

4种钙离子检测 成像系统检测细胞胞浆钙振荡的比较^{*}

方晓峰¹ 赵晓婷^{1**} 周维¹ 李佳¹ 刘琴¹
沈恂² Yoh-ichi Satoh³ 崔宗杰^{1***}

1. 北京师范大学细胞生物学研究所, 北京 100875; 2. 中国科学院生物物理研究所, 北京 100101;

3. Department of Histology, Iwate Medical University School of Medicine, Uchimaru 19-1, Morioka 020-8505, Japan

摘要 胞浆钙离子浓度的规律性增加, 已经在动物、植物、微生物等许多重要生命活动中得以证明, 如肌肉收缩、细胞分泌、卵子授精、神经传导、个体发育、细胞凋亡以及病原生物(寄生虫、细菌、病毒)对哺乳动物细胞的侵袭过程中的重要性, 已经得到广泛认可. 因此, 活细胞不同微区中钙离子浓度规律性变化的成像研究已受到越来越多的关注. 虽然目前多个厂家可以提供钙离子成像系统, 但用户在根据需要进行选择时, 往往得不到有关设备的足够信息, 因此很难做出正确的选择. 文中详细比较了4种不同配置的钙离子浓度测量系统在检测胰腺腺泡细胞和肝脏实质细胞胞浆钙离子浓度的振荡样增加时的性能差异, 分析了这些差异的原因及解决方法, 为钙离子成像系统的使用者和制造商提供参考信息.

关键词 钙离子浓度测量系统 胰腺腺泡细胞 肝细胞 胞浆钙振荡

胞浆钙离子浓度的规律性增加, 在肌肉收缩、细胞分泌、卵子授精、神经传导、个体发育、细胞凋亡等生理病理过程中, 是关键的调控信号^[1-3]. 钙离子信号适用于动物、植物、微生物的重要生命活动^[4-7], 在寄生虫、细菌、病毒对哺乳动物细胞的侵袭中也至关重要^[8-10]. 因而活细胞胞内不同微区钙离子浓度规律性变化的成像研究, 受到越来越多科学家的关注. 激光共聚焦显微镜的时间扫描功能可以用于一些简单的钙离子浓度测量, 更加系统的研究往往需要一套专用的钙离子成像系统. 多个厂家可以提供钙离子成像系统, 但是用户根据自己的需要进行选择时, 可以利用的现成文献往往不多. 系统配置的不同所引起的测量参数的变化, 在一般文献中也往往语焉不详, 使得在仪器购置或配

置时感到很难做出取舍. 本文中, 我们详细比较了4种不同配置的钙离子浓度测量系统, 并用于检测胰腺腺泡细胞和肝脏实质细胞中胞浆钙离子浓度的振荡样增加. 希望通过这些比较研究, 能够对国内同行自己购置钙离子成像系统, 或国内厂家研制相关产品时, 有所裨益.

如上所述, 多种细胞受到一定刺激后, 胞浆钙离子浓度呈规律性增加. 当这些刺激是低强度生理性刺激时, 钙离子浓度往往呈振荡样升高. 钙离子浓度以周期性钙离子峰的形式出现. 胰腺腺泡细胞属于典型的外分泌细胞, 在受到生理浓度的乙酰胆碱(ACh)和胆囊收缩素(CCK)刺激后, 出现典型的胞浆钙振荡^[11-15]. 类似地, 肝脏实质细胞在受到生理性浓度的去甲肾上腺素(NE)、血管加压素(vaso-

2008-04-08 收稿, 2008-05-06 收修改稿

^{*} 国家自然科学基金(批准号: 30472048, 3054042524, 30728020)和北京市自然科学基金(批准号: 6062014)资助项目

^{**} 共同第一作者

^{***} 通信作者, E-mail: zjcui@bnu.edu.cn

©1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

pressin, VP)、血管紧张素(angiotensin)等的刺激后, 也出现典型的胞浆钙振荡^[16-19]. 本文将主要利用上述两种细胞进行检测.

进行钙离子荧光成像时, 可以利用的钙离子荧光指示剂多种多样. 使用激光共聚焦显微系统成像时, 多数学者使用可被可见光激发的荧光指示剂. 这主要是因为受到了仪器的限制: 多数激光共聚焦显微系统没有配置 A 段紫外激光器, 不能使用双波长紫外激发指示剂 Fura-2, 只能使用可见光激发的 Fluo-3 类指示剂. 而使用单波长指示剂的主要缺点是在成像时, 细胞不同部位荧光强度的分布可能受到指示剂浓度不均匀分布的干扰. 而双波长指示剂因为得到的是两个波长荧光强度的比例, 不存在此问题. 所以重点介绍使用 Fura-2 进行钙离子浓度的测量和成像.

1 材料与方法

1.1 试剂

胆囊收缩素八肽(CCK-8), 牛血清白蛋白(BSA), 胰酶抑制剂(soybean trypsin inhibitor), 苯基肾上腺素(PE)购自 Sigma-Aldrich 公司(St. Louis, MO, USA). 胶原水解酶 P(collagenase P)和胶原水解酶 H(collagenase H), 缓冲剂 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethane-sulfonic acid(HEPES)为 Roche(Mannheim, Germany)产品, MEM 氨基酸混合液为 GIBCO-BRL(Grand island, NY, USA)产品, Fura-2 AM 为 Molecular Probes(Eugene, OR, USA)产品, Cell-Tak 为 BD Biosciences(Bedford, MA, USA)产品.

1.2 大鼠胰腺腺泡细胞的制备

大鼠胰腺腺泡细胞的制备如文献[12, 14]报道. 雄性 Sprague-Dawley 大鼠(维通利华, 北京)250—350 g, 断颈处死, 取出胰腺. 置于预先加有缓冲液的培养皿中, 去除脂肪及大血管, 取 P 型胶原水解酶液(800 U / 10 mL)5 mL(用缓冲液配制), 注射器注射充分, 37℃, 120 r/min 40 min. 小心吹打分散胰腺组织, 经 150 目滤器过滤至含 4%BSA 的缓冲液中自然沉降, 缓冲液将细胞洗 3 次, 即可得新鲜分离的胰腺腺泡细胞^[12]. 实验中所用胰腺腺泡细胞分离缓冲液, 是 Krebs 平衡液, 具体成分如下

(mmol/L): NaCl 118, KCl 4.7, CaCl₂ 2.5, MgCl₂ 1.13, NaH₂PO₄ 1.0, D-葡萄糖 5.5, HEPES 10, L-谷氨酰胺 2.0, 牛血清白蛋白(BSA) 2 mg/mL, MEM 氨基酸混合液 2%, 大豆胰酶抑制剂 0.1 mg/mL, 用 NaOH 4 mol/L 调 pH 至 7.4, 充氧 30 min 后待用. 胰腺腺泡细胞进行灌流时, 配制上述缓冲液时不加谷氨酰胺、BSA、氨基酸混合液和 大豆胰酶抑制剂.

