



钙指示剂的发展及其研究现状*

李 佳^{1,2)} 王友军^{1,2)} 张晓嫣^{1)**}⁽¹⁾ 北京师范大学生命科学学院生物系, 细胞增殖及调控生物学教育部重点实验室, 北京 100875;²⁾ 北京师范大学生命科学学院生物系, 抗性基因资源与分子发育北京市重点实验室, 北京 100875)

摘要 钙指示剂常被用于细胞及细胞器钙信号的检测, 是钙信号转导研究中必不可少的工具. 目前的钙指示剂分两大类, 包括化学钙指示剂, 如 Fura-2、Indo-1、Fluo-4 等, 和基因编码的钙指示蛋白如 D1ER、GCaMP、CEPIA1er 等. 随着技术的发展及研究需求的不断提升, 各版本的钙指示剂也在不断更新. 本文对已有的钙指示剂进行了系统地梳理, 详细介绍了目前应用最为广泛的钙指示剂, 总结了现有钙指示剂的优缺点, 并对可优化提升的部分进行了展望, 旨在为钙指示剂研究的进一步发展提供一些思路.

关键词 钙指示剂, 钙信号, 钙成像

中图分类号 Q5, Q7

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0366

胞内钙离子 (Ca^{2+}) 是细胞中普遍存在的信号分子, 它调控了包括细胞增殖、凋亡、受精、肌肉收缩和伤口愈合等在内的诸多生理及病理过程^[1]. 细胞静息时胞浆中的钙离子浓度约为 100 nmol/L, 在发生各类生理反应时, 胞浆中的钙离子浓度可以达到 1 $\mu\text{mol/L}$ 左右^[2]. 这些胞浆中钙离子浓度的短暂上升, 即钙信号, 会进一步激活和调控诸多下游反应. 钙信号贯穿了生物体的整个生命周期. 实时有效地监测生理及病理情况下胞内钙信号的变化, 可以帮助研究者们更好地解释细胞钙信号转导的分子机制. 利用钙指示剂开展的钙成像实验是检测活细胞内钙信号变化的有力手段. 目前已知的钙指示剂多达上百种, 这些钙指示剂在设计及作用方式的原理上是相通的, 大多是由发色基团和钙离子结合分子组合而成, 其中发色基团的吸收和发射光特性会随着钙离子与钙指示剂结合程度的强弱而发生改变^[3], 这些发光特性的变化可以有效地指示周围环境中钙离子浓度的变化.

从结构上来看, 钙指示剂可以分为化学合成的钙指示剂和基因编码的钙指示蛋白两大类, 本文将分别对已有的化学合成的钙指示剂和基因编码的钙指示蛋白进行归纳和介绍.

1 化学合成的钙指示剂

目前常用的化学合成的钙指示剂是通过 BAPTA 这种特异性的 Ca^{2+} 螯合剂改造而来的^[4-5]. BAPTA 是由 EGTA 这种良好的 Ca^{2+} 螯合剂改造而来 (图 1a). EGTA 对 Ca^{2+} 有较高的选择性, 但是其螯合钙离子的速度却有待提高. 这是因为 EGTA 对 pH 的变化很敏感, 在生理 pH 下, EGTA 分子上的氮会与质子结合, 导致 EGTA 结合和释放 Ca^{2+} 的速率变慢 2~3 个数量级, 往往需要几秒钟才能缓冲瞬时增加的 Ca^{2+} ^[4]. 为此, Tsien^[4] 用苯环取代了 EGTA 氮和氧原子之间的甲基链, 降低了 EGTA 的 pH 敏感性, 成功改造出了一种具有较高 Ca^{2+} 选择性 (pH=7 时, $K_d=0.2 \mu\text{mol/L}$), 且反应迅速的钙离子螯合剂, 并命名为 BAPTA (图 1b).

钱永健实验室进而通过在 BAPTA 上添加荧光基团, 制作出了包括 Quin2、Rhod、Fluo、Indo 和

* 国家自然科学基金重大研究计划 (91954205), 北京师范大学生命科学学院细胞增殖及调控生物学教育部重点实验室开放基金资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 010-58809729, E-mail: zhxy@bnu.edu.cn

收稿日期: 2020-10-12, 接受日期: 2021-01-08

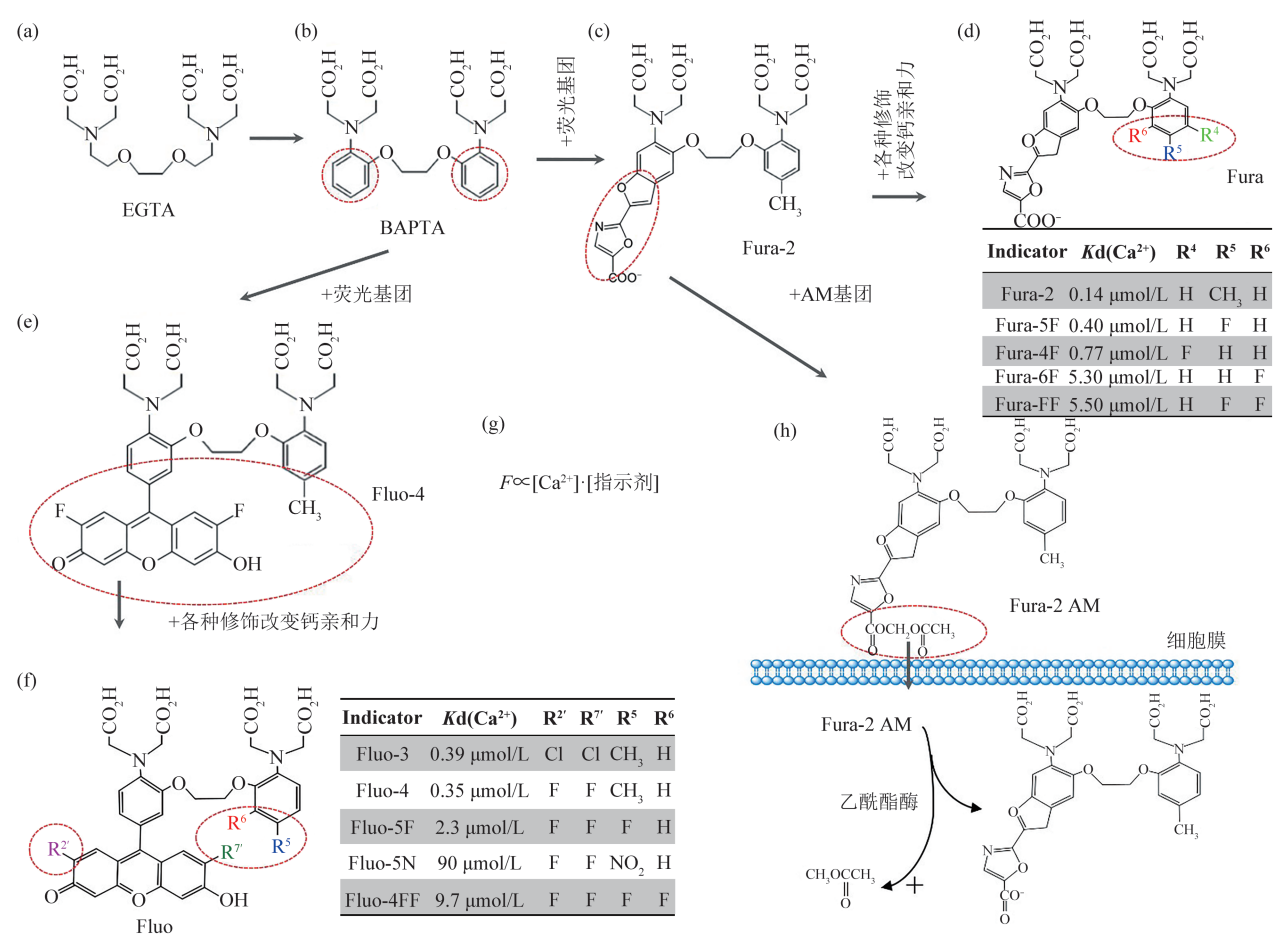


Fig. 1 Chemical calcium indicators

图1 化学合成的钙指示剂

(a) EGTA的结构式。(b) BAPTA的结构式(红色虚线圈标注了BAPTA中替代了EGTA甲基链的苯环)。(c) Fura-2的结构式(红色虚线圈标注了荧光基团)。(d) Fura系列钙指示剂结构式(红色虚线圈及表格标注了钙亲和力和修饰基团)。(e) Fluo-4的结构式(红色虚线圈标注了荧光基团)。(f) Fluo系列钙指示剂结构式(红色虚线圈及表格标注了钙亲和力和修饰基团)。(g) 化学合成的钙指示剂的荧光信号F与其本身的浓度及钙的浓度成正比。(h) Fura2-AM结构式及其进入细胞后的水解反应式(红色虚线圈标注乙酰氧基甲酯)。

Fura系列在内的一系列荧光钙指示剂. 其中一些常用钙指示剂的设计原理见图1c~e^[4-6]. 这些指示剂的荧光信号F与其本身的浓度及钙的浓度成正比: $F \propto [\text{Ca}^{2+}] \cdot [\text{指示剂}]$ (图1g). 因而在指示剂浓度不变时, 指示剂信号的变化可以反映胞内钙水平的变化情况. 其中Fura-2 (图1c) 是一种比值型指示剂, 它既可以被380 nm的光激发产生荧光(F_{380}), 也能被340 nm的光激发产生荧光(F_{340}). Fura-2的 F_{340} 和 F_{380} 荧光对钙的响应不同, 在结合 Ca^{2+} 后, 其最大激发光波长会从380 nm向340 nm处移动, 导致 F_{340} 增加以及 F_{380} 减少, 即 F_{340}/F_{380} 比值增加. 由前述公式(图1g)可见, Fura-2的 F_{340}/F_{380} 比值信号抵消掉了Fura-2浓度对Fura-2信号的影响. 因而与Fluo-4等单色钙指示剂

不同, Fura-2比值信号仅与胞浆的钙浓度有关, 可以直接反映胞浆中的静息及动态的钙离子水平. Fura-2在37℃下的 Ca^{2+} 解离常数为0.224 $\mu\text{mol/L}$, 20℃时解离常数为0.135 $\mu\text{mol/L}$, 灵敏度高, 可以有效地测定生理状态下胞浆中钙离子浓度的变化. 与早期的Quin2等化学钙指示剂相比, Fura-2的荧光亮度提高了30倍, 使得细胞需要负载的染料减少, 更利于对较小的组织进行精细的钙成像观察. 除了Fura-2以外, Indo-1和Fluo-4 (图1e) 是另外两种常见的化学钙指示剂. 与Fura-2相比, Indo-1也是比值型钙指示剂, 不过它被单色光激发激活后产生双色的荧光. Indo-1易发生光致异构化和光分解, 且溶解度较低, 不易载入细胞^[5]. Fluo-4在结合 Ca^{2+} 前后, 激发光 and 发射光的光谱都不会发生

迁移, 是一种单色指示剂, 能显示钙信号的变化, 但不能直接指示静息钙离子水平. 此外其解离常数为 $0.345 \mu\text{mol/L}$, 灵敏度低于 Fura-2, 因此无法测量到胞浆中较小的钙信号, 更适用于检测瞬时变化较大的胞浆钙信号^[6-7]. 因此到目前为止, 多数实验者仍把 Fura-2 作为钙成像实验中首选的化学钙指示剂. Fura-2 的缺点是紫外光激发. 紫外光对细胞有一定的光毒性, 且很多共聚焦成像系统没有配备紫外光源, 这两个因素限制了 Fura-2 的应用. Fluo-4 虽然不能指示静息钙水平的单色钙指示剂, 但可以被 488 nm 光激发, 因而在共聚焦成像系统中应用较广. 科学家们在 Fura-2 和 Fluo-4 的基础上, 通过各种化学修饰以改变其钙亲和力, 获得了更多的钙指示剂 (图 1f, g). 这进一步扩大了化学钙指示剂的应用范围. 这些化学钙指示剂分子都是包含了很多羧基的酸性化合物, 极性较强, 脂溶性低, 无法用直接胞外孵育等非破坏性的方式进入细胞, 往往需要使用显微注射或加载于全细胞膜片钳电极液中等方式载入单个体积较大的细胞中. 这导致了科学家们能研究的细胞类型有限, 且每次实验能研究的细胞数目也很有限. 为解决这些问题, Tsien^[8] 在 1981 年发明了乙酰氧基甲酯 (acetoxymethyl ester, AM) 化钙指示剂的方法, 由此得到 AM 版本的钙指示剂是脂溶性的, 可以非常方便的以胞外孵育方式进入细胞. 如在 Fluo-4 的发色基团中羧基处添加 AM 基团, 或在 Fura-2 荧光基团的羧基处添加 AM (图 1h), 脂溶性的 Fluo-4-AM 或 Fura-2-AM 进入细胞后, 胞内的乙酰酯酶会水解掉乙酰氧基甲酯, 产生功能正常的钙指示剂 Fluo-4 或 Fura-2, 用于检测细胞内钙信号 (图 1h). 通过胞外孵育, 甲酯化的化学钙指示剂可以同时进入多个任意体积的细胞中, 从而使得同时检测多个细胞中的钙信号变得简易可行. 化学钙指示剂的钙反应快速可逆, 其荧光信号较强, 且信号强度可以通过改变激发光强度或载入的指示剂浓度等进行调节. 上述这些是首个钙指示剂水母素 (见下文 2.1 节) 所不具备的独特优势, 使得化学钙指示剂获得了极为广泛的应用, 有力地推动了钙信号研究领域的兴起.

