

Sciences, Beijing 100850, China).

Abstract *E. coli* is still the first choice of host when foreign gene is expressed. Heterologous proteins could be expressed directly in the cytoplasm, secreted into the periplasmic space or

extracellular medium. Recent developments on *E. coli* expression system are covered, according to the possible destiny of foreign proteins.

Key words *E. coli*, gene expression, molecular chaperone, secretion

钙的光释放技术及其在细胞研究中的应用

徐建华 瞿安连 康华光

(华中理工大学生物物理与生物化学研究所, 武汉 430074)

摘要 Ca^{2+} 的光释放技术通过光解作用使预先引入细胞内的光敏感性螯合剂对 Ca^{2+} 的亲性和改变, 从而实现对细胞内游离钙离子浓度的调控, 有助于阐明 Ca^{2+} 作为第二信使对电兴奋性、肌肉收缩、神经分泌等细胞功能的调制作用。

关键词 光敏感性螯合剂, 细胞内钙离子浓度, 光释放

Ca^{2+} 的光释放技术 (photorelease technique) 是将负载或未负载 Ca^{2+} 的光敏感性 Ca^{2+} 螯合剂引入细胞, 再用特定波长的光束照射, 令其光解产生与 Ca^{2+} 亲和性更高或更低的产物, 从而导致细胞内 Ca^{2+} 浓度的降低或升高。由于 Ca^{2+} 是细胞信号系统中的重要环节, 调节着肌肉收缩、分泌活动、电兴奋性等诸多重要的细胞功能, 而光释放技术能主动调节 $[\text{Ca}^{2+}]_i$, 有助于揭示 Ca^{2+} 的调制作用, 所以它虽是在 80 年代后期出现, 却已在细胞研究中得到较广泛应用^[1]。控制 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的其他方法包括: 显微注射钙盐, 用药理手段从胞内钙库释放 Ca^{2+} , 利用离子电泳、电穿孔 (electroporation) 等输入 Ca^{2+} , 激活电压依赖性钙通道等。但光释放技术在效应的特异性、重现性、可靠性, 细胞完整性的保持, 空间上的明确性, 效果的快速以及使 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 变化维持足够长时间等方面, 均表现了巨大的优势^[1]。尽管这一技术在国内尚未开展, 但是, 鉴于它的广泛应用前景和钙信号系统在细胞功能中的重要意义, 本文特予介绍。

1 光敏感性 Ca^{2+} 螯合剂

Ca^{2+} 的光释放技术的实质在于特定光敏感性 Ca^{2+} 螯合剂 (photosensitive Ca^{2+} chelators) 的应用。理想的光敏感性 Ca^{2+} 螯合剂应具有如下特点^[1]: a. 易于引入细胞内; b. 负载 Ca^{2+} 的能力足够大, 引入细胞后将不干扰静息 Ca^{2+} 水平; c. 在化学上和光分解上稳定; d. 光解时能迅速改变自由 Ca^{2+} 水平; e. 高量子效应和光吸收率; f. 光照产物或光解后的缓冲混合体系, 应能继续缓冲 Ca^{2+} , 且维持 Ca^{2+} 在新水平; g. 螯合剂或光解产物应该无毒。如此理想的螯合剂并不存在, 不过目前所用光敏感性 Ca^{2+} 螯合剂如硝基 (nitr) 类化合物、DM-硝基苯基 (DM-nitrophen) 和叠氮 (diaz) 类化合物均已具备了上述主要特点。

1.1 nitr 类化合物

1986 年, Tsien 和 Zucker 在 Ca^{2+} 螯合剂 1, 2-双(O-氨基苯氧基) 乙烷-N, N, N', N'-四乙

酸(1, 2-bis(O-aminophenoxy) ethane-N, N, N', N'-tetracetic acid, BAPTA) 的芳香环上接入光敏感性硝基苯基, 获得 nitr-5、nitr-7 等光敏感性 Ca^{2+} 螯合剂^[2]. 它们在吸收光之后将产生强吸电子的亚硝基苯甲酰基, 由此减小与金属配位的氮原子上电子密度, 并最终降低化合物对 Ca^{2+} 的亲性和性.

nitr 类螯合剂也具有母体化合物 BAPTA 的优点, 如对 Ca^{2+} 的特异性高于 H^+ 、 Mg^{2+} ; pH 在 7.0 附近时不影响 Ca^{2+} 的亲性和性; 缓冲过程快速. 其缺点是光解后化合物 Ca^{2+} 亲和性的降低相对较小, 这决定着螯合剂调控的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 幅度较小, 如 nitr-5 和 nitr-7 约为 40 倍^[1].

