

技术与方法

培养的大鼠海马神经元胞内
 Ca^{2+} 和 NO 双标记方法研究*

陶 荣 宁钢民 杨 勇 郑筱祥**

(浙江大学生物医学工程系, 教育部生物医学工程重点实验室, 杭州 310027)

摘要 以培养 8~10 天的大鼠海马神经元为对象, 选择 Calcium Orange AM 和 DAF-FM diacetate 为 Ca^{2+} 和一氧化氮(NO)的荧光指示剂, 建立了基于激光扫描共聚焦显微技术的细胞内 Ca^{2+} 和 NO 双标记检测方法. 此方法对 Ca^{2+} 和 NO 进行分步染色, 然后应用激光扫描共聚焦显微镜(LSCM)的双轨迹(Two Track)模式, 通过快速切换激光实现对细胞内 Ca^{2+} 和 NO 的同时检测. 实验结果显示, 两种染料之间无串扰现象; 在 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)刺激下, 海马神经元胞内 Ca^{2+} 快速升高, 随后达到平台期并有波动, NO 则稳定持续升高, 这些变化过程与单标记的结果一致; 双标记层切序列图像显示细胞内 Ca^{2+} 和 NO 都较集中分布于细胞中部, 但在细节上两者的分布存在差异. 此双标记方法能同时检测培养的海马神经元胞内 Ca^{2+} 和 NO, 为研究神经元胞内 Ca^{2+} 和 NO 的相互调控作用提供了一种新的手段.

关键词 海马神经元, 钙离子, 一氧化氮, 双标记, 激光扫描共聚焦显微镜

学科分类号 Q-3, Q2, Q421, Q74

Ca^{2+} 和一氧化氮(NO)是神经细胞内重要的信使, 它们通过多途径的信号转导, 调控细胞内一系列生理反应, 在神经细胞的突触传递、可塑性以及神经毒性等生理过程的调节中起着重要作用^[1-6]. 神经细胞内的 Ca^{2+} 和 NO 之间有着密切的相互调控关系, 在兴奋性氨基酸毒性过程中, N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)通道开放引发的 Ca^{2+} 内流介导了 NO 的合成^[7,8], 而 NO 对 NMDA 通道又有着抑制作用^[9,10]. 现有研究大多采用单独检测细胞内 Ca^{2+} 和 NO 的方法, 无法直接反映 Ca^{2+} 和 NO 在单个细胞内的同步变化过程和空间分布的关联性, 因此, 为了研究神经细胞内 Ca^{2+} 和 NO 之间的相互作用和信号传导, 实现细胞内 Ca^{2+} 和 NO 的同步检测是很有必要的. 海马是大脑学习和记忆的重要部位, 本研究以培养的大鼠海马神经元为对象, 建立一种基于激光共聚焦显微技术的 Ca^{2+} 和 NO 双标记方法, 并用此方法研究了海马神经元胞内 Ca^{2+} 和 NO 的空间分布.

1 材料与方法

1.1 材料

新生 SD 大鼠(出生 24 h 内)由浙江医学科学院实验动物中心提供; 高糖 DMEM, Neuronbasal 培养液, B27 购自 Gibco BRL 公司; 胰蛋白酶, L-多聚赖氨酸购自 Sigma 公司; Calcium Orange AM, DAF-FM diacetate 购自 Molecular Probe 公司; 胎牛

血清购自杭州四季青生物制品公司; 青霉素, 链霉素购自华北制药股份有限公司; 其他均为市售分析纯.

1.2 溶液配置

磷酸盐缓冲液(PBS): NaCl 136.8 mmol/L, KCl 2.7 mmol/L, Na_2HPO_4 7.8 mmol/L, KH_2PO_4 1.4 mmol/L, pH 值调至 7.4, 室温保存. 多聚赖氨酸溶液: 用超纯水配成 20 mg/L, 过滤灭菌, -20°C 保存. 胰蛋白酶溶液: 用磷酸盐缓冲液现配 0.25% 的胰蛋白酶溶液, 过滤灭菌. 接种培养液: 高糖 DMEM 90%, 胎牛血清 10%, 青霉素 100 U/ml, 链霉素 100 mg/L, pH 值调至 7.4, 4°C 保存. 维持培养液: Neurobasal 培养基 98%, B27 2%, 谷氨酰胺 0.5 mmol/L, 青霉素 50 U/ml, 链霉素 50 mg/L, pH 值调至 7.4, 4°C 保存. 人工脑脊液(ACSF): NaCl 130 mmol/L, KCl 3.5 mmol/L, CaCl_2 2.0 mmol/L, NaH_2PO_4 1.25 mmol/L, MgSO_4 1.5 mmol/L, NaHCO_3 24 mmol/L, 葡萄糖 10 mmol/L, pH 值调至 7.4, 4°C 保存.

