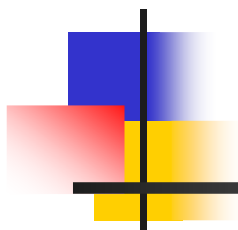


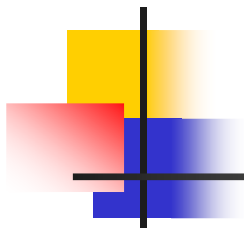
活细胞内钙离子浓度的检测





钙离子—第二信使

- 钙离子在信号传导通路中发挥第二信使作用。
- 在细胞收缩、运动、分泌和分裂等重要活动中，均需要钙离子的参与及调节。
- 钙离子的信使作用是通过其浓度的升高或降低来实现的。
- 细胞内游离钙离子的浓度是 10^{-8} --- 10^{-7} M，比细胞外钙离子浓度低 10^4 --- 10^5 倍，当细胞受到特异性信号刺激后，细胞内钙库（内质网、肌浆网）的钙通道或质膜上的钙通道开放，使细胞内钙离子浓度快速升高，产生钙信号，进而使细胞内某些酶的活性和蛋白质功能发生改变，产生细胞效应。



- 荧光钙离子测定技术发展简史
- 荧光钙离子浓度测定中常用的指示剂
- 荧光钙离子测定常用仪器
- 荧光钙离子测定的原理及具体方法



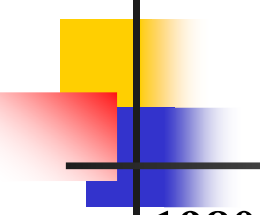
荧光钙离子测定技术发展简史

In 1920s许多学者开始着手进行钙离子浓度的测定。

1962年，**Shimomura**等首次分离出水母蛋白作为钙激活蛋白检测 Ca^{2+} 浓度，但其发光高峰较相应生理过程出现慢，且分子量大，通过细胞膜及在胞浆内扩散的能力较差，难于反映细胞内 Ca^{2+} 浓度的动态变化。

1967年**Ross**使用离子选择性微电极直接测定细胞内 Ca^{2+} 水平，该方法简便，但反应时间长，只能测定静息状态下的 Ca^{2+} 水平。

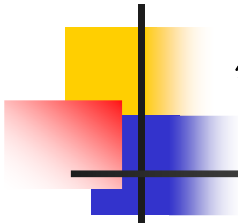
70年代用砷偶氮III（**aresenazoIII**）染色，可定量分析钙离子变化，但用微注射技术将染料注入细胞内，故只能测大细胞的 Ca^{2+} 变化。



1980s, Tsien 和同事合成了一种不需微注射就能进入到细胞的新荧光染料**Quin2**，以后又合成了**Fura-2**、**Indo-1**和**Fluo-3**，这些新的荧光染料被称为**荧光钙探针(Fluorescent probes)**或**钙荧光指示剂(Fluorescent indicators)**，很容易透过细胞膜进入胞内，对 Ca^{2+} 的敏感性高。随着这些试剂的发展，我们能够观察到许多与钙离子浓度变化有密切关系的亚细胞现象。

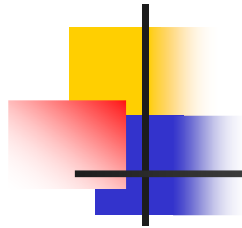
数字式录像显微镜、流式细胞仪、激光共聚焦显微镜和多光子技术等的发展使我们不但能够测定出钙离子浓度的实时变化，还可以得出精确分析的亚细胞水平的细胞内钙离子的空间定位。

目前关于钙离子的研究工作已经从细胞水平分析转移到亚细胞水平的研究。



钙离子浓度测定中常用的指示剂

- 化学荧光指示剂
- 生物发光钙离子指示剂



化学荧光指示剂

化学类荧光探针是应用最为广泛的钙离子示踪剂，对于同样的钙离子浓度变化，它的信号强度变化最强。

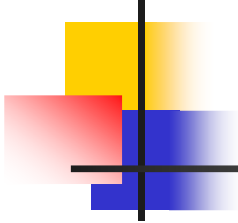


根据不同的分类标准可将其分成不同类:

根据是否能够进行率图(ratiometric)分析将其分为率图类和非率图类, 前者包括Indo1 、 fura2, 后者常用的有fluo3 、 calcium green和rhod 2。

根据其激发/发射光谱将其分为:

- ①蓝光发射组-quin2、 indo1 、 benzothiaza
- ②绿光发射组-fura2 、 fluo3 、 calcium green
- ③黄和橙光发射组-calcium orange 、 calcium crimson
- ④红光和近红外线发射组-- calcium crimson 、 fura red



生物发光钙离子指示剂

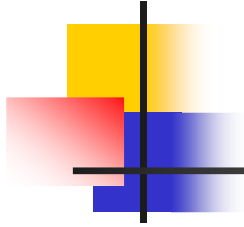
钙离子连接的发光蛋白:生物发光是由生物组织发出的光线，目前设计的几种发光蛋白质主要有aequorin、obelin、clytin、mitrocomin，当存在钙离子时，由于分子内反应，这些发光蛋白质能够发射出可见生物光，它们对仪器设备要求比较低，由于不是激发发光，所以不受荧光漂白的影响，最大缺点是标记和检测生物发光相对困难并很难校准。



绿荧光蛋白基础上的钙离子指示剂

优点：

1)与水母蛋白相比，它们能够进行率测量。2)钙离子依赖性的荧光反应是可逆的，不需要其它的辅助因子。3)与化学荧光探针相比，具有相对高荧光强度和时空分辨率，允许简单的光子探测系统。4) 敏感度或钙离子结合动力学与指示剂的浓度无关。5)如果用显微注射的方法将它们注入细胞，它们只是储留在微注射的部位，它们可以精确定位在细胞内靶细胞器。



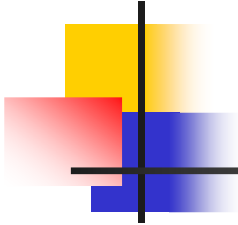
绿荧光蛋白(GFP)基础上的钙离子指示剂的缺点:

它们的荧光强度或率的变化范围较小, 大部分 $R_{\max}/R_{\min} < 2$, 而fura-2和indo1可达到20, fluo 3 的 $F_{\max}/F_{\min} > 100$ 。



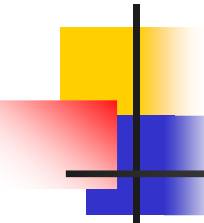
荧光钙离子探针优点

- ①易于进入细胞，为非损伤性测量。
- ②荧光图像分析技术可提供细胞内钙离子分布二维乃至三维图像，可实时显示，空间分辨率优于其他方法。
- ③反应速度快，对于相同浓度钙离子改变，信号变化最强。
- ④能与其他许多先进检测技术联合应用，可同时观察细胞的荧光图像与相差或微分干涉图像，以利于对照观察亚细胞结构并定位。
- ⑤能同时测定两种或多种离子浓度，有利于诸如钠/钙交换蛋白之类跨膜转运机制的研究。



