

双分子荧光增强法实时观察烟草BY2 细胞内Ca²⁺信号转导

翟翔 赵燕 曹哲 高晗 徐茂盛 黄妤

黄丽华 陈金军 张学文*

(湖南农业大学生物科学技术学院, 长沙 410128)

摘要 钙离子作为第二信使是细胞信号转导的重要成员,也是细胞信号转导研究的重要对象。为了更有效地实时观察植物细胞中的钙离子信号,将响应钙离子的水母素(aequorin, *AEQ*)基因转化到已由绿色荧光蛋白(GFP)标记的分泌载体膜蛋白SCMP2(secretive carrier membrane proteins 2)的烟草BY2细胞(SCAMP2-GFP)。经过对转化细胞的筛选和分子检测,获得了双价转化的BY2细胞株。转化细胞经腔肠素处理并实时显微观察,能较清晰地观察到细胞中钙离子响应的荧光信号,水母素单价转化细胞则几乎观察不到荧光信号,说明水母素响应钙离子并作用于腔肠素所发弱荧光能进一步激发GFP荧光,使弱荧光有效增强。尽管响应钙离子的双价自激发荧光较利用外施激发光对GFP的激发荧光稍弱,但已能满足在显微镜下直接观察和采集信号的荧光强度,实现对细胞内钙离子的实时观察。通过拍照采集钙离子响应的荧光图像,在3倍于外激发的曝光时间条件下获得清晰的荧光图片。以上结果证明了双价标记法能有效地实时观察细胞的钙离子信号。对应于Aequorin与GFP融合表达的体系,双价转化法还能利用GFP不同亚细胞内定位的特定蛋白标记,对亚细胞水平的不同部位开展钙离子信号研究,体现出其优势。

关键词 钙离子; 信号转导; 实时观察

A Fluorescence Enhancement Method for Real-Time Observation of Ca²⁺ Signaling Transduction in BY2 Cells

Zhai Xiang, Zhao Yan, Cao Zhe, Gao Han, Xu Maosheng, Huang Yu,

Huang Lihua, Chen Jinjun, Zhang Xuewen*

(College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract Calcium ion as the second messenger is an important member of cell signal transduction and is also a focused object of cell signal transduction research. It is meaningful to develop a method more sensitive and dynamical for real-time observation of calcium ion signal in plant cells to study the cellular signal transduction. In this paper, the gene of a calcium ion responsible aequorin (AEQ) original from jellyfish was transformed into tobacco BY2 (bright yellow 2) cell that was SCMP2 (secretive carrier membrane proteins 2) labeled with green fluorescent protein (SCAMP2-GFP). The bivalent transgenic BY2 cell lines were screened out and verified. The calcium ions response real-time fluorescence signal in the cells was clearly observed

收稿日期: 2018-05-18 接受日期: 2018-09-13

湖南省研究生科研创新项目(批准号: CX2016B296)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0731-84673602, E-mail: xwzhang@hunau.edu.cn

Received: May 18, 2018

Accepted: September 13, 2018

This work was supported by Hunan Graduate Research Innovation Project (Grant No.CX2016B296)

*Corresponding author. Tel: +86-731-84673602, E-mail: xwzhang@hunau.edu.cn

网络出版时间: 2018-10-26 11:11:22

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20181026.1111.014.html>

when the transformed cells were treated with coelenterazine and subjected to light microscopic observation. It indicated that the weak fluorescence, released by coelenterazine of AEQ response the Ca²⁺, could further stimulate GFP fluorescence and make the weak fluorescence converted into enhanced GFP green fluorescence. It made the real-time observation of calcium in plant cell more activity. The fluorescence strength had been able to satisfy the direct observation and acquisition signal under microscope although the green fluorescence is a bit weak comparing with the GFP direct excitation. A clear calcium response fluorescence image was obtained at three times the exposure time of external excitation with the same cell. The bivalent enhance methods possess its advantages that it enable research on calcium signal in identical subcellular localization if label some identical protein markers with GFP.

Keywords Ca²⁺; signal transduction; real-time analysis

钙离子(Ca²⁺)是细胞内进行信号转导的第二信使, 动态调节着细胞内的多种信号转导过程, 对细胞中酶或蛋白的活性、细胞骨架与运动、细胞膜泡运输、细胞电信号传递以及基因的表达调控等过程都起着重要的调节作用^[1]。近几十年来, 钙信号一直是细胞和分子生物学的重点对象, 从原核生物到真核生物, 从组织到整个生物体的研究, 人们对钙信号的认识及其相应的生理现象的了解都有显著增长^[2]。

在植物中, 细胞的膜系统将钙离子加以隔离, 形成了不同的浓度分布^[3]。细胞具有外高内低的钙离子浓度。在植物细胞的胞质中, 钙浓度[Ca²⁺]_{cyt}维持在很低的纳摩尔级的浓度范围[(1~2)×10⁻⁷ mol/L], 但在细胞膜外周、细胞器、液泡或一些囊泡中则可达到微摩尔甚至毫摩尔级的浓度(10⁻⁶~10⁻³ mol/L)^[4], 具有千倍的极差。内源信号和外部的生物与非生物的应激作用都会导致细胞内的钙浓度瞬时变化, 这种变化会激活下游相应信号的级联反应^[5], 实行对信号的快速转导。由于钙信号作用的特点, 研究细胞内钙信号需要在时空上监测细胞中浓度的动态变化, 才能直观了解该信使的作用过程。因此, 研究细胞内的钙信号, 很大程度地依赖开发出精确的测量或显示方法。