在 AM 基团的辅助下, 化学钙指示剂在细胞水平上的载入问题得到了解决, 但其在组织或器官水平上的载入仍是极为低效和昂贵的. 除了这个缺陷以外, 由于带有 AM 基团的钙染料在孵育过程中会滞留在胞浆而无法精确定位到细胞器, 化学钙指示

剂还有亚细胞定位不够准确的缺陷, 难以特异性地进入到膜包被的亚细胞结构中去. 比如, 内质网钙指示剂 Mag-fura-2 在定位到内质网的同时也存在部分胞浆定位, 并且 Mag-fura-2 指示剂的钙亲和力太高, 并不是很好的内质网钙指示剂^[9]. 类似的, Rhod-2 AM 倾向于定位到线粒体, 因而被广泛用于线粒体内的钙信号指示剂. 但 Rhod-2 同样也有定位不准确的问题, 部分会定位在胞浆中, 导致测得的所谓线粒体钙信号实际上包含了一部分来源于胞浆的钙信号^[10]. 近期, 有研究对化学钙指示剂的定位问题做出了突破和改进. 2020 年, Lu 等^[11] 采用肌浆网定位的羧酸酯酶 (srCES) 策略来实现化学钙指示剂的定向富集, 利用准确定位于内质网或肌浆网的 srCES 高效水解 AM 基团, 实现将 Fluo-5N 选择性富集在肌浆网中, 以达到检测局部钙信号的目的, 并对心肌细胞肌浆网钙信号进行了系统的成像研究.

综上, 化学合成钙指示剂钙亲和力的范围比较宽, 在 AM 基团辅助下, 通过与细胞共同孵育, 就可以载入细胞等样品中并快速获取实验结果. 但是化学钙指示剂也存在很多局限性, 比如亚细胞定位不准确、化学染料的长时间孵育会对细胞造成毒害、染料在细胞中只能较短的驻留限制了观察时长等.

为克服上述难题, 科学家们发展出了基因编码的钙指示剂 (genetically encoded calcium indicators, GECIs). 概括地说, GECI 就是能感知 Ca^{2+} 水平变化的发光或荧光蛋白, 其接收光和发射光的性质或能力会随着钙离子浓度的变化而发生改变. 作为基因编码的蛋白质, GECI 可以通过转基因的方式载入细胞, 并能以稳定表达的方式在细胞中长期存在. 这些特性使得在细胞、组织、器官乃至整体水平进行长时程的钙成像成为可能. 而在添加专门的定位序列后, GECI 还能特异性地定位到细胞核、内质网和线粒体等细胞器内, 且能够以融合蛋白方式定位到离子通道口附近, 直接检测来自单个通道的钙信号. 因而 GECI 大大提高了钙指示剂的空间分辨率, 将钙信号相关研究推进到了细胞器, 甚至单离子通道水平. 虽然它们还有易受 pH 变化的影响等缺点, GECI 在生物活体和亚细胞钙成像中得到了极大的应用. 近年来, 很多 GECI 的灵敏度和动态变化范围等特性已经远远超过了化学钙指示剂, 因此在多种应用中逐渐替代了化学钙指示剂, 有力地推动了相关研究的进展.

2 基因编码的钙指示剂 (GECI)

根据发光原理的不同, GECI可以分为生物发光 (bioluminant) 和荧光 (fluorescent) 两大家族. 荧光类 GECI 又可以细分为双荧光型 (基于福斯特共振能量转移) 和单荧光型 (基于单个荧光蛋白) 两大类. 随着 GECI 技术进一步发展, 在单荧光型基础上有了比值型 GECI, 对生物发光与荧光相结合的 GECI 也有所研究. 我们将在下文对每类进行详细介绍.

2.1 基于生物发光的GECI——水母素

水母素 (aequorin) 是一种蓝色的发光蛋白, 由 Shimomura 等^[12] 于 1962 年在维多利亚多管发光水母中分离鉴定出来. 他们发现水母素在 Ca^{2+} 的刺激下可发出蓝光, 且其发光强度与钙离子浓度正相关, 推测它可以用于检测生物系统内的钙信号^[13]. 1967 年, Ridgway 等^[14] 将水母素蛋白注射到肌肉纤维内, 首次在活细胞内观察到了钙瞬变信号, 并进一步测到了肌肉细胞兴奋-收缩耦联过程中的钙释放信号^[15]. 该工作标志着对活细胞内钙信号检测的开始, 是代表钙信号研究领域真正奠基的一个里程碑.

最初检测钙信号时, 需要先从发光水母中提取分离水母素蛋白, 然后注射到体积足够大的单个细胞内. 这些材料获取上的困难和技术上的壁垒均阻碍了水母素的应用及钙信号研究的进展. 为解决这些问题, 1988 年 Campbell 等^[16] 首先发现编码发光蛋白 Obelin 的 mRNA 显微注射进入细胞后可以表达发光蛋白. 进一步添加外源的腔肠素底物后, 细胞内表达的 Obelin 可以被用来检测胞内钙信号. 随

着基因工程技术的进一步发展, Anraku 实验室在 1991 年利用编码水母素的质粒在酵母菌成功表达了水母素, 并进而检测到了酵母菌的钙信号^[17]. 这是 GECI 首次真正意义上转基因方式的应用. 相对于较昂贵且难以载入组织或器官的化学钙指示剂, 利用转基因手段可以很方便地在大量的细胞、组织、器官乃至整体水平上导入外源 GECI. GECI 作为蛋白质, 还可以通过添加不同的靶向序列获得特异性的亚细胞定位, 这是 GECI 第二个优于化学钙指示剂的地方. 科学家们成功地利用不同靶向定位的水母素记录到了细胞核、线粒体、内质网及高尔基体等亚细胞结构内的钙信号^[18-21]. 因而 GECI 的应用从宏观和微观两个方面都进一步扩展了钙信号研究领域.

水母素是一种稳定结合有底物腔肠素的无活性氧化酶原. 每个蛋白质包含 3 个钙结合位点. 在结合钙离子后, 其构象发生变化, 变成有活性的氧化酶, 将其中的腔肠素底物分解为激发态的腔肠乙酰胺和二氧化碳并释放出来. 而激发态的腔肠乙酰胺在回到基态的过程中会释放光子^[22] (图 2). 水母素作为钙指示剂的优点有: a. 无需外源激发光, 在底物存在的情况下即可响应钙水平的变化而发光; b. 具有较高的信噪比; c. 细胞毒性小, 感知钙的范围比较大 ($0.5\sim100\text{ }\mu\text{mol/L}$). 对水母素的各种改进及应用请参看综述^[23]. 其缺点有: a. 即使在持续补充底物的情况下, 该发光反应的可逆性也很差; b. 在生理性钙浓度范围内, 一个水母素结合钙后仅能产生一个光子, 因而其产生的信号较弱^[23]. 由于这两个缺点, 在可逆性强且可以在一定程度上调控信号强度的荧光 GECI 类被发明出来后, 水母素的使用范围逐渐变窄.

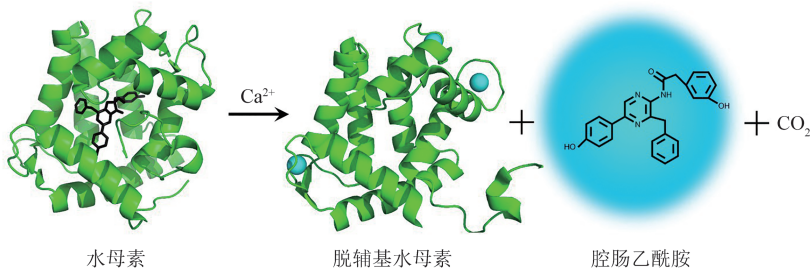


Fig. 2 The luminous principle of aequorin
图2 水母素的发光原理

2.2 福斯特共振能量转移型GECIs

自 Shimomura 等^[12] 发现水母素和绿色荧光蛋

白 (green fluorescent protein, GFP) 以来, 荧光蛋白已经被广泛地应用到各类研究当中. 将目的蛋白

与荧光蛋白组成融合蛋白,可以更好地监测活体细胞或组织中目的蛋白的动态变化^[24].受此启发,科学家们将改造后的荧光蛋白与钙结合蛋白结合制成GECIs,其中钙结合蛋白可以感知环境中Ca²⁺浓度的变化,在结合或释放Ca²⁺的过程中影响荧光/发光蛋白的构象或位置,从而改变荧光蛋白的激发或发射光性质,产生荧光信号的变化,进而指示钙信号.

当一对供体-受体荧光蛋白之间距离(r)足够近(<10 nm)时,供体被激发光激发后本身可以不产生荧光,而是将能量转移给受体荧光蛋白,后者产生荧光.该现象就是福斯特共振能量转移,即FRET(Förster resonance energy transfer).两者间FRET的效率(E_{FRET})跟它们之间的距离成负相关: $E_{\text{FRET}} = [1 + (r/R_0)^6]^{-1}$ (其中 R_0 为福斯特半径常数).因而FRET型GECI的原理如下:将一对可以产生FRET信号的供受体荧光蛋白用一个可以响应钙水平的肽段连接起来.当钙水平发生变化时,该肽段的构象发生变化,从而影响供体和受体荧光蛋白之间的距离,进而改变两种荧光蛋白之间的FRET效率.因而可以用荧光供体-受体之间FRET信号的变化来指示钙水平及钙信号.

2.2.1 基于CaM的Cameleon

Persechini组于1997年设计出了最初版本的FRET型GECI^[25].他们利用源自肌球蛋白轻链激酶的钙调蛋白(calmodulin, CaM)及其靶序列,将蓝色和绿色两种荧光蛋白用含靶序列肽段连接起来,构成了一种简称为FIP-CB_{SM}的GECI.在静息时,蓝色荧光蛋白(blue fluorescent protein, BFP)和GFP距离较近,FRET效率高.胞内钙水平增加时,内源的CaM与FIP-CB_{SM}中的靶序列结合,使得BFP和GFP之间的距离增加,FRET信号降低.但该工具对钙的反应较小且受内源CaM的影响,因此应用不广.

也是在1997年,Miyawaki等^[26]进一步将CaM和其靶蛋白序列肌球蛋白轻链激酶片段(M13)连在一起,然后在CaM-M13两侧分别连接了ECFP(enhanced cyan fluorescent proteins)和EYFP(enhanced yellow fluorescent proteins),构建出Cameleon系列融合蛋白(图3a).当CaM的Ca²⁺结合区域结合了Ca²⁺后,CaM与其M13靶序列^[27]紧密结合,CaM-M13的区域构象会由松散变得紧密,这使得位于Ca²⁺结合区域两端的ECFP和EYFP之间的距离变近,FRET信号的值变高(图

3b);反之亦然.运用该策略,他们成功地检测到了胞浆、内质网及细胞核中的钙信号.其中的Cameleon-2在胞内高钙时信号是其在低钙下信号的接近两倍,即其信号的动态范围接近2.这类GECI不再需要细胞额外提供CaM才能发挥作用,动态范围较大且FRET信号的变化与钙信号变化的方向一致,因而得到了较为广泛的应用.