1.3 大鼠肝细胞的分离

肝细胞的分离如文献[18, 19]报道. 断颈处死 SD 大鼠, 将肝门静脉及其一支结扎. 插管灌流, 先用灌流液 150 mL, 30 mL/min 灌流, 接着灌流酶解液 80 mL, 20 mL/min, 酶解液可循环使用. 灌流结束后剪下尾状叶及其相邻的一叶放入 5 mL 酶解液中, 用刀片切成小块, 在 37℃恒温摇床中振摇 2 min(120 r/min). 吸管轻轻吹打, 150 目的尼龙网过滤, 将滤液转移至含有 BSA 3 mg/mL 的缓冲液中, 离心 2 min(1000 r/min). 然后用标准缓冲液洗细胞 3 次, 重悬细胞. 分离肝细胞所用缓冲液成分如下(mmol/L): NaCl 118, KCl 4.7, CaCl₂ 2.5, MgCl₂ 1.13, NaH₂PO₄ 1, D-葡萄糖 5.6, HEPES 10, 牛血清白蛋白(BSA) 2 g · L⁻¹, MEM(×50) 2%, L-谷氨酰胺 2, 丙酮酸钠 2, 用 NaOH 4 mol/L 调 pH 值到 7.34, 缓冲液充氧 30 min. 肝细胞进行灌流时, 配制上述缓冲液时不加 BSA、氨基酸混合液、谷氨酰胺和丙酮酸钠.

1.4 钙离子浓度的测量

分离所得胰腺腺泡细胞、肝脏实质细胞重悬浮后在 37℃振荡水浴中与 Fura-2 孵育(终浓度 5 μmol/L) 30 min. 将负载好的细胞加入已涂有 Cell-TAK 并固定于 Sykes-Moore 灌流槽的盖玻片上粘贴细胞. 将灌流槽放置在钙离子测量/成像系统的倒置荧光显微镜载物台上, 选择细胞区域后进行测量.

1.5 钙离子测量 成像系统的配置

实验用了 4 种不同配置的系统对细胞钙信号进行测量, 系统的配置情况见图 1. 图 1(a)显示系统分解框图, 图 1(b)显示不同系统对应于图 1(a)的组分名称, 图 1(c)–(d)显示金属卤素灯泡(图 1(c); 系统 I)、氙灯灯泡(图 1(d); 系统 II–IV)的发射谱.

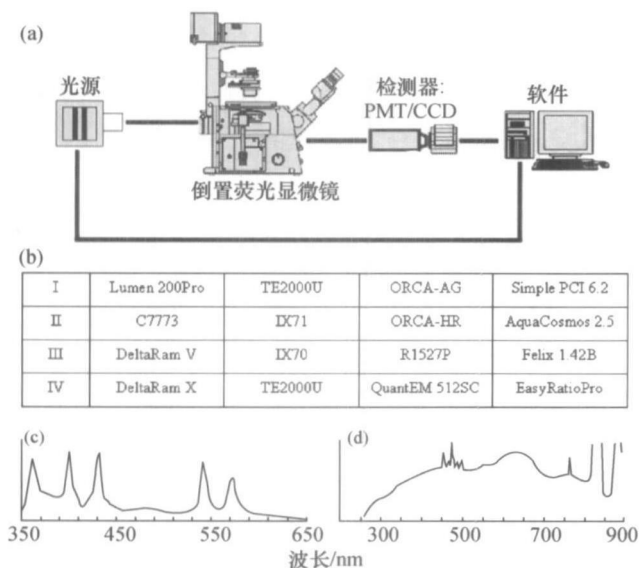


图 1 钙离子检测系统的配置

(a) 系统由独立外置光源、倒置荧光显微镜、检测装置 PMT/CCD 和计算机及软件构成; (b) 系统 I—IV 的具体配置: 光源分别来自 Prior Scientific (I), Hamamatsu (II), PTI (III—IV); 显微镜分别来自 Nikon (I), Olympus (II—III), Nikon (IV); 检测装置分别是 Hamamatsu CCD ORCA-AG (I) 和 Hamamatsu CCD ORCA-HR (C4742-95-12HR) (II), Hamamatsu PMT 814 (III), Roper Scientific CCD QuantEM 512SC (IV); 软件分别是 Hamamatsu / Compix Inc Simple PCI 6.2 (I), Hamamatsu AquaCosmos (II), PTI Felix 1.42B (III) 和 PTI EasyRatioPro (IV). PTI 是指 Photon Technology International; (c)—(d) 系统 I—IV 光源灯泡的发射谱。(c) 金属卤化物灯泡 (系统 I 的 Lumen 200 Pro); (d) 氙灯灯泡 (系统 II 的 Hamamatsu C7773、系统 III—IV 的 DeltaRam V/X). 灯泡发射谱修改自 (Prior Scientific Inc. 和 Photon Technology International 公司网站 (Prior Scientific Inc.: http://www.prior.com/downloads/user_files/en/Lumen200PRO_Datasheet.pdf; Photon Technology International: <http://www.pti-nj.com/UVvis/UVHardware.html>))

1.5.1 系统 I 如图 1 所示, 系统 I 所用光源为 Lumen 200 Pro (Prior Scientific Inc., Fulbourn, Cambridge, UK). 这款 Prior Scientific 光源配置的是金属卤化物 (metal halide lamp) 灯泡. Lumen 200 Pro 光源的光谱带范围为 350—650 nm. 所用金属卤化物灯泡功率为 200 W, 寿命约 2000 h. Lumen 200 Pro 光源内嵌一个马达驱动、直径 25 mm 的转轮; 转轮具有 6 个滤光片孔, 可实现滤光片之间的相互转换, 同时光源快门可控制光强. 转盘滤光片孔安装有 340 和 380 nm 滤光片, 可实现 340 /

380 nm 两个波长之间的快速切换, 相邻的两个滤光片转换需时 55 ms. 转盘外接一控制盒, 可手动控制 340 / 380 nm 波长之间的切换. Lumen 200 Pro 通过 2 m 长的液体导光管 (liquid light guide) 将激发光输送到荧光显微镜的入口, 避免光源和显微镜直接相连以及热量向显微镜的传递.