在细胞内钙离子研究中, 学者先后开发出了染色法、荧光探针法、水母素法、荧光蛋白法等多种方法^[6-8]。早期利用氧化亚氮等含氮染料对钙离子作用的显示反应来观察细胞钙离子分布, 这种方法灵敏度低、需要固定细胞, 不适用于对活细胞的观察; 此后采用合成染料的染色法提高了灵敏度和响应性, 但用于对活细胞的观察仍比较困难^[9]。Palmer等^[10]开发了钙离子指示荧光染料Quin2、Fura-2和

Fluo-5N等, 这些荧光染料对钙离子的有效指示范围为: 1.1×10⁻⁷~9×10⁻⁵ mol/L。虽然这些荧光染料的应用使细胞钙离子信号研究得以突飞猛进发展, 但这种方法也不是很适合实时性研究。

利用响应钙离子或结合钙离子调控其活性的酶或蛋白质, 有望开发出细胞实时钙离子研究的工具^[11]。从水母中分离的水母素AEQ(aequorin)是一种响应钙离子的荧光素酶, 在消耗ATP情况下通过对腔肠素coelenterazine的氧化而释放出蓝色荧光(λ=469 nm)^[12]。研究报道, 将AEQ的基因克隆转化到细胞中表达, 实现了对钙离子的实时研究^[13]。但AEQ响应钙离子后的荧光信号较弱, 需要高灵敏度的光感装置采集信号, 并不适合对细胞的直接观察。基于AEQ的高灵敏度发光记录系统被开发出来后, 对转AEQ拟南芥植株的Ca²⁺时空动力学研究, 在植物胁迫的钙信号转导方面取得了富有成效的研究成果^[14]。此外, Miyawaki等^[15]利用结合钙离子的钙调蛋白与荧光蛋白的嵌合, 开发出了基于荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)原理的嵌合式钙离子响应荧光蛋白探针Cameleon、Camgaroos及Pericams。进一步改进开发出来的YC3.6、GCaMP等已经广泛运用于植物中保卫细胞、根及根毛、花粉管及亚细胞结构的钙离子实时研究^[16]。

荧光发射波长为530 nm的GFP, 其细胞标记观察所用激发光为450~490 nm, 与腔肠素发射波长469 nm重叠^[6]。我们利用AEQ对钙离子的响应和腔肠素释放荧光可以再激发GFP的荧光增强原理, 将AEQ转化到已将细胞膜标记了GFP的烟草BY2细胞, 利用二价转化的双分子荧光增强法得到了钙离子响应增强的荧光信号, 能较好满足活细胞中对钙离子的实时研究。

1 材料与方法

1.1 材料

菌株和载体及植物材料: 大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 、农杆菌LBA4404菌株及植物表达载体pWM101均由本实验室保存。克隆载体pMD18-T购自TaKaRa公司。GFP-SCAMP2膜泡标记的烟草BY2转化细胞系由本实验室培养保存。

Trizol试剂购自Invitrogen公司。各种限制性核酸内切酶、反转录试剂盒、T4连接酶购自Fermentas公司。DNA分子量标准Trans2KTM、PlusDNA Marker、dNTPs、Taq酶均购自TransGen Bio-tech公司。通用质粒小量提试剂盒购自康为生物技术有限公司。DNA胶回收试剂盒购自Bioteke公司。吡啶-3-乙酸购自Sigma公司。

BY2细胞用MS1培养基和MS2培养基培养。MS1培养基配方为: 4.43 g/L MS盐+100.0 mg/L肌醇+200.0 mg/L磷酸二氢钾+1.0 mg/L盐酸硫胺素(VB1)+0.2 mg/L 2,4-D+2.0 mg/L甘氨酸+30.0 g/L蔗糖, pH5.8。MS2培养基配方为: 4.43 g/L MS盐+100.0 mg/L肌醇+200.0 mg/L磷酸二氢钾+1.0 mg/L盐酸硫胺素(VB1)+2.0 mg/L甘氨酸+30.0 g/L蔗糖, pH5.8。

细胞的悬浮培养用250 mL烧瓶加入100 mL的上述培养液, 水平摇床80 r/min, 28 °C恒温摇床培养。固体平板培养则在上述培养基中加入0.8% Phytagar, 高温高压消毒后倒培养皿, 接种细胞后置28 °C恒温培养箱培养。

1.2 引物

实验所用引物均由北京六合华大基因科技有限公司合成。Primer1: 5'-GCC CCG GGC ATG GAG TCA AAG ATT CAA ATA GA-3'; Primer2: 5'-GCT CTA GAT TAG GGG ACAGCTCCACCGTAG AG-3'。分别引入了*Sma* I和*Xba* I的酶识别序列作为克隆时的酶切位点。

1.3 方法

1.3.1 *AEQ*(aequorin)基因的克隆 *AEQ*基因从转*AEQ*的拟南芥中提取, 该基因已根据植物中有效表达*AEQ*进行了密码子优化。Trizol法提取表达*AEQ*的拟南芥总RNA, 按照反转录试剂盒说明进行反转录, 获得cDNA。设计扩增*AEQ*基因的引物, 并引入酶切位点。常规PCR反应扩增的PCR产物连接pMD18-T载体, 热激法转入大肠杆菌DH5 α , 阳性克

隆经菌落PCR检测和酶切检测后, 送北京六合华大基因科技有限公司测序。

1.3.2 表达载体的构建 用PCR的方法, 以测序结果正确的pMD18-T-*AEQ*克隆载体为模板进行PCR扩增, 产物纯化后用*Pst* I和*Xba* I双酶切。再与同样双酶切处理的表达载体pWM101连接, 将*AEQ*基因克隆在35S启动子下游。获得pWM101-35S::*AEQ*表达载体。