化学类钙指示剂如Fura-2在细胞内的动态范围在20左右,因而Cameleon还有很多改进的余地.为了获得更稳定、更灵敏和动态范围更大的GECI,科学家们对Cameleon进行了多方面的改进:

a. 对Cameleon的pH稳定性的优化:Yellow Cameleon(YC)上EYFP的pKa值在7附近,这意味着EYFP对生理环境下微小的pH变化非常敏感.YC2.1版本的钙指示蛋白中用突变体EYFP-V68L/Q69K替代了EYFP,其中EYFP-V68L/Q69K的pKa下降到6.1,使YC2.1的pH稳定性大大提升^[28].但是EYFP-V68L/Q59K突变体仍存在一些不足,包括:EYFP-V68L/Q59K的荧光在pH小于6.5的环境中仍不够稳定、37℃时EYFP-V68L/Q59K蛋白在内质网中很难正确折叠,不适合将其应用到内质网钙指示剂的构建中.为了克服以上问题,2001年,Griesbeck等^[29]筛选到一种更好的YFP突变体,命名为Citrine,它在37℃的折叠性更好,可以在细胞器中正确折叠,pKa进一步下降到5.7,酸性环境下荧光更稳定.鉴于Citrine的pH稳定性和良好的折叠性,他们用Citrine代替YC2和YC3上的EYFP构建出YC2.3和YC3.3,并在YC3.3的N端连接高尔基体定位序列,得到了首个高尔基体定位的荧光钙指示蛋白GT-YC3.3,并检测到了高尔基体的钙释放.除了EYFP-V68L/Q69K和Citrine,Venus是目前最常用的YFP突变体,其荧光最亮,成熟速度快,且对环境的变化不敏感,YC2.12中就使用Venus替代了EYFP,提高了测量结果的准确性^[30](图3c).

b. 对Cameleon钙反应的动态范围的优化:前期的Cameleon的动态变化范围较小,会阻碍其对微弱信号的检测.经过一系列的排列组合之后,2004年,Nagai等^[31]用cp173Venus(cpV)取代Venus,得到的YC3.60的动态变化范围比其母本YC3.12高5.6倍,无论是在培养的细胞还是在转基因老鼠的神经系统中,YC3.60都具有更好的时空分辨率^[3, 31](图3d).上述提到的YC3.12和YC3.60的CaM部分包含E104Q的突变.2010年,

Horikawa 等^[32]以YC2.60和YC3.60为基础,适当延长CaM和M13中间的连接肽段的长度,添加1~3个氨基酸后,改造出超灵敏的YC-Nano系列钙指示剂,具有较大的信号动态变化范围(12.5~14.5),有利于检测更加精细的钙信号(图3e)。

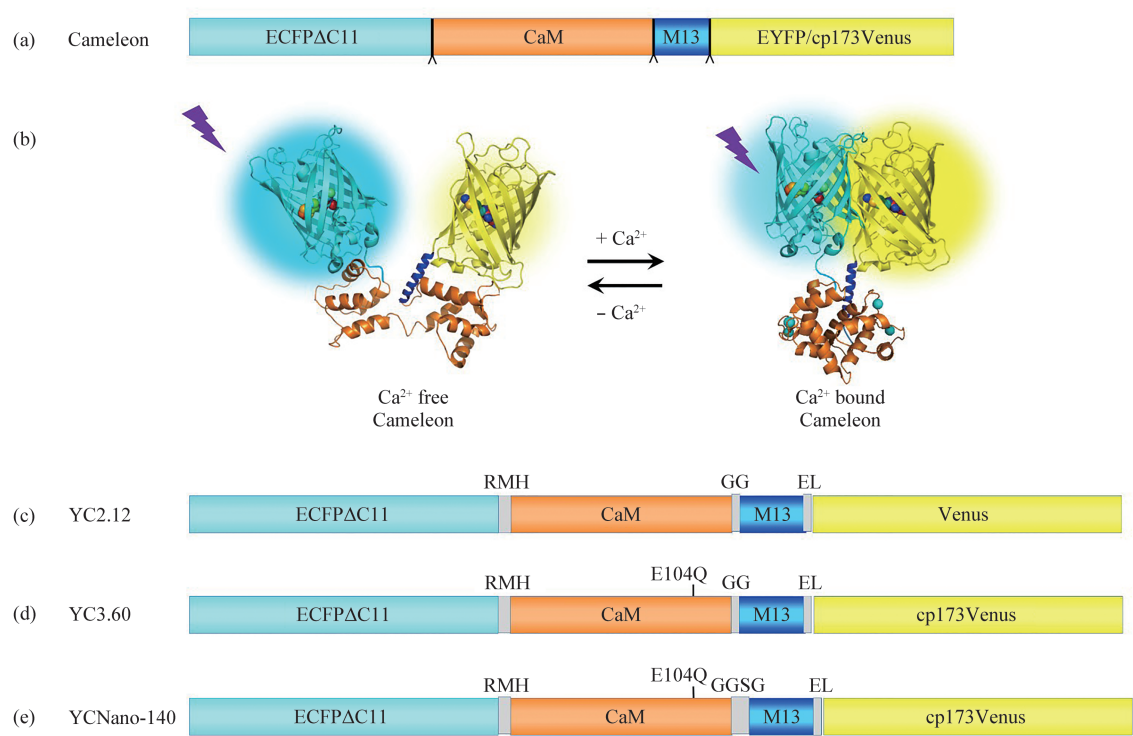


Fig. 3 Schematic map and working priciple of Cameleons
图3 Cameleon系列蛋白的工作原理及模式图

(a) Cameleon蛋白一级结构模式图. ECFPΔC11(去掉了羧基末端11个氨基酸的ECFP). (b) Cameleon作为钙指示蛋白的工作原理. (c~e) YC2.12、YC3.60和YCNano-140的蛋白质一级结构模式图.

c. 针对Cameleon钙亲和力的优化: 细胞胞浆的钙水平在100 nmol/L~1 μmol/L左右, 在线粒体中的钙水平可在100 nmol/L~100 μmol/L之间变动, 而在内质网、高尔基体和溶酶体中的Ca²⁺浓度在零点几毫摩尔左右. 因而需要开发不同钙亲和力的GECI来指示不同亚细胞结构内的钙信号. 对Cameleon钙亲和力的改变主要是通过改造CaM的钙结合位点, 以及CaM与M13之间的相互作用界面实现的. 2004年, Palmer等^[33]获得了钙亲和力较低的指示剂D1ER (K_d=69 μmol/L). 借助D1ER, 研究者有效检测到MCF-7乳腺癌细胞中Bcl-2会通过增强钙漏的方式使内质网的静息钙水平降低. 之后又通过计算机辅助设计, 改造出D2~D4三个钙亲和力在0.6~160 μmol/L之间的cpV版本的Cameleon^[34]. 2016年, Greotti等^[35]报道证实, 采用D4替代D1的D4ER钙亲和力比D1ER更低, 动态变化范围更大, 能够更加有效地检测到内

质网钙水平的下降^[35-36]. 此外, Nagai组还通过改变CaM与M13之间连接肽段的长度而改变了Cameleon的亲和力, 如YC-Nano系列钙指示剂具有较高的钙亲和力(K_d=15~140 nmol/L), 其中的YC-Nano140具备了与Fura-2大致相当的灵敏度和动态范围, 而另外几个的灵敏度则高于Fura-2^[32].

d. 针对Cameleon荧光的优化: 2015年, Weiermair等^[37]使用Clover和mRuby2作为FERT供受体对, 制作出光毒性更小的光谱红移版本的内质网钙指示蛋白D1ERCmR2. 该工具解决了FRET型内质网钙指示剂与细胞的自发荧光以及胞浆钙指示剂Fura-2之间光谱重合造成的串色问题. 可以用于胞浆、内质网钙信号的同时检测, 同时较小的光毒性更有利于长时程实验的开展.

经过上述改造后, 所获得的Cameleon变种的各项指标中, 除动态变化范围外, 亲和力和定位方面都能优于化学钙指示剂的相应指标.

除基于CaM的Cameleon之外, 研究者们还使用其他钙结合蛋白作为钙响应元件, 设计出了TN-XL^[38]、apoK1^[39]等检测胞浆及内质网钙信号的FRET型GECIs.

2.2.2 基于钙传感器Troponin C的TN-XL

TN-XL没有使用CaM, 而是利用肌肉中的钙传感器Troponin C (TnC) 作为钙结合部分, 两端添加FRET供受体对, 可以快速、稳定地开展成像实验. TN-XL的动态变化范围可以达到400%, 在转基因果蝇突触前运动神经元末端的活体成像中, TN-XL快速且准确地检测到了荧光信号^[38]. 将TN-XL连接在电压门控的Ca²⁺通道Ca_v2.2的 α_{1B} 亚基羧基端, 制成的钙指示蛋白可以精细地检测到通道口附近几纳米内的钙信号^[40].

2.2.3 不含钙响应元件的apoK1

2006年, Osibow等^[39]报道了一种新型的内质网钙指示蛋白apoK1-er. 它由载脂蛋白的三环结构域改造而来, 氨基、羧基端分别连接了CFP和YFP. 当内质网钙库钙水平上升时, apoK1-er自身不会与Ca²⁺相互结合, 而是会与钙网蛋白calreticulin和二硫键异构酶ERp57结合, 导致自身的构象发生改变. 与之前的内质网钙指示蛋白相比, apoK1-er的主要优势在于它不与Ca²⁺结合, 它在细胞中的大量表达不会影响内质网中Ca²⁺的生理浓度, 提升了测量的准确性.

2.3 单荧光型钙指示剂

鉴于FRET型钙指示剂的光谱覆盖面宽、动态范围较小、测量方式相对较繁琐等缺陷, 研究者们在对FRET型钙指示剂进行改造的同时, 也设计并开发出一系列单荧光蛋白钙指示剂. 含单荧光蛋白的钙指示剂不再以荧光蛋白之间的FRET变化作为指示钙水平的标准, 而是将单个荧光蛋白的发射光强度变化作为指标, 通过荧光蛋白荧光强度的变化指示环境中钙离子的水平. 这类钙指示剂包括了GCaMP、GECO、jRCaMP等胞浆钙指示蛋白, 也包含了CEPIA1er、GCaMPER、mito-GCaMP等细胞器定位的蛋白质.

2.3.1 绿色荧光的GCaMP系列GECI

GCaMP是由最早被发现 GFP 改造而来. 1999年, Baird等^[41]对GFP蛋白进行改造构建出发光强度大大增加的EGFP (enhanced green fluorescent protein), 然后又用一段六肽GGTGGs将EGFP蛋白的氨基端与羧基端相连, 重新从中部进行酶切后形成新的氨基端和羧基端, 由此构建出

了cpEGFP (circularly permuted EGFP) (图4a). 2001年, Nakai等^[42]在cpEGFP的C端连接上CaM, 在cpEGFP的N端连接M13, 获得了GCaMP这种单色GECI (图4b). 当GCaMP中的CaM与Ca²⁺结合后, CaM构象改变并与M13相互作用, 由此牵引cpEGFP构象改变, cpEGFP的荧光增强 (图4c). 因此, GCaMP荧光强度的变化可以被用于指示胞浆钙水平的改变. 各实验室进一步对GCaMP进行了各种改进和升级 (图4b, d, e)^[43-46]. 其中Kim实验室于2013年改造出了钙亲和力更强且动态变化范围广的GCaMP6 (图4e) (GCaMP6m, $K_d=0.167\ \mu\text{mol/L}$, $F_{\text{max}}/F_{\text{min}}=38.1$, 表1), 指示效果更加灵敏, 可以在在体水平清楚地检测到神经元中单个动作电位引发的钙信号^[47]. 而GCaMP系列最新的jGCaMP7版本则更为优秀, 单个动作电位引发的钙信号可以使jGCaMP7s的荧光增强4倍, jGCaMP7c的体外动态范围达到了惊人的145 (表1), 远远超过了化学类钙指示剂, 因而可以更好地追踪神经细胞中钙信号的动态变化^[48]. GCaMP系列的GECI在生物整体成像水平, 特别是神经科学及发育生物学领域获得了极为广泛的应用.

鉴于以上介绍到的大多数钙指示蛋白上都带有CaM, 这些外源的CaM可能会影响细胞CaM通路中的下游反应. 为了解决此问题, 刘晓冬实验室2018年在GCaMP6的氨基端添加了一段CaM的靶序列CBM (IQ domain of neuromodulin) 区, 获得了GCaMP-X钙指示蛋白^[49] (图4f). 当GCaMP-X不结合Ca²⁺时, CBM区可以与GCaMP-X中的CaM区域结合, 防止CaM与各种细胞内源的CaM靶蛋白结合, 从而有效地避免GCaMP上的CaM对细胞中L型钙通道的激活及其下游的转录造成影响. 而当GCaMP结合Ca²⁺后, 由于M13与CaM之间的亲和力更强, CaM从CBM上解离下来转而结合M13, 使得GCaMP发出更强的荧光. 因此, CBM不会影响GCaMP本身的钙指示能力 (表1). 这种新型的钙指示蛋白有效地减小了外源钙指示剂对细胞造成的影响, 为钙成像实验的开展提供了更多选择.

