DOI: 10.11895/j.issn.0253-3820.141040

乙酸胁迫酵母细胞凋亡过程中单个线粒体损伤的拉曼光谱分析

李 λ^{12} 卢明倩² 王巧贞¹² 石贵玉¹ 廖 威³ 黄庶识^{*2}

¹(广西师范大学生命科学学院,桂林 541004) ²(广西科学院生物物理实验室,南宁 530007) ³(广西职业技术学院,南宁 530226)

摘 要 应用激光光镊拉曼光谱技术(LTRS)作为一种非入侵分析线粒体的工具 结合氧电极法、紫外分光光 度计法 研究乙酸胁迫酵母细胞后提取的线粒体,以及直接胁迫正常酵母细胞的离体线粒体的拉曼光谱。结 果显示,乙酸胁迫酵母细胞后提取的线粒体的拉曼光谱,归属于核酸的谱峰(1081 和 1301 cm⁻¹)、蛋白质的谱 峰(872,1445,1604 和 1657 cm⁻¹)、脂类的谱峰(1125,1301,1445 和 1657 cm⁻¹)、Cyt c 的特征峰(750 和 1125 cm⁻¹)、线粒体呼吸特征峰(1604 cm⁻¹)都随着诱导程度的加深而降低,与常规法测定的指标呼吸率,磷 氧比,细胞色素 C 含量的降低,MDA 含量的升高的变化趋势相似;乙酸直接胁迫线粒体的拉曼光谱,归属于核 酸的谱峰(1081 和 1301 cm⁻¹),蛋白质的谱峰(872,1445,1604 和 1657 cm⁻¹),脂类的谱峰(1125,1301,1445 和 1657 cm⁻¹),Cyt c 的特征峰(750 和 1125 cm⁻¹),线粒体呼吸特征峰(1604 cm⁻¹),都随着诱导程度的加深而降 低,与常规法测定的指标呼吸率、磷氧比、细胞色素 C 含量的降低,MDA 含量的升高的变化趋势相似。结果表 明,乙酸胁迫细胞过程中,乙酸进到细胞内可能直接作用于线粒体,引起线粒体内物质的释放,导致依赖于线 粒体途径的细胞凋亡。

关键词 拉曼光谱;乙酸胁迫;酵母细胞;线粒体;凋亡

1 引 言

乙酸是酵母发酵过程中的一种代谢产物,它不能被酵母代谢,会对酵母细胞产生生理毒害作用,抑 制酵母发酵,如果乙酸等代谢产物进一步积累就会诱发酵母细胞大量死亡^[1,2]。用 20~200 mmol/L 乙 酸对对数期的酿酒酵母细胞进行胁迫,酵母细胞会发生染色质伴随着核膜的凝聚、细胞膜磷脂酰丝氨酸 的外翻和 TUNEL 显阳性表型等的凋亡现象,当乙酸胁迫同一种稳定时期的酿酒酵母时,发现依赖于线 粒体途径的酵母细胞凋亡现象^[3];进一步研究发现,酵母细胞凋亡与 ROS 的产生、Cyt c 从线粒体释放 到细胞质中有关^[4]。用一定浓度乙酸处理酵母细胞时,发现酵母细胞凋亡过程释放的 Cyt c 能激活 Caspase ,使 Caspase 裂解成为有酶解活性的异源二聚体,并引发下游的一系列级联反应,通过裂解特异 底物和激活内源性核酸酶最终导致细胞凋亡^[5,6]。但直到目前为止,酵母的代谢产物如何诱导细胞死 亡的过程仍不完全清楚。初步的研究表明,其代谢物可通过诱导线粒体中内含物的释放来启动细胞不 可逆的凋亡程序^[7]。

激光光镊拉曼系统(LTRS) 是利用激光束形成的光镊固定溶液中的单个活细胞,再经过瞬时增加激 光功率同时激发和收集细胞的拉曼光谱,具有无损伤、灵敏、快速等优势,是研究溶液中单个活细胞的有 力工具^[8,9]。线粒体是真核生物细胞中进行能量代谢的重要细胞器,在功能上线粒体不仅是细胞能量 代谢的中枢,还是细胞凋亡的重要参与者;线粒体大小约为0.5~1 µm,在缓冲液中可被激光镊子所捕 获,避免了由于布朗运动对线粒体的影响。因此,LTRS的应用使得离体有活性的单个线粒体的研究成 为可能^[10]。本研究应用LTRS,研究了乙酸胁迫酵母细胞以及离体线粒体过程中的光谱变化,获得乙酸 诱导酵母细胞发生凋亡的过程中,线粒体内核酸、蛋白质、脂类等大分子物质变化的实时信息,是单个线 粒体水平上的一种简单快速分析方法。