1.3.3 BY2细胞的转化 先将pWM101-*AEQ*基通过电击法将表达载体转入农杆菌LBA4404, 以液体继代培养3次的GFP-SCAMP2膜泡标记的烟草BY2转化细胞系^[17]为转化受体, 根癌农杆菌共培法转化35S::*AEQ*基因, 在含潮霉素(Hyg 30.0 mg/L)和草铵膦(Ppt 10.0 mg/L)的固体平板MS进行筛选。待抗性细胞团长出后, 转移至新的MS1培养基上二次筛选。选取4~5个二次筛选后生长较好的细胞团, CTAB法提取细胞总DNA进行PCR检测, 得到转化的细胞系。

1.3.4 转基因BY2细胞系的处理及显微观察 将转化细胞系以7天为一个周期在MS1液体培养基中继代培养3次。取第3次继代培养3~4天的悬浮细胞(对数期细胞), 800 r/min低速离心10 min, 收集细胞, 再以MS2悬浮细胞沉淀。26 °C、80 r/min摇瓶暗培养12 h左右, 经50目细胞筛过滤收集滤液, 后以800 r/min离心5 min, 收集细胞, 细胞沉淀重悬于4 mL MS2培养基中。细胞液直接铺片、在铺片时加入腔肠素10 μ L(5 μ mol/L), 显微观察和拍照记录荧光信号。

使用图像分析软件Image J进行荧光强度定量分析。在细胞荧光图选定区域操作界面选择分析, 然后绘制属性, 得到荧光强度定量分析图。

在细胞悬浮液腔肠素浓度分别为1.0 μ mol/L、5.0 μ mol/L、10.0 μ mol/L时观察BY2细胞, 进行对比, 得出最佳腔肠素处理浓度。

细胞外Ca²⁺及乙醇处理对细胞内Ca²⁺响应荧光的影响。分别使用去离子水悬浮细胞(无细胞外Ca²⁺)、MS悬浮细胞(含细胞外Ca²⁺)、5%乙醇处理MS悬浮细胞(乙醇可以阻断Ca²⁺跨膜转运)、EGTA(5.0 mmol/L)处理MS悬浮细胞、LaCl₃(5.0 mmol/L)处理MS悬浮细胞, 对比观察细胞Ca²⁺响应荧光信号的影响。EGTA、LaCl₃处理浓度参照张宗申等^[20]的方法。

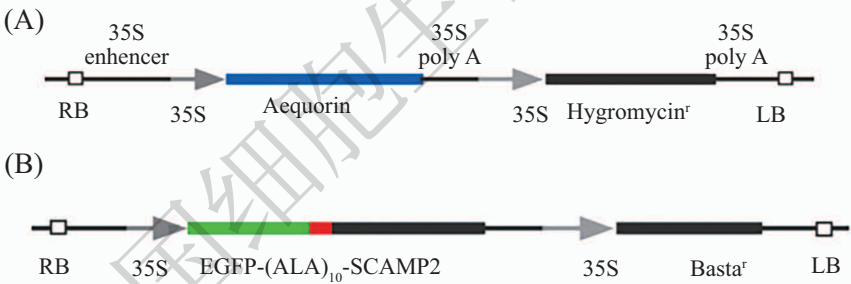
2 结果

2.1 基因的克隆与检测

菌落PCR及酶切检测均得到目的大小的分子条


```
1 ATGACCAGCGAACAACTACTCAGTCAAGCTTACACCAGACTTCGACAAACCAAAATGGATT
1 M T S E Q Y S V K L T P D F D N P K W I
61 GGACGACACAAGCACATGTTTAAATTTCTTGATGTCAACCACAATGGAAGGATCTCTCTT
21 G R H K H M F N F L D V N H N G R I S L
121 GACGAGATGGTCTACAAGGCGTCCGATATTGTTATAAACAACTCTGGAGCAACACCTGAA
41 D E M V Y K A S D I V I N N L G A T P E
181 CAAGCCAAACGTCACAAAGATGCTGTAGAAGCCTTCTTCGGAGGAGCTGGAATGAAATAC
61 Q A K R H K D A V E A F F G G A G M K Y
241 GGTGTAGAACTGAATGGCCTGAATACATCGAAGGATGGAAGAACTGGCTTCCGAGGAA
81 G V E T E W P E Y I E G W K R L A S E E
301 TTGAAAAGGTATTCAAAAACCAAACTCACACTTATTCGTTTATGGGGTGATGCATTGTTTC
101 L K R Y S K N Q I T L I R L W G D A L F
361 GATATCATTGACAAAGACCAAAATGGAGCTATTTCACTGGATGAATGGAAGCATAACACC
121 D I I D K D Q N G A I S L D E W K A Y T
421 AAATCTGCTGGCATCATCCAATCGTCAGAAGATTGCGAGGAAACATTGAGAGTGTGCGAT
141 K S A G I I Q S S E D C E E T F R V C D
481 ATTGATGAAAGTGGACAGCTCGATGTTGATGAGATGACAAGACAACATTTAGGATTTTGG
161 I D E S G Q L D V D E M T R Q H L G F W
541 TACACCATGGATCCTGCTTGCGAAAAGCTCTACGGTGGAGCTGTCCCTAA
181 Y T M D P A C E K L Y G G A V P *
```

图1 *AEQ*基因cDNA及其编码的AEQ酶
Fig.1 The *AEQ* gene cDNA sequence and it encoding AEQ protein



