

# 应用重组表达钙离子敏感蛋白 YC2.1 研究粟酒裂殖酵母细胞内钙离子浓度的分布

王少慧<sup>1,2</sup> 袁生<sup>1,2\*</sup>

(南京师范大学生命科学学院,<sup>1</sup>江苏省资源生物技术重点实验室,  
<sup>2</sup>微生物工程重点实验室, 南京 210097)

**摘要** 把重组表达钙离子敏感蛋白的 YC2.1 基因(yellow cameleon 2.1)导入了粟酒裂殖酵母中, 观察了粟酒裂殖酵母细胞内钙离子浓度的分布。结果发现, 钙离子敏感蛋白所指示的钙离子呈细胞周缘胞质较高浓度分布, 而在细胞胞质中部的钙离子浓度相对低一些。通过 DAPI 染色实验证实这是由于胞质中部细胞核的填充而形成。fluo-3 染色的裂殖酵母细胞, 由于 fluo-3 进入到细胞器(房室化现象), 所以出现胞质的内部区域高的荧光信号, 而在周缘的胞质区相对弱, 不能真实反应胞质钙离子的分布。因此重组表达钙离子敏感蛋白测定钙离子的方法优于 fluo-3 荧光探针的方法, 对于裂殖酵母细胞胞内钙离子的研究具有良好的应用前景。

**关键词** 粟酒裂殖酵母; 重组表达钙离子敏感蛋白 YC2.1; 细胞内钙离子; fluo-3

细胞增殖是生命的重要特征, 钙离子是胞内的第二信使。在细胞周期的 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期转换、G<sub>1</sub>/S 期转换、G<sub>2</sub>/M 期转换及中期/后期转换等控制点处都发挥着重要作用<sup>[1, 2]</sup>。陆玲等<sup>[3]</sup>的研究指出, 当外源 Ca<sup>2+</sup> 浓度在 0.5~20 mmol/L 范围内随 Ca<sup>2+</sup> 浓度增加, 裂殖酵母细胞增殖速度加快, 延滞期逐渐缩短; 而缺钙将使细胞周期终止在 G<sub>1</sub> 期<sup>[4, 5]</sup>。可见钙离子在裂殖酵母细胞增殖过程中起着重要作用, 因而需要研究裂殖酵母胞内的钙离子分布。然而以往的研究方法基本上是使用荧光染料如 fura-2、fluo-3 等负载的方法。这些染料可以通过酯化的形式进入到细胞内, 在胞内酶的作用下脱酯化并与胞内的钙离子结合, 通过检测它们与钙离子结合后荧光强度的升高来检测钙离子浓度。遗憾的是负载的方法无法对荧光染料准确定位, 已有报道 fura-2、fluo-3 存在着房室化效应问题, 可能不能正确的显示细胞内游离钙的分布<sup>[6, 7]</sup>。袁生等<sup>[8]</sup>在研究水霉 Ca<sup>2+</sup> 分布时发现: 由于 fluo-3 进入到细胞器中, 它给出的是细胞质和细胞器游离 Ca<sup>2+</sup> 浓度总的分布信息。为此, 许多科学家设法研究新的胞内 Ca<sup>2+</sup> 的探针。Miyawaki 等<sup>[9]</sup>报道了由基因编码的 cameleon 蛋白作为一种 Ca<sup>2+</sup> 感受蛋白, 用于对活细胞的胞内自由钙离子浓度进行定位和实时的研究。改进的 YC2.1 基因(yellow cameleon 2.1)包括一段 ECFP 基因通过 CaM