1.3 海马神经元原代培养

取新生 Wistar 大鼠, 用 75%乙醇消毒. 在无菌条件下快速断头取脑, 剥离出双侧海马, 置于冰浴 PBS 中. 将海马剪成 0.5 mm $\times$ 0.5 mm 的小块,

*国家自然科学基金资助项目(30470463).

**通讯联系人.

Tel: 0571-87951091, E-mail: zxx@mail.bme.zju.edu.cn

收稿日期: 2005-01-21, 接受日期: 2005-03-28

PBS清洗一次. 加 0.25%胰蛋白酶消化(37℃, 20~30 min), 然后加入与酶液等体积的接种培养液终止消化, 巴斯德吸管吹打, 100 目铜网过滤, 离心, 收集沉淀, 加入接种培养液制成单细胞悬液, 以 $2 \times 10^5/\text{ml}$ 的密度接种于 35 mm 的培养皿中, 每皿 2 ml, 放入 37℃、5% CO_2 的培养箱中培养. 培养皿中预置用多聚赖氨酸包被的 5 mm×5 mm 的玻片 10 片. 24 h 之后, 细胞已完全贴壁, 吸除接种培养液, 换成维持培养液. 此后每周换液 2 次, 每次换半液. 取培养 8~10 天的海马神经元进行实验.

1.4 Ca^{2+} 和 NO 双标记

1.4.1 染料特性. Ca^{2+} 标记使用 Calcium Orange AM 探针. Calcium Orange AM 可直接通透细胞膜, 在胞内水解为 Calcium Orange, 与 Ca^{2+} 结合, 在 549 nm 激发光下发出 574 nm 波长的荧光. NO 标记使用 DAF-FM diacetate 探针. DAF-FM diacetate 以被动扩散的方式通过细胞膜, 在胞内水解为 DAF-FM, 与 NO 结合后, 在 490 nm 激发光下发出 514 nm 波长的荧光. 图 1 为两种染料的激发和发射波谱图 (由 Molecular Probes 公司提供的数据绘制), 图 1 所示两种染料的发射光谱重叠较少, 因此我们可以应用 Calcium Orange AM 和 DAF-FM diacetate 对培养的海马神经元进行双染色来同时检测细胞内 Ca^{2+} 和 NO.

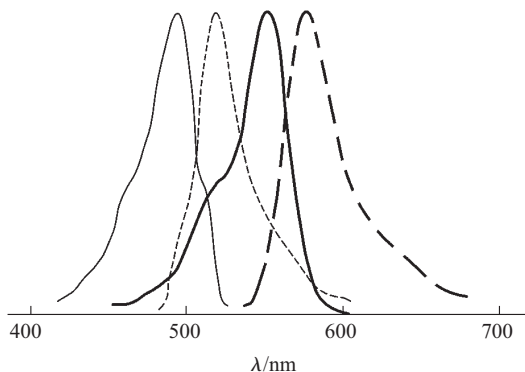


Fig.1 The excitation and emission spectra of Calcium Orange and DAF-FM

—: Calcium Orange excitation; — —: Calcium Orange emission; — — —: DAF-FM excitation; - - - -: DAF-FM emission.

1.4.2 染色方法. 取单管包装的 50 μg Calcium Orange AM 和 50 μg DAF-FM diacetate, 分别加入 10 μl DMSO 充分溶解, 配成母液, -20℃ 保存. 实验前, 分别取一定量母液, 用 ACSF 将其稀释成浓度为 2 $\mu\text{mol/L}$ 的 Calcium Orange AM 染液和

10 $\mu\text{mol/L}$ 的 DAF-FM diacetate 染液.

单标记染色: 取长有海马神经元的玻片, 用人工脑脊液冲洗 2 遍, 滴加 2 $\mu\text{mol/L}$ Calcium Orange AM 染液 (或 10 $\mu\text{mol/L}$ DAF-FM diacetate 染液), 37℃、5% CO_2 培养箱中孵育 30 min, 然后吸除染料, 用人工脑脊液冲洗 3 遍, 避光水解 15 min 后即可检测.