A: pWM101-35S::AEQ; B: pEGAD-35S::EGFP-SCAMP2.
图2 BY2细胞转化Ti质粒pWM101-35S::AEQ及SCAMP2-GFP标记载体pEGAD-35S::EGFP-SCAMP2的T-DNA区结构图
Fig.2 The T-DNA structure of pWM101-35S::AEQ and SCAMP2 labeled vector pEGAD-35S::EGFP-SCAMP2

带, 并对克隆获得的*AEQ*基因测序。序列编码区全长为588 bp, 与目标*AEQ*基因cDNA序列一致并能编码一个196 aa的AEQ酶(图1)。

2.2 载体构建与检测

菌落PCR及酶切检测结果表明, 上述*AEQ*分子重组到了pWM101的35S启动子下游, pWM101-35S::AEQ表达载体构建正确。BY2的膜泡标记是将适应植物表达改良的GFP(EGFP)与烟草分泌载体膜结合蛋白(SCAMP2)进行融合, EGFP融合在SCAMP2的N-端。*AEQ*的植物表达载体为pWM101, 基因插入在载体的35S启动子下游, 转化选择标记为潮霉素; SCAMP2的GFP标记载体为pEGAD,

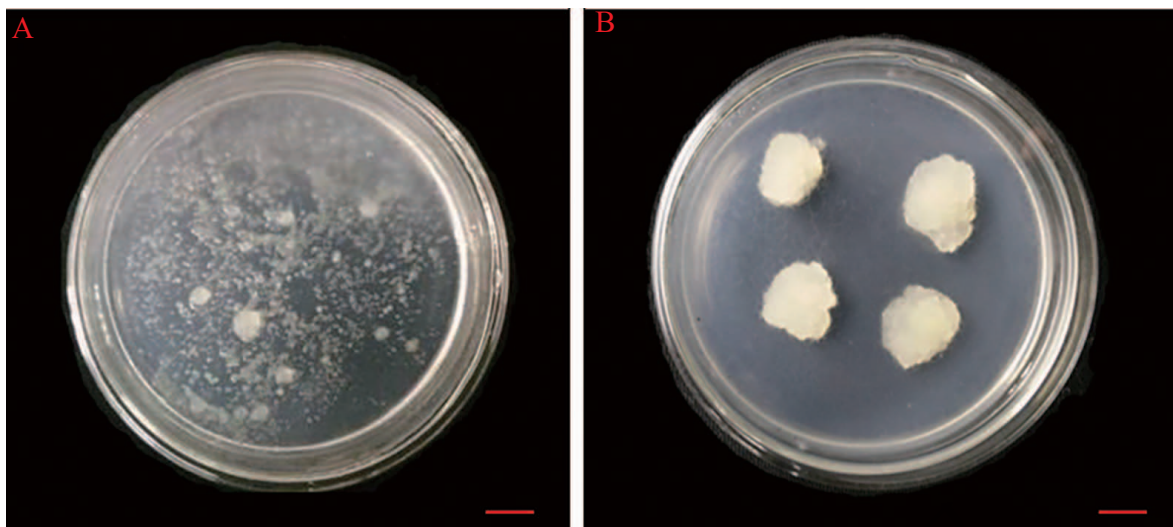
SCAMP2整合在GFP的羧基端, 转化选择标记为草铵膦抗性(图2)。

2.3 BY2细胞的转化

农杆菌侵染受体BY2细胞, 铺板抗性筛选3周左右, 平板上长出了亮黄饱满、表面湿润的新的细胞团突起。夹取长出的细胞团至新的培养基上二次筛选, 10天后生长迅速的细胞团(图3)经过PCR鉴定为双价转化细胞。

2.4 荧光观察及Ca²⁺实时分布分析

将转化的BY2细胞进行显微观察, 在细胞经过腔肠素处理后, 在普通光学显微镜下就能观察到绿色荧光信号(图4A1), 不经腔肠素处理则观察不到荧

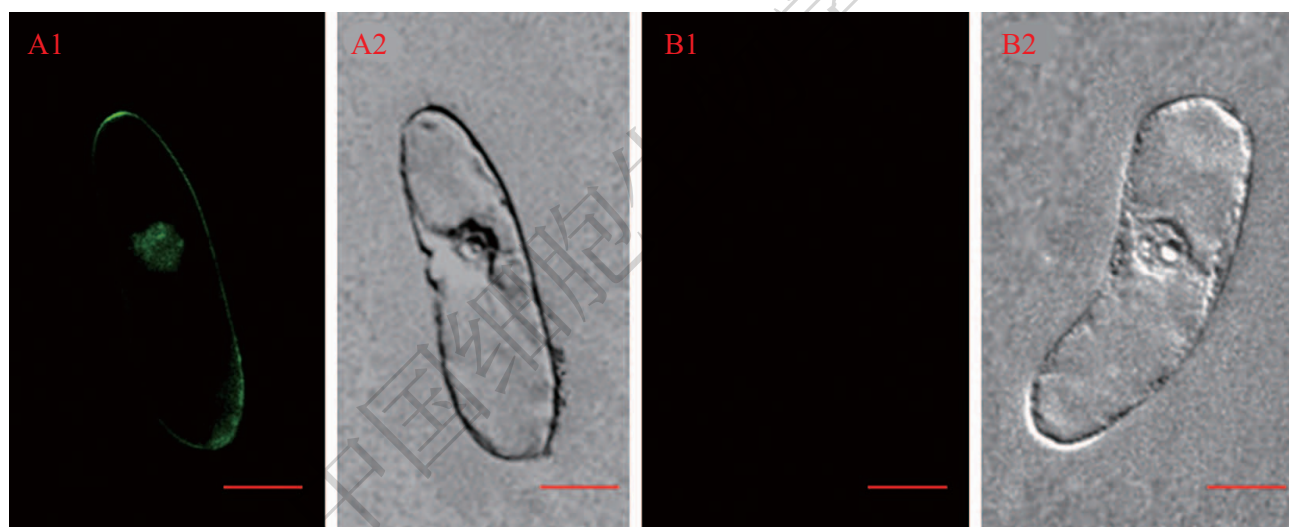


A: 在选定的培养基上筛选转化细胞; B: 转化细胞团; 标尺=10 mm。

A: the screening of transformed cell on selected media; B: transforming cell callus; bars=10 mm.