如果用闪烁光部分地光解 nitr 化合物, 一部分化合物的 Ca^{2+} 亲和性将降低, 其过程约需 0.3 ms. 由于缓冲平衡的建立比光解速度快得多, 整个光解期间 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 以同步的方式平缓上升, 产生一个较小而可定量的同步增长 (10^{-5} mol/L 数量级).

1.2 DM-nitrophen 类化合物

DM-nitrophen 是由 Ca^{2+} 螯合剂乙二胺四乙酸 (EDTA) 的结构加接 2-硝基苯基生成. 它结合 Ca^{2+} 的亲性和性为 5 nmol/L (pH 7.2), 两个光解产物则分别为 3 mmol/L 和 0.25 mmol/L; 故完全光解 DM-nitrophen 可使 $[\text{Ca}^{2+}]$ 提高 50 000 倍, 调控范围较大. 缺点为光解产物对 Ca^{2+} 的缓冲太弱, 最终的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 基本上由胞浆自身的缓冲体系决定. 此外, H^+ 和 Mg^{2+} 可竞争 Ca^{2+} 的螯合位点, pH 对 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的结合发生较大影响, 过量 DM-nitrophen 则与 ATP 争夺 Mg^{2+} ^[1].

DM-nitrophen 的动力学特性复杂^[1]. 其光解速度快, 与 nitr 化合物相近, 而对 Ca^{2+} 的结合速度却慢得多, 约为 1.5 mmol/(L·ms)^[3]. 利用该特性可实现不同的调控方式^[1]. 如对部分载 Ca^{2+} 的 DM-nitrophen 进行部分光解时 (partial photolysis of partially Ca^{2+} -loaded DM-nitrophen), 可产生一个较大的瞬态 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 峰值. 而用稳定的紫外光照射 DM-nitrophen

一段时间, 则可形成 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ “脉冲”, 其幅度和时宽分别取决于光照强度与时间. 当无需上述效果时, 可采用全部负载 Ca^{2+} 的 DM-nitrophen.

1.3 diazo 类化合物

当 BAPTA 的芳香环上接入吸电子基叠氮酮 (diazoketone) 时, 可得到低 Ca^{2+} 亲和性的化合物 diazo-2 和 diazo-4. 该取代基可由光解转变为供电子的羧甲基, 使光解产物的 Ca^{2+} 亲和性升高. 如 diazo-2 的 Ca^{2+} 亲和性从 2.2 $\mu\text{mol/L}$ 升至 73 nmol/L (离子强度 120 mmol/L) 或 150 nmol/L (离子强度 250 mmol/L). Diazo 化合物的这一特性可用于迅速降低细胞内钙水平. 与 nitr 化合物相似, diazo 化合物的缓冲平衡比光解迅速, 因而光闪烁可引起 Ca^{2+} 浓度平缓地同步变化. 同时, diazo 或其光解产物对 Mg^{2+} 的亲性和性都比较弱, 如 diazo-2 经光解从 5.5 mmol/L 变至 3.4 mmol/L, 因而 Mg^{2+} 不易产生干扰; pH 也无干扰^[1]. Diazo-2 的弱点在于未光解的螯合剂对 Ca^{2+} 亦有一定的亲性和性, 被引入细胞后, 可能会使静息 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 有所降低, 自然也将影响生理状态下 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高所导致的某些效应^[1].

2 Ca^{2+} 的光释放技术

2.1 向细胞内引入螯合剂

为调控细胞内游离钙离子浓度, 应将特定的螯合剂以适当形式引导入细胞质中. 目前采用的方法有四种: a. 由微管加压注射; b. 在全细胞膜片钳方式下以电极充灌; c. 经由细胞膜透入; d. 采用离子电泳^[1]. 其中, 离子电泳方法中要求螯合剂必须是未负载 Ca^{2+} 而只带负电荷的形式, 进入后再从胞浆或胞内钙库中吸收钙, 所以它只适于利用 diazo 化合物降低细胞内钙水平的情况. 由细胞膜透入时, 螯合剂是以酯化的形式 (-AM) 进入, 缺少游离羧基预先负载 Ca^{2+} , 也需由胞内吸收 Ca^{2+} , 至于 Ca^{2+} 的负载水平和螯合剂的位置都不确定, 因而光解效果难以定量, 以致应用

上受到限制.