双标记染色: 取长有海马神经元的玻片, 用人工脑脊液冲洗 2 遍, 滴加 2 $\mu\text{mol/L}$ Calcium Orange AM 染液, 37℃、5% CO_2 培养箱中孵育 30 min. 然后吸除染料, 用人工脑脊液冲洗 3 遍, 滴加 10 $\mu\text{mol/L}$ DAF-FM diacetate 染液, 37℃、5% CO_2 培养箱中再孵育 30 min. 最后吸除染料, 用人工脑脊液冲洗 3 遍, 避光水解 15 min 后即可检测.

1.5 图像采集

神经元胞内 Ca^{2+} 和 NO 的同步检测使用激光共聚焦显微镜 LSM 510 (ZEISS, Germany), 选用双轨迹 (Two Track) 模式, 通过快速切换激光进行扫描实现对细胞内 Ca^{2+} 和 NO 的同时检测. Calcium Orange 采用 543 nm (HeNe 激光) 激发, 接收大于 560 nm 波段的发射光; DAF-FM 采用 488 nm (Argon 激光) 激发, 接收光波段为 500 ~ 550 nm. 选择 20×/0.75 的物镜. 在进行单幅扫描和时间序列扫描时, Pinhole 设置为 1 000 μm , 最大限度检测细胞内荧光; 扫描速度设置为 1.76 $\mu\text{s}/\text{pixel}$. 在进行层切扫描时, Pinhole 设置为 80 μm ; 扫描速度设置为最高 0.88 $\mu\text{s}/\text{pixel}$, 以减少荧光淬灭; 层切步进 (slice interval) 为 1.2 μm .

1.6 数据处理

对时间序列扫描得到的图像, 计算单个细胞内 Calcium Orange 和 DAF-FM 的平均荧光强度变化 F_x/F_0 , 其中 F_x 为给药刺激后第 x 分钟时细胞内平均荧光强度, F_0 为给药刺激前的细胞内平均荧光强度的基础值. 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 所有结果进行方差分析和 t 检验 (与对照组进行比较), $P < 0.01$ 为非常显著差异.

对双标记层切序列图像进行以下处理: a. 针对单个细胞, 计算各层切面上细胞内 Calcium Orange 和 DAF-FM 的平均荧光强度, 分别取各自的最大值为基准进行归一化. 对多个细胞数据做统计处理, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示. b. 挑选某一层切面, 对该层切面上细胞内 Calcium Orange 和 DAF-FM 的荧光图像作伪彩色处理, 显示该层切面上细胞内 Ca^{2+} 和 NO 的浓度分布. c. 将扫描得到的 Calcium

Orange 和 DAF-FM 两组分量序列图像分别进行叠加求平均, 得到在 XY 平面上 Ca^{2+} 和 NO 的整体分布图, 分别做灰度级拉伸 (图像中最高灰度值映射为 255, 按此比例将该图像中所有像素点的灰度值进行等比例拉伸), 然后进行 2.5D 作图 (应用伪彩色), 图像中的颜色和高度都代表该点的相对物质浓度.

2 结 果

2.1 Calcium Orange 和 DAF-FM 检测的相互独立性

对神经元分别进行 Calcium Orange AM 单标记, DAF-FM diacetate 单标记和两种染料的双标

记, 在 LSM510 下进行 Two Track 检测, 可以观察到: a. Calcium Orange AM 单标记时, 在 Calcium Orange 检测通道下(channel 1), 细胞内染色均匀, 红色荧光明显, 而在 DAF-FM 检测通道下(channel 2), 细胞内无荧光. b. DAF-FM diacetate 单标记时, 在 channel 2 通道下, 细胞内染色均匀, 绿色荧光明显, 而在 channel 1 通道下, 即使将检测增益(Detector Gain)调至最高值, 细胞内仍无荧光. c. 双标记时, 在同样的检测参数下, 双标记得到的胞内 Calcium Orange 和 DAF-FM 的平均荧光强度与各自单标记的结果一致. 图 2 为单标记、双标记结果对照图.