²⁰¹⁴⁻¹¹⁻²⁷ 收稿; 2015-03-11 接受

本文系国家自然科学基金资助项目(No. 31160018)

^{*} E-mail: hshushi@gxas.cn

2 实验部分

2.1 菌株与培养基

菌种:安琪酿酒高活性干酵母(安琪酵母股份有限公司)。

培养基为 YPD 培养基:1% 酵母提取物、2% 葡萄糖、2% 蛋白胨。

2.2 乙酸胁迫酵母细胞以及线粒体的提取

2.2.1 酵母菌的活化 取干酵母粉于 YPD 液体培养液中 29 ℃、100 r/min 培养过夜 将长菌的液体培养基稀释 10⁵倍后涂板 29 ℃培养。挑取单菌落至新鲜的 YPD 液体培养基中 ,在 29 ℃以 100 r/min 培养过夜 ,按 1% 的接种量接种到新鲜的 YPD 液体培养基中 ,再在 29 ℃以 150 r/min 培养 ,当 OD ≈ 0.8 时 ,即可离心收集菌体。

2.2.2 线粒体的提取 将离心收集的菌体 ,用菌体预处理缓冲液处理后加入蜗牛酶缓冲液 ,再加入原 生质体裂解液和玻璃珠(425~600 μm) 冰上涡旋破壁 ,破壁后差速离心法提取线粒体^[11,12] ,线粒体提取 液悬浮 A ℃保存待用。对所提取的线粒体马上进行稳定性与完整性测试 ,只有在4 ℃条件下 2 h 内保 持结构的完整性以及生理稳定性的离体线粒体 ,才可用于后续实验。

2.2.3 不同浓度乙酸胁迫酵母细胞 将离心收集的菌体,用 50 mmol/L Tris 缓冲液(pH 7.5)洗 2~3次 在等体积、终浓度分别为 0.50,100和 200 mmol/L 乙酸中进行处理 在 29 ℃以 100 r/min 缓慢 摇60 min 离心去掉处理液,用 50 mmol/L Tris 缓冲液(pH 7.5)洗 3次 称湿重,提取酵母线粒体。

2.2.4 高浓度乙酸胁迫酵母细胞后不同时间点线粒体的提取 将离心收集的菌体 ,用 50 mmol/L Tris 缓冲液(pH 7.5)洗3次 在终浓度为200 mmol/L 乙酸中进行处理 ,在 29 ℃以100 r/min 缓慢摇 ,分别在 0 ,30 ,60 和 90 min 时间点取样 离心去掉上清液 50 mmol/L Tris 缓冲液(pH 7.5)洗3次 称湿重 ,提取 酵母线粒体。

2.3 乙酸胁迫离体线粒体

将离心收集的酵母细胞,用 50 mmol/L Tris 缓冲液(pH 7.5)洗 3 次,称湿重,提取酵母线粒体。提取后的酵母线粒体,在4 °C条件下,终浓度为 20 mmol/L 乙酸中进行处理,不时摇动离心管使线粒体始终悬浮于处理液中,分别在0,15,30,45,60,75 和 90 min 时间点取样,离心去掉处理液,线粒体悬浮液洗涤 3 次后悬浮 $A ^{\circ}$ 保存备用。

2.4 凋亡细胞 DAPI 染色

细胞凋亡 DAPI 染色按试剂盒说明书步骤进行(南京凯基生物科技发展有限公司)。离心收集乙酸 处理后的细胞 加 500 μL DAPI 工作液洗1 次 再加 500 μL DAPI 工作液重悬细胞 37 ℃染色 15 min ,离 心收集细胞弃去工作液 加入 Buffer A 重悬细胞 滴加于载玻片上 荧光显微镜以 340/380 nm 紫外光激 发 ,镜检、拍照。