2.3.2 其他颜色的GECI: GECO、RCaMP、NCaMP及XCaMP等

基于GFP的荧光蛋白GCaMP系列的指示工具几乎已经达到了优化的极限. 但GCaMP系列的GECI仍具有GFP的固有局限, 其中一个问题就是

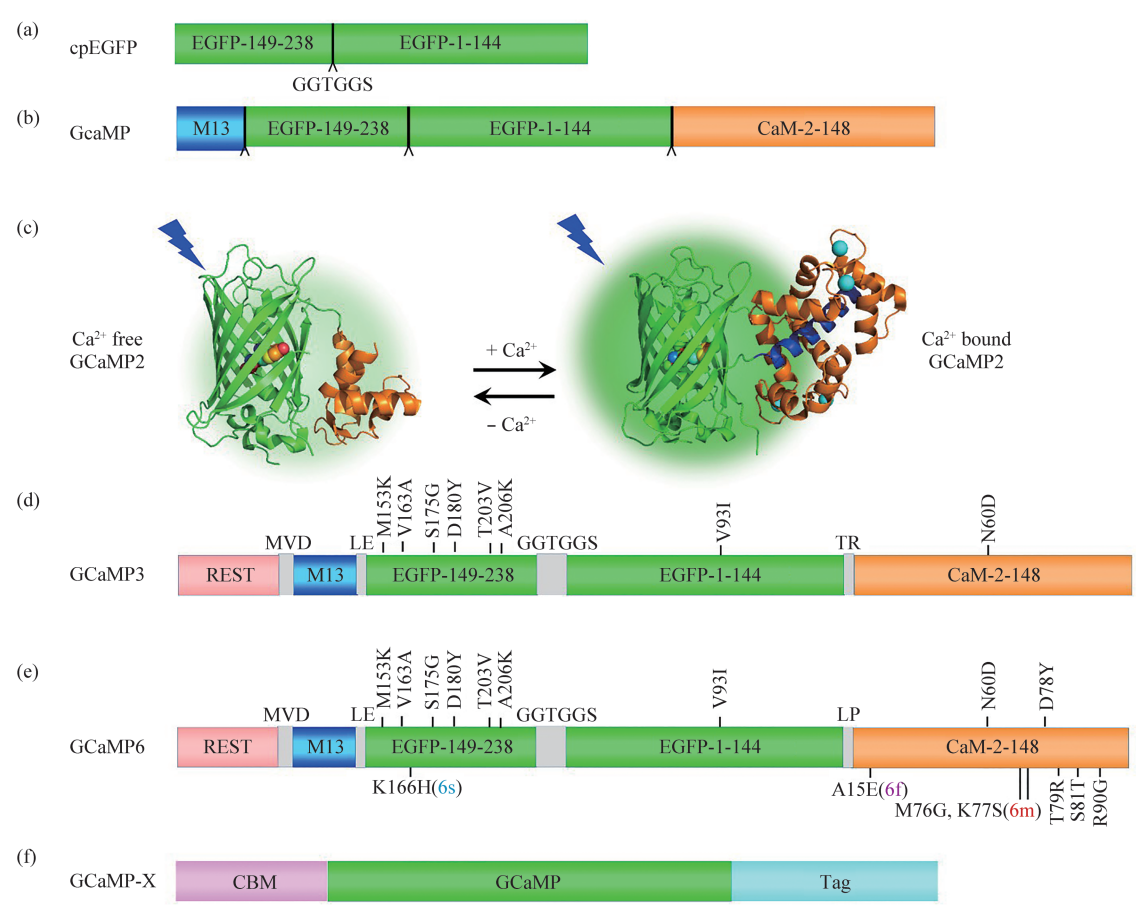


Fig. 4 Schematic map and working principle of GCaMPs

图4 GCaMP系列蛋白的工作原理及模式图

(a, b) cpEGFP和GCaMP蛋白的一级结构模式图。(c) GCaMP作为钙指示蛋白的工作原理示意图(以GCaMP2为例)。(d-f) GCaMP3、GCaMP6(6s, 6f, 6m)和GCaMP-X的蛋白质一级结构模式图。

GFP 激发光波谱比较宽, 会串色到 YFP 和 CFP 通道中. 这导致在应用 GCaMP 系列指示剂时, 能同时采集的其他荧光数目有限, 从而限制了 GCaMP 在同时检测多种细胞的钙信号活动, 或多种细胞信号等多色荧光成像中的应用. 为此, 科学家们以 GCaMP 或其他 GECI 为设计蓝本, 得到并改进了多种其他荧光的 GECI. 基本的设计思路是用环化的其他荧光蛋白来替代 GCaMP 中的 cpEGFP, 或者是对构成 cpEGFP 发色基团的一些关键氨基酸进行突变, 使之发出其他荧光. 然后对 CaM、CaM 与 M13 或荧光蛋白之间的互作界面等处进行随机突变或基于 GECI 结构的蛋白质工程学上的改变, 乃至更换 CaM 的靶序列等, 来进一步优化其各种性能. 科学家们以此获得了能发出不同荧光的一系列新 GECI, 如 Campbell 组的 GECO 系列^[50]、Looger 组的 B/Y/Cy/RCaMP 系列^[51]、Bito 组的 X-CaMP 系列等^[52].

目前除了还没有青色荧光 (Cyan) 的 GECI, 以及蓝色荧光的 GECI 表现一般外, 其他荧光的 GECI 均有表现较好的版本, 下边将重点介绍每种荧光的 GECI 中较为出色的几个.

a. 橙色、红色或近红外荧光的 O-GECO1、R-GECO1.2、jRGECO1a 和 NIR-GECO1: Zhao 等^[50]在 2011 年通过改造 GCaMP3 而得到了 GECO (genetically encoded Ca²⁺ indicators for optical imaging) 系列的钙指示蛋白. 他们用环化后的 mApple 荧光蛋白代替原有的 cpEGFP 部分, 或将 GFP 突变为其他荧光的蛋白质, 并对 CaM 部分进行突变等操作, 最终得到了一系列不同荧光的 GECO 指示剂. 除了比 GCaMP3 表现更好的绿色荧光 G-GECO 外, 他们还首次获得了多种其他荧光的 GECI, 包括蓝色荧光 B-GECO, 具有良好动态范围的红色荧光 R-GECO (K_d=0.482 μmol/L,

$F_{\max}/F_{\min}=17$, 表 1), 以及比值型的 GEM-GECO (见 2.4.1 节) 等. 他们之后又进一步做了改进, 获得了动态范围更为优异的红色钙指示剂 CAR-GECO ($F_{\max}/F_{\min}=27$)、R-GECO1.2 ($F_{\max}/F_{\min}=33$) 以及橙色的 O-GECO1 ($F_{\max}/F_{\min}=146$)^[53]. 这些橙色及红色的 GECI 因钙亲和力稍低 ($\sim 1 \mu\text{mol/L}$) 而不适用于检测较小的钙信号 (表 1), 但它们优异的动态范围无疑昭示着其广阔的应用前景.

R-GECO 的一个缺点是容易被蓝光照射而激活, Looger 组也制备了一组多荧光的 GECI, 其中用环化的 mRuby 获得了红色荧光的 RCaMP1. 虽然 RCaMP1 的灵敏性和动态范围都不如 R-GECO, 但它不容易被蓝光激活的特性使得它更适用于光遗传学操作^[51]. Bito 组用环化的 mApple 蛋白制作出了性能比 R-GECO1 稍优的 R-CaMP1.07, 并进一步将前两者中的 M13 短肽替换为来自钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶激酶 2 (CAMKK2) 的 CKKAP 短肽, 得到了响应速度更快、亲和力更高的 R-CaMP2 ($K_d=69 \text{ nmol/L}$) 和 R-GECO2L ($K_d=26 \text{ nmol/L}$). 用 R-CaMP2 可以分辨 20 Hz 动作电位引发的单个钙信号^[54]. 但 R-CaMP2 的动态范围不够高, 只有 4. 因而 Dona 等^[55] 进一步对 R-GECO 和 R-CaMP2 进行了改进, 获得了灵敏度更高的 jRGECO1a 和 jRCaMP1a, 其中 jRGECO1a 的钙亲和力更强 (148 nmol/L), 灵敏度与 GCaMP6 相当, 动态范围也不错 (11.6), 因而更适宜于检测较弱的钙信号.

为了进一步削弱由于光谱重叠造成的限制, 2019 年, Qian 等^[56] 将 GECI 的荧光发射范围扩大到了近红外区域, NIR-GECO1 的最大激发及发射光分别为 678 和 704 nm, 可以检测到脑组织中的钙瞬变现象, 是非常理想的可以与蓝光激活的光遗传学工具共用的钙指示剂. 但作为初代的近红外 GECI, NIR-GECO1 仍存在荧光亮度不够, 反应不够迅速等问题, 还有待进一步改进.

b. 蓝色荧光的 XCaMP-B: 2019 年, Inoue 等^[52] 系统性地用 CKKAP 替代 CaM 的靶序列 M13 短肽, 并对该区进行了优化, 结合其他改造, 获得了一套四色的 XCaMP 钙指示蛋白, 包括 XCaMP-B (B 表示发射光为蓝色)、XCaMP-G (G 表示发射光为绿色)、XCaMP-Y (Y 表示发射光为黄色), 以及 XCaMP-R (R 表示发射光为红色). 与 GECO 系列相比, XCaMP 系列指示剂的希尔系数 (Hill coefficient) 较低 (1~2)、钙亲和力更高 ($100\sim 200 \text{ nmol/L}$)、钙响应速度更快. 这些更加优越的生

物物理特性使得 XCaMP 可以快速且灵敏地检测微弱钙信号, 因而可以将这些不同颜色的钙指示蛋白分别表达于不同类型的神经元细胞, 从而实现对动态神经环路的相关研究. XCaMP 系列 GECI 的缺点是在生理 pH 下的动态范围较小, 除 XCaMP-G 以外, 其余的动态范围均在 10 以下. 而其中 XCaMP-B 的动态范围在 5 左右, 是目前最优的蓝色荧光 GECI.

c. 绿色荧光的 N-CaMP7: mNeonGreen 是目前已知最亮的 GFP, 其发射光谱在 GFP 和 YFP 之间. 最重要的是其激发和发射光谱与 CFP 分得很开, 可以方便地同时进行 CFP 和 YFP 动态荧光成像^[57]. 2016 年, Barykina 等^[58] 用 mNeonGreen 替代 EGFP, 并在其氨基 (1~145) 和羧基端 (146~236) 中间插入 TnC 制作了 NTnC 绿色钙指示剂, 并用它记录到了单个动作电位引发的钙信号. 相比可以结合 4 个钙离子的 CaM, TnC 只结合 2 个钙离子, 因而其响应钙离子浓度变化的线性程度更高. 但 NTnC 在生理条件下的动态范围比较小 (<3), 且该指示剂的荧光在钙水平增加的时候反而降低. 在此基础上, Subach 等^[59] 将 NTnC 的钙结合结构替换为 CaM-M13, 制成了目前最亮的绿色钙指示蛋白 NCaMP7, NCaMP7 具有优秀的钙亲和力 (125 nmol/L) 及动态范围 ($\Delta F/F=27$), 可应用于神经元活动的测量. NCaMP7 的缺点是受 Mg^{2+} 的影响, 在没有 Mg^{2+} 时, 其荧光的动态范围可以达到 89, 因此 NCaMP7 还有待进一步改进.

d. 黄色荧光的 jYCaMP: 2020 年, Mohr 等^[60] 在 jGCaMP7 的基础上进行突变, 得到了 jYCaMP 系列的黄色荧光钙指示剂, 包括 jYCaMP1 和 jYCaMP1s 两种. 与前文提到的黄色荧光钙指示蛋白 XCaMP-Y 相比, jYCaMP 系列的动态变化范围明显更大, 其中体外测试 jYCaMP1s 的动态变化范围可到达 18~19, 而 XCaMP-Y 在生理 pH 下的动态变化范围仅在 6~8 左右. 与 jGCaMP7 等绿色荧光钙指示剂相比, jYCaMP1 和 jYCaMP1s 更加适用于双光子显微 (two-photon microscopy) 成像, 在 1 030 nm 激发光下 jYCaMP1 和 jYCaMP1s 的亮度是 jGCaMP7b 的 2.7 倍, 在双光子检测小鼠和果蝇脑神经钙信号的实验中展现了更加灵敏的指示能力.

2.4 比值型 GECIs

单荧光 GECI 与单荧光化学钙指示剂类似, 难以直接展示静息的钙水平, 只能指示钙信号的变化 (图 1g). 而比值型 GECI 则与比值型化学钙指示剂

类似, 能发出两种响应钙信号方式不同的荧光. 其荧光比值与GECI蛋白表达量无关, 能直接指示钙离子水平, 因而更适用于钙稳态的检测.

2.4.1 单激发双发射的比值型GECI

这类GECI可以被一种激发光激活, 产生两种不同的荧光. FRET型GECIs可以算是这其中一种比较特殊的比值型GECI. 它们被供体荧光蛋白的激发光照射后, 产生的FRET荧光与供体荧光的比值可以直接指示钙水平及钙信号. 不过这类GECI的动态变化范围和灵敏度远远落后于GCaMP和CEPIA1er等钙指示蛋白, 如何提高这一类钙指示剂的性能是目前较为关键的问题.