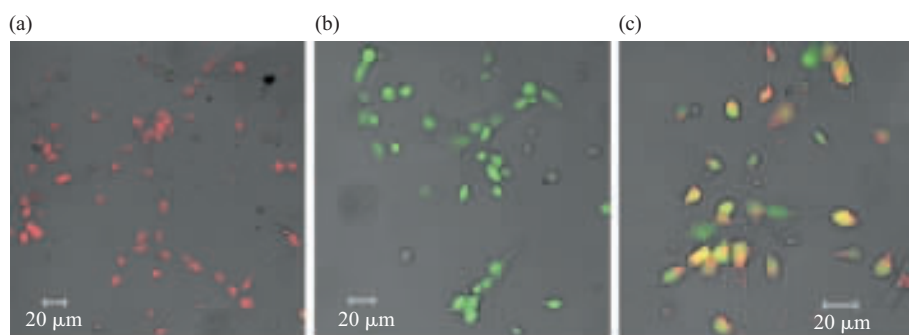


Fig.2 Images of cultured hippocampal neurons using single-label and double-label method

(a) Neurons labeled with Calcium Orange. (b) Neurons labeled with DAF-FM. (c) Double-labeled neurons.

2.2 双标记和单标记检测 NMDA 刺激下培养的海马神经元胞内 Ca^{2+} 和 NO 变化的比较

对神经元分别进行 Calcium Orange AM 单标记, DAF-FM diacetate 单标记和两种染料的双标

记, 在 LSM510 下进行时间序列扫描, 扫描速度为 1 min/frame, 扫描 25 min, 在扫描第一幅之后加入 0.2 mmol NMDA(图 3). 可以观察到, 在 Calcium Orange AM 单标记的细胞内, Calcium Orange 平均

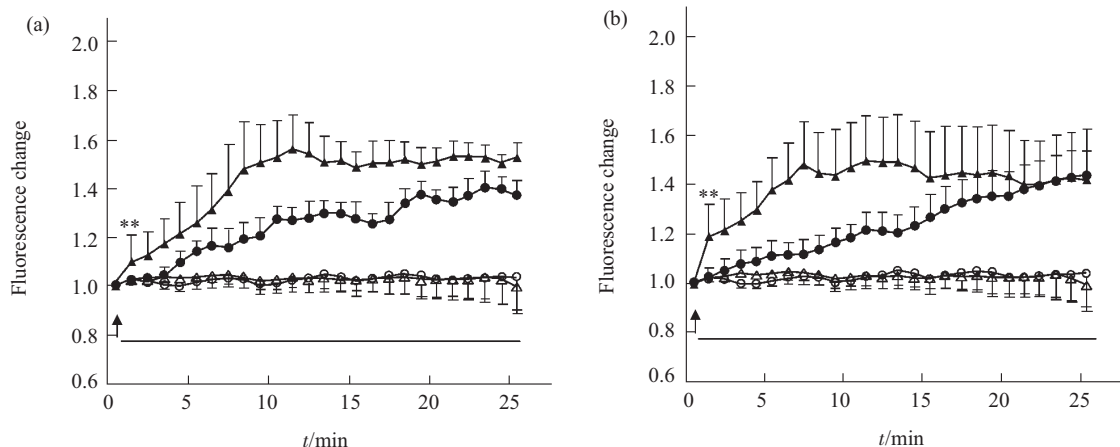


Fig.3 The average fluorescence intensity changes of Calcium Orange and DAF-FM in cultured hippocampal neurons under the stimulation of 0.2 mmol NMDA

(a) Detected simultaneous changes of Calcium Orange fluorescence and DAF-FM fluorescence by using double-label method ($n=12$). (b) Detected changes of Calcium Orange fluorescence ($n=12$) and DAF-FM fluorescence ($n=13$) by separately using single-label methods. The data of each point represents the $\bar{x} \pm s$. Results were analyzed by two-tailed Student's t -test. ** represents $P < 0.01$ compared to control group and the first relevant point in each curves is marked. The two arrows and black lines indicate the time point when NMDA was added and the duration period. ●—●: DAF; ▲—▲: Calcium Orange; ○—○: DAF-control; △—△: Calcium Orange-control.

荧光强度先快速升高达到峰值, 达峰时间为 (9.3 ± 2.2) min, 峰值升高幅度为 $(54.8 \pm 12.5)\%$, 此后进入平台期, 数值在峰值上下波动(图 3b, $n=12$). 在 DAF-FM diacetate 单标记的细胞内, DAF-FM 平均荧光强度持续上升, 升高幅度为 $(45.6 \pm 9.8)\%$ (图 3b, $n=13$). 在双标记细胞内 Calcium Orange 和 DAF-FM 的平均荧光强度变化与各自单标记的结果一致, Calcium Orange 的平均达峰时间为 (9.0 ± 0.9) min, 峰值升高幅度为 $(57.7 \pm 14.1)\%$; DAF-FM 的升高幅度为 $(41.5 \pm 5.6)\%$ (图 3a, $n=12$). t 检验

结果显示, 与对照组相比, Calcium Orange 荧光强度在 NMDA 刺激 1 min 后有显著性升高, DAF-FM 荧光强度则在 3 min 后才出现显著性上升, 此结果双标记与单标记一致.