系统 I 所配显微镜为 TE-2000 U (Nikon, Japan). 显微镜激发块配置了 Fura-2 专用滤光片块组合 (Chroma 74500-二色镜片和发射滤光片组合; 激发滤光片放置在上述光源的滤光片转轮中). TE-2000U 所配 40 X 超级荧光物镜 (油镜) 在 340 nm 处透过率 52%, 380 nm 处透过率 74%. 系统 I 所用 CCD 为 ORCA-AG (Hamamatsu, Japan), 像素 1344×1204, 致冷温度 -30 °C, 470—570 nm 范围内量子产率 70%.

系统 I 所配软件为 Simple PCI 6.2 (Hamamatsu / Compix Inc.). 软件自动生成数据工作文件, 自动存储所有获得图像, 分析数据和图表. 软件提供了模块化设计, 能根据自己的需要选择相对应的功能模块. 实验中主要使用软件的以下模块: AIC: 自动控制图像捕获及显微多位成像模块, 其中又包括 CCD 相机驱动模块, 标准设备驱动模块, 高级驱动模块, 和实验计划者 4 个模型组合. IPA: 图像处理分析模块, 主要是结合 AIC 模块完成在线的捕获和分析以及优化, 并可以进行后期的图像分析处理. DIA: 动态光密度分析模块, 可处理 Ca^{2+} 浓度测定, 双波长比率, pH 值比率测量等. DNN: 去模糊模块, 采用快速算法去除图像模糊.

1.5.2 系统 II 系统 II (图 1) 光源是一个内置氙灯的高速扫描单色仪 (Hamamatsu C7773). 氙灯灯泡 150 W, 呈连续光谱. 单色仪 C7773 在 340/380 nm 之间的转换需时 3 ms, 适用双波长快速交替激发.

系统 II 的显微镜是 Olympus IX71 倒置荧光显微镜. Olympus 高紫外透过物镜取材于低自发荧光玻璃 (全反射镀膜和连接材料), UAPO40X3/340 在 340 nm 处的光透过率超过 50%. 系统 II 的 CCD ORCA-HR (C4742-95-12HR) 像素 4000×2624, 最短曝光时间 330 μs, 适合于高速、弱信号成像.

系统 II 配置的软件为 AquaCosmos 2.5 (Hamamatsu, Japan), 软件内设操作向导, 实验时

可将荧光图像 (340 和 380 nm)、荧光比例图像 (F340/F380)、荧光及其比例变化曲线实时展现出来. 实验结束后可对实验结果重新划 ROI 并进行各种分析计算.

1.5.3 系统 III 系统 III(图 1)的光源是美国 PTI 公司生产的 DeltaRam V 单色仪, 使用 75 W 氙灯灯泡, 在紫外和可见波段连续发射. 其优秀的光学设计使得其输出功率在单一波长可达到 19 mW. DeltaRam V 具有高速波长转换功能, 速度 80 nm/s.

系统 III 显微镜是 Olympus IX-70, 与系统 II 类似. Olympus IX-70 配置了 Fura-2 专用激发块. 发射光的检测使用 Hamamatsu R1527P 型 PMT (PTI PM T814 型), 可进行模拟和数字(光子计数)两种检测模式, 可检测波长范围 200—680 nm. PMT 灵敏度高, 动态范围广.

系统 III 的数据获取和分析软件是 Felix 1.42B, 可根据硬件的配置自己设置数据获取程序, 将荧光强度和比例值实时显示.

1.5.4 系统 IV 系统 IV(图 1)的光源与系统 III 类似, 是美国 PTI 公司生产的单色仪 DeltaRam X. DeltaRam X 单色仪内置氙灯灯泡功率 75 W, 使用时无须制冷, 不产生臭氧. DeltaRam X 可多波长高速转换, 波长范围 250—680 nm. DeltaRam X 与 DeltaRam V 一样, 具有双侧可调狭缝, 在 0—24 nm 范围连续可调. DeltaRam V 的 340/380 nm 激发光切换速度 < 2 ms, 能在 15 ms 内完成 4 个不连续波长的转换.

系统 IV 的显微镜与系统 I 相同, 是 TE-2000U (Nikon, Japan). 配置了 40X 超级荧光物镜, 340 nm 处光通过率为 43%. 系统 II—IV 荧光显微镜的激发块都配置有 Fura-2 滤光片组合, 但是因为光源是单色仪(而不是系统 I 中的滤光片转轮), 所以在购置 Fura-2 滤光片组合(如 Chroma 的 71000)时, 可省去激发滤光片. 系统 IV 的 CCD 是 Roper Scientific 的高灵敏度增强型 QuantEM 512 CS, 具有双放大器, 制冷温度为 -30 °C, 量子效率大于 90%. 使用软件是 PTI 公司配置的 EasyRatioPro. 这套高级荧光成像和分析软件专门为一个非常现代化的 WarpDrive 定制, 操作方便. 能在获取荧光图像的同时, 实时生成比率图像, 实时显示荧光强度

和比例曲线.

为了便于总结, 表 1—2 是光源、检测器的性能比较一览表.

表 1 光源性能比较一览表

系统	名称	灯泡/W	类别	主要波峰/ 发射范围 / nm	340/380 转换速度 / ms	输出单色 光带宽 (nm)/ 功率(mW)
I	Lumen Pro200	金属卤化 物(200)	滤光 片轮	360 400 430 540 570	55	25 / —
II	C7773	氙灯(150)	单色 仪	330—650	3	可调/ 3.5 (at 500 nm)
III	DeltaRam V	氙灯(75)	单色 仪	250—680	2	0—24 / —
IV	DeltaRam X	氙灯(75)	单色 仪	250—680	2	0—24 / 19 (at 473 nm)

表 2 检测器性能比较一览表

系统	名称	类别	曝光时间/ 读出速率	量子 产率/%	像素	制冷 温度/ °C
I	ORCA-AG	CCD	10 ^μ s— 4200 s	70	1344× 1204	-30
II	ORCA-HR	CCD	330 ^μ s— 10 s	50	4000× 2624	5—7
III	1527P	PMT	—	10—20	—	—
IV	QuantEM 512SC	CCD	1.5— 10 MHz	90	512× 512	-30

