DOI:10.16016/j.1000-5404.1995.04.034



# Fura-2荧光探针测定突触体胞浆游离$Ca^{2+}$浓度

技术与方法

# Estimation of cytosolic free calcium within synaptosomes with fluorescent indicator Fura-2

熊 鹰 隋建峰 张长城 (第三军医大学基础部生理学教研室)重庆,630038

细胞内钙的含量极微,静息时约为$10^{-8}$～$10^{-7}$ mol/L,而细胞外钙含量高达$10^{-3}$～$10^{-2}$ mol/L,胞内外形成极高的$Ca^{2+}$跨膜电化学梯度,因此胞内$Ca^{2+}$浓度的微小变化将影响活细胞内重要的生理、生化过程。细胞内游离$[Ca^{2+}]_i$的测定对了解正常细胞功能的启动,加强或抑制以及与$Ca^{2+}$有关的疾病的发生机理均有重要意义。近10年来,出现数种胞内游离$[Ca^{2+}]_i$测定方法,如钙激活的光蛋白、离子选择性微电极、金属铬指示剂等,普遍反应速度慢、灵敏度低。80年代以来相继合成了$Ca^{2+}$荧光探针Quin-2(1982),Fura-2及Indo-1、Fulo-3等(1985)[1]。近年来Fura-2应用最为广泛,因具有高灵敏度、波长漂移、反应速度快等特点。

突触体(synaptosomes)是指脑组织匀浆经超速离心,神经末梢的细胞膜从轴突上断裂、封闭而形成的神经末梢单位,内含胞浆和各种细胞器(包括线粒体),膜上有$Ca^{2+}$通道[2]。自1960年Gray和Whittaker将其引入神经化学的研究以来,突触体已成为研究神经递质和受体的基本工具。Ashley等(1984)率先应用Quin-2测定突触体胞浆游离$Ca^{2+}$浓度(简称SCF $[Ca^{2+}]_i$),Komulainen等(1987)报道Fura-2测定SCF $[Ca^{2+}]_i$具有更大优越性[3]。但由于这一方法刚起步,在技术上仍存在不少问题,在文中对突触体分离、Fura-2负载等方面进行了探索。

## 1 Fura-2荧光探针测$[Ca^{2+}]_i$的原理

1985年美国加州大学伯克利分校G.Grynkiewicz[4]合成了$Ca^{2+}$荧光探针Fura-2。Fura-2与钙螯合剂EGTA一样,具有四羧酸的$Ca^{2+}$螯合中心,能特异性与$Ca^{2+}$结合,不同的是Fura-2可发出荧光,并且与$Ca^{2+}$结合后其荧光光谱发生变化。Fura-2为极性大的酸性化合物,难以进入细胞,在其负性基团部位结合上亲脂的乙酰羟甲基酯成为Fura-2/AM($C_{44}H_{47}O_{24}N_3$=1001.86),它不能与$Ca^{2+}$结合。Fura-2/AM与细胞温孵时很容易透过细胞膜,胞浆内的非特异性酯酶将其水解为Fura-2,后者与胞浆内游离$Ca^{2+}$结合形成Fura-2-$Ca^{2+}$复合物。Fura-2及Fura-2-$Ca^{2+}$复合物的最大激发光波长分别为380和340 nm,其发射光的强度与$Ca^{2+}$浓度呈正比,据此可测定$[Ca^{2+}]_i$及其变化。

## 2 材料与方法

### 2.1 突触体分离

Wistar大鼠,体重200～250 g,断头后迅速取出额叶皮层和海马,称重,按1∶10(W/V)加入冰浴的0.32 mol/L等渗蔗糖液(pH7.4)中,以800 r/min匀浆2～3次,每次15～25 s。匀浆液经1 100×$g$离心10 min,线粒体、小片的髓鞘及自发形成的突触体留在上清($S_1$)中。将$S_1$在12 000×$g$离心20 min,突触体、线粒体及髓鞘形成沉淀($P_2$)。以0.8 mol/L和1.2 mol/L蔗糖液造成密度梯度,将$P_2$用0.32 mol/L蔗糖液混悬后,小心铺在0.8 mol/L蔗糖液表面,100 000×$g$离心1 h。收集0.8与1.2 mol/L界面液体悬浮在0.32 mol/L蔗糖液中,15 000×$g$离心30 min取沉淀,加人工脑脊液(ACSF),5 500×$g$离心20 min,沉淀悬浮在ACSF中,用Lowry法测定蛋白,最后调蛋白浓度至1.5～2.5 mg/ml。上述步骤均在0～4℃下操作。

### 2.2 Fura-2/AM负载

取1 ml上述溶液(1.5～2.5 mg/ml蛋白),加入Fura-2(终浓度为5 μm/L),对照管加入等体积的DMSO;通以95%$O_2$+5%$CO_2$的混合气体,并加入牛血清白蛋白(终浓度0.1%)帮助Fura-2负载,37℃恒温振荡20 min后各加入9 ml ACSF,继续温孵15 min,从负载Fura-2管中取6 ml,分为6管(1 ml/管),对照管取2 ml,分为2管。将此8管温孵液离心(12300×$g$离心5 min),沉淀悬浮在1 ml冰冷的ACSF中,测定前各管再离心一次(12000×g,30 s),沉淀悬浮在2.5 ml ACSF中。