2.3 双标记方法在检测培养的海马神经元内 Ca^{2+} 和 NO 空间分布中的应用

对双标记的神经元进行层切扫描, 得到一组双标记层切序列图像(图 4a 和图 4b). 对各层切面细胞内 Calcium Orange 和 DAF-FM 的平均荧光强度进行统计作图, 可以观察到在 Z 轴方向, 层切面由上

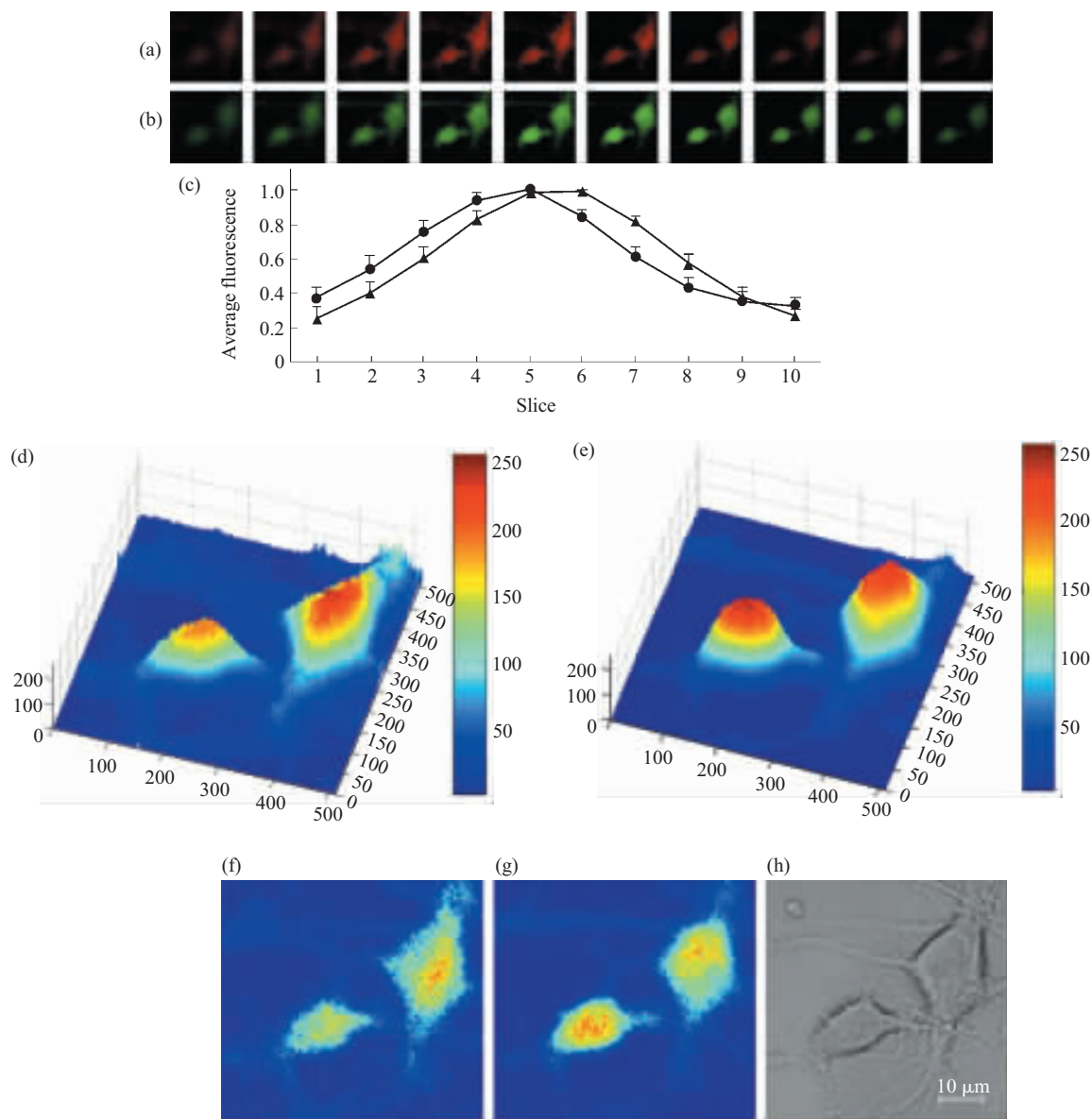


Fig.4 Results of slicing scanning on double-labeled hippocampal neurons

(a) Slicing image sequence of Calcium Orange fluorescence of two neurons. (b) The corresponding slicing image sequence of DAF-FM fluorescence. (c) The average fluorescence intensity changes of Calcium Orange and DAF-FM in slicing image sequences of hippocampal neurons ($n=12$). ●—●: Calcium Orange; ▲—▲: DAF-FM. (d) The overall distribution of Calcium Orange fluorescence of (a) in XY Plane. (e) The overall distribution of DAF-FM fluorescence of (b) in XY Plane. (f) The distribution of Calcium Orange fluorescence in the 5th image of (a). (g) The distribution of DAF-FM fluorescence in the 5th image of (b). (h) The image of transmitted light showing the nucleus's position. Pseudo-color was used in (d), (e), (f), (g) and 2.5D construction was used in (d) and (e) in which both color and height represent the fluorescence intensity.