2 结果

2.1 系统 I

利用系统 I 在明场的视野中观察到胰腺腺泡细胞的形态如图 2(a)所示, 腺泡中每个腺泡细胞的界线清晰可见, 细胞富含酶原颗粒的顶部与基底部分界明显. 图 2(a)显示成像时选取了 3 个候选区域(region of interest, ROI): ROI 1.1 为胰腺最右侧的一个细胞, 测量整个细胞的平均胞浆钙离子浓度; ROI 1.2 选取细胞的基底部, ROI 1.3 选取细胞富含酶原颗粒的顶部, 分别测量该细胞基底部、颗粒顶部的平均胞浆钙离子浓度. 图 2(b)显示 3 个 ROI 平均胞浆钙离子浓度随时间的变化. CCK 10 pmol/L 刺激诱发胰腺腺泡细胞规则胞浆钙振荡. 但是钙离子峰值出现的先后, 在细胞不同部位明显不同. 刺激早期, 细胞顶部首先出现钙离子峰; 刺激后期, 细胞基底部首先出现钙离子峰. 全细胞的

峰值出现时间是二者的中间值。同时, 细胞不同部位钙离子峰幅值也明显不同。基底部的峰值明显高于细胞顶部。细胞顶部和基底部振荡频率基本一致, 但是在刺激初期细胞顶部出现小的钙离子峰, 在细胞基底并没有体现(图2(c))。

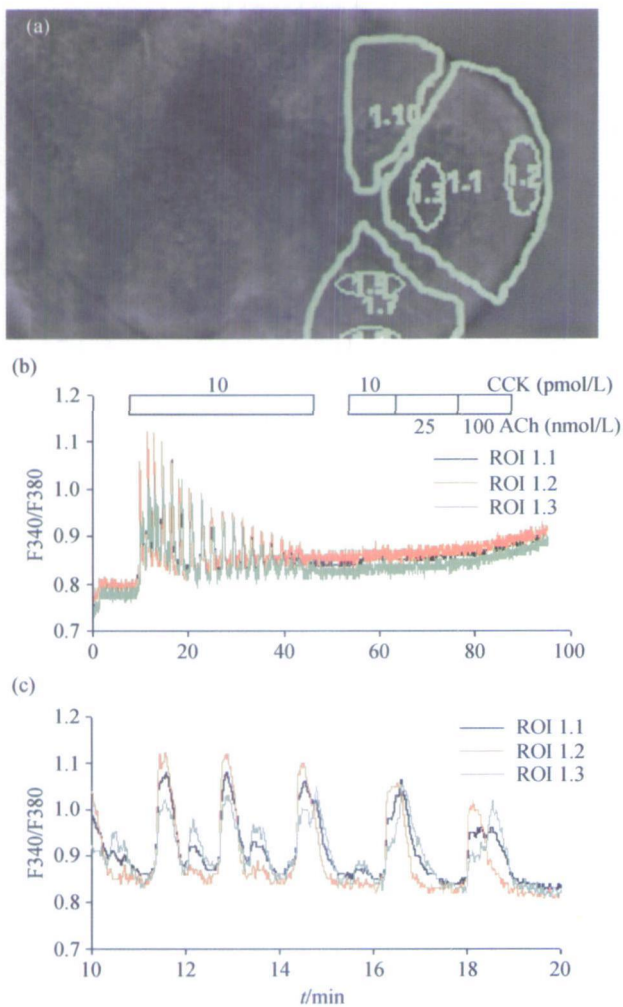


图 2 系统 I 检测大鼠胰腺腺泡细胞胞浆钙信号的变化

(a) 胰腺腺泡细胞的明场相差图, 显示绿色 ROI 1.1—1.3 的位置, 分别是同一个细胞的全细胞 ROI、细胞基底部 ROI 和细胞顶部 ROI; (b) ROI 1.1—1.3 在受到 CCK 10 pmol/L, ACh 25, 100 nmol/L 刺激后胞浆钙离子浓度随时间变化的曲线; (c) 是图 b 中记录的部分放大, 时间如图所示。(b) 中方框显示给药时间

这些不同 ROI 区域的钙离子振荡信号, 在刺激后逐渐衰减并最后消失。在洗掉 CCK 之后, 再依次加入 CCK 10 pmol/L, ACh 25 nmol/L, ACh 100 nmol/L, 都不能再次引发胞浆钙离子浓度的升

高(图 2(b), $N=6$)。

2.2 系统 II

利用系统 II 选取视野中不同 ROI(图 3(a), (b)), 发现用 CCK 10 pmol/L 刺激胰腺腺泡细胞, 在不同细胞均引发腺泡细胞胞浆规则钙振荡; 刺激期间振荡幅值变化不大, 洗去 CCK 后钙振荡消失(图 3(c), (d), $N=7$)。利用系统 II 可以直接观察到