GEM类GECI: 其中GEM-GECO是Zhao等^[50]在2011年用定向进化的方式优化GECO系列GECI的时候, 意外得到的产物. 它可以被390 nm的紫外光激发, 产生蓝色(F_{Blue})和绿色(F_{Green})的荧光. 在结合 Ca^{2+} 后, 发射光谱会由长波向短波偏移, $F_{\text{Blue}}/F_{\text{Green}}$ 增加. 因而可以用两者的比值直接指示静息钙离子浓度及动态钙信号的变化. GEM-GECO的灵敏度稍低($K_d = 340 \text{ nmol/L}$) (表1), 但是它的荧光比值变化范围可达110, 是目前动态范围最大的比值型GECI. GEM-CEPIA1er则是GEM-GECO的低亲和力版本, 用于检测内质网的钙水平 (详见下文第3.1节). GEM类GECI的一个缺点是它们的激发光位于蓝紫色波段, 具有较大的光毒性, 因而无法被应用长时程的钙水平检测.

2.4.2 双激发单发射的比值型GECI

2014年, Alonso等^[61]将不结合底物的水母素(apo-aequorin)作为钙感受元件连接到水母GFP上, 得到GFP-aequorin protein (GAP)这种新型的荧光蛋白. GAP能分别吸收403和470 nm的光, 发出510 nm的荧光. GAP的荧光随钙水平改变而改变, 其中由403 nm激发光产生的荧光(F_{403})随钙水平增加而降低; 而470 nm激发光产生的荧光(F_{470})则随钙水平增加而增加. 因而GAP是一种新型的比值型GECI, 可以用 F_{470}/F_{403} 来指示钙水平的变化. GAP的亲和力为200 nmol/L, 动态范围在4左右, 均不是特别出色. 其优点在于两个元件均来自水母, 在哺乳动物细胞不存在同源蛋白, 因而对后者各种钙信号通路的干扰较小. 它的内质网定位的低钙亲和力版本erGAP1能在转基因小鼠神经元中较好地表达, 并展示出了优于经典内质网钙指示剂D1ER的动态范围 (详见下文第3.1节).

2.4.3 双激发双发射的比值型GECI

除了GEM-GECO/GEM-CEPIA1er外, 上述几类比值型GECI的动态范围都远比单荧光GECI的低. 为此, 科学家们设计出了双激发双发射的比值型GECI. 其设计原理为: 将单荧光GECI和不具有钙响应能力的荧光蛋白或标签做成融合蛋白. 用前者指示钙水平, 从而具有与其模板类似的动态范围和灵敏度, 并以后者显示GECI的浓度, 而两者的荧光比值信号则消除了GECI浓度等带来的假象, 从而可以直接反映环境中的钙水平.

2017年, Cho等^[62]在GCaMP基础上添加红色荧光蛋白mCherry, 并使用了降低GFP-mCherry之间FRET信号的ER/K链接肽段, 制成了GCaMP-R系列融合蛋白, 从而可以用GCaMP/mCherry荧光比值直接指示胞浆钙水平及钙信号. 2019年, Luo等^[63]在G-CEPIA1er的基础上添加SNAP标签构成融合蛋白GCEPIA1-SNAP_{ER}, 使用荧光底物标记融合蛋白后, G-CEPIA1er和荧光标签的荧光比值即反映了内质网钙水平. 该方法克服了Cho等研究中使用mCherry所带来的成熟慢易聚合的缺点, 同时选择647 nm激发的荧光底物, 削弱了双荧光之间光谱重叠造成的FRET误差. 但SNAP标签上添加化学荧光标记分子时的效率不是100%, 因而会引入额外的误差.

2020年, Li等^[64]将GCaMP、R-GECO、jRCaMP、G-CEPIA1er、mito-GCaMP等单色钙指示蛋白和钙不敏感的可见光激发荧光蛋白用短肽连接, 制作了由可见光激发的、被命名为VR-GECIs的比值型GECIs. VR-GECIs可被用于检测胞浆(riG6m)、内质网腔(miGer)、线粒体腔的钙水平(mt-riG6m), 扩大了双荧光比值型GECIs的应用范围. 实验结果表明: VR-GECIs保留或优化了母本钙指示蛋白的钙响应能力; 荧光比值可以直接用于比较细胞间或细胞内的钙水平差异; 同时VR-GECIs由可见光激发, 光毒性较低, 可用于长时程检测细胞钙信号. 其中的miGer是用已知钙亲和力最低的内质网钙指示蛋白G-CEPIA1er制备的, 其钙亲和力更低(miGer: 425 $\mu\text{mol/L}$ vs. G-CEPIA1er: 293 $\mu\text{mol/L}$), 同时指示ionomycin引发的钙库清空时的最大相对变化更大, 暗示着miGer的动态变化范围要大于G-CEPIA1er. miGer是当前最优的内质网钙指示工具. 运用miGer对细胞进行长时程检测的结果表明, HEK-293细胞的内质网钙水平在有丝分裂过程中相对稳定.

2.5 基于生物发光-荧光的eNL (Ca²⁺) 和GLICO等

上述荧光类GECI虽然具有良好的时空分辨率,但由于它们需要借助于外界光源的激发才能产生信号,所以它们具有外界光照射造成的光毒性和光漂白等固有缺陷,还受到来自样品自发荧光的干扰等.而基于生物发光的GECI则在底物作用下即可发光,不需要外源激发光,可以有效避免上述问题,因而它们是荧光类GECI的有益补充.

自水母素以来,生物发光蛋白在细菌、昆虫、真菌、海洋生物等多种生物体中不断被发现,包括萤火虫(*Photinus pyralis*)、海肾(*Renilla*)、深海虾(*Oplophorus gracilirostris*)中都有可以生物发光的荧光素酶(luciferase)^[65].2016年,Suzuki等^[66]对发光强度较高的发光蛋白荧光素酶NanoLuc进行改造,基于生物发光共振能量转移BRET(bioluminescence resonance energy transfer)技术,将NanoLuc与不同颜色的荧光蛋白连接为融合蛋白,构建出了5种颜色的发光蛋白,并将其命名为eNLs,提高了生物发光蛋白的光谱多样性,图5a为eNLs中绿色发光蛋白GeNL的模式图.Suzuki等^[66-67]同时将这些新型的发光蛋

白改造成了具有钙响应能力的钙指示蛋白,命名为eNL (Ca²⁺),图5b为通过GeNL改造得到的GeNL (Ca²⁺)₄₈₀.同样是2016年,Yang等^[68]在钙响应蛋白TnC的两端添加Venus和NanoLuc构建出BRET型的钙指示蛋白CalflexVTN.然而,目前这一类发光蛋白制成的钙指示剂应用却十分有限,原因如下:a.早期的eNL (Ca²⁺)动态范围较小,灵敏度不够(表1);b.需要在实验过程中不断加入发光底物Furimazine,操作繁琐,底物对结果的影响大;c.来自非焦平面的发光不利于3D成像.2019年,Farhana等^[69]将GCaMP和生物发光蛋白相结合,构建出荧光/生物发光相结合的新型钙指示蛋白GLICO(图5c).GLICO在生物发光模式下拥有所有生物发光GECIs中最高的体外动态变化范围($F_{\max}/F_{\min}=22$),但在细胞内的动态范围不是特别高,在4左右.在荧光模式下模拟GCaMP系列钙指示剂的指示原理,GLICO这种在荧光和生物发光模式之间切换的能力,生物发光模式下可以摆脱外界光源的束缚及干扰,荧光模式下可以克服发光蛋白的不足,为生理和病理条件下Ca²⁺的实时成像提供更多机会.

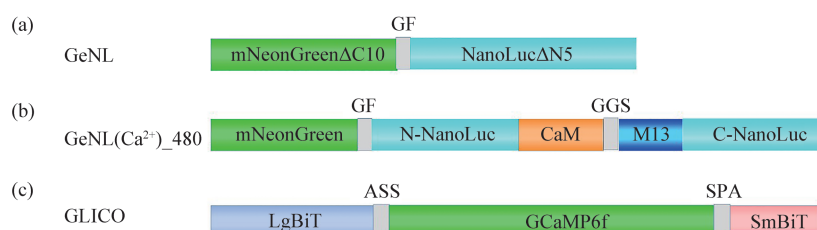


Fig. 5 Schematic map of eNL (Ca²⁺) and GLICO

图5 基于生物发光-荧光的eNL (Ca²⁺)和GLICO模式图

GeNL、GeNL (Ca²⁺)₄₈₀以及GLICO蛋白的一级结构模式图.

3 GECI在细胞器钙成像中的应用

跟化学钙指示剂相比,除在整体成像中的广泛应用外,GECI的另一个重大优势在于它们可以在被添加不同的定位肽后,特异性定位于某种细胞器,实现对细胞器钙信号的检测.

3.1 内质网定位的GECI

将GECI定位在内质网相对简单,只需要在GECI的N端添加内质网定位信号肽,C端添加内质网驻留序列KDEL即可.内质网是动物细胞内最

大的钙库,其中的Ca²⁺对细胞稳态的维持、蛋白质的正确折叠,以及胞质和线粒体钙信号的产生等至关重要.因此准确测量内质网钙库钙水平,对于钙信号的研究具有重大意义.内质网静息钙水平在亚毫摩尔级别.因而获得钙亲和力足够低的钙感受器元件是构建内质网定位GECI的最大挑战.

从第一个GECI水母素,早期的Cameleon,到近年的GCaMP系列、GECO和GAP等,均有ER定位的版本乃至低钙亲和力的ER版本^[20, 26, 33-34, 61, 70-71].虽然这些GECI使得内质网钙

水平的检测成为可能, 但它们的钙亲和力多数偏高, 动态范围较小, 难以灵敏地检测内质网钙信号(表1). 其中Palmer等^[33]制作的D1ER亲和力较低($K_d=59\sim 296\ \mu\text{mol/L}$, 表1), 且在钙库清空后信号能降低30%左右, 因而应用较广, 其后期钙亲和力稍低的改进版本D4ER^[35], 以及更换为GFP-RFP荧光的D1ERcmR2^[37]版本则分别稍微改善了其动态范围($\Delta F/F\sim -40\%$)或光谱.

降低GECI钙亲和力的一种策略是对CaM-M13的互作界面进行改造, 另一种策略则是选择新的钙感受元件(详见2.2节). 而Zou等^[72]则试图通过直接在EGFP上构建钙离子结合域来获得钙亲和力低的GECI. 他们首先在EGFP的发色团位置处插入了一个钙离子结合域, 并添加内质网定位序列后, 构建出名为Ca-G1-ER的钙指示蛋白. 该工具不含CaM, 因而消除了传统GECI所带有的CaM对细胞造成的影响. 这种钙指示蛋白结合钙离子之后吸光度会发生改变, 结合钙离子后最大激发光会从490 nm向398 nm移动, 因此398 nm和490 nm激发光下的发射光比值反应了内质网钙水平的变化. Ca-G1-ER的钙亲和力虽然够低($0.8\ \text{mmol/L}$), 但动态范围较小($\Delta F/F\sim -10\%$). 他们之后将EGFP的147、202、204、223以及225位氨基酸进行突变, 在EGFP上产生了一个 Ca^{2+} 结合区, 由此得到了CatchER这种结构简单、钙释放迅速的钙指示蛋白, 其荧光变化可以指示内质网钙水平的改变, 动态范围较好($\Delta F/F\sim -50\%$)^[73]. 但CatchER是单色GECI, 且在动物细胞内表达水平相对较低, 这些问题均限制了其应用.

当前最优的内质网钙指示工具首推CEPIA1er. 上述内质网GECI或钙亲和力, 或动态范围仍不够好. 为此, 2014年, Suzuki等^[74]首先将D1ER中低亲和力的CaM-M13钙感应元件替换进GCaMP2中, 制备出了cfGCaMP2($K_d=14.5\ \mu\text{mol/L}$). 然后以此为蓝本, 针对CaM的钙结合位点进行了一系列的基于结构-功能的定向突变, 获得了钙亲和力低且动态范围大的CEPIA (calcium-measuring organelle-entrapped protein indicators). 他们进而将CEPIA中的CaM-M13替换进动态范围优异的GECO系列GECI, 并进行了进一步的定向突变优化, 最终获得了一系列不同荧光的CEPIA指示蛋白. 包括红色荧光的R-CEPIA1er ($K_d=565\ \mu\text{mol/L}$, $F_{\max}/F_{\min}=8.8$)、绿色荧光的G-CEPIA1er ($K_d=672\ \mu\text{mol/L}$, $F_{\max}/F_{\min}=4.7$)和比值荧光的GEM-CEPIA1er ($K_d=$

$558\ \mu\text{mol/L}$, $R_{\max}/R_{\min}=21.7$). CEPIA1er系列是当前ER定位GECI中综合低亲和力高动态范围的最优解. 其中GEM-CEPIA1er还是一种比值型GECI可以直接测定内质网钙水平. 但GEM的紫外激发光有细胞毒性, 为此Li等^[64]将红色荧光蛋白mKate连接到钙亲和力最低的G-CEPIA1er上, 获得了比G-CEPIA1er钙亲和力稍低和动态范围稍大比值型miGer. miGer另外一个优点是可见光激发, 因而可以对细胞进行长时间成像.