至下移动时 Ca^{2+} 和 NO 的浓度均先升高后降低, 浓度最高处均位于细胞中部, 但两者的分布并不完全重合, 有微小的平移(图 4c, $n=12$). 对层切序列图像中的 Calcium Orange 和 DAF-FM 两组分量分别进行叠加求平均, 可以得到 Ca^{2+} 和 NO 在 XY 平面上分布的整体效果图, 可以观察到两者均较集中于细胞中部, 树突次之, 轴突处浓度最低, 但与 Ca^{2+} 相比 NO 在胞体内分布更接近球形扩散分布(图 4d 和图 4e). 比较同一层切面的 Calcium Orange 和 DAF-FM 的荧光图像, 可以观察到 Ca^{2+} 和 NO 在分布细节上存在差异, Ca^{2+} 浓度高的区域呈点状离散分布, 而 NO 浓度高的区域则较集中于细胞核所在区域(图 4f 和图 4g).

3 讨 论

Ca^{2+} 和 NO 在细胞的生理调节中起着重要的作用. 现有研究大多单独标记细胞内的 Ca^{2+} 和 NO, 每次实验只能检测其中一种物质的变化过程, 无法知道同一时刻另一种物质的变化情况. 本研究应用 Calcium Orange AM 和 DAF-FM diacetate 对培养的海马神经元胞内 Ca^{2+} 和 NO 进行双标记, 实现了对细胞内 Ca^{2+} 和 NO 的同时检测.

进行双标记的前提是使用两种染料的发射波谱相对独立, 两者之间无串扰现象. Calcium Orange 的激发光波峰在 549 nm, 发射光波段集中在 550~650 nm, 而 DAF-FM 的激发光波峰在 495 nm, 发射光波段集中在 500~550 nm. 因为两种染料发射光波段重叠很少, 我们可以通过分波段接收的方式来排除它们之间的干扰, 同时鉴于它们激发光波峰相差较大, 需采用快速切换激发光的方式分两次激发扫描. 实验结果显示, Calcium Orange AM 单标记的神经元在 DAF-FM 的检测通道下无荧光, 只有在将 DAF-FM 的检测增益调至过高时, 才会在细胞内观察到微弱绿色荧光, 这是由于 Calcium Orange 的激发光和发射光波谱范围宽广, 与 DAF-FM 的有少许重叠所致, 但这并不影响 DAF-FM 的正常检测. 而 DAF-FM diacetate 单标记的神经元在 Calcium Orange 的检测通道下, 即使将检测增益调至最大值, 仍无荧光, 说明 DAF-FM 对 Calcium Orange 的检测无干扰. 海马神经元富含 NMDA 受体和一氧化氮合酶(NOS), NMDA 受体通道激活会引发 Ca^{2+} 内流, 激活 NOS 生成 NO. 实验中, 我们用 0.2 mmol NMDA 刺激培养的海马神经元, 观察到双标记方法的检测结果与分别进行单

标记检测所得的结果一致, 说明用此双标记方法进行 Ca^{2+} 和 NO 的同时检测是可行且可靠的. 实验结果显示 NMDA 刺激后神经元胞内 Ca^{2+} 浓度的升高先于 NO 约 2 min (t 检验结果). 提高扫描频率和成像速度将有助于检测快速反应过程中两者的动态响应.