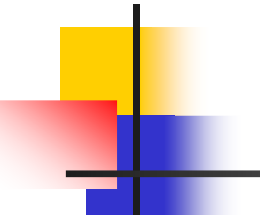
染料标记方法

1 酯标记方法:新一代荧光钙离子探针是由钙螯合剂BAPTA发展而来,有游离酸和乙酰甲氧基酯(acetoxymethyl ester, AM ester)衍生物两种形式。游离酸形式有较强的亲水性,不易透过细胞膜,但能与钙结合并产生荧光强度变化,加上亲脂的AM变成酯化形式。酯化形式的钙荧光指示剂与活细胞一起孵育一定时间后可透过细胞膜进入胞内,胞浆内的酯酶将酯化形式的钙荧光指示剂再水解为游离酸形式,与胞内游离钙结合,可产生荧光强度变化或荧光光谱移动,记录这些改变,依据公式可推算出胞浆内钙离子浓度。



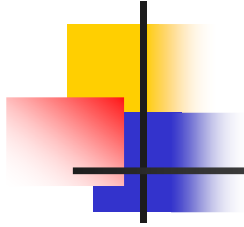
常用某些促分布的药物如一种非离子型表面活性剂PluronicF-127 或Cremophor EL来帮助其通透。

Pluronic F-127是一种非离子型促进分布的药物，能够在生理介质环境中促进大染料分子溶解。如果需要较长的标记时间则需要标记液中加入1mg/ml的牛血清白蛋白（BSA）或1-5%胎牛血清（FCS）来维持合适的渗透压，但FCS有时含有非特异性酯酶能够使AM在进入细胞前已经发生水解。酯标记方法还可标记整个器官(完整的离体心脏)同时保持其生理状态。

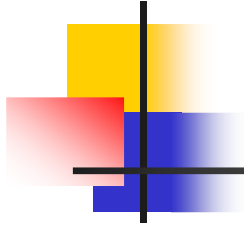


2显微注射: 化学荧光钙离子指示剂并不总是细胞通透的酯类形式, 一些葡聚糖结合物和发光蛋白的分子量太大, 不能通过细胞膜。用这些指示剂标记细胞时, 需要某种特殊的技术。钙离子指示剂溶解在胞浆样溶液中并充满显微注射针, 然后把它直接注入细胞。

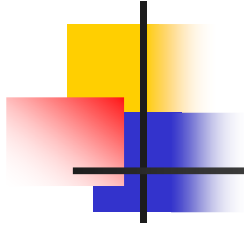
这种方法的优点: 能够把电荷型的指示剂准确地注入胞浆。由于它是侵袭性的, 需要特殊的仪器和一定的实验技术。与AM相比, 被标记的细胞数目也是有限的(最好的显微注射也只能达到100个细胞/小时)。



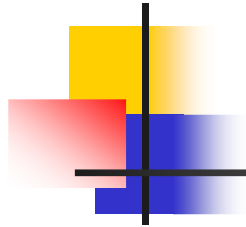
3利用膜片钳技术注射:显微注射技术在大细胞是很有效的, 而细胞较小时, 注射针会损伤细胞。将一些染料通过膜片钳针注入细胞, 如兴奋细胞(神经元, 心肌细胞等), 这种方法不但可以用来测定细胞内钙离子浓度, 并可同时测定膜电位, 记录膜电流。



4 化学标记技术(低钙离子标记)和大量注射：这种方法可同时标记组织器官的许多细胞。组织首先要暴露在低钙离子灌注液中，使胞浆的膜渗透性提高，将含有指示剂的溶液通过一根玻璃针加压注入细胞。然后，灌注液的钙离子浓度不断增加到正常的范围。它的操作比较容易，但可信度没有微注射高。



5通过缝隙连接分布：是将标记钙离子指示剂通过短暂通透的缝隙连接。酶消化后某些缝隙连接处仍保持着它的通透性，部分对外界溶液(indo1)通过缝隙连接弥散进细胞浆。这种方法可轻松标记许多种细胞；标记浓度范围变化大时，需仔细校正并估计细胞内钙离子浓度。



6 ATP诱导的通透性

7 低渗休克处理(HOST)

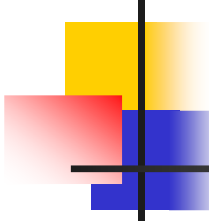
8 重力标记

9 刮除标记

10脂转移标记方法

11融合细胞杂交

12内吞作用和逆行吸收



钙离子浓度的计算

对于单波长激发或发射的荧光指示剂，可按下式计算

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

K_d : 荧光剂与 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

测量最大值时，用一种 Ca^{2+} 促进剂使胞内 Ca^{2+} 饱和；

测量最小值时，用荧光指示剂的淬灭剂 Mn^{2+} 淬灭荧光来求得最小值。



对于双波长的荧光指示剂，用率比值信号来计算细胞内游离Ca²⁺浓度，公式如下：

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

K_d：荧光剂与Ca²⁺形成配合物的解离常数。

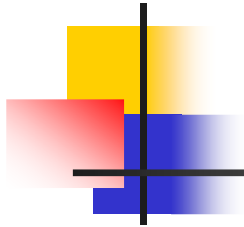
F_d和F_s分别表示荧光剂没有结合Ca²⁺和被Ca²⁺饱和时的荧光强度。

R为实验观察到的荧光比值。R_{min}为细胞内荧光剂最小量结合Ca²⁺时的荧光比值。R_{max}为胞内荧光剂被Ca²⁺饱和时的荧光比值。



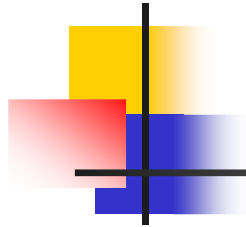
荧光钙离子测定常用仪器

1. 荧光显微镜：利用一定波长的光源照射被检物体，使之受激发产生荧光，然后再经显微镜成像镜检。荧光显微镜可用来分析在单独的完整活细胞中钙离子的分布和功能分子动力学。由于多种细胞内现象中同时可见许多分子的浓度、分布、功能会同时或相应地发生一系列变化，为了估计这些细胞内现象的机制，需要进行多参数分析。一些钙离子指示剂的性质受细胞内环境的影响，因此，多参数分析是很必要的。

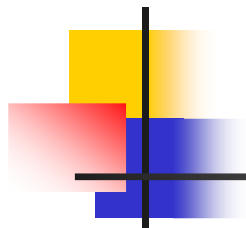


- 1.1 多参数数字式录像显微系统（Multiparameter digitized video microscopy）：

可允许单一活细胞被多种指示剂标记，系统包括带有微分干涉相差的倒置荧光显微镜、CCD相机（照像机或录像机）、可进行图像处理的计算机工作站、氩离子激发灯（汞灯）、控制系统的主计算机、计算机控制下多位置滤光片转化轮用来在激发光路上放置干涉和中性密度滤光片等，同时采集图像，数字化保存每种指示剂特异的相差、DIC和荧光图像，经图像分析和处理系统可以量化分析在单细胞中的不同参数的空间和时间的分布变化。