3.2 高尔基体定位的GECI

高尔基体是数个短平囊泡堆叠在一起形成的具有极性的细胞器, 其靠近内质网的一面称为顺面, 靠近质膜的一侧称为反面^[75]. 高尔基体中储存了大量游离 Ca^{2+} (静息钙水平为 $130\sim 250\ \mu\text{mol/L}$)^[76], 参与了高尔基体内脂质及蛋白质的修饰^[77]. 管腔内的pH由顺面至反面呈现6.7~6.0逐渐递减的趋势, 是一种弱酸性的细胞器, 因此高尔基体钙指示剂要做到对弱酸性环境不敏感^[78]. 除前文提到过高尔基体定位的钙指示蛋白GT-YC3.3之外, 目前还有许多高尔基体定位的GECI, 包括通过在水母素、D1cpv或GAP等胞浆钙指示蛋白上添加高尔基体定位肽制成的Go-Aeq、Go-D1cpv以及goGAP1^[21, 61, 79].

3.3 线粒体定位的GECI

除了内质网以外, 细胞的线粒体中也存储了 Ca^{2+} , 参与了线粒体能量代谢、线粒体分裂等重要的细胞功能的调控^[80]. 因此线粒体钙指示剂是研究线粒体功能过程中不可缺少的一类工具.

线粒体定位GECI常会出现定位不准确(部分胞浆定位)的问题. 研究表明, 在钙指示蛋白N端连接多次重复的而不是单次的线粒体定位序列可以增强线粒体钙指示蛋白的定位准确性^[81-83]. 最新的FRET型线粒体钙指示蛋白4mtD3mC3+16定位准确率高, 但动态变化的范围较低($R_{\max}/R_{\min}=1.92$)^[83].

线粒体定位GECI面对的另一个问题是线粒体中的钙水平可以在 $\sim 100\ \text{nmol/L}$ 到 $100\ \mu\text{mol/L}$ 之间波动, 是普通胞浆钙信号的10~100倍. 因此与胞浆钙指示剂相比, 需要钙亲和力不同的指示剂进行线粒体钙信号的检测. 检测较小线粒体钙信号的GECI工具主要由各版本的GCaMP发展而来, 如mito-GCaMP、2mt-GCaMP6m和4mtGCaMP6^[84-87]等. 其中表现最佳的单荧光型线粒体钙指示蛋白mito-GaMP6s的动态变化可达到63.2, 克服了

FRET型钙指示蛋白在动态变化上的限制^[86],而基于GCaMP6m的mt-riG6m则是能检测静息钙水平的最佳比值型线粒体GECI,其动态范围为26^[64].而Iino实验室制备了钙亲和力在0.16~59 $\mu\text{mol/L}$ 的CEPIA2/3/4mt^[74],从而可以分别检测线粒体内不同的钙动态范围的钙信号.

除此之外,线粒体基质的pH并不稳定.静息状态下,不同细胞线粒体基质的pH值维持在7.2~8.2附近^[78, 88];当胞浆 Ca^{2+} 的浓度上升时,质膜上的钙泵激活导致胞浆和线粒体基质中 H^{+} 的增加、pH下降^[88];同时为保持相邻线粒体之间膜电位的平衡,线粒体基质还会发生碱化瞬变(pH flash),导致pH自发的瞬时升高^[89].由于除响应钙水平的变化外,现有GECI的荧光还会随pH的改变而发生变化.因此,现有的线粒体钙指示剂仍需被进一步改进,使之对pH不再敏感,减弱或消除pH改变所造成的假象.

3.4 溶酶体定位的GECI

溶酶体是酸性细胞器,负责降解来自细胞内或细胞外的大分子,由于钙指示蛋白的荧光稳定性会被溶酶体内的酸性环境(pH 4~5)影响,且异源表达的钙指示蛋白面临被溶酶体降解的风险,所以目前只有化学钙指示剂被成功应用到溶酶体腔的钙水平检测^[90-91].Fura-Dx检测到溶酶体中的钙水平在500 $\mu\text{mol/L}$ 左右^[90],因此溶酶体又被称为“酸性钙库”^[92].目前溶酶体定位的GECI都定位在溶酶体膜的外侧,比如将GCaMP3锚定在溶酶体钙通道TRPML1上的GCaMP3-TRPML1(GCaMP3-ML1),可用于检测溶酶体钙释放^[93].因此亟需一种定位在溶酶体腔一侧的GECI,来推动溶酶体作为钙库的功能研究.

3.5 细胞核定位的GECI

细胞核定位的GECI主要是通过胞浆GECI上添加核定位序列得到的.包括NLS-YC^[94-95]、NLS-GCaMP^[96]、nucGAP^[61]等.细胞核中产生的钙信号可以直接调控基因的转录、影响突触活性^[96-97].核钙的监测对研究这些关键基因的功能至关重要.

3.6 质膜定位的GECI

细胞质膜是隔绝和沟通细胞内外的一个关键结构,其附近的钙信号具有重要的生理功能和研究价值.研究者们开发出了带质膜定位序列的GECI,如Lck-GCaMP^[98]、GCaMP-CAAX^[99-100]、PM-GCaMP6^[101]等,PM为实现膜定位常用方法,因

此PM-GCaMP6具有普遍的适用性.这些被锚定在质膜胞浆侧的钙指示蛋白,可特异性地记录质膜附近产生的钙信号的频率及振幅.

3.7 细胞微钙区域的GECI

相对于会在胞浆乃至细胞器内做三维自由扩散的化学钙指示剂,融合不同的定位肽或蛋白的GECI可以特异性定位于某些亚细胞结构或某些通道口处,并仅能进行较慢的二维扩散.这一特性使得GECI特别适合细胞微钙区域内钙信号的测量.2014年,Cheng实验室利用GCaMP6f与心肌细胞肌浆网膜蛋白Triadin或junctin融合形成的GCaMP6f-T/J捕捉到了心肌细胞二联体纳米区域内毫秒量级的钙信号“纳米钙火花”^[102].诸多研究还开发出了许多定位在 Ca^{2+} 通道口或转运体附近的GECI,如与质膜钙泵PMCA(plasma membrane calcium/calmodulin dependent ATPase)融合以测定心肌细胞钙泵附近钙信号的PMCA4-GCaMP2^[103],以及可以测量钙通道口附近钙信号的 $\alpha 1/2(f)$ GCaMP^[104]、CaV2.2-TN-XL^[40]、G-GECO1-Orai1^[105]及GCaMP6f-Orai1^[101]等.利用G-GECO1-Orai1,Calahan组发现Orai1通道有开放持续时间在毫秒级和秒级的两种开放模式^[105].利用GCaMP6f-Orai1,Cheng实验室则发现Orai1能在WM793黑色素瘤细胞中介导产生持续几秒的自发“ Ca^{2+} glow”钙信号^[101].这些发生在内质网-质膜微钙区域的信号,很可能是Orai1钙通道所介导的基本钙信号单元.因而GECI帮助科学家们以一种全新的方式揭示了质膜-内质网膜接触位点区域的钙信号产生模式.

4 展 望

本文简要介绍了钙指示剂的发展历史以及研究现状,并对各类钙指示剂的优缺点进行了总结.概括地来说,化学合成的钙指示剂投入应用最早、操作简单并可有效检测胞质内的钙信号,但是,染料毒性大、定位特异性较差等因素限制了这类钙指示剂的应用范围,并推动了GECI的产生.目前GECI的种类繁多、功能各异,很多指标已经远远超过了化学钙指示剂,并将钙信号研究领域分别推进到整体、亚细胞器乃至单通道水平.可以根据不同的实验需求,选择适当的指示蛋白开展实验,应用范围较广.

随着技术的不断发展,新型钙指示蛋白的出现正在改变着钙指示剂领域的现状,结合以上各类钙指示剂的优势与不足,我们相信在不久的将来,会

诞生一种集百家之长的钙指示剂, 以推动钙信号转导研究的不断发展. 导机制领域的研究进程, 促进钙成像技术以及钙信

Table 1 Parameters for GECI calcium indicators
表1 常见GECI钙指示剂性能参数

亚细胞定位	类型	名称	钙亲和力/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	希尔系数	动态范围	激发峰/nm				发射峰/nm	参考文献
						-Ca ²⁺	+Ca ²⁺	-Ca ²⁺	+Ca ²⁺		
胞浆	FRET型	YC2.60	0.04 0.09/0.95	2.4 2.7/1.0	5.6 13	435		480,	530		[31-32]
	FRET型	YC3.60	0.25 0.22/0.78	1.7 3.6/1.2	5.6 14	435		480,	530		[31-32]
	FRET型	YC-Nano140	0.14/0.75	2/0.9	13	435		480,	530		[32]
	FRET型	TN-XL	2.50	1.7	5	432		475,	527		[38]
	绿色荧光	GCaMP	0.24	3.3	4.5	488	487		510		[42]
	绿色荧光	GCaMP1.6	0.15	3.8	4.9	489	488	510	509		[43]
	绿色荧光	GCaMP2	0.15 0.55	1.8	5.1	491	487	511	508		[44,46]
	绿色荧光	GCaMP3	0.35 0.54	2.54	13.5	505	497	517	515		[44,46]
	绿色荧光	GCaMP5G	0.45	2.46	32.7	505	497	517	515		[46]
	绿色荧光	GCaMP6m	0.17	2.96	38.1	505	497	517	515		[47]
	绿色荧光	GCaMP6s	0.14	2.9	63.2	505	497	517	515		[47]
	绿色荧光	GCaMP6f	0.38	2.27	51.8	505	497	517	515		[47]
	绿色荧光	jGCaMP7f	0.17	2.3	30.2	505	497	517	515		[48]
	绿色荧光	jGCaMP7s	0.07	2.49	40.4	505	497	517	515		[48]
	绿色荧光	jGCaMP7c	0.30	2.44	145.6	505	497	517	515		[48]
	绿色荧光	jGCaMP7b	0.08	3.06	22.1	505	497	517	515		[48]
	绿色荧光	XCaMP-G	0.20	1.8	14 ¹⁾	487	487	512	514		[52]
	绿色荧光	XCaMP-Gfo	0.13	1.3	8~10 ¹⁾	494	488		514		[52]
	绿色荧光	XCaMP-Gf	0.12	1.4	8~10 ¹⁾	492			514		[52]
	红色荧光	XCaMP-R	0.1	1.1	9 ¹⁾	574	561	598	593		[52]
	黄色荧光	XCaMP-Y	0.08	1.5	6~8 ¹⁾	498	503	525	527		[52]
	蓝色荧光	XCaMP-B	0.07	1.3	5 ¹⁾	376	374	443	446		[52]
	绿色荧光	NCaMP7	0.13	1.8	27	512		522			[59]
	黄色荧光	jYCaMP1	0.08	--	13 ¹⁾	513	510	--	--		[60]
	黄色荧光	jYCaMP1s	0.07	--	18 ¹⁾	513	513	--	--		[60]
	绿色荧光	G-GECO1.2	1.15	2.11	23	498		513			[50]
	蓝色荧光	B-GECO1	0.16	2.64	7	378		446			[50]
	红色荧光	R-GECO1	0.48 0.34	2.06 2	16 12	577	561	600	589		[50,55]
	红色荧光	R-GECO1.2	1.2	2.79	33	564	556	595	585		[53]
	橙色荧光	O-GECO1	1.5	2.06	146	545	543	570	564		[53]
	红色荧光	CAR-GECO1	0.49	2.01	27	565	560	620	609		[53]
	红色荧光	RCaMP1h	1.13	2.2	12.6	--	--	--	--		[51]
	红色荧光	jRCaMP1a	0.21	0.86	3.2	--	--	--	--		[55]
	红色荧光	jRCaMP1b	0.71	1.6	7.2	--	--	--	--		[55]
	红色荧光	jRGECO1a	0.15	1.9	11.6	--	--	--	--		[55]
内质网	近红外荧光	NIR-GECO1	0.22	1.03	8	678		704			[56]
	蓝绿荧光比值型	GEM-GECO1	0.34	2.94	110	397	390	511	455		[50]
	红绿荧光比值型	miG6m	0.14	2.8	--	498,	588	510,	635		[64]
	FRET型	YC3er	4.4	0.76	--	433		475,	527		[26]
内质网	FRET型	apoK1-er	124	1.148~1.245	--	433		475,	527		[39]