激光扫描共聚焦显微镜能对细胞进行层切扫描, 通过分析所得的层切序列图像可以研究胞内物质的空间分布. 对双标记的海马神经元进行层切扫描, 可以观察到细胞内 Ca^{2+} 和 NO 的空间分布相似, 两者均较集中于细胞中部, 树突次之, 轴突处浓度最低. 细胞内 NO 一旦生成, 在有氧条件下会迅速与 DAF-FM 反应, 因此 NO 的空间分布间接反映了 NOS 的空间分布. 海马神经元胞内 Ca^{2+} 和 NOS 分布的相关性使得 NOS 能及时响应 Ca^{2+} 信号调控, 通过调节 NO 的生成量来影响细胞内的生理过程^[1]. 从单一层切面的双标记图像中可以观察到细胞内 Ca^{2+} 和 NO 分布存在着差异, 这可能是由于 Ca 库和 NOS 在胞内的分布不同引起的. 神经元胞内 NOS 主要为 neuron NOS(nNOS), 分布区域包括突触小泡、内质网膜、线粒体外膜、细胞骨架、核膜以及胞浆, 但大脑不同区域的神经元胞内 nNOS 的分布存在差异^[12-14]. 我们的实验结果表明培养的海马神经元胞内 nNOS 可能在细胞核及附近区域分布较多, 而 Ca^{2+} 浓度高的区域位于胞浆 Ca 库(内质网等). 双标记结果显示细胞内 NO 的分布较 Ca^{2+} 更类似球形扩散分布, 这可能与 NO 的扩散型小分子气体的特性有关. 提高层切扫描的分辨率(轴向和水平)将有助于更精细地检测 Ca^{2+} 和 NO 的空间分布差异.

国外有文献报道使用 Fura-2 和 DAF-2 对细胞内的 Ca^{2+} 和 NO 进行双标记, 并用此方法对内皮细胞^[15-17]、卵细胞^[18]、神经胶质细胞^[19]内 Ca^{2+} 和 NO 的关系和功能进行了研究. 与 Fura-2 相比, Calcium Orange 是一种可见光激发的 Ca^{2+} 荧光染料, 避免了 Fura-2 紫外激发对细胞造成伤害和容易产生自发荧光的问题. 与 DAF-2 相比, DAF-FM 的检测灵敏度更高且更稳定. 实验中我们也发现 Calcium Orange 的动态范围较窄, 对 Ca^{2+} 浓度变化的灵敏度不是很高, 故 Ca^{2+} 最佳染色方法有待今后改进. 关于此方法能否适用于其他类型细胞内 Ca^{2+} 和 NO 的同步检测, 还有待进一步研究.