图3 转化BY2细胞的抗性筛选

Fig.3 The resistance screening of transformed BY2 cells



A1: 腔肠素处理后普通光学显微观察的荧光; A2: 同一(A1)细胞的微分干涉观察; B1: 未加腔肠素细胞无荧光信号; B2: 同一(B1)细胞的微分干涉观察。标尺=20 μm。

A1: the fluorescence under normal optical microscopy after coelenterazine treatment; A2: the differential interference (DIC) observation of the same cell; B1: there was no fluorescence signal in the cell without coelenterazine treatment; B2: the same cell of B1 under DIC. Bars=20 μm.

图4 二价转化BY2细胞的显微观察

Fig.4 The microscope observation of bivalent transformed BY2 cell

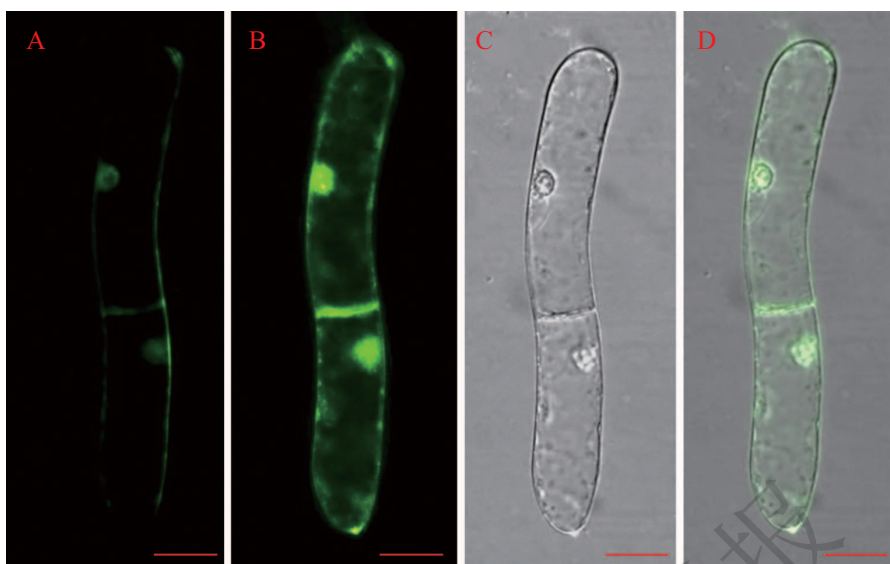
光信号(图4B1)。以上结果说明, AEQ对 Ca^{2+} 响应作用于腔肠素的荧光信号进一步激发了GFP荧光。

GFP在外源激发光作用下, 能发出较强的绿色荧光。因此, 通过外源激发和腔肠素处理后AEQ酶响应的荧光观察, 比较了两种条件下的荧光强弱。二价转化细胞在荧光显微镜下观察GFP外激发的荧光强度, 与非外源激发状态下 Ca^{2+} 响应荧光对照, 外

源激发所发荧光相对较强(图5)。

尽管钙离子响应荧光相对外激发稍弱, 但在显微照相3倍曝光时长时, Ca^{2+} 响应荧光的强度可以达到GFP的外激发荧光相近的强度(图6)。利用软件对箭头所指断面进行荧光强度定量, 得到图6中C、D的结果, 说明两者强度较一致。

