

# 细胞内自由钙离子浓度的测定方法

张春光 郑海雷 马建华 赵中秋 (厦门大学生命科学学院 福建厦门 361005)

钙离子不仅是植物生长发育所必需的 1 种大量元素,而且在植物的信号传导中起重要作用。钙离子作为一种第二信使把外源信号(激素、光、重力、温度等)转变成胞内信号,导致一系列胞内事件的发生。大量的研究表明,  $Ca^{2+}$  的信使功能是通过调控细胞内游离  $Ca^{2+}$  浓度来实现的。 $Ca^{2+}$  信号的产生和终止是细胞内  $Ca^{2+}$  增减、波动的结果。因此测定细胞溶质中的  $Ca^{2+}$  浓度是十分重要的。

从理论上讲,测定细胞内  $Ca^{2+}$  浓度的方法应符合如下要求:首先,所使用的  $Ca^{2+}$  指示剂必须对  $Ca^{2+}$  有很强的专一性;其次,是灵敏度高,能够测定低浓度的  $Ca^{2+}$ ;第 3,对  $Ca^{2+}$  水平改变的反应必须比细胞内  $Ca^{2+}$  信号引起的相关生理反应快;第 4,不会破坏细胞内的正常生理生化过程。

$Ca^{2+}$  测定方法有金属铬指示剂法、偶氮胂指示剂法、微电极法、荧光蛋白指示剂法以及钙荧光指示剂法等。下面主要介绍两种常用的方法:荧光蛋白指示剂法和钙荧光指示剂法。

## 1 荧光蛋白指示剂

在 20 世纪 60 年代初,Shimomura 等从多管水母属 (*Aequorea victoria*) 中分离出 1 种钙水母荧光蛋白,该蛋白与  $Ca^{2+}$  结合后,辅基被氧化并发出蓝光。这种蛋白对生物体内  $Ca^{2+}$  的微量变化很灵敏,在  $0.1 \sim 10 \mu\text{mol/L}$  范围内,荧光强度与  $Ca^{2+}$  浓度成正比。

这种蛋白的优点是:发光不需要外加任何底物或辅助因子,仅以蓝色或紫外光照射就能激发其荧光;检测方便,钙水母荧光蛋白发射的荧光很强,且很稳定,用肉眼或荧光显微镜就可以检测到;无毒性,不会影响细胞的正常生长发育;它是一种高负电性蛋白,没有区域化现象,也不会渗出细胞。缺点是:分子量大,必须采用微注射法进入细胞,只能用于大型细胞,而且发

光高峰发生迟缓,比相应生理过程要慢。

目前采用基因工程的方法,改变钙水母荧光蛋白的光谱性质和灵敏度,并将克隆的钙水母荧光蛋白基因导入烟草等植物细胞,并在其中表达,不仅成功解决了人工注射的困难和对细胞的伤害问题,还可进行植物整株各部分细胞  $Ca^{2+}$  测定,而且也可以更加准确的定性、定量测定细胞内  $Ca^{2+}$  浓度。

## 2 钙荧光指示剂

### 2.1 钙荧光指示剂概述

钙荧光指示剂法是目前应用最广泛的,也是较好的测定胞内  $Ca^{2+}$  浓度的方法。这种荧光指示剂对  $Ca^{2+}$  有高度选择性和高亲和力,能够检测低浓度的  $Ca^{2+}$ ,并且应答迅速。根据激发或发射光谱的特征,可将它们分成单波长荧光指示剂和双波长荧光指示剂。

1982 年,加利福尼亚大学的 Tsien 等合成出了第 1 代  $Ca^{2+}$  荧光指示剂,包括  $Quin-1$ 、 $Quin-2$ 、 $Quin-3$ 。其中  $Quin-2$  的准确度较高,对钙的亲和力较高,适于静态细胞钙的测定,但具有对温度敏感、激发波长较短、光稳定性差及离子选择性差等缺点,并且所需的  $Quin-2$  浓度较高,要达到  $0.5 \text{ mmol/L}$  才能高出背景荧光。