基因(即钙调素基因)和 M13 基因(该基因编码的蛋白质在钙离子调节下可以与 CaM 蛋白可逆结合)与 EYFP 基因相连<sup>[10]</sup>。当钙离子与 CaM 蛋白结合时, 引起 CaM 蛋白与 M13 蛋白的空间结构发生改变: 由原先松散的哑铃形到紧密结合的球形, 从而使其两端的荧光生色团供体和受体 ECFP/EYFP 之间的荧光共振能量转移(FRET)效率增强, 结果是受体 EYFP 发射的荧光强度升高, 供体 ECFP 发射的荧光强度降低。即 535 nm/480 nm 发射波长比值升高。Allen 等<sup>[11]</sup>应用 YC2.1 基因在植物保卫细胞中表达, 并研究了其胞内钙离子的动态变化; 而 Yu 等<sup>[12]</sup>于 2000 年在动物细胞 HEK 293 细胞中表达 YC2.1 基因, 研究了在信号转导过程中钙离子的变化。Facanha 等<sup>[13]</sup>近来使用 N 端融合有 PKKKRKV(SV40)核定位信号序列的 cameleon YC2, 研究并报道了粟酒裂殖酵母细胞核内 Ca<sup>2+</sup> 浓度变化受 *Cta4* 影响的情况, 但迄今未见有利用 cameleon 直接研究酵母细胞内 Ca<sup>2+</sup> 浓度的研究。因而进一步使用 cameleon 研究酵母细胞质内是否存在一个 Ca<sup>2+</sup> 浓度的梯度分布, 以及这种局部的高 Ca<sup>2+</sup> 浓度分布与极性生长部位的关系是十分必要的<sup>[13]</sup>。

收稿日期: 2004-12-30 接受日期: 2005-05-16

国家自然科学基金项目资助(No.30170474)

\*通讯作者。Tel: 025-83598790, Fax: 025-83598723, E-mail: shengyuan@email.njnu.edu.cn

本文使用 YC2.1 在裂殖酵母胞质中表达,并用共聚焦显微镜观察了细胞内钙离子在生理条件下的分布,讨论了其生理意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

引物合成由上海生工负责合成。*NotI*、*BamHI*、*NdeI*、T4 DNA 聚合酶、T4 DNA 磷酸激酶是 NEB 公司产品, *Cfr9I* 内切酶是 Fermentas 公司产品。酵母抽提物是 Oxoid 公司产品, 蛋白胨是 Difco 公司产品。伴刀豆球蛋白 ConA 是上海源聚生物科技有限公司产品(PBS 缓冲液配制)。其他所用试剂均为国产分析纯。

### 1.2 仪器

激光共聚焦扫描显微镜为美国 Bio-Rad 公司产品(型号 MRC-1024)。使用的软件是 LaserSharp 3.2 和 TimeCourse 1.0。

### 1.3 菌种与细胞培养

粟酒裂殖酵母菌株 SP-Q01 和质粒 pESP-3 购自 Stratagene 公司。SP-Q01 菌株是亮氨酸营养缺陷型, 单倍体, h 交配型。它只能在完全培养基 YPAD(该培养基适合所有的酵母菌生长)上生长, 转化子筛选在 EMM+T 液体基本培养基(该培养基是合成培养基, 仅适合野生型裂殖酵母的生长, T 是硫胺素 thiamine 的缩写, 硫胺素的存在抑制外源基因表达)上进行。具体的转化筛选操作见 Stratagene 公司的裂殖酵母转化操作手册。

菌体培养: 将冰箱里保存的菌株接种在 EMM-T

液体培养基<sup>[14]</sup>(该培养基是合成培养基, 与 EMM+T 液体基本培养基区别在于不含硫胺素, 适合外源 YC2.1 基因的表达), 于 30 °C, 200 r/min 培养 12 h, 然后 1:20 转接到新鲜 EMM-T 液体培养基中, 同上条件下培养 8~12 h, 供实验观察。