2.5 线粒体生理生化活性测定

参照文献 [13]的方法测定线粒体丙二醛(MDA) 含量; 用改良的文献 [14]方法测定线粒体 Cyte 含量; 用氧电极法^[15]测定线粒体的呼吸率(RCR) 与磷氧比(P/O)。

2.6 拉曼光谱测定以及光谱数据处理

按文献 [15] 描述的 LTRS 系统和拉曼光谱测定方法测定线粒体的拉曼光谱,激光激发功率为 45 mW 780 nm 激光激发 积分时间 20 s,100 × 油镜下,光镊子随机捕获线粒体,共测定 30 个线粒体的 拉曼光谱 在线粒体附近收集背景的拉曼光谱。光谱处理按文献 [15] 的方法,去背景基线校正平滑后 截取信号峰集中的 600 ~ 1800 cm⁻¹的指纹区作图分析。

3 结果与讨论

3.1 乙酸胁迫酵母细胞引起的凋亡

DAPI 是一种 DNA 特异性染料,与 DNA 产生非嵌入式结合,在紫外光激发下可以产生蓝色荧光。 对细胞膜 DAPI 有半通透性,可以透过正常的细胞并产生较弱的蓝色荧光,随着细胞凋亡,细胞膜的透 性增强 进入细胞内 DAPI 染料增多 产生更强的蓝色荧光。

图 1 是 300 mmol/L 乙酸胁迫酵母细胞不同时间后的 DAPI 染色图。随着胁迫时间的延长,荧光强度增加,至4 h 核内的染色质凝聚呈新月状分布核内周边,有的细胞核破裂形成碎片,出现明显的细胞 周亡特征,说明乙酸胁迫酵母细胞可导致细胞凋亡。



图 1 300 mmol/L 乙酸处理酵母细胞不同时间后的 DAPI 染色图。a:0 h,b:1 h,c:2 h,d:4 h

Fig. 1 Photofluorograms of yeast cells dyed with 4^{-} β -diamidino-2-phenylindole (DAPI) after incubated with 300 mmol/L of acetic acid at 0 h (a) , 1 h (b) , 2h (c) and 4 h (d) , respectively.

3.2 线粒体和细胞色素 C 拉曼光谱

图 2a 是一个典型的酵母细胞线粒体拉曼光谱图,1081 和1301 cm⁻¹归属于核酸的谱峰;872,1445,1604 和 1657 cm⁻¹归属于蛋白质的谱峰;1125,1301,1445 和 1657 cm⁻¹归属于脂类的谱峰^[17~19]。图 2b 是 Cyt c 的拉曼光谱图,750,1125,1314 和 1580 cm⁻¹分别归属吡咯呼吸环伸缩振动、吡咯半环对称伸缩振动、Cm—H 变角振动、Ca—Cm 对称伸缩振动,是细胞色素 C 的特征峰^[20]。酵母线粒体的拉曼光谱(图 2a) 也表征了 750 和 1125 cm⁻¹这两个细胞色素 C 的特征峰。





Fig. 2 Raman spectra of a single yeast mitochondrion (a) and Raman spectrum of pure cytochrome c (Cyt c) (b). The illustration in figure is the mitochondria image ($\times 100$)

3.3 乙酸胁迫酵母细胞后其线粒体拉曼光谱变化过程

由不同浓度乙酸胁迫酵母细胞 60 min 后提取其线粒体的拉曼光谱及特征峰强度变化趋势(图3) 可见,乙酸浓度为 50 mmol/L 时,750,1081,1445 和 1657 cm⁻¹的峰强比 0 mmol/L 时稍有增强,而其它峰 强与 0 mmol/L 时基本相同,是因为低浓度乙酸对酵母菌的生长没有伤害作用,甚至还有促进生长的作 用,当乙酸浓度不断增加时,就会对酵母菌的生长产生毒害作用^[21,22],所以当乙酸浓度为 100,150 和 200 mmol/L 时,可明显看出归属于核酸的谱峰(1081 和 1301 cm⁻¹),蛋白质的谱峰(872,1445,1604 和 1657 cm⁻¹),脂类的谱峰(1125,1301,1445 和 1657 cm⁻¹),Cyt c 的特征峰(750 和 1125 cm⁻¹)及线粒体呼吸 特征峰(1604 cm⁻¹)的强度均随着乙酸浓度的增加而降低,这些光谱强度变化与乙酸浓度存在依赖关系。