1985 年,第 2 代钙荧光指示剂出现,包括  $Fura-1$ 、 $Fura-2$ 、 $Fura-3$ 、 $Indo-1$ ,其中  $Fura-2$  最好。 $Fura-2$  是典型的双激发荧光指示剂,与钙结合后导致荧光光谱移动,当被  $Ca^{2+}$  饱和后,340 nm 处激发荧光强度上升 3 倍,而 380 nm 处激发荧光强度下降 10 倍,340nm~380 nm 的荧光强度比值能够更好的反映  $Ca^{2+}$  浓度,故准确度较高。与  $Quin-2$  相比, $Fura-2$  分子中的咪唑环和噻唑环提高了它的离子选择性和荧光强度。 $Indo-1$  也是典型的双发射荧光指示剂,具有  $Fura-2$  的优点,不同的是 350 nm 激发后的发射峰由游离态时的 485 nm 移至饱和态时的 410 nm,410~480 nm 的荧光比值与  $Ca^{2+}$  浓

后,要充分将细胞吹打均匀;二是要注意低渗时的温度和时间,低渗时离心管需置于  $37^\circ\text{C}$  的水浴箱中,时间不少于 30 min。

3) 固定:低渗处理完后,需加入固定液,固定的目的是对染色体形态进行固定。染色体制备时所用的固定液是用甲醇与冰醋酸按 3:1 的比例配制,固定液需现配。加固定液时,应沿管壁慢慢加入并轻轻吹打均匀,加入太快,会使固定液作用不均匀,染色体出现毛刷状。吹打细胞时,用力要适度,如吹打过重,会导致核型中染色体的丢失或变形。

4) 滴片:采用 0 预冷的冰片滴片。滴片时导致实

验失败的原因有以下几方面:由于细胞悬液太稀,导致滴片时细胞稀少;载玻片上水太多,导致细胞悬液顺着水流失;载玻片不洁净,染色体分散不佳;滴片后,应立即放入  $70^\circ\text{C}$  的烤箱中,以利于细胞的进一步胀开。

总之,细胞培养和染色体制备实验从接种到制片长达 76 h,其中一些步骤同学只能在课余时间完成,整个实验安排必须严谨不能有任何差错。而且细胞培养实验不同于其他实验,步骤多,整体性强,操作要求严格认真,最终实验才会取得成功。

(BH)

度成正比。

第3代钙荧光试剂 Fluo-3, 是典型的单波长指示剂, 它的最大吸收波峰位于 506 nm, 最大发射波长为 526 nm, 可以在远离 340~380 nm 波长范围内测得荧光。Fluo-3 结合  $\text{Ca}^{2+}$  后的荧光强度比游离态的高出 35~40 倍, 从而避免了透镜吸收和细胞自身的荧光干扰。Fluo-3 是一种长波指示剂, 可作为激光共聚焦成像研究以及与其他类型荧光指示剂结合作双标记研究。由于 Fluo-3 的激发波长位于可见光, 光源易找到, 价格便宜, 对  $\text{Ca}^{2+}$  反应灵敏, 目前受到广泛的应用。

## 2.2 测定方法

使用荧光剂测定细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  的过程一般包括荧光剂负载、荧光强度测定和离子浓度计算 3 个步骤。

### 2.2.1 荧光剂负载

目前常用以下方法将荧光指示剂导入细胞。

**孵育法:** 荧光指示剂被酯化后, 很容易跨过质膜进入细胞内。在胞内, 酯形式指示剂被非特异性酯酶水解, 重新与  $\text{Ca}^{2+}$  结合。此法不太适用于植物细胞, 由于其细胞壁中存在酯酶, 荧光指示剂在进入细胞前就被分解了。

**电击法:** 电击法是用高强度的电脉冲, 引起细胞自修复性穿孔, 将游离态的  $\text{Ca}^{2+}$  荧光指示剂导入细胞原生质体。此方法最适于细胞悬液, 但会对细胞造成暂时性的伤害。

**显微注射法:** 显微注射法包括离子微电泳注射和压力注射两种。离子微电泳注射适合于带电荷低分子量指示剂的导入; 压力注射适合于中性或在电场下不移动的荧光指示剂。

**酸导入法:** 此法利用酸性条件下, 指示剂处于不带电荷的非解离状态, 有可能通过细胞膜进入细胞内, 由于细胞质中 pH 较高, 指示剂发生解离, 与细胞质中的  $\text{Ca}^{2+}$  结合。此法对细胞无害, 既适于单个细胞, 也适于悬浮液测定, 还能用于植物细胞。