### 1.4 克隆的构建

p35S-YC2.1-Kan 质粒由美国加利福尼亚大学的 Allen GJ 友情赠送。其上面的 YC2.1 基因通过 *NotI* 和 *BamHI* 酶切位点(已经切掉了终止密码子)切下来装入到酵母表达质粒 pESP-3 多克隆位点的 *NdeI* 和 *BamHI* 酶切位点之间, 接着通过设计一个连接子: 5'-PCCGGGCTAAGGTGGTGGTCTATC-3', 3'-CGATTCCACCACCAGATAGGGCCP-5', 把终止密码子装入到 YC2.1 基因的下游, 构建成 pESP-YC2.1 质粒(图 1)。pESP-YC2.1 质粒通过 LiAc 方法转化酵母菌 SP-Q01(参考 Stratagene 公司的裂殖酵母操作手册)。

### 1.5 YC2.1 激光共聚焦观察

取 100 μl 0.5 mg/ml ConA 加至盖玻片上, 静置 1~2 min 后, 吸走。然后置于温箱中烘干; 加 6~10 μl 上述准备好的裂殖酵母培养液, 静置 1~2 min 后, 加入新鲜 EMM-T 液体培养基; 不需清洗直接置于共聚焦显微镜下观察。激发波长: 442 nm, 发射波长: 460 LP 和 540/30 nm 同时双通道检测。中性滤光片, 40 × 放大倍数。观察条件: 460 LP: 8/1000; 540/30 nm: 6.5/1000; Zoom: 4.0~5.0。

### 1.6 DAPI 核染色与观察

向裂殖酵母细胞培养液中加入 DAPI(终浓度为

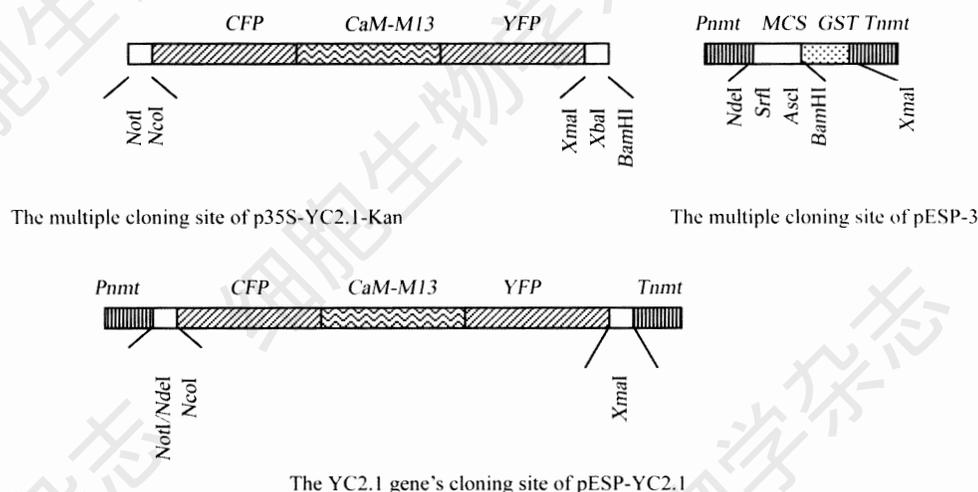
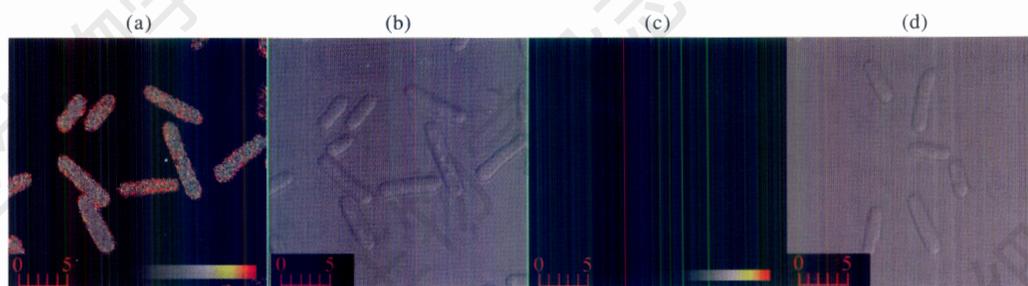
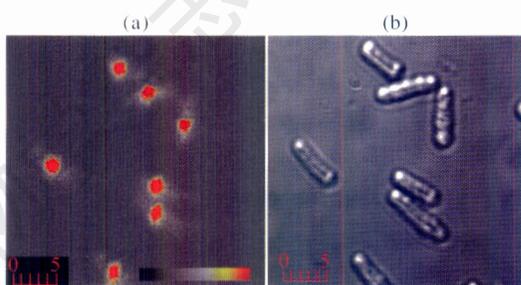