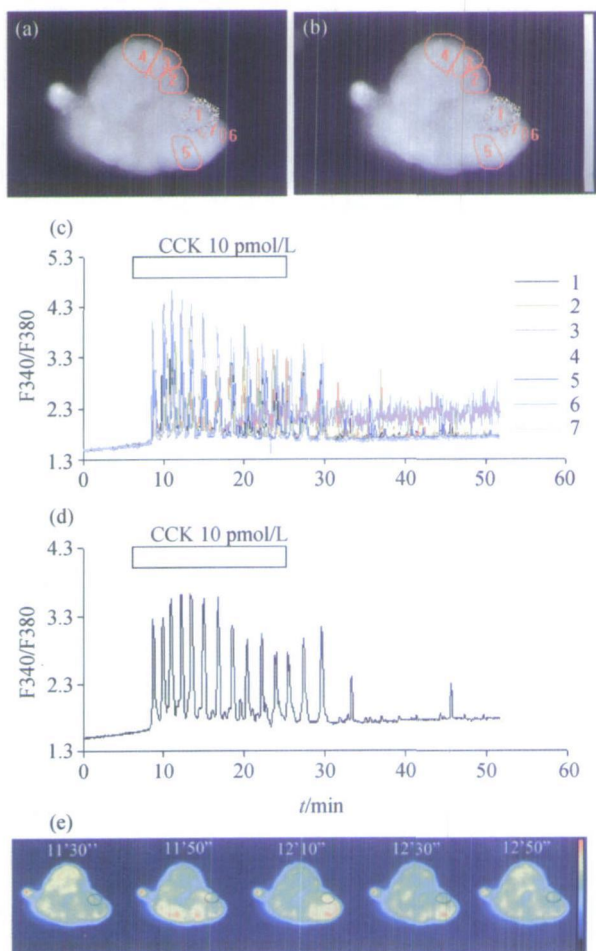


图 3 系统 II 检测大鼠胰腺腺泡细胞胞浆钙信号的变化

(a), (b) 胰腺腺泡细胞 340 nm(a)、380 nm(b) 激发所得荧光图像。图中所画圆圈显示所选择的 ROI 1—7 的位置。图右侧彩灰度条表示 F340/380 荧光的强度; (c) 显示 ROI 1—7 在受到 CCK 10 pmol/L 刺激后胞浆钙离子浓度变化的情况; (d) 单独显示 ROI 1 的情况; (e) ROI 1(a), (b) 中重点标出的细胞在所示时间点的 F340 荧光图, 注意与 11'30" 相比, 11'50"、12'10" 时 ROI 1 的 F340 荧光强度明显增加, 12'30"、12'50" 时又有所回落。图右侧彩条表示 F340 荧光的强度; (d) 中方框显示给药时间

视野内不同 ROI 的 340, 380 nm 荧光图像、340/380 比例图像以及不同 ROI 平均荧光强度比值 (F340/F380) 随时间的变化曲线. 也可以通过图像伪彩颜色的变化直接观察到钙信号的变化(图3(e)).

图 3 可以看到在同一腺泡内, 不同腺泡细胞的钙振荡并不同步, 其振荡频率和振幅均有所不同. 同一细胞的不同区域(图 3(c)中 ROI 6 与 ROI 7)其振幅也有所不同, 基底部振幅较大. 图 3(d)显示 ROI 1 随时间的变化, 图 2(e)显示在 11'30"–12'50"期间 ROI 1 实际的 F340 荧光强度变化.

2.3 系统 III

利用系统 III 进行实验, 每次只能通过一个 pin-

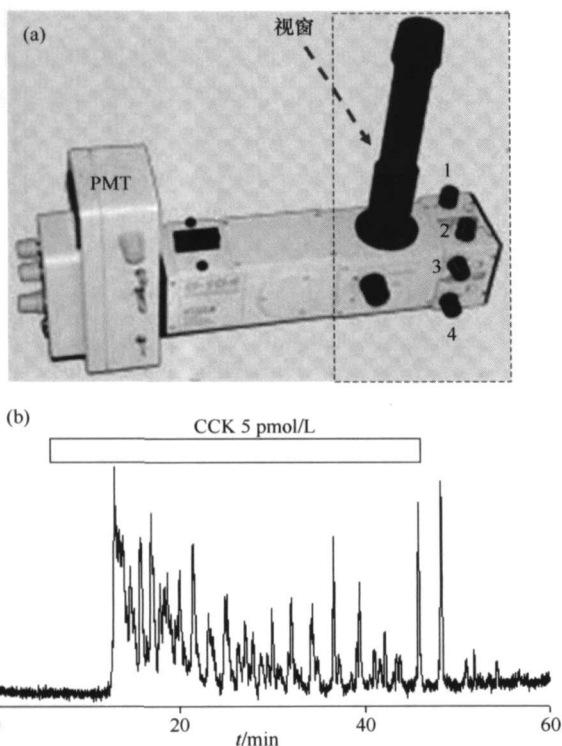


图 4 系统 III 测量单个胰腺腺泡细胞的钙信号

测量时首先利用光路中 PMT 前的 pin-hole 装置((a), 虚线所框部分), 通过调整装置中的 4 个转钮的位置(图中所示 1–4)将所感兴趣的细胞(ROI)框住, 通过垂直观察桶(视窗)观察所框位置是否合适. 检测方形 ROI 中平均荧光强度和 F340/F380 比例. (b) 显示胰腺腺泡细胞受到 CCK 5 pmol/L 刺激后胞浆钙离子浓度的振荡样增加. (b) 中方框显示给药时间. (a) 中图片修改自 Photon Technology International 公司网站: <http://www.pti-nj.com/RatioMaster/RatioMaster.pdf>

hole 装置(图 4(a)). 手动框取一个方形的 ROI, 检测 ROI 中的平均钙离子浓度. 通过调节 4 个不同的转钮, pin-hole 装置可以框取视野中特定 ROI. 与系统 II 所得结果类似, CCK 5 pmol/L 刺激胰腺腺泡细胞, 出现持续的胞浆钙振荡; 洗去 CCK 后振荡消失(图 4(b)). 但是系统 III 因为每次只能框取一个 ROI, 所以每次实验只能测量一个细胞. 实验时不能同时比较同一视野不同细胞的钙信号变化的差异. 系统 III 的优势在于, 因为检测装置是 PMT, 动态反应范围广, 检测灵敏度高, 可以获取快速反应数据.

2.4 系统 IV

用系统 IV 对胰腺腺泡细胞和肝细胞进行了钙信号的检测. 系统 IV 与系统 I, II 一样, 可以进行多个 ROI(多个细胞)的同时检测. CCK 10 pmol/L 刺激胰腺腺泡细胞后引发规则钙振荡, 洗去 CCK 后振荡消失(图 5(a), 5(c), $N=6$). 所得结果与系统 II 和 III 相似. PE 刺激肝脏细胞, PE 1 μ mol/L 在肝脏细胞引发规则胞浆钙振荡; 在 PE 刺激持续存在时, 这种钙振荡也持续存在, 洗掉 PE 后振荡消失(图 5(b), 5(d), $N=6$).

3 讨论

胰腺腺泡细胞的主要分泌刺激物受体包括 CCK-1 受体. 低浓度激活后引发持续胞浆钙振荡. 钙离子浓度的升高进一步调节腺泡细胞消化酶合成与分泌等^[14, 15, 20]. 本文中, 4 种配置的钙离子测量系统, 都可以检测到胰腺腺泡细胞的振荡样胞浆钙离子浓度升高. 系统 IV 也用于检测肝脏实质细胞, 发现细胞受到刺激后, 钙离子浓度的振荡样升高, 与文献报道相似^[19]. 其中系统 I 在检测胰腺腺泡细胞变化的过程中, 胞浆钙振荡逐渐衰弱并最终消失; 而其他系统(II–IV)都在刺激细胞的过程中全程检测到规则钙振荡信号. 系统 III 因为是利用 pin-hole 装置和 PMT 检测, 每次只检测一个细胞; 系统 I, II 和系统 IV 都可以检测多个细胞或 ROI 钙离子浓度的平行变化.