图 4 是 200 mmol/L 乙酸胁迫酵母细胞不同时间后提取其线粒体的拉曼光谱及特征峰强度变化趋势图。图中显示,归属于核酸的谱峰(1081 和 1301 cm⁻¹),蛋白质的谱峰(872,1445,1604 和 1657 cm⁻¹) 脂类的谱峰(1125,1301,1445 和 1657 cm⁻¹) Cyt c 的特征峰(750 和 1125 cm⁻¹) 及线粒体呼

第43卷



图 3 不同浓度乙酸胁迫酵母细胞 60 min 后其线粒体拉曼光谱图(a)及主要特征峰强度变化趋势(b,c) Fig. 3 Raman spectra of yeast mitochondria induced with different concentrations of acetic acid for 60 min (a) and the trends of major band intensities (b and c)



图 4 200 mmol/L 乙酸胁迫酵母细胞不同时间后其线粒体拉曼光谱图(a) 及主要特征峰强度变 化趋势(b,c)

Fig. 4 Raman spectra of yeast mitochondria induced with 200 mmol/L of acetic acid in different time

(a) and the trends of major band intensities (b and c)

吸特征峰(1604 cm⁻¹)均随着胁迫时间的增加而降低。所以 200 mmol/L 乙酸胁迫下,酵母细胞线粒体内的核酸、蛋白质、脂类、Cyt c 的谱峰强度变化和时间存在依赖关系。

3.4 乙酸胁迫酵母细胞后其线粒体生理生化指标

图 5 是 200 mmol/L 乙酸胁迫酵母细胞不同时间后 在不同时间点提取其线粒体后所测定的的生理 生化指标变化趋势。图 5A 是乙酸胁迫细胞后其线粒体在不同时间点的呼吸率(RCR) 与磷氧比(P/O) 值,RCR 和 P/O 反映线粒体氧化磷酸化的偶联程度,图 5A 显示,随着胁迫时间的延长 RCR 和 P/O 均 呈下降趋势,说明线粒体的氧化磷酸化偶联程度降低,功能受损^[23],呼吸下降,与图 4 中呼吸特征峰 1604 cm⁻¹的变化相似。图 5B 是乙酸胁迫细胞后其线粒体在不同时间点的丙二醛(MDA) 和 Cyt c 含量 变化趋势图。MDA 是膜脂过氧化的一种终产物,而且,MDA 还具有较强的细胞毒素,对线粒体的呼吸 功能具有显著的抑制作用^[24],图 5B 显示,随着乙酸胁迫时间的延长,MDA 含量增加,说明线粒体膜脂 过氧化程度加深。Cyt c 是存在于膜间隙的水溶性蛋白质,正常情况下不能自由的通过线粒体外膜,当 线粒体外膜通透性增加时,会被释放到胞浆中^[25 26];随着乙酸胁迫时间的延长,Cyt c 含量降低,说明线 粒体外膜受到破坏。图 5 中的生理生化指标与图 4 脂类、Cyt c、呼吸的拉曼峰强度变化基本一致。



图 5 200 mmol/L 乙酸胁迫酵母细胞不同时间后其线粒体生理生化指标。(A)线粒体呼吸率(RCR)以及磷氧比(P/O) (B) MDA 含量以及 Cyt c 含量。

Fig. 5 (A) Changes of respiratory control ratio (RCR) (a) , phosphat oxygen ratio (P/O) (b); (B) malondialdehyde (MDA) content (a) , Cyt c concentration (b) of yeast mitochondra after induced with 200 mmol/L of acetic acid in different times

当细胞受到凋亡信号的刺激时,可导致线粒体跨膜电位降低,外膜破裂,促使线粒体内各种凋亡诱 导因子的释放,诱导因子的释放可引起线粒体内蛋白质含量的降低。而线粒体跨膜电位的降低,可使氧 化磷酸化过程解偶联,大量的 ROS 产生,ATP 的水解大于合成,造成 ATP 浓度迅速降低,胞质 ADP 和膜 上肌酸磷酸酯浓度增高 影响线粒体的呼吸作用^[27]。线粒体中的线粒体 DNA(mtDNA),裸露于基质中,缺 乏组合蛋白的保护,最易受到伤害,而且催化 mtDNA 复制的 DNA 聚合酶 Y 不具有校正功能,同时还缺乏 有效的修复酶,所以 mtDNA 一旦受到损伤不易被修复,造成呼吸链功能受损,进一步积累 ROS^[28],而线粒 体内外膜的破裂可使一些受损伤的 mtDNA 扩散到胞浆中,引起核酸含量的降低。Cyte 从破裂的线粒体 中释放出来,导致线粒体呼吸链功能出现异常,引起 ATP 的减少,影响线粒体的呼吸作用^[27]。