2.2 光解

现有光敏感性 Ca^{2+} 螯合剂的光解波长在 330~ 380 nm 范围^[1], 故在细胞内光解时, 需要一个近紫外的明亮光源照射. 如时间分辨率不重要时, 可以采用普通的汞灯或氙弧光灯. 配备着准直石英透镜的 100~ 150 W 汞灯, 其能量足以在 2 s 内光解 25% 的光敏感性化合物. 功率更大时, 光解更迅速.

快速事件需采用激光或氙弧光闪光灯. 激光光源因其固有的准直光束而易于聚焦成很小的斑点, 氙灯则更便宜更轻便. 对氙灯充入 200 J 电能, 可产生一个长约 1 ms 的脉冲, 谱带在 330~ 380 nm. 聚焦时选用适于紫外光的椭圆形反射镜或石英折射镜头.

光线经由光纤传送. 在显微镜处, 光束通过外荧光入口 (epifluorescence port) 导入. 显微镜的物镜要求数值孔径大、紫外光传送好, 使光线有效地聚焦并限定范围. 若需同时使用其他光源 (如对 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 进行荧光测量), 应采用半反射镜, 并对光路作妥善设置.

2.3 校准

在启用新光学系统或者试用新的光敏感性 Ca^{2+} 螯合剂时, 必须测定所用设备的光解速率, 据此调节光强度或光照时间, 获得所需光解程度. 测定方法通常是^[1]: 将部分载钙的光敏感性螯合剂与含 Ca^{2+} 指示剂的溶液相混合于微量样品池; 用光解的光束或闪光均一地多次照射, 每次光照后以显微荧光法或吸收光度计测量溶液中 $[\text{Ca}^{2+}]$ 的变化. 在全细胞膜片钳实验中, 也可把细胞作为校准容器. 供选 Ca^{2+} 指示剂如: fura-2, indo-1, furaptra, fluo-3, 钙绿 (Calcium GreenTM), 钙橙 (Calcium OrangeTM) 等, 主要根据所用仪器确定. 应该注意, 指示剂必须在有光敏感性螯合剂的情况下校准, 以消除螯合剂的荧光干扰导致指示剂的荧光特性变化^[4].

3 在细胞研究中的应用

自 1986 年第一个光敏感性 Ca^{2+} 螯合剂出

现后, Ca^{2+} 的光释放技术日渐活跃地应用于细胞研究. 其内容涉及由细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 调控的不同功能过程. 主要可分为以下几方面.

3.1 离子通道的调制

在已知细胞膜离子通道中, 受胞内钙浓度调制的有: 钙离子通道、 Ca^{2+} 依赖性钾通道、 Ca^{2+} 依赖性氯通道等. Ca^{2+} 光释放技术与膜片钳方法等相结合, 有助于揭示通道的 Ca^{2+} 调控特性. 1987 年, Gurney 等^[5] 最先利用 nitr-2, nitr-5 和 nitr-7 释放钙以激活大鼠交感神经元的 Ca^{2+} 依赖性 K^+ 电流. 1995 年, Currie 等^[6] 以 DM-nitrophen 在胞内光释放 Ca^{2+} 研究培养的大鼠背根神经节细胞上 Ca^{2+} 依赖性氯离子通道电流 ($I_{\text{Cl}}(\text{Ca})$) 的特性, 有力地说明了 $I_{\text{Cl}}(\text{Ca})$ 的衰减是由于细胞质中的 Ca^{2+} 负载被清除, 而不是通道的失活; 只要细胞膜附近 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 维持足够高, $I_{\text{Cl}}(\text{Ca})$ 就会对膜兴奋性进行调制.

3.2 肌细胞钙库的触发

Gyorke 和 Fill^[7] 用 Ca^{2+} -DM-nitrophen 释放钙, 表明心肌的兰尼定 (ryanodine) 受体对 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 在 μmol 范围的持续升高有适应性, 而对更大的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 变化敏感. Iino 等^[8] 在豚鼠门静脉平滑肌上, 发现 IP_3 依赖性的 Ca^{2+} 释放也与 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 有关. 以 Ca^{2+} -DM-nitrophen 的光解提高 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 时, 观测到它加速 Ca^{2+} 从对 ryanodine 不敏感、受 IP_3 激活的钙库释放.