- 1.2 激光扫描共聚焦显微镜 (Laser Scanning Confocal Microscope, LSCM)
- 1.3 双光子激发的激光扫描显微镜 (Two-photon excitation laser scanning microscopy, TPLSM)
- 1.4 时间分辨-荧光存留时间图像显微镜 (Time-resolved fluorescence lifetime imaging microscopy, TRFLM)



2. 流式细胞仪 (Flow Cytometry, FCM)

3. 荧光分光光度计



荧光钙离子测定的原理及具体方法

- 实验一 荧光分光光度计检测细胞内钙离子浓度
- 实验二 倒置荧光显微镜活细胞钙离子测定系统检测细胞内钙离子浓度
- 实验三 激光共聚焦扫描显微镜检测细胞内钙离子浓度

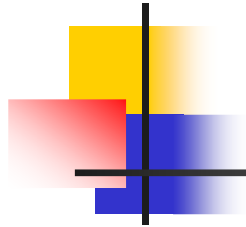
实验一

荧光分光光度计检测细胞内钙离子浓度

Fura-2是第二代 Ca^{2+} 荧光指示剂，具有荧光强度高，与 Ca^{2+} 结合能力强，测定方法简便、灵敏、重复性好等优点。

Fura-2--最大激发波长380nm--最大发射波长510nm

Fura-2/ Ca^{2+} --最大激发波长340nm--最大发射波长510nm



Fura-2因有较强的亲水性，难以进入细胞，在其负性基团部位结合上亲脂的乙酰羟甲基酯成为Fura-2/AM后，与细胞温孵时很容易透过细胞膜，胞浆内的酯酶可将Fura-2/AM水解成Fura-2而滞留在胞浆内，后者与胞内游离的钙离子结合形成Fura-2-钙离子复合物。Fura-2不容易受到光漂白作用的明显影响，在1小时以内测定荧光，都不会由于荧光泄漏和光漂白作用使测定结果产生明显变化。在乙酸甲酯（AM）的水解过程中将产生乙酸和甲醛，当浓度达到5—10uM时，对细胞可以产生明显的酸化和毒性作用。



实验步骤

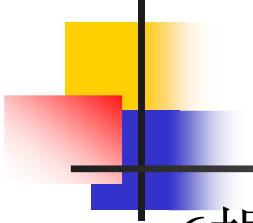
1消化细胞，离心2次。

2加入PBS重悬，调整细胞密度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 。

3加入Fura-2/AM，使其终浓度为 $5 \mu\text{mol/L}$ ，置入 37°C 水浴箱中，避光孵育30~45min。

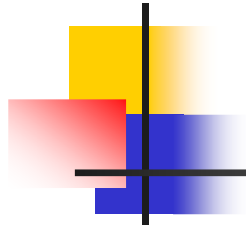
4离心2次。

5加入HBSS溶液（含 CaCl_2 1.5mmol/L ）悬浮细胞，调整细胞密度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$ ， 37°C ，30min（酯化探针充分水解），避光。



6提前20min开机，恒温测钙水浴箱保持37℃。

7使用荧光分光光度计进行检测，激发波长为340 nm和380 nm的激发光交替扫描，检测发射波长为510 nm的发射光的荧光强度。先分别测定340 nm和380 nm激发光所产生的发射光荧光强度，再加入终浓度为0.1%的Triton X-100进行测定，最后加入5 mmol/L EGTA进行测定。



$$\text{【Ca}^{2+}\text{】} = \frac{K_d(R-R_{\min})(F_{2\min}/F_{2\max})}{(R_{\max}-R)}$$

K_d:Fura-2与Ca²⁺结合反应的解离平衡常数,224nmol/L

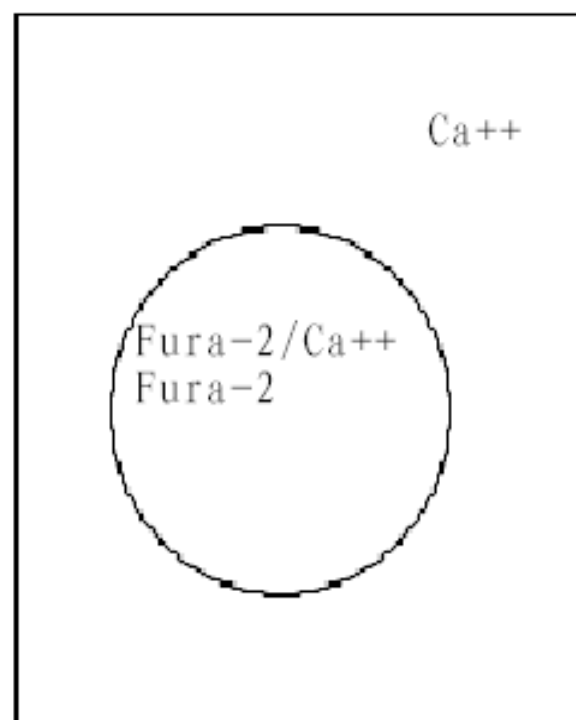
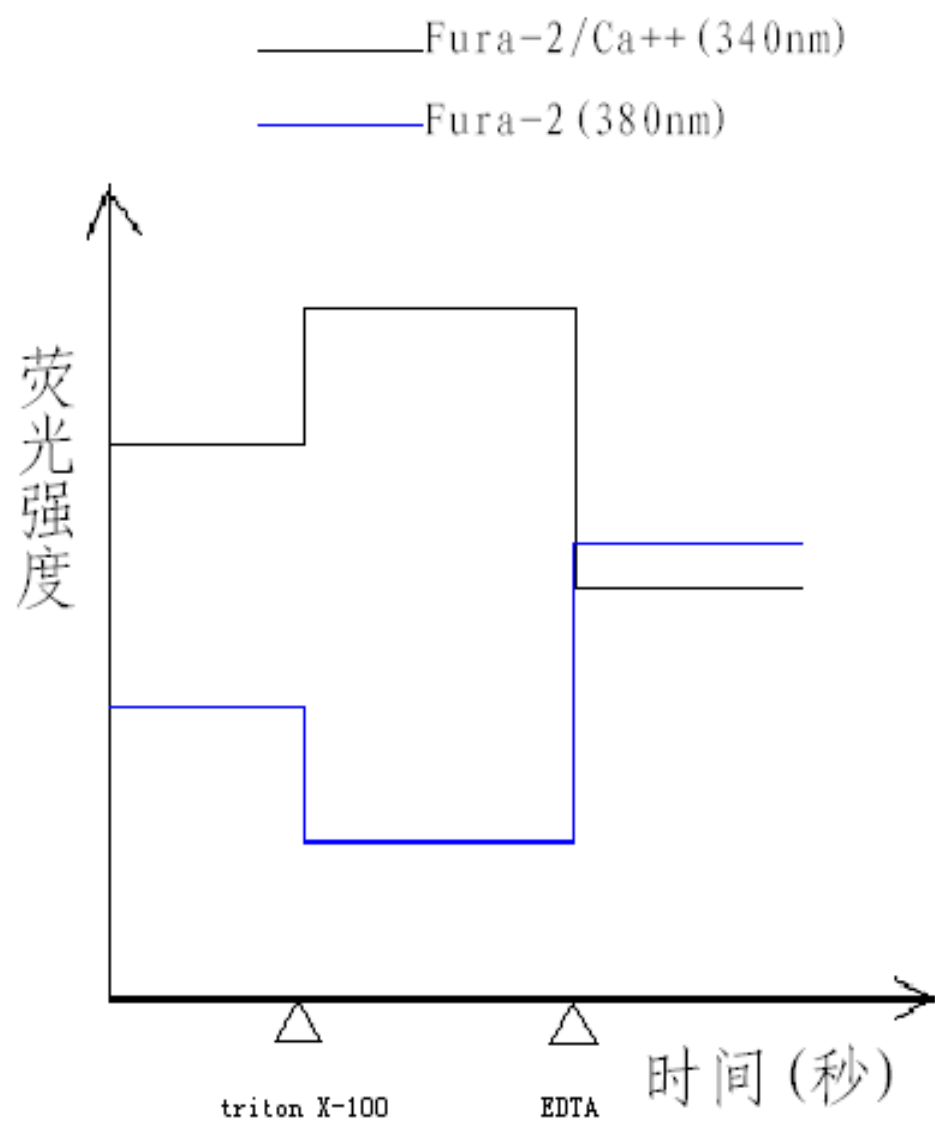
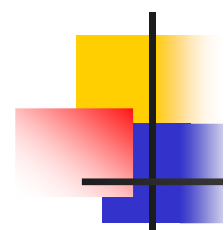
R:F340/F380