3.5 乙酸胁迫酵母离体线粒体拉曼光谱

图 6 是提取酵母线粒体后,用 20 mmol/L 乙酸直接胁迫离体线粒体不同时间的拉曼光谱及特征峰 强度变化趋势图。结果显示,归属于核酸的谱峰(1081 和 1301 cm⁻¹),蛋白质的谱峰(872,1445,1604 和 1657 cm⁻¹),脂类的谱峰(1125,1301,1445 和 1657 cm⁻¹),Cyt c 的特征峰(1125 cm⁻¹)及线粒体呼吸特征 峰(1604 cm⁻¹)均随着胁迫时间的延长而降低,与乙酸直接胁迫细胞后,提取线粒体测定其光谱的变化 趋势一致。提示乙酸直接胁迫细胞后,乙酸进到胞内可能直接作用于线粒体,造成生物大分子的流失。 **3.6**乙酸胁迫酵母离体线粒体生理生化指标

图 7 是 20 mmol/L 乙酸胁迫酵母离体线粒体后,不同时间点的生理生化指标。呼吸率、磷氧比 (图 7a)和 Cyt c 含量(图 7b)随着胁迫时间的延长而下降,与图 6 中呼吸特征峰 1604 cm⁻¹和 Cyt c 特征 峰 1125 cm⁻¹的变化相似。MDA 的含量(图 7b)随着乙酸胁迫时间的延长而上升,与图 6 中的拉曼谱峰 变化趋势相似。这些生理生化指标与图 5 结果一致。

4 结 论

乙酸胁迫酵母细胞后提取线粒体,以及乙酸直接胁迫离体线粒体,归属核酸、蛋白质、脂类、Cyt c、 线粒体呼吸特征峰强度均随着胁迫程度的加深而降低。表明在乙酸胁迫酵母细胞过程中,乙酸进入到 细胞内可能直接作用于线粒体,导致线粒体膜脂质过氧化程度加深,线粒体内的核酸、蛋白质、脂类、 Cyt c 含量的降低,呼吸功能衰竭,出现依赖于线粒体途径的细胞凋亡现象。LTRS 可以作为一种非入侵 性分析线粒体的有用工具。

第43卷



图 6 20 mmol/L 乙酸胁迫酵母离体线粒体不同时间拉曼光谱图(a)及主要特征峰的强度变化趋势(b,c) Fig. 6 Raman spectra of yeast mitochondria *in vitro* induced with 20 mmol/L of acetic acid in different times (a) and the trends of major band intensities (b and c)



图 7 20 mmol/L 乙酸胁迫酵母离体线粒体后其不同时间点的生理生化指标。(a) 线粒体呼吸率(RCR) 以及磷氧比(P/O) (b) MDA 含量以及 Cyt c 含量。

Fig. 7 Changes of RCR (a) , P/O (a) , MDA content (b) Cyt c concentration (b) of yeast mitochondria *in vitro* induced with 20 mmol/L of acetic acid in different times

References

- LI Xue-Yan , ZHAO Hua. Liquor Making , 2001 , 28(6): 58-60
 李雪雁, 赵华.酿酒, 2001 , 28(6): 58-60
- 2 WANG Xing-Wen, QIU Xing-Tian, JI Geng-Sheng, YONG Qiang, YU Shi-Yuan. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 2007, 29(5): 834-836