采用腔肠素作为AEQ底物, 我们比较分析了

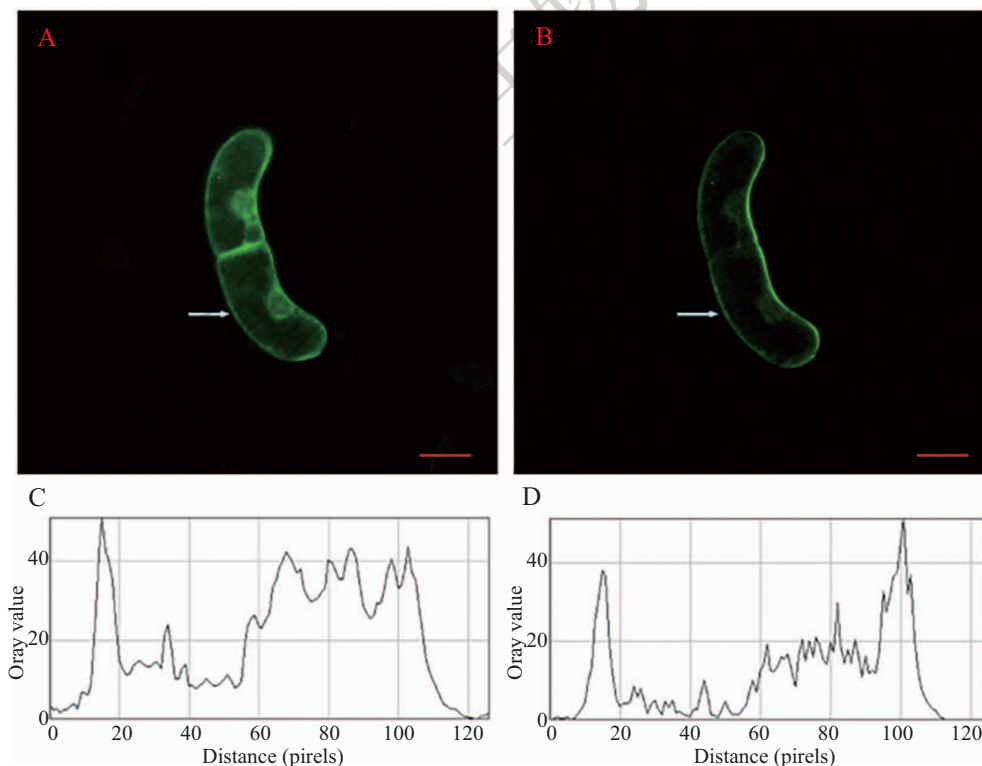


A: AEQ响应 Ca^{2+} 后激发的GFP荧光; B: 同一细胞紫外激发的GFP荧光; C: 同一细胞的DIC; D: B、C叠加图。标尺=20 μm 。

A: the Ca^{2+} response by coelenterazine excited GFP fluorescence; B: the UV excitation of GFP fluorescence with the same cell; C: DIC of the same cell; D: merge of B and C. Bars=20 μm .

图5 外激发GFP荧光与 Ca^{2+} 响应荧光的比较

Fig.5 The fluorescence strength comparison of GFP by UV excitation and Ca^{2+} response

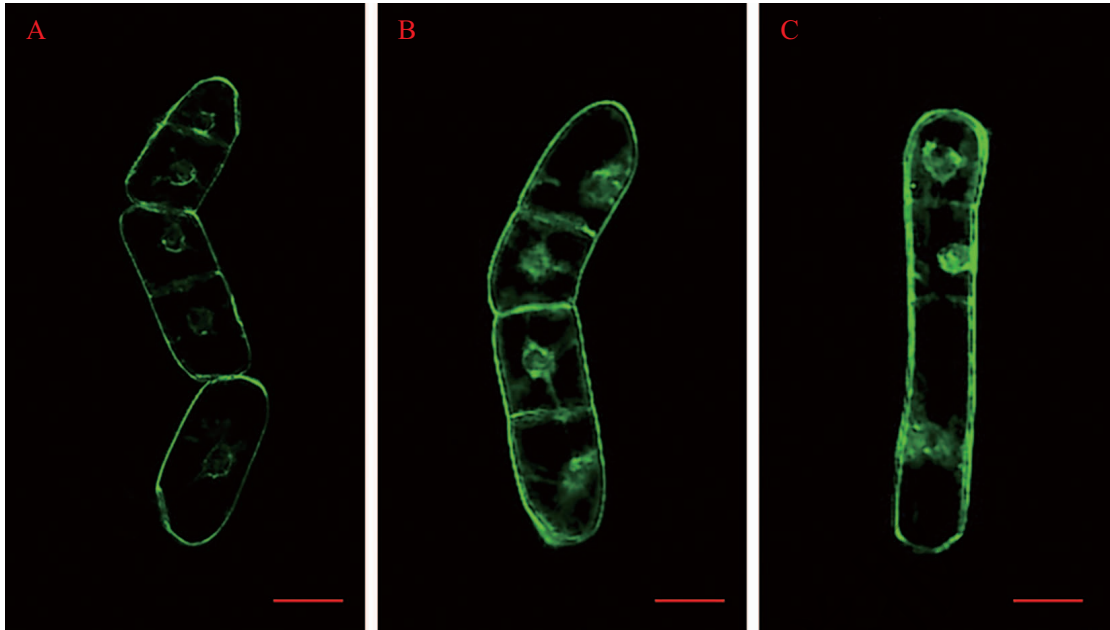


A: 外激发GFP荧光, 曝光时间3 s; B: 同一细胞非外激发 Ca^{2+} 响应荧光, 曝光时间10 s; C: 图A箭头处的荧光定量分析; D: 图B箭头处的荧光定量分析。标尺=20 μm 。

A: the picture of external excitation GFP fluorescence, exposure time 3 s; B: the picture of Ca^{2+} response fluorescence in exposure time of 10 s were observed in the same cell; C: fluorescence quantitative analysis of area indicated by the arrow in figure A; D: fluorescence quantitative analysis of area indicated by the arrow in figure B. Bars=20 μm .

图6 外激发GFP荧光与非外激发 Ca^{2+} 响应荧光的比较

Fig.6 The external excitation of GFP fluorescence and non-external excitation Ca^{2+} response fluorescence comparison



A: 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 腔肠素; B: 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 腔肠素; C: 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 腔肠素。标尺=20 μm 。

A: 1.0 $\mu\text{mol/L}$ coelenterazine; B: 5.0 $\mu\text{mol/L}$ coelenterazine; C: 10.0 $\mu\text{mol/L}$ coelenterazine. Bars=20 μm .