续表1

亚细胞定位	类型	名称	钙亲和力/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	希尔系数	动态范围	激发峰/nm	发射峰/nm	参考文献
	FRET型	D1ER	0.5/56.46 0.5/296	1.18/1.67 1.08/1.35	--	433	475, 529	[33,35]
	FRET型	D4ER	321	1.01	--	433	475, 529	[35]
	FRET型	D1ERCmR2	200	0.5	--	490	510, 560	[37]
	绿色荧光	G-CEPIA1er	672 597 293	1.95 0.95 1.5	4.7	498 497	512 511	[63-64, 74]
	红色荧光	R-CEPIA1er	565	1.70	8.8	576 562	570 561	[74]
	红色荧光	ER-LAR-GECO1	24	1.3	10	574 561	598 589	[71]
	绿色荧光	GCaMPER10.19	400	1.9	14	496	513	[70]
	绿色荧光	CatchER	180	0.94	2.3	398, 490	510	[73]
	蓝绿荧光比值型	GEM-CEPIA1er	558	1.37	21.7	401 391	510 462	[74]
	绿色荧光比值型	Ga-G1-ER	800	1	1.8	490 398	510	[72]
	绿色荧光比值型	erGAP1	12	1	2.7	403 470	510	[61]
	红绿荧光比值型	miGer	425	1.7	--	498, 588	510, 635	[64]
	红绿荧光比值型	GCEPIA1-SNAP _{ER}	514	1.26	--	488, 652	512, 670	[63]
线粒体	FRET型	YC2mt	1.24	0.79	--	433	475, 529	[81]
	FRET型	4mtD3cpv	2.49, 3.22 ²⁾	0.99, 0.68 ²⁾	2.48, 2.44 ²⁾	433	475, 528	[83]
	FRET型	4mtD3mC3+16	6.48, 6.18 ²⁾	1.07, 0.72 ²⁾	1.92, 2.37 ²⁾	433	475, 528	[83]
	绿色荧光	mito-GCaMP2	0.20	--	--	405, 488	510	[84]
	绿色荧光	mito-GCaMP6s	0.14	2.9	63.2	497	515	[86]
	绿色荧光	2mtGCaMP6m	0.17	2.96	38.1	497	515	[87]
	绿色荧光	CEPIA2mt	0.16 ²⁾	--	1.7 ²⁾	487	508	[64, 74]
	绿色荧光	CEPIA3mt	11 ²⁾	--	1.6 ²⁾	487	508	[74]
	绿色荧光	CEPIA4mt	59 ²⁾	--	1.5 ²⁾	487	508	[74]
	绿色荧光比值型	mitGAP	0.2	1	--	403 470	510	[61, 106]
	红绿荧光比值型	mt-riG6m	0.25	1.3	26 ¹⁾	498, 588	510, 635	[64]
高尔基体	FRET型	medialGo-D1cpv	27.4	--	--	435	480, 530	[77]
细胞核	绿色荧光	NLS-GCaMP2	0.15	3.8	--	487	508	[96, 106]
	绿色荧光比值型	nuc-GAP	0.2	1	--	403 470	510	[61]
质膜	FRET型	Cav2.2-TN-XL	2.5	--	1.7	433	475, 529	[40]
	绿色荧光	Orai-GECO1	0.75	2.97	25	498	513	[105]
	绿色荧光	Orai-GECO1.2	1.15	2.11	23	498	513	[105]

¹⁾ 估算值; ²⁾ pH=8时测定的数据; -- 暂无数据。

参 考 文 献

- [1] Clapham D E. Calcium signaling. Cell, 1995, **80**(2): 259-268
- [2] Berridge M J, Lipp P, Bootman M D. The versatility and universality of calcium signalling. Nat Rev Mol Cell Biol, 2000, **1**(1): 11-21
- [3] Horikawa K. Recent progress in the development of genetically encoded Ca²⁺ indicators. J Med Invest, 2015, **62**(1-2): 24-28
- [4] Tsien R Y. New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures. Biochemistry, 1980, **19**(11): 2396-2404
- [5] Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien R Y. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. J Biol Chem, 1985, **260**(6): 3440-3450
- [6] Minta A, Kao J P, Tsien R Y. Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. J Biol Chem, 1989, **264**(14): 8171-8178
- [7] Gee K R, Brown K A, Chen W N, *et al.* Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca(2+) -indicator dyes. Cell Calcium, 2000, **27**(2): 97-106
- [8] Tsien R Y. A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. Nature, 1981, **290**(5806): 527-528
- [9] Giepmans B N, Adams S R, Ellisman M H, *et al.* The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. Science, 2006, **312**(5771): 217-224
- [10] Del Nido P J, Glynn P, Buenaventura P, *et al.* Fluorescence measurement of calcium transients in perfused rabbit heart using rhod 2. Am J Physiol, 1998, **274**(2): H728-741

- [11] Lu F, Zhao Y, Xie W, *et al.* Imaging sarcoplasmic reticulum Ca(2+) signaling in intact cardiac myocytes. *Circulation*, 2020, **142**(15): 1503-1505
- [12] Shimomura O, Johnson F H, Saiga Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol*, 1962, **59**: 223-239
- [13] Shimomura O, Johnson F H, Saiga Y. Microdetermination of calcium by aequorin luminescence. *Science*, 1963, **140**(3573): 1339-1340
- [14] Ridgway E B, Ashley C C. Calcium transients in single muscle fibers. *Biochem Biophys Res Commun*, 1967, **29**(2): 229-234
- [15] Ashley C C, Ridgway E B. Simultaneous recording of membrane potential, calcium transient and tension in single muscle fibers. *Nature*, 1968, **219**(5159): 1168-1169
- [16] Campbell A K, Patel A K, Razavi Z S, *et al.* Formation of the Ca²⁺-activated photoprotein obelin from apo-obelin and mRNA inside human neutrophils. *Biochem J*, 1988, **252**(1): 143-149
- [17] Nakajima-Shimada J, Iida H, Tsuji F I, *et al.* Monitoring of intracellular calcium in *Saccharomyces cerevisiae* with an apoaequorin cDNA expression system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**(15): 6878-6882
- [18] Brini M, Murgia M, Pasti L, *et al.* Nuclear Ca²⁺ concentration measured with specifically targeted recombinant aequorin. *EMBO J*, 1993, **12**(12): 4813-4819
- [19] Rizzuto R, Bastianutto C, Brini M, *et al.* Mitochondrial Ca²⁺ homeostasis in intact cells. *J Cell Biol*, 1994, **126**(5): 1183-1194
- [20] Montero M, Brini M, Marsault R, *et al.* Monitoring dynamic changes in free Ca²⁺ concentration in the endoplasmic reticulum of intact cells. *EMBO J*, 1995, **14**(22): 5467-5475
- [21] Pinton P, Pozzan T, Rizzuto R. The Golgi apparatus is an inositol 1, 4, 5-trisphosphate-sensitive Ca²⁺ store, with functional properties distinct from those of the endoplasmic reticulum. *EMBO J*, 1998, **17**(18): 5298-5308
- [22] Shimomura O, Johnson F H, Morise H. Mechanism of the luminescent intramolecular reaction of aequorin. *Biochemistry*, 1974, **13**(16): 3278-3286
- [23] Granatiero V, Patron M, Tosatto A, *et al.* The use of aequorin and its variants for Ca²⁺ measurements. *Cold Spring Harb Protoc*, 2014, **2014**(1): 9-16
- [24] Tsien R Y. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem*, 1998, **67**: 509-544
- [25] Romoser V A, Hinkle P M, Persechini A. Detection in living cells of Ca²⁺-dependent changes in the fluorescence emission of an indicator composed of two green fluorescent protein variants linked by a calmodulin-binding sequence. A new class of fluorescent indicators. *J Biol Chem*, 1997, **272**(20): 13270-13274
- [26] Miyawaki A, Llopis J, Heim R, *et al.* Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature*, 1997, **388**(6645): 882-887
- [27] Porumb T, Yau P, Harvey T S, *et al.* A calmodulin-target peptide hybrid molecule with unique calcium-binding properties. *Protein Eng*, 1994, **7**(1): 109-115
- [28] Miyawaki A, Griesbeck O, Heim R, *et al.* Dynamic and quantitative Ca²⁺ measurements using improved cameleons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**(5): 2135-2140
- [29] Griesbeck O, Baird G S, Campbell R E, *et al.* Reducing the environmental sensitivity of yellow fluorescent protein. Mechanism and applications. *J Biol Chem*, 2001, **276**(31): 29188-29194
- [30] Nagai T, Ibata K, Park E S, *et al.* A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat Biotechnol*, 2002, **20**(1): 87-90
- [31] Nagai T, Yamada S, Tominaga T, *et al.* Expanded dynamic range of fluorescent indicators for Ca(2+) by circularly permuted yellow fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**(29): 10554-10559
- [32] Horikawa K, Yamada Y, Matsuda T, *et al.* Spontaneous network activity visualized by ultrasensitive Ca(2+) indicators, yellow Cameleon-Nano. *Nat Methods*, 2010, **7**(9): 729-732
- [33] Palmer A E, Jin C, Reed J C, *et al.* Bcl-2-mediated alterations in endoplasmic reticulum Ca²⁺ analyzed with an improved genetically encoded fluorescent sensor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**(50): 17404-17409
- [34] Palmer A E, Giacomello M, Kortemme T, *et al.* Ca²⁺ indicators based on computationally redesigned calmodulin-peptide pairs. *Chem Biol*, 2006, **13**(5): 521-530
- [35] Greotti E, Wong A, Pozzan T, *et al.* Characterization of the ER-targeted low affinity Ca(2+) probe D4ER. *Sensors (Basel)*, 2016, **16**(9): 1419
- [36] Ravier M A, Daro D, Roma L P, *et al.* Mechanisms of control of the free Ca²⁺ concentration in the endoplasmic reticulum of mouse pancreatic beta-cells: interplay with cell metabolism and [Ca²⁺]_i and role of SERCA2b and SERCA3. *Diabetes*, 2011, **60**(10): 2533-2545
- [37] Waldeck-Weiermair M, Bischof H, Blass S, *et al.* Generation of red-shifted cameleons for imaging Ca(2+) dynamics of the endoplasmic reticulum. *Sensors (Basel)*, 2015, **15**(6): 13052-13068
- [38] Mank M, Reiff D F, Heim N, *et al.* A FRET-based calcium biosensor with fast signal kinetics and high fluorescence change. *Biophys J*, 2006, **90**(5): 1790-1796
- [39] Osibow K, Malli R, Kostner G M, *et al.* A new type of non-Ca²⁺-buffering Apo(a)-based fluorescent indicator for intraluminal Ca²⁺ in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 2006, **281**(8): 5017-5025
- [40] Tay L H, Dick I E, Yang W, *et al.* Nanodomain Ca²⁺ of Ca²⁺ channels detected by a tethered genetically encoded Ca²⁺ sensor. *Nat Commun*, 2012, **3**: 778
- [41] Baird G S, Zacharias D A, Tsien R Y. Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**(20): 11241-11246
- [42] Nakai J, Ohkura M, Imoto K. A high signal-to-noise Ca(2+) probe composed of a single green fluorescent protein. *Nat Biotechnol*,