R_{min}:F340/F380的最小值

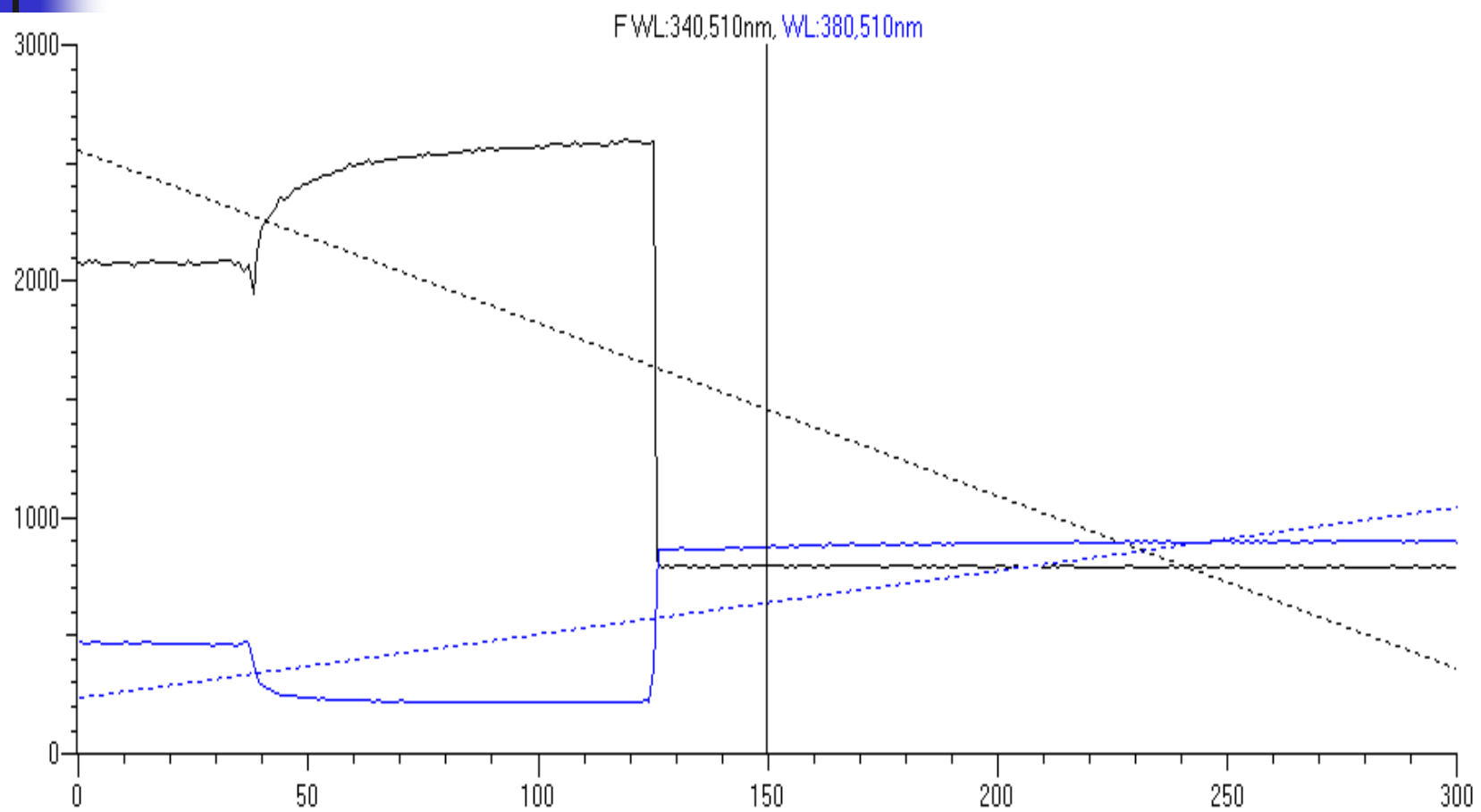
R_{max}:F340/F380的最大值

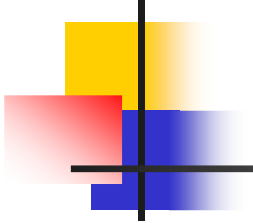
F_{2min}:Ca²⁺ 游离时380曲线的荧光强度值

F_{2max}:Ca²⁺ 饱和时380曲线的荧光强度值



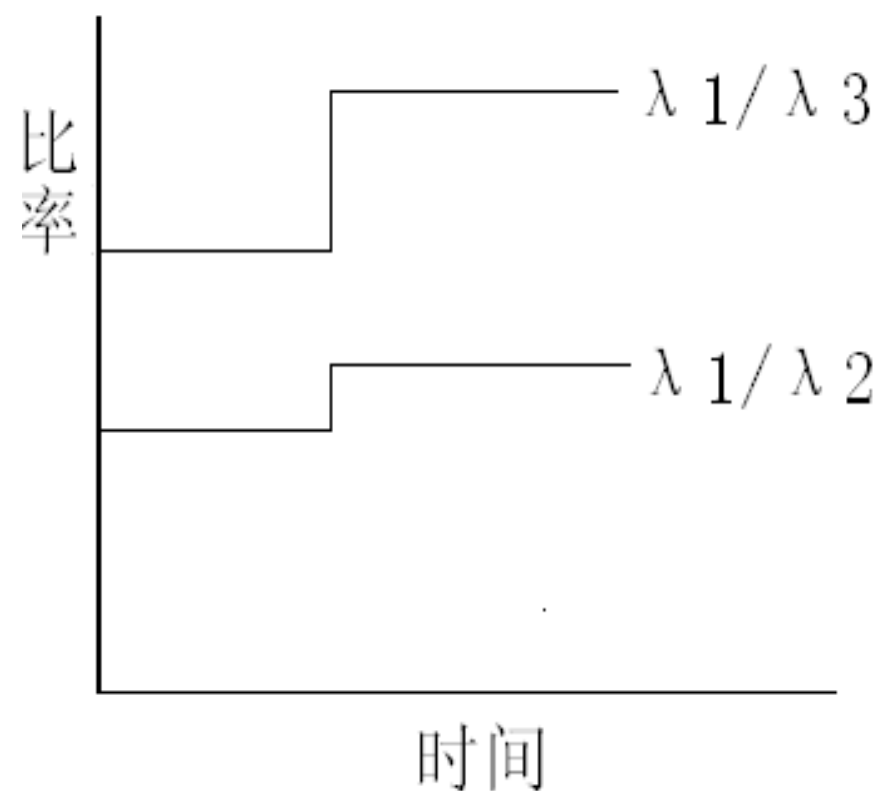
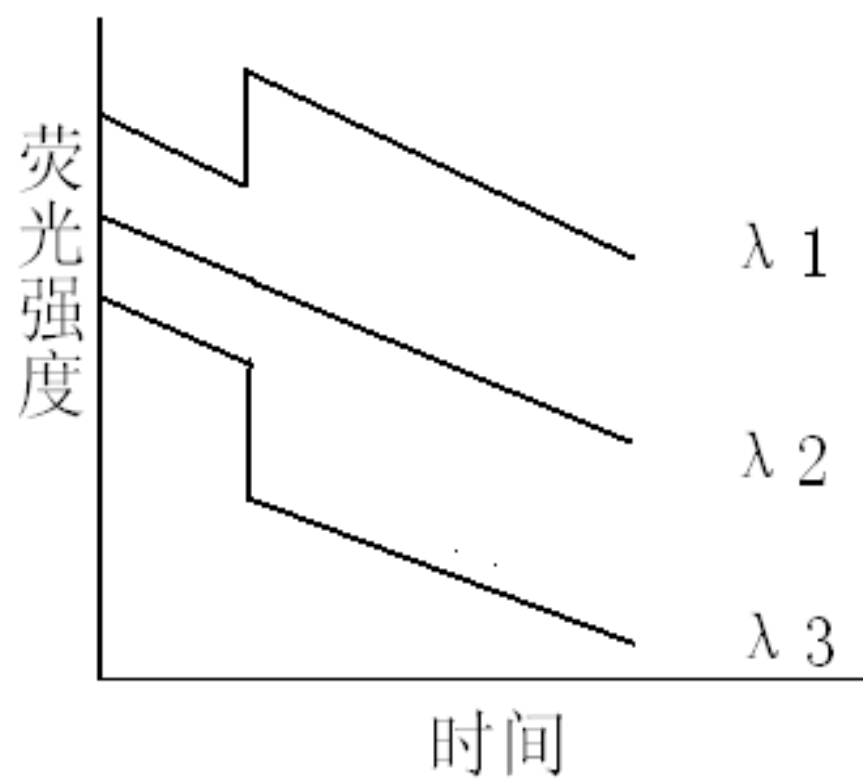
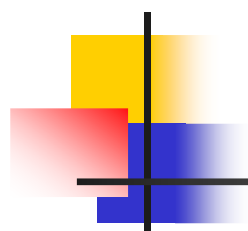
示例

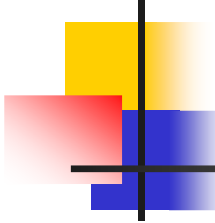




比率测量的校准

与离子结合后，出现激发或发射光谱移位的探针可使用在两个不同波长测定的荧光强度比率校准，可克服由于离子浓度的变化而造成的荧光信号人工假象。