图7 腔肠素浓度对二价转化标记BY2细胞钙离子响应信号的影响

Fig.7 The coelenterazine concentration effect on calcium response signal of BY2 cells of bivalent transformation

腔肠素底物浓度对荧光信号的影响。结果表明,当腔肠素浓度较低(1.0 $\mu\text{mol/L}$)时荧光信号较弱,说明底物浓度过低影响了钙离子响应的荧光效果(图7A)。腔肠素浓度为5.0 $\mu\text{mol/L}$ 时已能得到足够的荧光信号(图7B)。腔肠素浓度为10.0 $\mu\text{mol/L}$ 时荧光强度略有增强,但细节表现则下降(图7C)。因此以5.0 $\mu\text{mol/L}$ 的腔肠素浓度进行后续的实验。

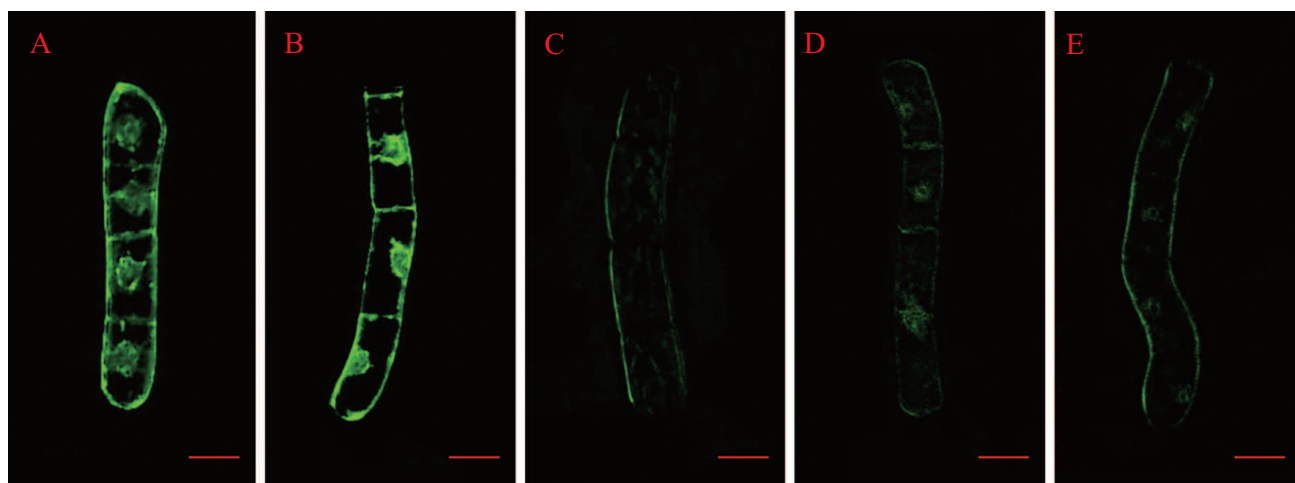
利用乙醇处理阻断细胞钙离子的转运,结合细胞外钙离子的作用对细胞内钙离子响应的分析,在含钙离子的MS液悬浮细胞钙离子响应信号较去离子水中悬浮细胞的钙离子信号强,说明该报告系统有效地响应了钙离子信号。以乙醇、 LaCl_3 处理阻断钙离子转运后,较弱的荧光信号在细胞膜附近,细胞内几乎无钙离子响应信号。以上结果说明,细胞中钙离子信号既存在细胞外向细胞内的运输,也存在细胞内体向细胞质中的转运。这两种转运都受乙醇和 LaCl_3 的阻断。乙醇及 LaCl_3 作为抑制钙离子通道抑制剂,对细胞钙离子信号的影响具有相似性(图8C、图8E)。利用EGTA螯合钙离子后,则在细胞核膜附近具有明显减弱的荧光信号,细胞膜附近的荧光信号更弱(图8D)。EGTA处理细胞使钙离子响应信号明显降低,细胞膜附近的信号较乙醇和 LaCl_3 等钙离子阻断剂的处理更低,表现出了螯合剂与阻断

剂对细胞钙作用的差异性(图8)。

3 讨论

利用AEQ和GFP进行细胞中 Ca^{2+} 的实时研究,可以将AEQ和GFP构建成一个融合的表达载体转化到细胞中表达^[6]。类似于荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)方式的荧光激发模式进行荧光观察,已有效开展了活体细胞钙离子信号的实时观察,显著推动了细胞钙信号转导研究^[18]。

在本研究中,AEQ和GFP则为分别表达。我们先将GFP标记在细胞的膜系统上,然后将AEQ对该标记的细胞进行二次转化。通过AEQ在细胞中表达响应 Ca^{2+} 作用于腔肠素的荧光,能进一步激发与其临近的膜上GFP释放绿色荧光而使荧光信号显著加强。这与FRET不同,并不需要两种荧光蛋白融合,而是利用AEQ在细胞质中的表达,激发与其临近的标记在膜上的GFP。GFP融合SCAMP2标记在细胞的膜系统上,膜泡标记的GFP在外激发的作用下,能释放较强的荧光信号,而且对细胞的质膜、内膜系统及核膜都有良好的标记。在 Ca^{2+} 信号转导的过程中,信号的初始发生就是位于细胞膜附近的 Ca^{2+} 浓度变化,因此在AEQ作用下的荧光信号,能很好地反



A: 去离子水悬浮细胞(无细胞外Ca²⁺); B: MS悬浮细胞(含细胞外Ca²⁺); C: 5%乙醇处理阻断Ca²⁺跨膜转运; D: 5.0 mmol/L EGTA处理细胞; E: 5.0 mmol/L LaCl₃处理细胞。标尺=20 μm。

A: the deionized water suspension cells (no extracellular Ca²⁺); B: MS suspension cells (with extracellular Ca²⁺); C: 5% ethanol treatment blocks Ca²⁺ transmembrane transport; D: 5.0 mmol/L EGTA treats cells; E: 5.0 mmol/L LaCl₃ treats cells. Bars=20 μm.