Fig. 1 The construction of plasmid pESP-YC2.1



**Fig. 2 The distribution of  $\text{Ca}^{2+}$  in the cytoplasm of *Schizosaccharomyces pombe* shown by calcium indicated sensor YC2.1**

a: The fission yeast strain which expresses YC2.1 protein. The color means the fluorescence ratio 535 nm/488 nm of YC2.1, which represents the distribution of  $\text{Ca}^{2+}$  in the cytoplasm of *Schizosaccharomyces pombe*; b: The differential interference discrepancy image of picture a; c: The spontaneous fluorescence image of *Schizosaccharomyces pombe* which doesn't express YC2.1 protein; d: The differential interference discrepancy image of picture c. Bar:  $\mu\text{m}$ ; Magnification: 40 $\times$ ; Zoom: 5.0.



**Fig. 3 Nucleus dying of DAPI**

a: The DAPI fluorescence image of *Schizosaccharomyces pombe* with false color; b: The differential interference discrepancy image of picture a. Bar:  $\mu\text{m}$ ; Magnification: 40 $\times$ ; Zoom: 5.0.

25  $\mu\text{g/ml}$ 的DAPI, 30  $^{\circ}\text{C}$ , 200 r/min 培养1 h后, 取样制作凹玻片于激光共聚焦观察。激发波长: 351 + 363 nm; 发射波长: 455/30 nm。

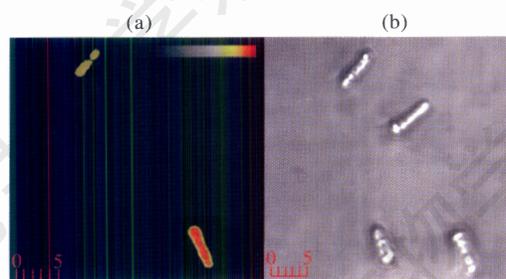
### 1.7 fluo-3 染色与观察

取裂殖酵母细胞培养液, 5000 r/min 离心 10 min; PBS 溶液洗涤 2~3 次后, 用 20  $\mu\text{mol/L}$  fluo-3/PBS 染色液悬浮, 于 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜。次日取出, PBS 溶液洗涤 3 次。加入新鲜的 PBS 温育 30 min 以上, 置于载玻片上, 在共聚焦显微镜下观察。激发波长 488 nm; 发射波长: 522/35 nm。

## 2 结果

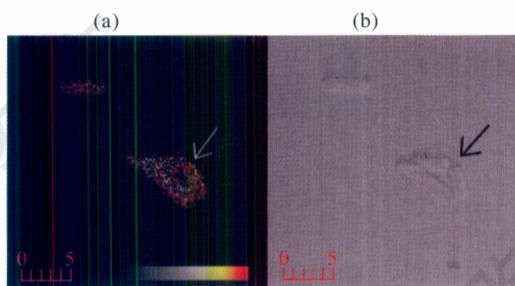
### 2.1 重组表达钙离子敏感蛋白 YC2.1 指示的粟酒裂殖酵母细胞内钙离子浓度分布

把 YC2.1 基因导入了裂殖酵母中并诱导表达, 由图 2a 可以看出 YC2.1 钙离子荧光强度沿细胞的周缘胞质分布, 而在细胞中部钙离子荧光强度相对较低。为了排除微生物菌株有自发荧光现象, 本实验采用菌株 SP-Q01-pESP-3 作为对照, 结果表明, 正



**Fig. 4 The distribution of  $\text{Ca}^{2+}$  in *Schizosaccharomyces pombe* by calcium fluorescence probe fluo-3**

a: The distribution of  $\text{Ca}^{2+}$  in *Schizosaccharomyces pombe* indicated by fluo-3 with false color; b: The differential interference discrepancy image of figure a. Bar:  $\mu\text{m}$  Magnification: 40 $\times$ ; Zoom: 5.0.