在 4 种系统中, 系统 I 光源灯泡为金属卤化物灯, 而系统 II, III 和 IV 均为氙灯. 两种灯泡的发射谱显示(图 1(c)–(d)), 氙灯连续光谱在本文

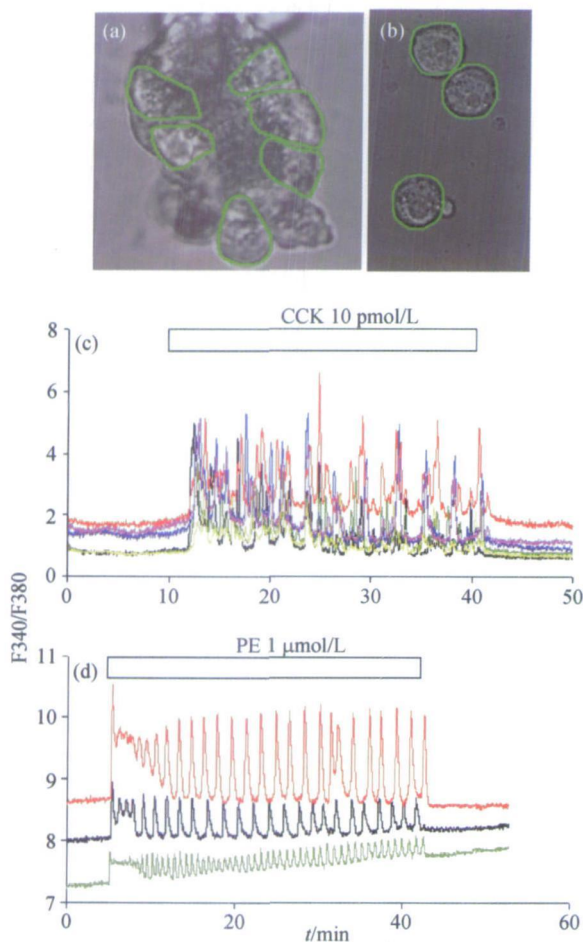


图5 系统IV测量胰腺腺泡细胞和肝细胞的钙信号

(a), (b) 实验中所记录的胰腺腺泡细胞和肝脏实质细胞。(a) 中绿色 ROI 为选定的单个胰腺腺泡细胞轮廓;(b) 显示所记录的 3 个肝脏实质细胞;(c) ROI 1—6 在受到 CCK 10 pmol/L 刺激后,胞浆钙离子浓度的振荡样增加;(d) 图(b)中的 3 个肝细胞在受到 PE 1 μmol/L 刺激后胞浆钙离子浓度的振荡样增加;(c), (d) 中方框显示给药时间

的兴趣区(UVA)有较好的发射(图 1(d));金属卤化物灯的不连续光谱在 360, 400, 430, 540, 570 nm 处有特征发射峰(图 1(c)),但在本文的兴趣区,只在 380 nm 显示有发射,在 340 nm 发射数据不详(图 1(c))。Lumen 200 Pro 的灯泡功率是 200 W,可能也能保证有足够的 340 nm 光到达样品。但是过多的光可能在一定程度上对细胞有损伤作用,所以在 CCK 刺激胰腺腺泡细胞期间,钙振荡峰开始降低,最后导致细胞对 CCK 和 ACh 的刺激完全没有反应(图 2(b))。系统 I 光源内置光强衰

竭器,可以 1% 光强为单位在 0—100% 范围内调节光的强度。细胞失活的问题可能在适当调节光强后得到解决。系统 I 光源的输出是通过滤光片转轮来实现激发光波长的选择的。其输出激发光的带宽取决于所配备的滤光片的带宽, Fura-2 滤光片的带宽一般在 25 nm 左右(参见: <http://www.chroma.com/>)。这个带宽在决定了滤光片后是不可调的。带宽过宽,可能导致了细胞的损伤。

系统 II, III 和 IV 的光源是单色仪,其输出的发射光是单色光。系统 II 光源 Hamamatsu C7773 是一款高速变换激发光的光源,发射光光谱范围为 330—650 nm,灯泡 150 W,在 500 nm 输出功率 3.5 mW。C7773 狭缝宽度可调,通过调节狭缝宽度来调节光强。系统 III 和 IV 的光源分别是 PTI 公司的 DeltaRam V 和 DeltaRam X 单色仪,单色仪的可调狭缝范围 0—24 nm,也可用来调节光强。本实验中所用的 DeltaRam V 和 X 狭缝均设为 1 nm。DeltaRam X 是计算机控制的高速连续可调波长单色仪,输出光波长 250—680 nm。PTI 光源 DeltaRam X 在 300 nm 输出功率为 18 mW,在 473 nm 输出功率 19 mW (Allan Stevenson and Xiao Dong Zhang, PTI, personal communication)。DeltaRam V 和 X 都使用 75 W 的氙灯灯泡。灯泡发射范围宽,实验所涉及的波段 UVA 是连续发射(图 1(d))。因为系统 II—IV 所用的都是狭缝连续可调的单色仪,所以可以控制光的带宽范围,同时光强通过带宽的变化,连续可调。当带宽为 1 nm 时,光强可以满足实验的需要,对细胞没有损伤作用(图 3—5)。

因为使用的钙离子荧光探针是 Fura-2,所以 340/380 nm 激发光的高速转换是必需的。而波长转换的速度,在一定程度上决定了获得最终 F340/F380 比值的速度。Prior Scientific Inc. 声称 Lumen 200Pro 滤光片转轮上两个相邻的滤光片最高转换速度是 55 ms,则 340/380 nm 转换一圈需时 110 ms,所以获得 F340/F380 比值的最高速度是 9/s; Hamamatsu C7773 单色仪在 340/380 nm 之间的转换最快可在 3 ms 内完成,与 HiSCA CCD 配套使用时,可以保证 80/s 的成像速度; DeltaRam X 单色仪在 340/380 nm 之间的转换最快可在 2 ms 内完成,340/380 nm 转换一圈需时 4 ms,获得 F340/F380 比值的速度可能将主要取决于检测装置。利用

PMT 检测, 速度显著高于 CCD 检测. 与 QuantEM 52SC 配套使用, 成像速率为 30/s.