王杏文, 邱兴天, 季更生, 勇强, 余世袁. 江西农业大学学报, 2007, 29(5): 834-836

- 3 Ludovico P , Sousa M J , Silva M T , Leao C , Corte-Real M. Microbiology , 2001 , 147(9): 2409-2415
- 4 Ludovico P, Rodrigues F, Almeida A, Silva M T, Barrientos A, Corte-Real M. Mol. Biol. Cell, 2002, 13(8): 2598-2606
- 5 Guaragnella N, Bobba A, Passarella S, Marra E, Giannattasio S. FEBS Lett. , 2010, 584(1): 224-228
- 6 Guaragnella N, Pereira C, Sousa M J, Antonacci L, Passarella S, Corte-Real M, Marra E, Giannattasio S. FEBS Lett., 2006, 580(30): 6880-6884
- 7 Kitaqaki H , Araki Y , Funato K , Shimoi H. FEBS Lett. , 2007 , 581(16): 2935 2942
- 8 ZHOU Bing , LU Ming-Qian , ZHAO Li-Wei , HUANG Shu-Shi , CHEN Li-Mei. Chinese J. Anal. Chem. , 2013 , 41(12): 1789 - 1794

周冰, 卢明倩, 赵丽伟, 黄庶识, 陈丽梅. 分析化学, 2013, 41(12): 1789-1794

- 9 WANG Yan-Jun , YAO Hui-Lu , WANG Gui-Wen , WANG Yun , FENG Fu-Mei. Spectroscopy and Spectral Analysis , 2009 , 29(7): 1881 - 1883 王雁军,姚辉璐,王桂文,汪蕴,丰美福.光谱学与光谱分析,2009,29(7):1881-1883 10 Tang H Y , Yao L H , WANG G W , Wang Y , Li Y Q , Feng M F. Opt. Express , 2007 , 15(20): 12708 - 12716 JIN Jian-Ling , GAO Dong , SUN Zhong-Dong. Hereditas , 1996 , 18(2): 46-48 11 金建玲,高东,孙忠东.遗传,1996,18(2):46-48 12 ZHAO Hong-Yu , LI Jun , ZHAO Yue , WANG Xin , CAI Lu. Food Science , 2011 , 32(9): 170-173 赵宏宇,李珺,赵玥,王馨,蔡禄. 食品科学,2011,32(9):170-173 13 DONG Zhuo-Ya. Journal of Anhui Agricultural Sciences , 2012, 40(26): 12805 - 12807 董卓娅. 安徽农业科学, 2012, 40(26): 12805-12807 14 ZHANG Jun-Tian , DU Guan-Hua. Modern Experimental Methods in Pharmacology. Beijing: Peking Union Medical College Press , 2012: 1228 - 1229 张均田,杜冠华.现代药理实验方法.北京:中国协和医科大学联合出版社,1998:1228-1229 15 Yang S , Tan T M C , Wee A , Leow C K. Cell. Mol. Life Sci. , 2004 , 2(61): 220 - 229 16 LU Ming-Qian, DONG Rong, WEN Shun-Hua, ZHANG Wei, WANG Qiao-Zhen, HUANG Shu-Shi, CHEN Li-Mei. Chinese J. Anal. Chem. , 2012 , 40(12): 1845-1851 卢明倩,董蓉,温顺华,张韦,王巧贞,黄庶识,陈丽梅.分析化学,2012,40(12):1845-1851 17 Shetty G, Kendall C, Shepherd N, Stone N, Barr H. Br. J. Cancer, 2006, 94(10): 1460-1464 18 Notingher I. Sens. , 2007, 7(8): 1343-1358 19 XU Yi-Ming. Raman Spectroscopy in Application of Structure Biology. Beijing: Chemical industry press, 2005: 11 - 114 许以明. 拉曼光谱及其在结构生物学中的应用. 北京: 化学工业出版社, 2005: 11-141 20 Onogi C, Hamaguchi H. Chem. Lett. , 2010, 39(3): 270-271 21 Palmqvist E, Grage H, Meinander N Q, Hahn-Hägerdal B. Biotechnol. Bioeng., 1999, 63(1): 46-55
- 22 PAN Jin-Quan , LIU Yun. Biotechnology , 2002 , 12(1): 45-47 潘进权,刘耘. 生物技术,2002,12(1):45-47
- ZHANG Lei, CHEN Shun-Zhi, LIU Shu-Sen. Modern Preventive Medicing, 2008, 35(7): 1348-1352 23 张 蕾,陈顺志,刘树森.现代预防医学,2008,35(7):1348-1352
- LONG Jian-Gang, WANG Xue-Min, GAO Hong-Xiang, LIU Chang-Sheng, LIU Zhi, MIU Ming-Yong, LIU Jian-Kang, 24 Academic Journal of Second Military Medical University, 2005, 26(10): 1131-1135 龙建纲,王学敏,高宏翔,刘昌盛,刘志,缪明永,刘健康.第二军医大学学报,2005,26(10):1131-1135
- 25 ZHANG Wen-Hua, ZHOU Lu, XU Shu-Jun, CHEN Teng, JIA De-Ze, ZHOU Mao-De, WU Cheng-Yun. Journal of Shandong University(Health Sciences) , 2007 , 45(12): 1193 - 1196 张文华,周璐,徐淑军,陈腾,贾德泽,周茂德,吴承运.山东大学学报(医学版),2007,45(12):1193-1196
- 26 LAI Gui-Hua, WANG Xun-Cui, LI Qing-Lin. Journal of Anhui TCM College, 2013, 32(4): 61-64 赖桂华, 王训翠, 李庆林. 安徽中医学院学报, 2013, 32(4): 61-64
- 27 Gottlieb E , Armour S M , Thompson C B. PNAS , 2002 , 99(20) : 12801 12806
- 28 WU Lan-Fang, YANG Ai-Zhen, LIU He, WANG You-Nian. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2010, 26(8): 63-68 吴兰芳,杨爱珍,刘和,王有年.中国农学通报,2010,26(8):63-68