参 考 文 献

- 1 Linstedt A D, Kelly R B. Molecular architecture of the nerve

- terminal. *Curr Opin Neurobiol*, 1991, **1** (3): 382~387
- 2 Lipton S A, Kater S B. Neurotransmitter regulation of neuronal outgrowth, plasticity and survival. *Trends Neurosci*, 1989, **12** (7): 265~270
 - 3 Dawson V L, Dawson T M. Physiological and toxicological actions of nitric oxide in the central nervous system. *Adv Pharmacol*, 1995, **34**: 323~342
 - 4 Muller F, Koch K W. Calcium-binding proteins and nitric oxide in retinal function and disease. *Acta Anatomica*, 1998, **162** (2~3): 142~150
 - 5 朱洪波, 罗建红. NMDA 受体和长时程增强. *生物化学与生物物理进展*, 1999, **26** (6): 541~543
Zhu H B, Luo J H. *Prog Biochem Biophys*, 1999, **26** (6): 541~543
 - 6 周苏娅, 夏强, 海马 CA1 区锥体细胞内钙离子释放与突触传递的可塑性. *神经解剖学杂志*, 2003, **19** (1): 11~16
Zhou S Y, Xia Q. *Chin J Neuroanatomy*, 2003, **19** (1): 11~16
 - 7 Sattler R, Xiong Z, Lu W Y, *et al.* Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD-95 protein. *Science*, 1999, **284** (5421): 1845~1848
 - 8 Lentile R, Pedale S, Ginoprelli T, *et al.* Intracellular polyamine levels are involved in NMDA-evoked nitric oxide production in chick retina cells. *J Neurochem*, 1999, **72** (4): 1744~1749
 - 9 Vidwans A S, Kim S, Coffin D O, *et al.* Analysis of the neuroprotective effects of various nitric oxide donor compounds in murine mixed cortical cell culture. *J Neurochem*, 1999, **72** (5): 1843~1852
 - 10 Kim W K, Choi Y B, Rayudu V P, *et al.* Attenuation of NMDA receptor activity and neurotoxicity by nitroxyl anion, NO⁻. *Neuron*, 1999, **24** (2): 461~469
 - 11 Brouch L A, Harrison R W, Skaf M W, *et al.* Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms. *Nature*, 2002, **416** (6878): 337~339
 - 12 Holmqvist B, Ekstrom P. Subcellular localization of neuronal nitric oxide synthase in the brain of a teleost; an immunoelectron and confocal microscopical study. *Brain Res*, 1997, **745** (1-2): 67~82
 - 13 Batista C M, Paula K C, Cavalcante L A, *et al.* Subcellular localization of neuronal nitric oxide synthase in the superficial gray layer of the rat superior colliculus. *Neurosci Res*, 2001, **41** (1): 67~70
 - 14 Xu M, Ng Y K, Leong S K. Distinct subcellular localization and mRNA expression of neuronal nitric oxide synthase in the nucleus dorsalis and red nucleus and their correlation with inducible transcription factors after spinal cord hemisection. *Nitric Oxide*, 2000, **4** (5): 483~495
 - 15 Berkels R, Dachs C, Roesen R, *et al.* Simultaneous measurement of intracellular Ca²⁺ and nitric oxide: a new method. *Cell Calcium*, 2000, **27** (5): 281~286
 - 16 Yi F, Zhang Y A, Campbell B W, *et al.* Simultaneous in situ monitoring of intracellular Ca²⁺ and NO in endothelium of coronary arteries. *AJP- Heart Circ Physiol*, 2002, **283** (6): 2725~2732
 - 17 Dedkova N E, Blatter A L. Nitric oxide inhibits capacitative Ca²⁺ entry and enhances endoplasmic reticulum Ca²⁺ uptake in bovine vascular endothelial cells. *J Physiol*, 2002, **539** (1): 77~91
 - 18 Hyslop A L, Carroll M, Nixon L V, *et al.* Simultaneous measurement of intracellular nitric oxide and free calcium levels in chordate eggs demonstrates that nitric oxide has no role at fertilization. *Dev Biol*, 2001, **234** (1): 216~230
 - 19 Li N, Sul J, Haydon G P. A calcium-induced calcium influx factor, nitric oxide, modulates the refilling of calcium stores in astrocytes. *J Neurosci*, 2003, **23** (32): 10302~1031

Simultaneous Detection of Ca²⁺ and Nitric Oxide in Cultured Hippocampal Neurons Using Double-label Method *

TAO Rong, NING Gang-Min, YANG Yong, ZHENG Xiao-Xiang**
(Department of Biomedical Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

Abstract Choosing 8~10 days cultured hippocampal neurons of SD rat, using Calcium Orange AM and DAF-FM diacetate as the fluorescent indicators of intracellular Ca²⁺ and nitric oxide (NO), simultaneous detection of intracellular Ca²⁺ and NO was proposed by double-label method on laser scanning confocal microscope (LSCM). The dyeing process includes two steps and "Two Track" mode of LSCM is applied to realize simultaneous detection of intracellular Ca²⁺ and NO through quickly switching excitation wavelengths. The experiment results show that there is no cross talk between two dyes and the double-label method can reveal the changes of intracellular Ca²⁺ and NO concentrations under the stimulation of N-methyl-D-aspartate (NMDA), quite consistent with the results of respective single-label experiments. The analysis of slicing image sequences of double-labeled neurons shows that both Ca²⁺ and NO are mainly located in the center area of cell bodies, while their distribution details are different. The results suggest that the double-label method can simultaneously detect the intracellular Ca²⁺ and NO in cultured hippocampal neurons and thus provide an approach to investigate the roles of Ca²⁺ and NO in neurons as well as the interaction between them.

Key words hippocampal neuron, Ca²⁺, nitric oxide, double-label, laser scanning confocal microscope (LSCM)

*This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China (30470463).

**Corresponding author. Tel: 86-571-87951091, E-mail: zxx@mail.bme.zju.edu.cn

Received: January 21, 2005 Accepted: March 28, 2005