测量胞浆钙离子浓度变化时, 首选倒置荧光显微镜. 系统 I 和 IV 所用显微镜均为 Nikon TE2000U, 系统 II 的显微镜为 Olympus IX71, 系统 III 的显微镜为 Olympus IX70. 因为本文主要涉及 Fura-2, 激发光在紫外区域, 所以选择或配置显微镜时必需考虑到物镜的紫外透过率, 尤其是在 340 nm 处的透过率. 尼康的 S Fluor 40x 和 S Fluor 40xH 超级荧光物镜在 340 nm 处的透过率分别为 43% 和 52%, 在 380 nm 处的透过率分别为 69% 和 74% (Tadashi Iida, Nikon, personal communication). Olympus 的 40 倍荧光物镜 (UAPO40X/340) 在 340 nm 处透过率可达到 50%, 380 nm 处透过率可达到 75%; 40X 荧光物镜 (UAP040X013/340) 340 nm 处透过率可达到 55%, 380 nm 处透过率可达到 80% (Jing Jing Qi, Olympus, personal communication). Nikon 和 Olympus 这些 UVA 高透过率物镜都可以非常好地满足 Fura-2 荧光检测的需要.

荧光信号可以用 CCD 或 PMT 检测. 系统 I 的 CCD 为 Hamamatsu ORCA-AG, 有效像素 1344×1204. CCD 致冷温度 -30℃, 在红绿光谱区最大量子效率 70%. 系统 II 的 CCD 为 Hamamatsu ORCA-HR(C4742-95-12HR), 有效像素 4000×2624, 最短曝光时间可为 330 μs, 量子产率在 460 nm 左右可达 50%, 可致冷至 5-7℃. 系统 III 使用 Hamamatsu 1527P (PTI PMT814) 进行检测, 其量子产率在 300-500 nm 之间为 0.11-0.2 (0.2 at 300 nm, 0.19 at 400 nm, 0.11 at 500 nm, 参见 http://jp.hamamatsu.com/resources/products/etd/pdf/R1527_TPMS1007E02.pdf). 系统 IV 所用的 CCD 为 Roper Scientific 的 QuantEM 512SC, 有效像素为 512×512, 致冷温度 -30℃, 高量子效率 90%. 需要高速度、超灵敏, 但是不需要空间分辨时, 可选用 PMT. 选择 CCD 时, 空间分辨率和量子产率是主要的考虑参数. 检测较弱信号时, 需要选择高量子效率的 CCD.

系统 I 所用软件是 Simple PCI 6.2, 操作简单, 自动存储所有的实验图像, 分析数据和图表, 可在后期的实验数据处理中方便快速的查找. 系统 II 的软

件是 AquaCosmos 2.5, 这款软件操作简单快捷, 可以通过系统设置的向导操作. 系统 III 软件为是 Felix 1.42b, 可实时显示出实验中钙信号的变化. 系统 III 现在已有更新的软件 Felix 32; PMT 检测的优点包括数据所占空间小, 实验室不用考虑随时扩展硬盘空间. 系统 IV 的软件为 EasyRatioPro, ERP 除了可以通过计算机鼠标操作外, 还提供了一个外置的高度人性化的 WarpDrive 操作界面, 可以更直接的进行操作, 避免了繁琐的窗口切换, 应用十分方便.

4 个检测系统中系统 III 是唯一以 PMT 为检测装置的系统. PMT 的高灵敏度可以检测极弱的荧光信号, 且动态反应快范围广. 缺点是实验时每次只能检测一个 ROI, 并且一旦确定所要检测的细胞后便不能再更改, 即在实验数据处理时只有事先选择好的细胞的数据. 与 PMT 对单个 ROI 平均荧光强度的检测相比, 钙离子浓度荧光成像研究可以同时检测多个 ROI (不同细胞以及同一细胞不同部位) 的钙离子浓度变化. 如系统 I (图 2) 同时检测了胰腺腺泡细胞全细胞、细胞基底部、顶部的钙振荡发生情况. 发现 3 个 ROI 的钙振荡频率完全一致, 但是基底部振幅最高, 顶部振幅低, 全细胞振幅也低于基底部. 胰腺腺泡细胞的分泌颗粒集中在顶部, 内质网主要分布在基底部. 这种特殊的亚细胞结构分布决定了钙离子浓度变化的极性分布. 对于系统 I 中出现的 CCK 引发的钙振荡衰减和消失, 可能是其激发光过强引起的. 所用的金属卤化物灯在 340 nm 处发射较弱, 而增加此波长的光的强度可能导致相应的 340 nm 左右光的大幅增加, 从而导致对细胞的损伤. 通过光源的衰减器将光强更进一步减低, 可能避免这种损伤.

系统 II 也可同时测量多个 ROI 的钙信号变化, 比较同一腺泡、不同腺泡的细胞以及同一细胞的不同部位的钙信号. 在测量的过程中, 表示 F340/F380 比值变化的伪彩图颜色变化非常明显, 可以直观地从图上看出同一团块细胞不同区域钙信号的强弱和变化情况. 系统 II 最多可同时检测 10 个 ROI, ROI 中不能再画 ROI, 所以不能比较细胞不同部分与整个细胞钙信号的差别; 但是这些差别可以通过实验完成后的数据后处理实现, 对实验结果影响并不大.

系统 IV 对 ROI 数量没有限制, ROI 中可以再画小的 ROI, 而且在实验进程中可以随时增加新的

ROI, 可以方便地实时增加对感兴趣区域的检测. 图5显示CCK刺激胰腺腺泡细胞, PE刺激肝细胞, 都引发胞浆规则钙振荡. 胰腺腺泡细胞的基础F340/F380比较一致, 说明细胞间基础钙离子水平差别不大; 而肝脏细胞不同细胞间其基础钙离子水平有一定差别. 两种细胞受到低浓度刺激后, 均可见均匀钙振荡. 系统IV所配备的专用计算机, 可以将实验成像数据直接写在外置硬盘上, 保证了测量速度. 但在测量过程中, 只能分别显示F340, F380, 或荧光比例(F340/F380)图像的变化, 不能同时显示3个图像的变化, 这种变化只能通过实时计算的F340/F380比值数据变化曲线来体现; 3个图像的同时显示可能在今后的软件升级中会得到改善. 建议将来把3个图像作为3个独立的窗口显示. 同时因为F340, F380荧光强度和F340/F380荧光比例显示在同一个窗口, 往往同时显示时看不到F340/F380. 建议将来把F340/F380作为独立窗口显示.