Raman Spectra Analysis for Single Mitochondria after Apoptosis Process of Yeast Cells Stressed by Acetic Acid

LI Bing^{1,2}, LU Ming-Qian², WANG Qiao-Zhen^{1,2}, SHI Gui-Yu¹, LIAO Wei³, HUANG Shu-Shi^{*,2}

¹(College of Life Science, Guangxi Normal University, Guilin 541004, China)

² (Biophysics Laboratory, Guangxi Academy of Sciences, Nanning 530007, China)

³(Guangxi Vocational and Technical College, Nanning 530226, China)

Abstract Laser tweezers Raman spectroscopy (LTRS) as a non-invasive tool for mitochondria analysis, combined with oxygen electrode and ultraviolet spectrophotometric method, was used to investigate the Raman spectra of the mitochondria of yeast cells in vitro and in vivo after induced with acetic acid. The results showed that when the mitochondria of yeast cells in vivo was induced by acetic acid, the spectral peaks of the nucleic acid (1081, 1301 cm⁻¹), proteins (872, 1604, 1445, 1657 cm⁻¹), lipids (1125, 1301, 1445, 1657 cm⁻¹), cytochrome c (750, 1125 cm⁻¹) and mitochondria respiration (1604 cm⁻¹) were significantly decreased as a function of the duration of the acetic acid stress, and the obtained physiological and biochemical indexes of respiration rate, p/o ration and cytochrome c content were similar to that of by the conventional method. Besides , when the mitochondria of yeast cells in vitro was induced by acetic acid , the spectral peaks of the nucleic acid (1081 , 1301 cm $^{-1}$) , proteins (872 , 1604 , 1445 , 1657 cm $^{-1}$) , lipids $(1125, 1301, 1445, 1657 \text{ cm}^{-1})$, cytochrome c $(750, 1125 \text{ cm}^{-1})$ and mitochondria respiration (1604) cm^{-1}) were significantly decreased as the function of the duration of the acetic acid stress, and the obtained physiological and biochemical indexes of respiration rate, p/o ration and cytochrome c content were similar to that of by conventional method. The results indicated that acetic acid could penetrate into the cell interior and directly impacted the mitochondria possibly, resulted in the release of inclusions from the mitochondria, subsequently, caused the apoptosis of yeast cells which relied on the mitochondria pathways.

Keywords Raman spectroscopy; Acetic acid stress; Yeast cell; Mitochondria; Apoptosis

(Received 27 November 2014; accepted 11 March 2015)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31160018)

《化学化工文献检索与应用》(第二版)

陈琼、朱传方、辜清华 编著

本书在第一版的基础上,为更好地适应现阶段文献检索的需要,详细介绍了文献基础知识、化学化工专业领域的重 点科技图书与期刊的同时,重点介绍了化学领域各类期刊数据库与电子期刊,以及"Web of Knowledge", "SciFinder Scholar", "Reaxys"等数据库的检索方法。另外,还详细介绍了专利文献检索、"WEB 资源"检索等内容。

书 号: 9787122221292 定价: 28.0元 出版时间: 2015年2月 开本: 16 化学工业出版社出版