Bright等（1989）发现比率测量减少或消除几种决定因素的变化对测量荧光强度的影响，包括探针浓度、激发光的光路长度、激发强度和检测效率。消除的人工假象包括光漂白、探针渗漏、细胞厚度、探针在细胞内（区室化作用引起）或不同细胞群之间（负载效率差异造成）的不均匀分布。

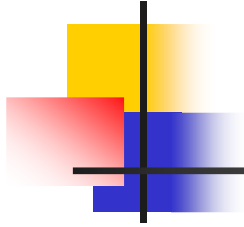




实验二 倒置荧光显微镜活细胞 钙离子测定系统检测细胞内钙离子浓度

- 系统配置要求:

- * 要求系统具有较高灵敏度和速度高灵敏度，可以减小曝光时间而提高实验速度，同时减少对样品的照射时间，从而减小紫外光对样品的损害，高的量子效率和低系统噪音。
- * 系统对于CCD空间分辨率要求不高， 要求CCD具有高的动态范围和良好的线性度有利于同时分析高、低两种信号强度有利于进行定量分析
- * 比例分析需要配置高速波长切换器件
- * 专业的离子比例成像分析软件系统

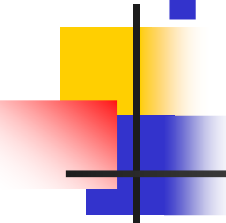


- 实验室配置:

- * 高性能荧光显微镜（氙灯灯源）

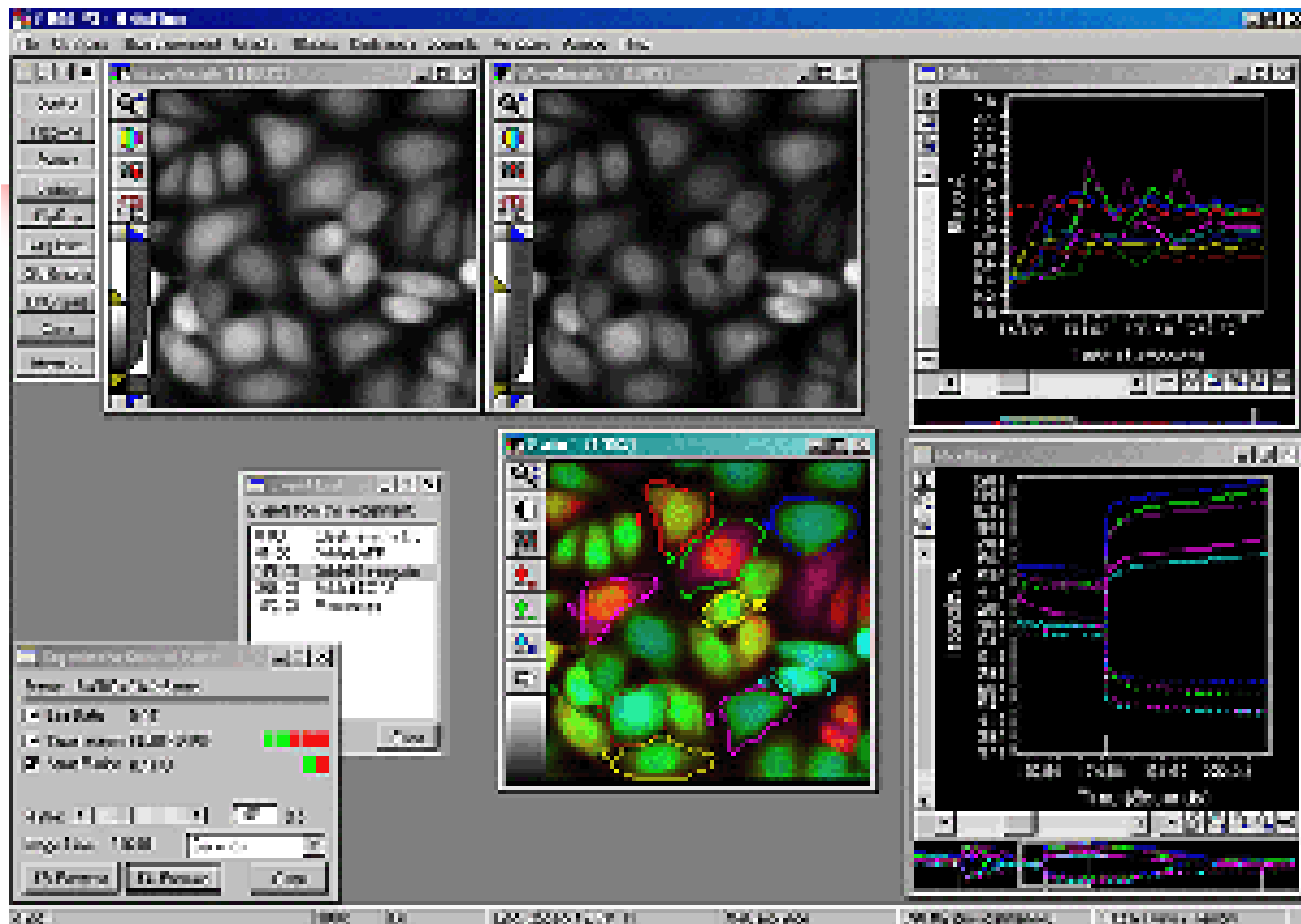
- * 快速、高灵敏度CoolSNAP HQ CCD相机

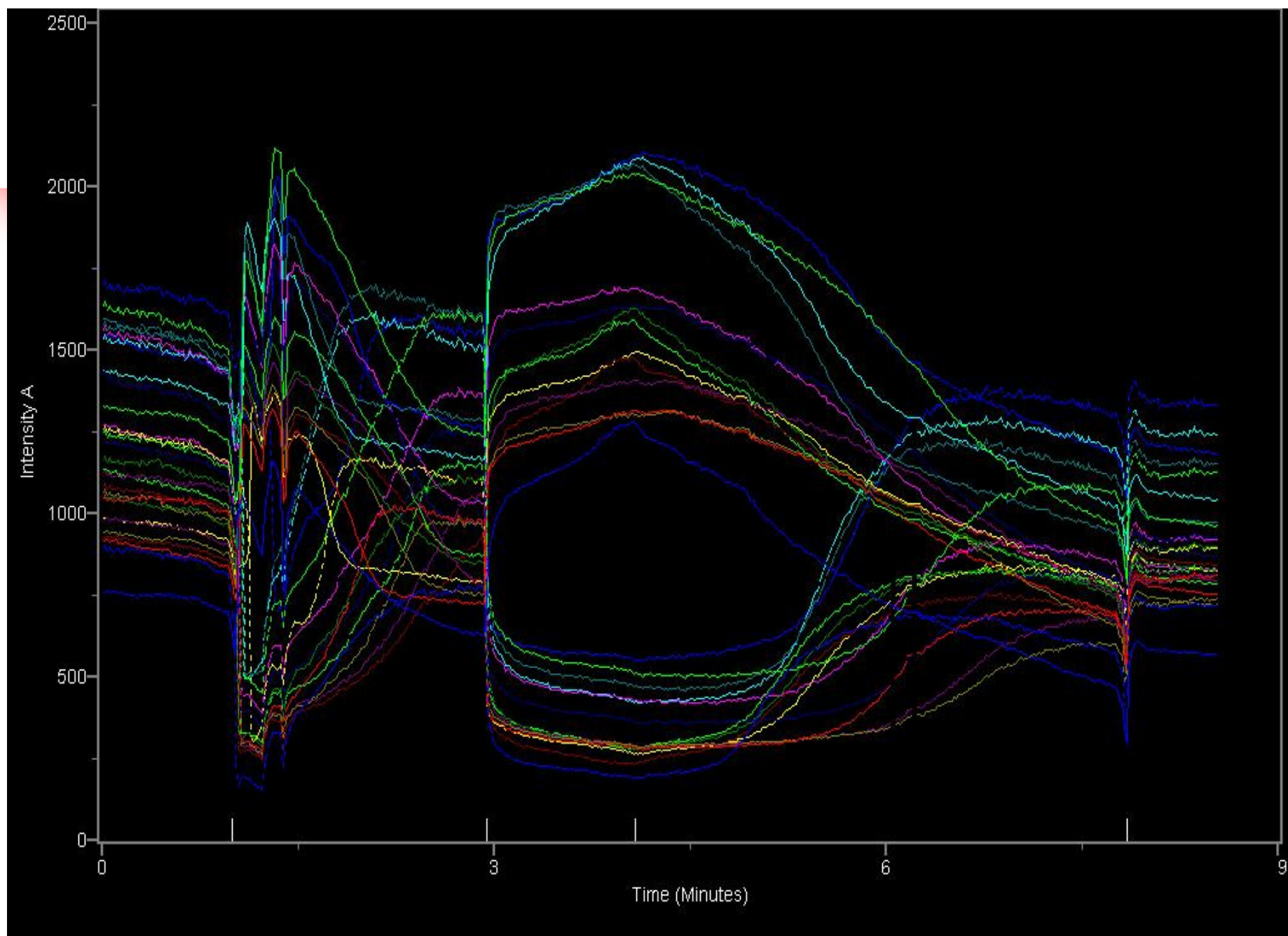
- * SUTTER公司LB10-2快速滤光片转轮

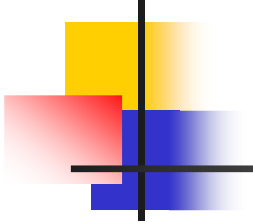


* MetaFluor专业离子比例成像分析软件是专为单波长或双波长细胞内离子浓度的测量而设计，适用于Fura-2， BCECF， INDO-1等常用比例用指示剂，进行定时、定量的荧光扫描，用双比例来测定细胞内 Ca^{2+} 、PH和其他离子的浓度；能同时显示原始波长图像（多达四种波长），比例图像（可同时做两种不同指示剂的比例图像），获得时间序列的动态图像，不同细胞的光密度、Ratio及离子浓度变化曲线等；MetaFluor软件同时还可以控制激发光源快门，尽量减少激发光对细胞长时间照射造成的损伤。