总结以上结果, 在配置钙离子测量/成像系统时, 建议做如下考虑: 光源一般可选择氙灯类光源, 如果对检测频率要求不高, 可以考虑经济型的滤光片轮光源, 但是如果对检测/成像速度有较高的要求, 应该考虑专用的单色仪光源; 最好是输出单色仪带宽可调. 对于Fura-2的检测来说, 需要重点考虑荧光显微镜物镜在340 nm的紫外透过率. CCD的分辨率和量子产率之间可根据自己的需要进行取舍, 对于弱的以及变化频率快的荧光信号建议CCD的量子产率要高一些. 软件的配置应该人性化, 易操作, 能实时显示所检测的信号, 能存储为多种格式, 如图片、数据以及图像伪彩变化情况. 进行成像实验时应该配置足够大的存储空间.

本文主要介绍了使用Fura-2时检测仪器的配置. 使用单波长探针如Fluo-3时, 实际实验时只设置系统的一个激发波长就可以了. 进行钙离子荧光比例成像时, 也可以使用单波长激发、双波长发射探针如Indo-1. 使用Indo-1时, 只需要一个激发波长(350 nm), 因而不需要两个激发光波长之间的高速转换, 对激发光光源的要求相对较低, 但是最好是激发光的带宽可调. 但是使用Indo-1等双波长发射探针时, 需同时检测两个发射波长的荧光强度. 如在上述系统III, 仪器可以配置两个PMT, 将发射光在PMT前通过分光镜和两个滤光片(分别通过

390 nm和475 nm的光)分光后, 两个PMT分别检测390 nm和475 nm的发射光, 得到荧光比例F390/F475. 钙离子比例荧光成像时, 在CCD前加入一个dual view图像分解装置(website: <http://www.magbiosystems.com/products/multichannel.php>), 将图像分解为F390 nm图像和475 nm图像. 可以配置两个CCD(需使用dual view图像分解装置DC2), 也可以只配置一个CCD(需使用dual view图像分解装置DV2), 都可以得到比例图像F390/F475.

致谢 本文的实验, 部分(系统I、II)是2007年5月13—16日在中国科学院生物物理研究所举行的“现代显微成像技术在生物医学研究中的应用”研讨班期间所做, 部分(系统II, III, IV)在作者实验室补充完成. 研讨班由中国科学院生物物理研究所和日本滨松医科大学主办, 日本滨松光子学株式会社(Hamamatsu KK)、尼康显微镜公司(北京)和奥林帕斯显微镜公司(北京)提供仪器设备.

参 考 文 献

- 1 Winslow MM, Crabtree GR. Decoding calcium signaling. *Science* 2005, 307: 56—57
- 2 Knot HJ, Laher I, Sobie EA, et al. Twenty years of calcium imaging: Cell physiology to dye for. *Mol Interv*, 2005, 5: 112—127
- 3 Su L, Ma CY, Zhou YD, et al. Cytosolic calcium oscillations in the submandibular gland cells. *Acta Pharmacol Sin*, 2006, 27: 843—847
- 4 Xu X, Hotta CT, Dodd AN, et al. Distinct light and clock modulation of cytosolic free Ca^{2+} oscillations and rhythmic CHLOROPHYLL A/B BINDING PROTEIN2 promoter activity in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2007, 19: 3474—3490
- 5 Pang X, Halaly T, Crane O, et al. Involvement of calcium signalling in dormancy release of grape buds. *J Exp Bot*, 2007, 58: 3249—3262
- 6 Campbell AK, Naseem R, Holland IB, et al. Methylglyoxal and other carbohydrate metabolites induce lanthanum-sensitive Ca^{2+} transients and inhibit growth in *E. coli*. *Arch Biochem Biophys* 2007, 468: 107—113
- 7 Trimble WS, Grinstein S. TB or not TB: Calcium regulation in mycobacterial survival. *Cell* 2007, 130: 12—14
- 8 Nikolskaia OV, de A Lima AP, Kim YV, et al. Blood-brain barrier traversal by African trypanosomes requires calcium signaling induced by parasite cysteine protease. *J Clin Invest*, 2006, 116: 2739—2747

- 9 Cheshenko N, Liu W, Satlin LM, et al. Multiple receptor interactions trigger release of membrane and intracellular calcium stores critical for herpes simplex virus entry. *Mol Biol Cell*, 2007, 18: 3119—3130
- 10 Grant JR, Moise AR, Jefferies WA. Identification of a novel immunosubversion mechanism mediated by a virologue of the B-lymphocyte receptor TACI. *Clin Vaccine Immunol*, 2007, 14: 907—917
- 11 Motta PM, Macchiarelli G, Nottola SA, et al. Histology of the exocrine pancreas. *Microsc Res Techniq*, 1997, 37: 384—398
- 12 Cui ZJ, Kanno T. Photodynamic triggering of calcium oscillations in the isolated rat pancreatic acini. *J Physiol(Lond)*, 1997, 504: 47—55
- 13 Petersen OH, Burdakov D, Tepikin AV. Polarity in intracellular calcium signaling. *Bioessays*, 1999, 21: 851—860
- 14 An YP, Xiao R, Cui H, et al. Selective activation by photodynamic action of cholecystokinin receptor in the freshly isolated rat pancreatic acini. *Br J Pharmacol*, 2003, 139: 872—880
- 15 Xiao R, Cui ZJ. Mutual dependence of VIP/PACAP and CCK receptor signaling for a physiological role in duck exocrine pancreatic secretion. *Am J Physiol*, 2004, 286: R189—198
- 16 Rooney TA, Joseph SK, Queen C, et al. Cyclic GMP induces oscillatory calcium signals in rat hepatocytes. *J Biol Chem*, 1996, 271: 19817—19825
- 17 Woods NM, Cuthbertson KS, Cobbold PH. Repetitive transient rises in cytoplasmic free calcium in hormone-stimulated hepatocytes. *Nature*, 1986, 319: 600—603
- 18 Cui ZJ, Habara Y, Satoh Y. Photodynamic modulation of adrenergic receptors in the isolated rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 277: 705—710
- 19 Cui ZJ, Guo LL. Photodynamic modulation by Victoria Blue BO of phenylephrine-induced calcium oscillations in the freshly isolated rat hepatocytes. *Photochem Photobiol Sci*, 2002, 1: 1001—1005
- 20 Williams JA, Sans MD, Tashiro M, et al. Cholecystokinin activates a variety of intracellular signal transduction mechanisms in rodent pancreatic acinar cells. *Pharmacol Toxicol*, 2002, 91: 297—303