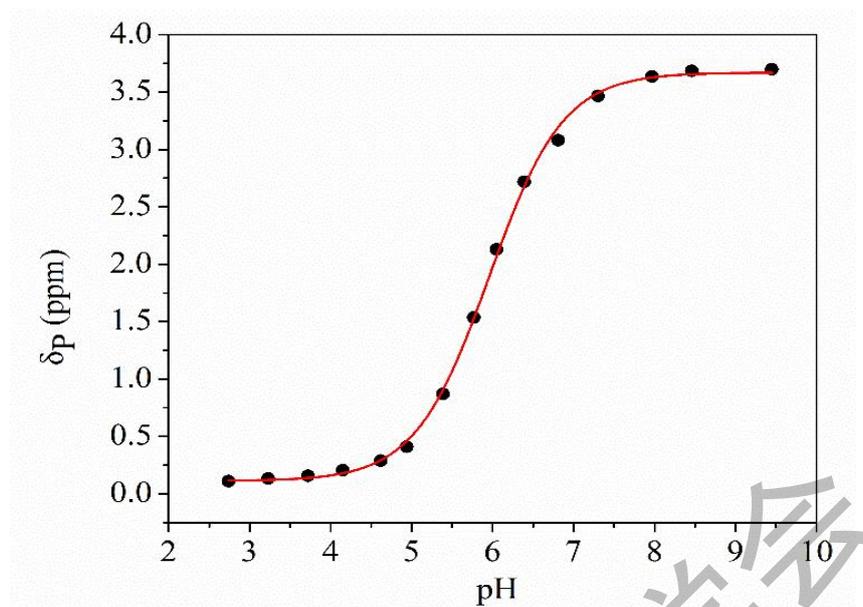


图2 AMP ^{31}P 化学位移随 pH 变化的标准曲线。

表2 ^{31}P NMR 计算的 AMP 的 pKa 值和化学位移变化极值

探针分子	^{31}P NMR 测定参数		
	pKa	δ_{HA} , ppm	δ_{A} , ppm
AMP	5.95	0.11	3.67

2.3 HepG2.215 细胞样品检测

为了验证该方法实际应用的可操作性，我们对 HepG2.215 细胞进行了 pH 值测定。考虑到在实际的生物样品中含磷化合物的浓度都会比较低，因此我们在 ^{31}P NMR 测试时将扫描次数分别增加到了 3072 次。图 3 展示了 HepG2.215 细胞的 ^{31}P NMR 谱图，观察到 AMP 的 ^{31}P 的化学位移为 3.21 ppm，同时，AMP 的 pKa、 δ_{HA} 和 δ_{A} 值在表 2 的数据表中已知，根据上述的方法计算出该样品的 pH 值是 6.83。在误差允许范围内，与 pH 计测出的数值 (7.21) 相一致，测量结果的偏差为 5.2%

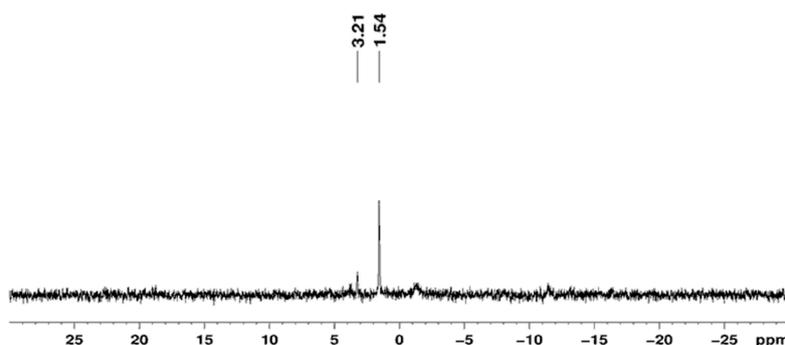


图3 HepG2.215 细胞的 ^{31}P NMR 谱图。

3 结语

AMP 的 ^{31}P 化学位移随着 pH 值的增大有往低场强方向漂移的趋势。通过 Henderson-Hasselbach 方程拟合, 建立使用 ^{31}P NMR 检测样品 pH 值的新方法, 并将其应用于细胞 pH 值的检测。该方法除了简单、绿色、样品消耗少外, 还具有较好的重现性, 对样品进行无损分析, 在多种生物样品的研究中有很大的应用潜力。

参考文献:

- [1]Suka N, O, Furihata K, et al. Analysis of binding mode of 2'-GMP to proteins using $^1\text{H}/^{31}\text{P}$ NMR Spectroscopy. *Analytical Sciences*. 2020;36:1551-1553.
- [2]Ross J, Najjar A, Tong W, et al. Fatty acid synthase inhibition results in a magnetic resonance-detectable drop in phosphocholine. *Molecular cancer therapeutics*. 2008;7:2556-2565.
- [3]Evans P, Jones K, Laws B, et al. Phosphorus NMR and its application to metabolomics. *Analytical Chemistry*. 2020;92:9536-9545.
- [4]Furse S, Watkins A, Vietue S, et al. A pipeline for making ^{31}P NMR accessible for small and large-scale lipidomics studies. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2021;413:4763-4773.
- [5]乔娟. Cos-7 细胞胞内 pH 的 ^{31}P 核磁共振测定. *分析化学研究简报*, 2005;33:1298-1300.
- [6]Feoufell F, Ferre P. Role of adenosine monophosphate-activated protein kinase in the control of energy homeostasis. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. 2005;8:355-360.
- [7]Szakacs Z, Hagele G, Tyka R. $^1\text{H}/^{31}\text{P}$ NMR pH indicator series to eliminate the glass electrode in NMR spectroscopic pKa determinations. *Analytica chimica acta*. 2004;522:247-258.
- [8]Culcasi M, Casano G, Lucchesi C, et al. Synthesis and biological characterization of new aminophosphonates for mitochondrial pH determination by ^{31}P NMR spectroscopy. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2013;56:2487-2499.