图8 细胞外钙离子及乙醇、EGTA、LaCl₃处理对细胞内钙离子响应荧光的影响

Fig.8 The intracellular calcium ion fluorescence response to extracellular Ca²⁺ and ethanol, EGTA and LaCl₃ treatment

映出细胞Ca²⁺的快速变化^[19]。

BY2细胞对Ca²⁺的转运, 既存在细胞外向细胞内的转运也存在细胞内体向细胞质的转运。这种转运都是在Ca²⁺泵的作用下实现的, 因为都受到了乙醇、LaCl₃等抑制剂的抑制阻断。

与AEQ与GFP融合表达的体系比较, 对GFP-SCAMP2融合表达的BY2细胞再进行AEQ基因的转化的双价转化法一是能避免GFP与AEQ基因相互干扰; 可以利用GFP与细胞内特定表达区蛋白的融合, 可以将Ca²⁺响应的观察进一步区分到亚细胞水平。因此, 该法相较于融合转化法及FRET的同分子模式也有一定的优势。

参考文献 (References)

- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signaling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000; 1(1): 11-21.
- Bassett JJ, Monteith GR. Genetically encoded calcium indicators as probes to assess the role of calcium channels in disease and for high-throughput drug discovery. *Adv Pharmacol* 2017; 79: 141-71.
- Kanchiswamy CN, Malnoy M, Occhipinti A, Maffei ME. Calcium imaging perspectives in plants. *Int J Mol Sci* 2014; 15(3): 3842-59.
- Dodd AN, Kudla J, Sanders D. The language of calcium signaling. *Annu Rev Plant Biol* 2010; 61: 593-620.
- Batistic O, Kudla J. Analysis of calcium signaling pathways in plants. *Biochem Biophys Acta* 2012; 1820(8): 1283-93.
- Baubet V, Le Mouellic H, Campbell AK, Lucas-Meunier E, Fossier P, Brulet B. Chimeric green fluorescent protein-aequorin as bioluminescent Ca²⁺ reporters at the single-cell level. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(13): 7260-5.
- Rogers KL, Stinnakre J, Agulhon C, Jublot D, Shorte SL, Kremer EJ, Brulet P. Visualization of local Ca²⁺ dynamics with genetically encoded bioluminescent reporters. *Eur J Neurosci* 2005; 21(3): 597-610.
- Shimomura O, Musicki B, Kishi Y, Inouye S. Light-emitting properties of recombinant semi-synthetic aequorins and recombinant fluorescein-conjugated aequorin for measuring cellular calcium. *Cell Calcium* 1993; 14(5): 373-8.
- Goldberg JH, Tamas G, Aronov D, Yuste R. *Calcium microdomains* in aspiny dendrites. *Neuron* 2003; 40(4): 807-21.
- Palmer AE, Tsien RY. Measuring calcium signaling using genetically targetable fluorescent indicators. *Nat Protoc* 2006; 1(3): 1057-65.
- Bonza MC, Loro G, Behera S, Wong A, Kudla J, Costa A. Analyses of Ca²⁺ accumulation and dynamics in the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis* root cells using a genetically encoded Cameleon sensor. *Plant Physiol* 2013; 163(3): 1230-41.
- Tricoire L, Tsuzuki K, Courjean O, Gibelin N, Bourout G, Rossier J, *et al.* Calcium dependence of aequorin bioluminescence dissected by random mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(25): 9500-5.
- Sheu YA, Kricka LJ, Pritchett DB. Measurement of intracellular calcium using bioluminescent aequorin expressed in human cells. *Anal Biochem* 1993; 209(2): 343-7.
- Monshausen GB. Visualizing Ca²⁺ signatures in plants. *Curr Opin Plant Biol* 2012; 15(6): 677-82.
- Miyawaki A, Griesbeck O, Heim R, Tsien RY. Dynamic and quantitative Ca²⁺ measurements using improved cameleons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(5): 2135-40.
- Barberini ML, Muschietti J. Imaging of calcium dynamics in pollen tube cytoplasm. *Methods Mol Biol* 2015; 1242: 49-57.

- 17 柳叶, 王亚红, 黄妤, 陈宗星, 赵燕, 张学文. 植物生长素通过ABP1促进细胞膜泡的外排运输. 中国细胞生物学学报 (Liu Ye, Wang Yahong, Huang Yu, Chen Zongxing, Zhao Yan, Zhang Xuwen. ABP1 mediates auxin accelerating of vesicular exocytosis in plant. Chinese Journal of Cell Biology) 2014; 36(9): 1250-6.
- 18 Mank M, Reiff DF, Heim N, Friedrich MW, Borst A, Griesbeck O. A FRET-based calcium biosensor with fast signal kinetics and high fluorescence change. Biophys J 2006; 90(5): 1790-6.
- 19 Krebs J. The plasma membrane calcium pump (PMCA): regulation of cytosolic Ca^{2+} , genetic diversities and its role in sub-plasma membrane microdomains. Adv Exp Med Biol 2017; 981: 2-21.
- 20 张宗申, 利容千, 王建波. 外源 Ca^{2+} 、 La^{3+} 和EGTA处理对辣椒叶片热激反应的影响. 武汉大学学报(自然科学版)(Zhang Zongshen, Li Rongqian, Wang Jianbo. Effects of Ca^{2+} , La^{3+} and EGTA treatments on the responses of pepper leaves to heat tress. Wuhan University Journal of Natural Sciences) 2000; 46(2): 253-6.

中国细胞生物学学报