**Fig. 5 The distribution of  $\text{Ca}^{2+}$  in the cytoplasm of *Schizosaccharomyces pombe* shown by calcium indicator YC2.1 during cell division**

a: The fission yeast strain which expresses YC2.1 protein in cell cycle. The fluorescence ratio 535 nm/488 nm of YC2.1 represents the distribution of  $\text{Ca}^{2+}$  of cytoplasm in *Schizosaccharomyces pombe*; b: The differential interference discrepancy image of picture a. Arrow indicates the new-forming septum. Bar:  $\mu\text{m}$ ; Magnification: 40 $\times$ ; Zoom: 5.0.

常裂殖酵母菌株本身的 488 nm 荧光非常微弱, 在我们进行的实验观察条件下是肉眼不可见的, 见图 2c。

## 2.2 DAPI 的核染色

考虑到细胞中部钙离子荧光强度较弱可能为细胞核和其他细胞器填充所造成,我们进行了 DAPI 的核染色实验,细胞株选择表达 YC2.1 蛋白的裂殖酵母菌株。结果如图 3a 所示,DAPI 染色所代表的细胞核确实主要位于细胞中央区域。

## 2.3 钙离子荧光探针 fluo-3 指示的粟酒裂殖酵母细胞内钙离子浓度分布

与 YC2.1 钙离子敏感蛋白所反映的胞内游离  $\text{Ca}^{2+}$  的荧光分布不同,应用 fluo-3 染色的裂殖酵母细胞,由于 fluo-3 进入到细胞器,所以细胞的内部区域显示高的钙离子荧光信号,而在周缘的胞质区相对较弱(图 4a)。

## 2.4 细胞分裂过程中胞内钙离子的分布

利用构建好的表达系统观察细胞分裂过程中钙离子浓度的分布变化,我们发现,当细胞横隔出现时,在横隔附近显示的钙离子浓度较高(图 5a),这提示钙离子浓度的升高可能与细胞分裂过程有关。

## 3 讨论

YC2.1 蛋白是 Miyawaki 等<sup>[9]</sup>研发出来的由基因编码的测钙荧光蛋白,代表了最新测量细胞钙离子浓度变化和准确定位的技术和思路,在短短的 5 年时间里被广泛应用到植物细胞、神经细胞等领域,显示了与传统测钙荧光探针无可比拟的优点<sup>[9,10,15]</sup>。YC2.1 基因由完整 CaM 基因和 M13 基因通过 GLY-GLY 连接子拼在一起的主干,加上两侧串连的荧光供体和受体 ECFP/EYFP 基因组成。它与传统的测钙荧光探针的不同在于它是由基因编码并受到严格定位控制的最新比例法测钙“探针”。由于严格的定位控制,它的使用避免了传统的测钙荧光探针如 Fura-2、Fluo-3 等带来的不可避免的房室化结果,从而可以克服细胞器游离钙对测定的干扰<sup>[6,7]</sup>。应用 YC2.1 蛋白的研究表明,裂殖酵母胞内钙离子呈细