- 2001, **19**(2): 137-141
- [43] Ohkura M, Matsuzaki M, Kasai H, *et al.* Genetically encoded bright Ca^{2+} probe applicable for dynamic Ca^{2+} imaging of dendritic spines. *Anal Chem*, 2005, **77**(18): 5861-5869
- [44] Tallini Y N, Ohkura M, Choi B R, *et al.* Imaging cellular signals in the heart *in vivo*: cardiac expression of the high-signal Ca^{2+} indicator GCaMP2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(12): 4753-4758
- [45] Tian L, Hires S A, Mao T, *et al.* Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators. *Nat Methods*, 2009, **6**(12): 875-881
- [46] Akerboom J, Chen T W, Wardill T J, *et al.* Optimization of a GCaMP calcium indicator for neural activity imaging. *J Neurosci*, 2012, **32**(40): 13819-13840
- [47] Chen T W, Wardill T J, Sun Y, *et al.* Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature*, 2013, **499**(7458): 295-300
- [48] Dana H, Sun Y, Mohar B, *et al.* High-performance calcium sensors for imaging activity in neuronal populations and microcompartments. *Nat Methods*, 2019, **16**(7): 649-657
- [49] Yang Y, Liu N, He Y, *et al.* Improved calcium sensor GCaMP-X overcomes the calcium channel perturbations induced by the calmodulin in GCaMP. *Nat Commun*, 2018, **9**(1): 1504.
- [50] Zhao Y, Araki S, Wu J, *et al.* An expanded palette of genetically encoded Ca^{2+} indicators. *Science*, 2011, **333**(6051): 1888-1891
- [51] Akerboom J, Carreras Calderon N, Tian L, *et al.* Genetically encoded calcium indicators for multi-color neural activity imaging and combination with optogenetics. *Front Mol Neurosci*, 2013, **6**: 2
- [52] Inoue M, Takeuchi A, Manita S, *et al.* Rational engineering of XCaMPs, a multicolor GECI suite for *in vivo* imaging of complex brain circuit dynamics. *Cell*, 2019, **177**(5): 1346-1360
- [53] Wu J, Liu L, Matsuda T, *et al.* Improved orange and red Ca^{2+} -indicators and photophysical considerations for optogenetic applications. *ACS Chem Neurosci*, 2013, **4**(6): 963-972
- [54] Inoue M, Takeuchi A, Horigane S, *et al.* Rational design of a high-affinity, fast, red calcium indicator R-CaMP2. *Nature Methods*, 2015, **12**(1): 64-70
- [55] Dana H, Mohar B, Sun Y, *et al.* Sensitive red protein calcium indicators for imaging neural activity. *Elife*, 2016, **5**: e12727
- [56] Qian Y, Piatkevich K D, Mc Larney B, *et al.* A genetically encoded near-infrared fluorescent calcium ion indicator. *Nat Methods*, 2019, **16**(2): 171-174
- [57] Shaner N C, Lambert G G, Chammas A, *et al.* A bright monomeric green fluorescent protein derived from *Branchiostoma lanceolatum*. *Nat Methods*, 2013, **10**(5): 407-409
- [58] Barykina N V, Subach O M, Doronin D A, *et al.* A new design for a green calcium indicator with a smaller size and a reduced number of calcium-binding sites. *Sci Rep*, 2016, **6**: 34447
- [59] Subach O M, Sotnikov V P, Plusnin V V, *et al.* Novel genetically encoded bright positive calcium indicator NCaMP7 based on the mNeonGreen fluorescent protein. *Int J Mol Sci*, 2020, **21**(5): 1644
- [60] Mohr M A, Bushey D, Aggarwal A, *et al.* jYCaMP: an optimized calcium indicator for two-photon imaging at fiber laser wavelengths. *Nat Methods*, 2020, **17**(7): 694-697
- [61] Rodriguez-Garcia A, Rojo-Ruiz J, Navas-Navarro P, *et al.* GAP, an aequorin-based fluorescent indicator for imaging Ca^{2+} in organelles. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, **111**(7): 2584-2589
- [62] Cho J H, Swanson C J, Chen J, *et al.* The GCaMP-R family of genetically encoded ratiometric calcium indicators. *ACS Chem Biol*, 2017, **12**(4): 1066-1074
- [63] Luo C, Wang H, Liu Q, *et al.* A genetically encoded ratiometric calcium sensor enables quantitative measurement of the local calcium microdomain in the endoplasmic reticulum. *Biophysics Reports*, 2019, **5**(1): 31-42
- [64] Li J, Wang L, Chen Y, *et al.* Visible light excited ratiometric-GECIs for long-term in-cellulo monitoring of calcium signals. *Cell Calcium*, 2020, **87**: 102165
- [65] Hall M P, Unch J, Binkowski B F, *et al.* Engineered luciferase reporter from a deep sea shrimp utilizing a novel imidazopyrazinone substrate. *ACS Chem Biol*, 2012, **7**(11): 1848-1857
- [66] Suzuki K, Kimura T, Shinoda H, *et al.* Five colour variants of bright luminescent protein for real-time multicolour bioimaging. *Nat Commun*, 2016, **7**: 13718
- [67] Hossain M N, Suzuki K, Iwano M, *et al.* Bioluminescent low-affinity Ca^{2+} indicator for ER with multicolor calcium imaging in single living cells. *ACS Chem Biol*, 2018, **13**(7): 1862-1871
- [68] Yang J, Cumberbatch D, Centanni S, *et al.* Coupling optogenetic stimulation with NanoLuc-based luminescence (BRET) Ca^{2+} sensing. *Nat Commun*, 2016, **7**: 13268
- [69] Farhana I, Hossain M N, Suzuki K, *et al.* Genetically encoded fluorescence/bioluminescence bimodal indicators for Ca^{2+} imaging. *ACS Sens*, 2019, **4**(7): 1825-1834
- [70] Henderson M J, Baldwin H A, Werley C A, *et al.* A low affinity GCaMP3 variant (GCaMPer) for imaging the endoplasmic reticulum calcium store. *PLoS One*, 2015, **10**(10): e0139273
- [71] Wu J, Prole D L, Shen Y, *et al.* Red fluorescent genetically encoded Ca^{2+} indicators for use in mitochondria and endoplasmic reticulum. *Biochem J*, 2014, **464**(1): 13-22
- [72] Zou J, Hofer A M, Lurtz M M, *et al.* Developing sensors for real-time measurement of high Ca^{2+} concentrations. *Biochemistry*, 2007, **46**(43): 12275-12288
- [73] Tang S, Wong H C, Wang Z M, *et al.* Design and application of a class of sensors to monitor Ca^{2+} dynamics in high Ca^{2+} concentration cellular compartments. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, **108**(39): 16265-16270
- [74] Suzuki J, Kanemaru K, Ishii K, *et al.* Imaging intraorganellar Ca^{2+} at subcellular resolution using CEPIA. *Nat Commun*, 2014, **5**: 4153
- [75] Mellman I, Simons K. The Golgi complex: *in vitro* veritas?. *Cell*, 1992, **68**(5): 829-840
- [76] Pizzo P, Lissandron V, Capitanio P, *et al.* Ca^{2+} signalling in the Golgi apparatus. *Cell Calcium*, 2011, **50**(2): 184-192

- [77] Wong A K, Capitanio P, Lissandron V, *et al.* Heterogeneity of Ca²⁺ handling among and within Golgi compartments. *J Mol Cell Biol*, 2013, **5**(4): 266-276
- [78] Casey J R, Grinstein S, Orlowski J. Sensors and regulators of intracellular pH. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, **11**(1): 50-61
- [79] Lissandron V, Podini P, Pizzo P, *et al.* Unique characteristics of Ca²⁺ homeostasis of the trans-Golgi compartment. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, **107**(20): 9198-9203
- [80] Rowland A A, Voeltz G K. Endoplasmic reticulum-mitochondria contacts: function of the junction. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, **13**(10): 607-625
- [81] Arnaudeau S, Kelley W L, Walsh J V, Jr., *et al.* Mitochondria recycle Ca(2+) to the endoplasmic reticulum and prevent the depletion of neighboring endoplasmic reticulum regions. *J Biol Chem*, 2001, **276**(31): 29430-29439
- [82] Nagai T, Sawano A, Park E S, *et al.* Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense Ca²⁺. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**(6): 3197-3202
- [83] Greotti E, Fortunati I, Pendin D, *et al.* mCerulean3-basedameleon Sensor to explore mitochondrial Ca(2+) dynamics *in vivo*. *iScience*, 2019, **19**: 161
- [84] Chen M, Wang Y, Hou T, *et al.* Differential mitochondrial calcium responses in different cell types detected with a mitochondrial calcium fluorescent indicator, mito-GCaMP2. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2011, **43**(10): 822-830
- [85] Zhao H, Li T, Wang K, *et al.* AMPK-mediated activation of MCU stimulates mitochondrial Ca(2+) entry to promote mitotic progression. *Nat Cell Biol*, 2019, **21**(4): 476-486
- [86] Li H, Wang X, Zhang N, *et al.* Imaging of mitochondrial Ca²⁺ dynamics in astrocytes using cell-specific mitochondria-targeted GCaMP5G/6s: mitochondrial Ca²⁺ uptake and cytosolic Ca²⁺ availability *via* the endoplasmic reticulum store. *Cell Calcium*, 2014, **56**(6): 457-466
- [87] Logan C V, Szabadkai G, Sharpe J A, *et al.* Loss-of-function mutations in MICU1 cause a brain and muscle disorder linked to primary alterations in mitochondrial calcium signaling. *Nat Genet*, 2014, **46**(2): 188-193
- [88] Poburko D, Santo-Domingo J, Demaurex N. Dynamic regulation of the mitochondrial proton gradient during cytosolic calcium elevations. *J Biol Chem*, 2011, **286**(13): 11672-11684
- [89] Santo-Domingo J, Giacomello M, Poburko D, *et al.* OPA1 promotes pH flashes that spread between contiguous mitochondria without matrix protein exchange. *EMBO J*, 2013, **32**(13): 1927-1940
- [90] Christensen K A, Myers J T, Swanson J A. pH-dependent regulation of lysosomal calcium in macrophages. *J Cell Sci*, 2002, **115**(Pt3): 599-607
- [91] Narayanaswamy N, Chakraborty K, Saminathan A, *et al.* A pH-correctable, DNA-based fluorescent reporter for organellar calcium. *Nat Methods*, 2019, **16**(1): 95-102
- [92] Yang J, Zhao Z, Gu M, *et al.* Release and uptake mechanisms of vesicular Ca(2+) stores. *Protein Cell*, 2019, **10**(1): 8-19
- [93] Shen D, Wang X, Li X, *et al.* Lipid storage disorders block lysosomal trafficking by inhibiting a TRP channel and lysosomal calcium release. *Nat Commun*, 2012, **3**: 731
- [94] Huang F, Luo J, Ning T, *et al.* Cytosolic and nucleosolic calcium signaling in response to osmotic and salt stresses are independent of each other in roots of *Arabidopsis* seedlings. *Front Plant Sci*, 2017, **8**: 1648
- [95] Krebs M, Held K, Binder A, *et al.* FRET-based genetically encoded sensors allow high-resolution live cell imaging of Ca²⁺ dynamics. *Plant J*, 2012, **69**(1): 181-192
- [96] Bengtson C P, Freitag H E, Weislogel J M, *et al.* Nuclear calcium sensors reveal that repetition of trains of synaptic stimuli boosts nuclear calcium signaling in CA1 pyramidal neurons. *Biophys J*, 2010, **99**(12): 4066-4077
- [97] Carrión A M, Link W A, Ledo F, *et al.* DREAM is a Ca²⁺-regulated transcriptional repressor. *Nature*, 1999, **398**(6722): 80-84
- [98] Shigetomi E, Kracun S, Khakh B S. Monitoring astrocyte calcium microdomains with improved membrane targeted GCaMP reporters. *Neuron Glia Biol*, 2010, **6**(3): 183-191
- [99] Marisca R, Hoche T, Agirre E, *et al.* Functionally distinct subgroups of oligodendrocyte precursor cells integrate neural activity and execute myelin formation. *Nat Neurosci*, 2020, **23**(3): 363-374
- [100] Tsai F C, Seki A, Yang H W, *et al.* A polarized Ca²⁺, diacylglycerol and STIM1 signalling system regulates directed cell migration. *Nat Cell Biol*, 2014, **16**(2): 133-144
- [101] Lu F, Sun J, Zheng Q, *et al.* Imaging elemental events of store-operated Ca(2+) entry in invading cancer cells with plasmalemmal targeted sensors. *J Cell Sci*, 2019, **132**(6): jcs224923
- [102] Shang W, Lu F, Sun T, *et al.* Imaging Ca²⁺ nanosparks in heart with a new targeted biosensor. *Circ Res*, 2014, **114**(3): 412-420
- [103] Mohamed T M, Abou-Leisa R, Baudoin F, *et al.* Development and characterization of a novel fluorescent indicator protein PMCA4-GCaMP2 in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*, 2013, **63**: 57-68
- [104] Lee M Y, Song H, Nakai J, *et al.* Local subplasma membrane Ca²⁺ signals detected by a tethered Ca²⁺ sensor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(35): 13232-13237
- [105] Dynes J L, Amcheslavsky A, Cahalan M D. Genetically targeted single-channel optical recording reveals multiple Orail gating states and oscillations in calcium influx. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, **113**(2): 440-445
- [106] Suzuki J, Kanemaru K, Iino M. Genetically encoded fluorescent indicators for organellar calcium imaging. *Biophys J*, 2016, **111**(6): 1119-1131

Research Progress on Calcium Indicators*

LI Jia^{1,2)}, WANG You-Jun^{1,2)}, ZHANG Xiao-Yan^{1)**}

⁽¹⁾Ministry of Education Key Laboratory of Cell Proliferation and Regulation Biology, College of Life Sciences,
Beijing Normal University, Beijing 100875, China;

²⁾Beijing Key Laboratory of Gene Resource and Molecular Development, College of Life Sciences, Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

Abstract Calcium indicators are often used to monitor calcium signaling in cells and organelles, which include chemical calcium indicators and genetically encoded calcium indicators. With the development of technology and the continuous increase in research requirements, various versions of calcium indicators are constantly updated. The review systematically sorts out the existing calcium indicators, and introduces in detail the most widely used calcium indicators. Here, the advantages and disadvantages of existing calcium indicators are summarized, and the parts that can be optimized and improved are discussed. The aim is to provide some ideas for the further development of calcium indicator research.

Key words calcium indicators, calcium signaling, calcium imaging

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0366

* This work was supported by Major Research Plan of the National Natural Science Foundation of China (91954205) and Open Fund of Ministry of Education Key Laboratory of Cell Proliferation and Regulation Biology.

** Corresponding author.

Tel: 86-10-58809729, E-mail: zhxy@bnu.edu.cn

Received: October 12, 2020 Accepted: January 8, 2021