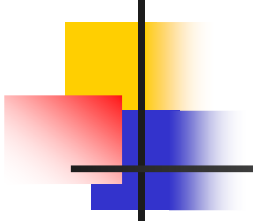


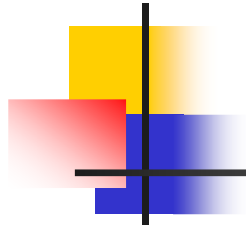
实验三 激光共聚焦扫描 显微镜检测细胞内钙离子浓度

- Fluo-3: 是最适用于激光共聚焦显微镜和流式细胞仪的一种 Ca^{2+} 指示剂

Fluo-3/ Ca^{++} : 最大激发波长490nm
最大发射波长520nm

Fluo-3基本不发荧光

- 
- 发射荧光随钙离子浓度的增加而增强，且有较低的背景荧光的干扰。与Fura-2不同的是，与 Ca^{2+} 结合前后，无论是激发或是发射的波峰均没有显著迁移，这样也导致使用荧光比率测定法并不适用于Fluo-3。缺点：结合钙后，吸收或发射光谱并没有明显能量转移，因此不能用作率图。

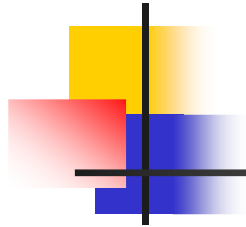


$$\text{【Ca}^{2+}\text{】} = K_d \frac{(F - F_{\min})}{(F_{\max} - F)}$$

K_d: Fluo-3与Ca²⁺结合反应的解离平衡常数,400nmol/L

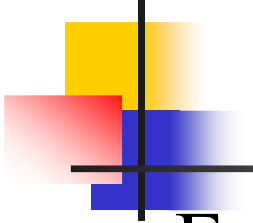
F_{min}: Ca²⁺ 游离时曲线的荧光强度值

F_{max}: Ca²⁺ 饱和时曲线的荧光强度值



Fmax的测量方法：

细胞外钙浓度1-2mM，加入A23187
（一种移动性离子载体，平衡细胞内外钙
离子浓度），使质膜对钙通透性增加，胞
内钙浓度达到饱和，测得的荧光强度即为
Fmax。

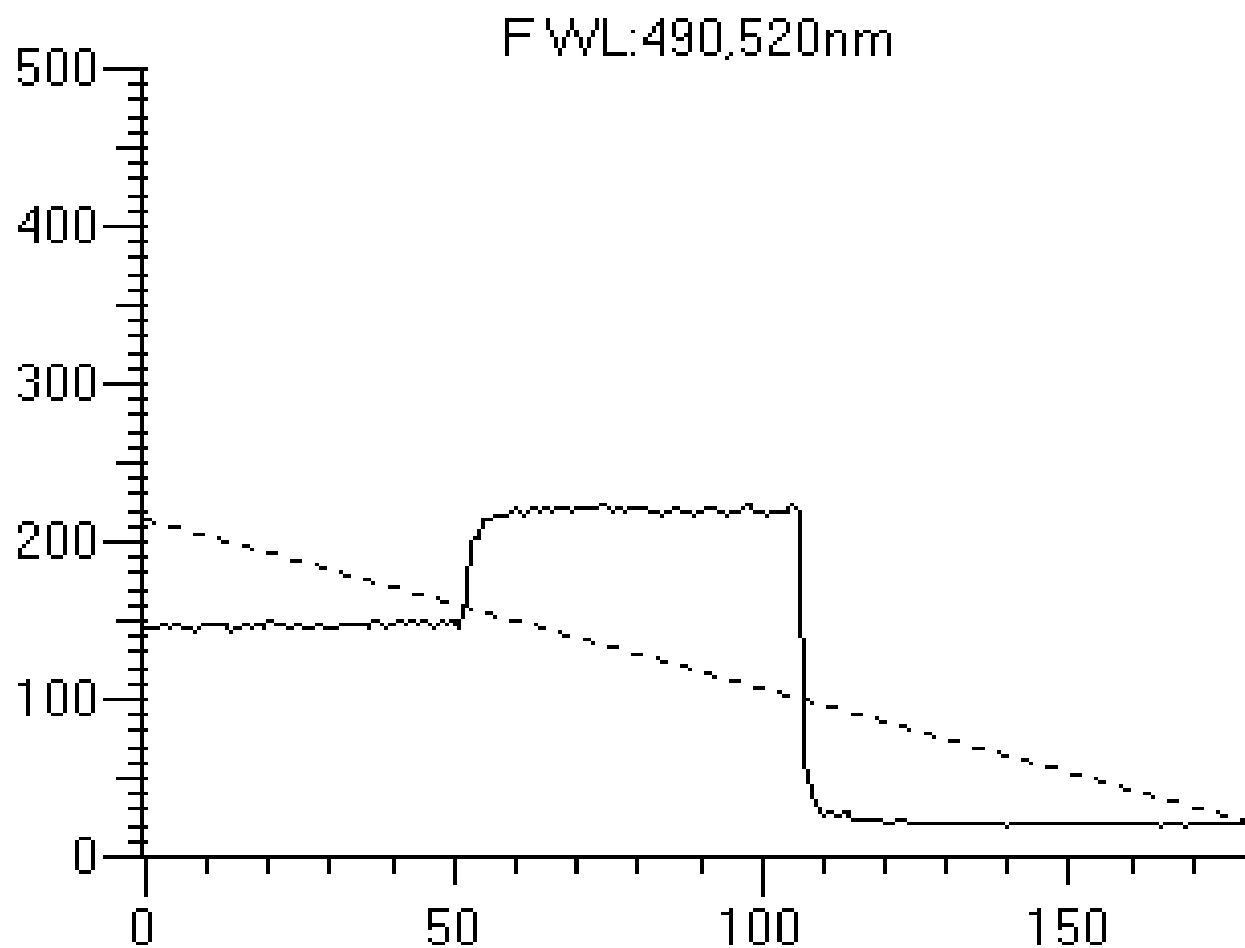


Fmin的测量方法:

1在细胞外液中加入A23187、 MnCl_2 ， Mn^{2+} 将进入细胞内，以其高亲和力与钙竞争而结合于荧光探针Fluo-3，从而使Fluo-3-Ca荧光褪去，平衡几分钟，测得的荧光强度即为Fmin。