胞的周缘胞质高分布,而在细胞内部钙离子浓度相对低一些,这与 fluo-3 染色的裂殖酵母细胞呈现的细胞内部区域高的荧光信号完全不同。DAPI 核染色实验证明,DAPI 染色所代表的细胞核主要位于细胞中央区域,而已有文献也早就指出酵母细胞中间区域主要被细胞核、内质网、线粒体、液泡等一些细胞器所填充<sup>[6]</sup>,因此 fluo-3 指示的裂殖酵母胞内钙离子的分布不能真实反应胞质钙离子的分布,与我们先前所报道的水霉菌丝中存在的情况一样,fluo-3 给出的是细胞质和细胞器游离  $\text{Ca}^{2+}$  浓度总的分布信息<sup>[8]</sup>。显然利用重组表达钙离子敏感蛋白代表的活体内测定钙离子方法优于以 fluo-3 为代表的钙离子荧光探针的方法,能够比较真实地反映细胞内游离钙的分布情况。另外,本研究表明,当细胞横隔出现时,在横隔附近 YC2.1 显示的钙离子浓度较高。这提示可能与细胞分裂过程有关,但是需要进一步的实验证明。

## 参考文献 (References)

- [1] Lu KP *et al.* *Endocr Rev*, 1993, **14**: 40
- [2] Takuwa N *et al.* *Cell Signal*, 1995, **7**: 93
- [3] 陆玲等. *菌物系统*, 2001, **20**: 347
- [4] 鲁仲谋等. *菌物系统*, 1998, **17**: 233
- [5] 陆玲等. *南京农业大学学报*, 2000, **23**: 53
- [6] Poenie M *et al.* *Science*, 1986, **233**: 886
- [7] Tang S *et al.* *Cell Calcium*, 1990, **11**: 425
- [8] 袁生等. *实验生物学报*, 1995, **28**: 263
- [9] Miyawaki A *et al.* *Nature*, 1997, **388**: 882
- [10] Miyawaki A *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**: 2135
- [11] Allen GJ *et al.* *Plant J*, 1999, **19**: 735
- [12] Yu R *et al.* *J Biol Chem*, 2000, **275**: 23648
- [13] Facanha AL *et al.* *J Cell Biol*, 2002, **157**: 1029
- [14] Maundrell K *et al.* *J Biol Chem*, 1990, **265**: 10857
- [15] Tsien RY. *Annu Rev Biochem*, 1998, **67**: 509
- [16] Robinnow CF *et al.* *General cytology of fission yeasts*. In: Nasim A *et al.* (eds.) *Molecular Biology of the Fission Yeast*, London: Academic Press, 1989, 274

## The Intracellular Distribution of Ca<sup>2+</sup> in *Schizosaccharomyces pombe* Shown by Cameleon Calcium Indicator YC2.1

Shao-Hui Wang<sup>1,2</sup>, Sheng Yuan<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>Jiangsu Key Laboratory for Bioresource Technology; <sup>2</sup>The Key Laboratory of Microbiol Technology,  
College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China )

**Abstract** We transformed the recombinant yellow cameleon 2.1 (YC2.1) gene into the *Schizosaccharomyces pombe* and observed the distribution of free calcium concentration in the cytoplasm shown by expressed YC2.1. The results showed that the calcium fluorescence ratio of YC2.1 appeared mainly around the peripheral area of the cytoplasm in the fission yeast cell, less in the center area of the cytoplasm in which occupied by the organelles and nuclear. In contrast, the calcium fluorescence of fluo-3 was higher in the center of the cytoplasm not than around the peripheral area of the cytoplasm because fluo-3 was sequestered into organelles in the cell. Therefore, fluo-3 could not reflect the true distribution of calcium in the cytoplasm. Our data provided that the recombinant yellow cameleon calcium indicator is better than the traditional chemical fluorescence indicator fluo-3 for measuring of free calcium in cytoplasm, and will promote studying of distribution and role of intracellular calcium in yeast cell proliferation.

**Key words** *Schizosaccharomyces pombe*; yellow cameleon 2.1; free calcium; fluo-3

Received: December 30, 2004 Accepted: May 16, 2005

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30170474)

\*Corresponding author. Tel: 86-25-83598790, Fax: 86-25-83598723, E-mail: shengyuan@email.njnu.edu.cn