3.3 细胞分泌

在神经元中, 动作电位引起 Ca^{2+} 由钙通道流入, 引起递质释放. 由于去极化与 Ca^{2+} 的内流相耦联, 以前难以确定膜电位是否对分泌器存在其他的直接作用. 1988 年, Zucker^[9] 采用 nitr-5 灌流培养的蜗神经突触前神经元, 然后光解释放 Ca^{2+} , 并对突触前膜进行电压钳, 以鉴别 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 和膜电位在神经分泌中的作用. 他们发现膜电位不直接影响由 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高触发的递质释放速率. Delany 等^[10] 通过在枪乌贼巨大突触的突触前注射 Ca^{2+} -DM-nitrophen, 证实动作电位对 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高所触

发的递质释放无作用。

DM-nitrophen 曾用于考察内分泌细胞上的胞吐 (exocytosis) 步骤. Neher 等^[11]发现在牛肾上腺嗜铬细胞上, 随 $[Ca^{2+}]_i$ 逐步增至大约 100 $\mu\text{mol/L}$, 分泌呈现三个动力学阶段. 他们认为各不同阶段反映着囊泡从不同池 (pool) 中由分泌机构释放. 同时也发现, 预照射可使 $[Ca^{2+}]_i$ 略增 ($\mu\text{mol/L}$ 级), 为 DM-nitrophen 进一步释放 $[Ca^{2+}]_i$ 时产生的效应作准备, 这说明 $[Ca^{2+}]_i$ 不只是触发胞吐, 而且也动员囊泡进入可释放状态^[11].

3.4 其他应用

在纤维瘤细胞 (fibroblast) 中, 促进有丝分裂的刺激可引起钙振荡. Harootunian 等^[12]曾以 AM 形式把 nitr-5 孵入纤维瘤细胞, 发现光释放 Ca^{2+} 将促进和加速钙振荡, 而光解 diazo-2 释放螯合剂将抑制振荡. 对 nitr-7 光解时, $[Ca^{2+}]_i$ 不仅因螯合剂的释放而立即升高, 而且稍后诱发 $[Ca^{2+}]_i$ 再度升高. 药理学研究表明, 后一效应源于 IP_3 敏感型的钙库. 提示 $[Ca^{2+}]_i$ 与这些钙库之间的相互作用是 $[Ca^{2+}]_i$ 振荡的基础^[12]. 1990 年, Kao 等^[13]用 nitr-5/AM 负载纤维瘤细胞, 观察到光解会使 $[Ca^{2+}]_i$ 提高数百 nmol, 并且触发有丝分裂的早期步骤——核周膜的解离, 而对分裂中期向后期的过渡影响不大.

Gilroy 等^[14]将负载 Ca^{2+} 的 DM-nitrophen 注射入睡莲叶子的卫星细胞, 光解时可在细胞内释放大约 600 nmol/L 的 Ca^{2+} , 并引起气孔关闭.

光释放 Ca^{2+} 的技术也用于研究内质网囊泡上 Ca^{2+} 与 Ca^{2+} -ATPase 结合的动力学. 由于从 nitr-5 光释放的 Ca^{2+} 能引起酶的傅立叶变换红外光谱变化, 因而可提供 ATPase 在结合 Ca^{2+} 后的结构变化信息^[1, 15].

综上所述, 细胞内钙调控的生物功能多而重要. Ca^{2+} 的光释放技术赋予人们主动调节细胞内钙离子浓度、考察细胞生理效应的机会. 它常与其他较新的研究方法如膜片钳技术、共

聚焦显像技术、碳纤电极技术、膜电容监测相结合, 更有利于深入探讨钙调控的细胞功能. 目前, 利用光释放技术研究的对象已不限于初期的神经细胞、肌细胞、纤维瘤细胞等. 新类型的螯合剂也在设计、合成, 现有螯合剂的动力学特性仍继续被认识与利用^[16]. 无疑, Ca^{2+} 的光释放技术将更充分地应用, 为揭示 Ca^{2+} 作为最广泛、最全能的第二信使的功能提供有力帮助.