### 2.2.2 荧光强度的测定

**测定仪器:** 目前常用的有荧光分光光度计、显微荧光光度计、激光共聚焦扫描显微镜以及荧光比率图象技术等。

**影响因素:** 指示剂区域化、荧光衰减或光漂白、酯不完全水解、淬灭剂的干扰以及细胞荧光自身干扰等, 都会影响荧光指示剂测量结果。

## 2.3 离子浓度的计算

对于单波长激发或发射的荧光指示剂, 可按下式计算

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_d (F - F_{\min}) / (F_{\max} - F)$$

式中  $K_d$  为荧光剂与  $\text{Ca}^{2+}$  形成配合物的解离常数,  $F_{\min}$  和  $F_{\max}$  为最小荧光强度和最大荧光强度。校正方法是: 测量最大值时, 用一种  $\text{Ca}^{2+}$  载体 (如: A 23187) 使胞

内  $\text{Ca}^{2+}$  饱和; 测量最小值时, 用荧光指示剂的淬灭剂  $\text{Mn}^{2+}$  淬灭荧光来求得最小值。

而对于双波长的荧光指示剂, 用比值信号来求胞内游离  $\text{Ca}^{2+}$  浓度, 不必校正。用下式计算细胞内游离  $\text{Ca}^{2+}$  浓度

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_d (F_d / F_s) (R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)$$

式中  $K_d$  为荧光剂与  $\text{Ca}^{2+}$  形成配合物的解离常数,  $F_d$  和  $F_s$  分别表示荧光剂没有结合  $\text{Ca}^{2+}$  和被  $\text{Ca}^{2+}$  饱和时在 340~380 nm (对于 Fura-2) 处的荧光强度,  $R$  为实验观察到的荧光比值,  $R_{\min}$  为胞内荧光剂最小量结合  $\text{Ca}^{2+}$  时的荧光比值,  $R_{\max}$  为胞内荧光剂被  $\text{Ca}^{2+}$  饱和时的荧光比值,  $R_{\min}$  和  $R_{\max}$  可通过实验测定。

$\text{Ca}^{2+}$  在细胞功能调节上有重要作用, 为了对其作用机制有更全面的了解, 研究胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的变化是非常重要的。目前由于研究水平的限制, 各种方法都有待完善, 可以预计, 随着测定技术和仪器装置的不断进步, 以及新荧光剂的合成, 一定会有更有效的方法出现。

(BH)

## 酵母菌发酵产生酒精和二氧化碳的简易实验

酵母菌属兼性厌氧真核微生物, 在缺氧时进行酒精发酵, 积累酒精和二氧化碳。那么, 如何通过实验来证明酵母菌在缺氧的条件下, 发酵的产物是酒精和二氧化碳? 现介绍一种简易的实验方法:

**1 酵母菌的培养繁殖** 取一定量的发面 (约乒乓球大小的一团) 放入 200 mL 的烧杯内, 再倒入浓度为 5% 的葡萄糖溶液至烧杯的 100 mL 的刻度处, 用玻璃棒搅拌均匀。盖上培养皿盖后, 放在温暖的地方培养 3~4 h, 以增加菌体数量。

**2 发酵产物制备** 取 1 支较大的试管 (20 mm × 200 mm), 将上述烧杯内的培养液用玻璃棒搅拌后倒入试管中, 倒至约距试管口的 40 mm 处, 塞上带 U 型玻璃管的橡胶塞, 将试管放入 35~37 °C 的水中保温 10 min 左右, 即可进行检验酵母菌发酵的产物。

**3 发酵产物的检测** 检验时, 取一支较小的试管 (15 mm × 15 mm), 注入约 10 mL 澄清的石灰水, 将 U 型玻璃管的另一端开口伸入到该支试管的液面下。注意观察玻璃管内排出气泡情况和澄清石灰水的变化: 起初随着排出气泡的逐渐增大, 在气泡的边缘处出现白雾状混浊; 后来随着气泡的不断排出, 澄清的石灰水即变得混浊。当完成检验好排出的气体后, 打开试管塞, 在管口处便会闻到清香的酒味。从试管内取 1 滴发酵液做成装片, 放在显微镜下观察, 可见大量的酵母菌。由此证明酵母菌发酵产生酒精和二氧化碳。

洪正树 (祁门县第二中学 安徽祁门 245600)

(BF)