2在细胞外无钙并含有EDTA条件下，向细胞外液中加入A23187，测得的荧光强度即为Fmin。

荧光分光光度计示例



流式细胞仪测定示例（摘自文献）

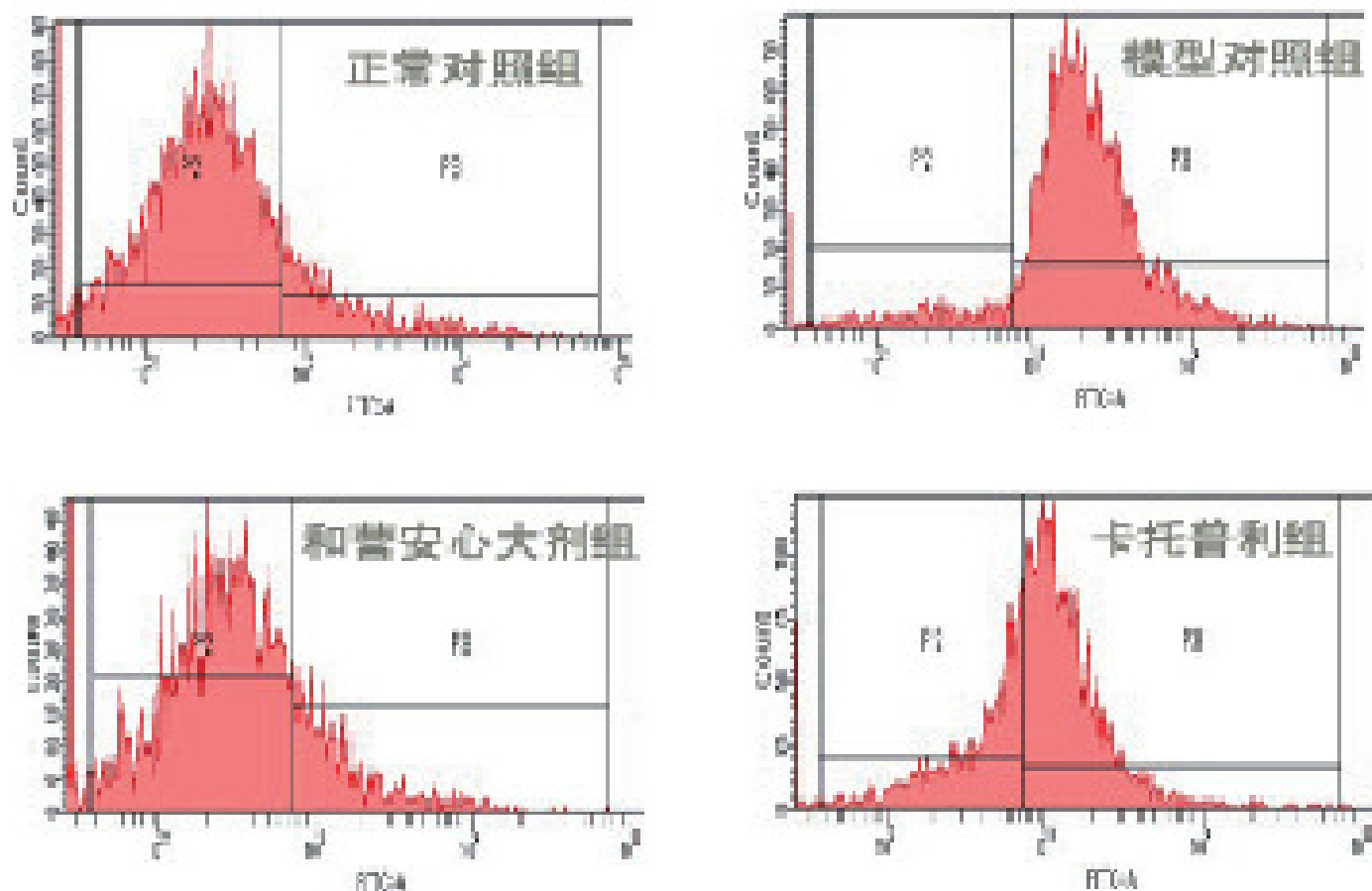
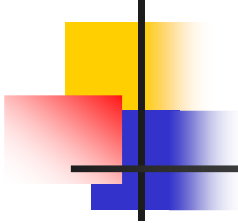


图1 各组心肌细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ (%) 的变化



钙离子测定注意事项

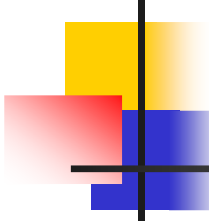
- 1 保持细胞活性
- 2 染色后尽快检测
- 3 加药刺激量要适宜（过小---无反应；过多---细胞过度反应或死亡）
- 4 监测时间间隔要适宜
- 5 尽量避光操作
- 6 尽量缩短曝光时间和强度---防止荧光淬灭
- 7 细胞外液中**DMSO**的最终浓度尽量小于**0.1%**。



紫外波长激发的荧光指示剂

Fura2:由紫外激发的一种率测量指示剂，当与 Ca^{2+} 结合后吸收峰发生改变，在最大和最小 Ca^{2+} 浓度时，它的最大吸收峰分别在335nm和363nm处，结合钙和游离钙形式Fura2的发射峰都是510nm。在作率测量时经常选用的波长是340nm和380nm。

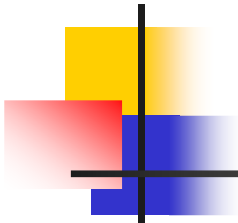
Fura2不适于激光共聚焦显微镜和流式细胞仪，因为很难用它们完成激发光谱的快速转换。



可见光激发的荧光指示剂

Fluo 3: 最适用于激光共聚焦显微镜和流式细胞仪的一种 Ca^{2+} 指示剂，它的最大吸收峰分别在505nm和526nm, 可被氩离子激光器在488nm 激发，发射荧光随钙离子浓度的增加而增强，当与 Ca^{2+} 结合后，Fluo 3的荧光强度会提高40~200倍。许多细胞接受刺激后，钙离子浓度通常会提高5~10倍，此时Fluo 3的敏感度较高，它的 K_d 值受PH值、粘滞度和体内连接蛋白的影响。

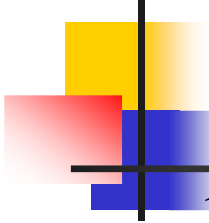
缺点：结合钙后，吸收或发射光谱并没有明显能量转移，因此不能用作率图。



问题一

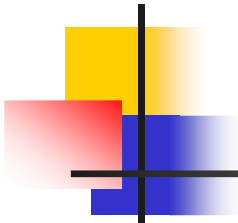
测定时细胞外液是否需要含钙离子？

- Hanks液、HBSS液、BSS液.....
- PBS液、D-Hanks液.....



举例：研究**DHT**药物对细胞内钙离子浓度影响

- 1细胞外液含钙时：显微镜下加入不同浓度的DHT，检测细胞内钙离子浓度变化，发现DHT能促进细胞内钙离子浓度增高，且随药物浓度改变。
- 2细胞外液不含钙时：使用无钙细胞外液，发现DHT未能促进细胞内钙离子浓度增高。
- 3细胞外液含钙，细胞膜钙离子通道阻滞剂加入组：发现DHT未能促进细胞内钙离子浓度增高。
- 4细胞外液含钙，细胞内储钙库钙离子通道阻滞剂加入组：发现DHT能促进细胞内钙离子浓度增高。



问题二

- 荧光分光光度计

- Triton X-100

- EDTA

- 激光共聚焦显微镜

- A23187（与Fura-2组合时有明显背底荧光，适合可见光荧光探针；溴化物Br-A23187则可以与紫外光激发的荧光探针配合使用）

- MnCl₂