参 考 文 献

- 1 Zucker R. Photorelease techniques for raising or lowering intracellular Ca^{2+} . *Methods in Cell Biology*, 1994, **40**: 31 ~ 63
- 2 Tsien R, Zucker R S. Control of cytoplasmic calcium with photolabile 2-nitrobenzhydryl tetracarboxylate chelators. *Biophys J*, 1986, **50**: 843~ 853
- 3 Zucker R S. The calcium concentration clamp: Spikes and reversible pulses using the photolabile chelator DM-nitrophen. *Cell Calcium*, 1993, **14**: 87~ 100
- 4 Zucker R S. Effects of photolabile calcium chelators on fluorescent calcium indicators. *Cell Calcium*, 1992, **13**: 29~ 40
- 5 Gurney A M, Tsien R Y, Lester H A. Activation of a potassium current by rapid photochemically generated step increase of intracellular calcium in rat sympathetic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, **84**: 3496~ 3500
- 6 Currie K P, Wootton J F, Scott R H. Activation of Ca^{2+} -dependent Cl⁻ currents in cultured rat sensory neurons by flash photolysis of DM-nitrophen. *J Physiol (London)*, 1995, **482** (part 2): 291~ 307
- 7 Györke S S, Fill M. Ryanodine receptor adaptation: control mechanism of Ba^{2+} induced Ca^{2+} release in heart. *Science*, 1993, **260**: 807~ 809
- 8 Lino M, Endo M. Calcium-dependent immediate feedback control of inositol 1, 4, 5-trisphosphate-induced Ca^{2+} release. *Nature (London)*, 1992, **360**: 76~ 78
- 9 Zucker R S, Haydon P G. Membrane potential plays no direct role in evoking neurotransmitter release. *Nature (London)*, 1988, **335**: 360~ 362
- 10 Delaney K R, Zucker R S. Calcium released by photolysis of DM-nitrophen stimulates transmitter release at squid giant synapse. *J Physiol*, 1990, **426**: 473~ 498
- 11 Neher E, Zucker R S. Multiple calcium-dependent processes related to secretion in bovine chromaffin cell. *Neuron*, 1993, **10**: 21~ 30
- 12 Harootunian A T, Kao J P, Paranjape S *et al.* Cytosolic Ca^{2+} channels as key positive feedback elements. *Cell Calcium*, 1991, **12**: 153~ 164

(下转第 189 页, Continued on page 189)

参 考 文 献

1 Lamark T, Kaasen I, Eshoo M W *et al.* DNA sequence and analysis of the bet genes encoding the osmoregulatory choline glycine betaine pathway of *Escherichia coli*. Mol Microbiol, 1991, **5**: 1049

2 吴如丹, 林其谁. 鼠肝线粒体胆碱脱氢酶的提纯. 生物化学与生物物理学报, 1985, **17**: 624

3 吴如丹, 林其谁. 胆碱脱氢酶的性质. 生物化学与生物物理学报, 1985, **17**: 643

4 Paul M. Sequence from picomole quantities of protein electroblotted onto PVDF membranes. J Biol Chem, 1987, **262**: 10035

5 Mann P J G, Quastel J H. The oxidation of choline by rat liver. Biochem J, 1937, **31**: 869

6 Douglas R C. GMC oxidoreductases: a newly defined family of homologous proteins with diverse catalytic activities. J Mol Biol, 1992, **223**: 811

Amino Terminal Sequence of Choline Dehydro-

genase. FU Xiaohong, LIN Qishui (*State Key Laboratory of Molecular Biology, Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai 200031, China*).

Abstract Solubilized rat liver mitochondrial choline dehydrogenase was further purified by the SDS-PAGE and electroblotting methods. Both the lipids and detergents etc. were removed during the process of purification. The amino terminal sequence of the purified CDH was determined, it was: VAAAAGGGKD. Although the sequence showed high homology with mouse CO5 protein, rat adenylyl cyclase and human oxysterol-binding protein, there was no similarity with CDH of *E. coli*.

Key words choline dehydrogenase, electroblotting, primary sequence, homology

(上接第 135 页, Continued from page 135)

13 Kao J P Y, Alderton J M, Tsien R Y *et al.* Active involvement of Ca^{2+} in miaroric progression of Swiss 3T3 fibroblasts. J Cell Biol, 1990, **111**: 183~ 196

14 Gilroy S S, Tead N D, Trewavas A J. Elevation of cytoplasmic calcium by caged calcium or caged inositol triphosphated initiates stomatal closure. Nature (London), 1990, **346**: 769~ 771

15 Buchet R, Jona I, Martonosi A. Ca^{2+} release from caged Ca^{2+} alters the FTIR spectrum of sarcoplasmic reticulum. Biochim Biophys Acta, 1991, **1069**: 209~ 217

16 Adams S R, Tsien R Y. Controlling cell chemistry with caged compounds. Ann Rev Physiol, 1993, **55**: 755~ 784

Photorelease Technique of Ca^{2+} and Its Applications in Cell Studies. XU Jianhua, QU Anlian, KANG Huaguang (*Institute of*

Biophysics and Biochemistry, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China).

Abstract Photorelease technique of Ca^{2+} can manipulate intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) by photolyzing specific photosensitive Ca^{2+} chelator in the cell to change its affinity with Ca^{2+} . This technique is especially useful in elucidating the intracellular messenger role of Ca^{2+} in cell functions such as electrical excitability, muscle contraction and secretion, etc.

Key words photosensitive chelators, intracellular Ca^{2+} concentration, photorelease