### 2.3 荧光测定及$[Ca^{2+}]_i$的计算

采用Hitachi-4010荧光分光光度计,首先需扫描测定标准液、负载液以及细胞内Fura-2的激发波长和发射波长,正常情况下激发波长为340 nm和380 nm,发射波长为500 nm,然后将样本倒入石英比色杯进行测定。KCl、Glu等激动剂以及其它药物均通过盖外一小孔加入。实验时,分别测量静息期和加入激动剂、拮抗剂或药物后的荧光强度以及最大荧光比值(Rmax)、最小荧光比(Rmin)。Rmax是指加入Triton X-100(0.1%～1%)破坏细胞膜,使Fura-2被胞外$Ca^{2+}$全部饱和时的荧光比值;Rmin是Fura-2所结合$Ca^{2+}$被EGTA全部螯合时的荧光比值。根据下面公式可算出$[Ca^{2+}]_i$[4]

$$[Ca^{2+}]_i = Kd\left(\frac{R-Rmin}{Rmax-R}\right)\left(\frac{F_D}{F_S}\right)(nmol/L)$$

R是观察到的荧光比值($F_{340}/F_{380}$),Kd是Fura-2与$Ca^{2+}$反应的解离常数,Kd=224 nm;$F_D$和$F_S$分别为零$Ca^{2+}$和$Ca^{2+}$饱和时380 nm激发光产生的荧光强度。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

## 3 结果

在ACSF中含$CaCl_2$为零时，测得突触体胞浆游离$[Ca^{2+}]_i$为183.2±29.1，随着ACSF $Ca^{2+}$浓度增加，突触体胞浆游离$[Ca^{2+}]_i$也升高(表1)。当在ACSF加入激动剂KCl时，随KCl浓度递增，突触体胞浆游离$[Ca^{2+}]_i$逐渐增加，在30 mmol/L时达到最高值(表2)。

**表1 Fura-2测定静息状态下SCF$[Ca^{2+}]_i$($\bar{x}\pm s$)**

| ACSF中$[Ca^{2+}]_i$(mmol/L) | 突触体胞浆游离$[Ca^{2+}]_i$(nmol/L) |
|---|---|
| 0 | 183.2±29.1 |
| 0.01 | 271.1±43.2※ |
| 1 | 339.7±52.2※ |

※：$P<0.01$，与ACSF中$Ca^{2+}$为零组相比。

**表2 不同浓度KCl作用下SCF$[Ca^{2+}]_i$($\bar{x}\pm s$)**

| KCl (mmol/L) | 突触体胞浆游离$[Ca^{2+}]_i$(nmol/L) |
|---|---|
| 5 | 339.7±52.2 |
| 10 | 411.1±62.2※ |
| 20 | 482.1±69.2※ |
| 30 | 522.0±76.3※ |
| 50 | 498.2±71.1※ |

※：$P<0.01$，与ACSF中KCl浓度5 mmol/L相比。

## 4 讨论

Komulainen等[3]采用Fura-2荧光探针测得SCF$[Ca^{2+}]_i$为300～400 nmol/L，Verhage(1988)[5]应用不同的提取突触体方法，测得的SCF$[Ca^{2+}]_i$范围从204～626 nmol/L，他指出SCF$[Ca^{2+}]_i$还与Fura-2负载量、负载时间、温度等有密切关系。本实验采用蔗糖密度梯度法制备突触体，Fura-2/AM负载终浓度为5 μmol/L，突触体悬液蛋白含量1.5～2.5 mg/ml，负载温度为37℃，温孵时间35 min，并以95%$O_2$+5%$CO_2$的混合气体和牛血清白蛋白(终浓度0.1%)帮助负载，测得的静息SCF$[Ca^{2+}]_i$332.2±62.1(ACSF含$CaCl_2$ 1 mmol/L)，在激动剂KCl作用下，SCF$[Ca^{2+}]_i$迅速升高，与文献[3,5]报道的结果相似，表明本实验方法是可靠的。实验中值得注意的是：

### 4.1 突触体分离

突触体功能的好坏是影响测定结果的关键因素，若突触体破裂，一方面其脂酶可将Fura-2/AM水解成Fura-2，使其负载减少，另一方面可将胞内Fura-2排出胞外；突触体功能受损，则对荧光剂的负载和对激动剂反应不明显；若突触体活性丧失则影响更大，因为死亡细胞内$[Ca^{2+}]_i$比正常细胞高出十几倍。因此，突触体分离的每一步骤均必须在0～4℃进行。

### 4.2 Fura-2的荧光受下列因素影响

①pH值：荧光素发光的最有利条件是它们的离子化状态，pH值可影响荧光指示剂的离子化程度，因此溶液的pH值应严格控制。生理情况下pH值的变化(7.0～7.4)对Fura-2的荧光谱影响不大。②温度：温度升高则分子运动增加，分子间的相互碰撞使得荧光减弱，测定细胞悬液时可以在室温下进行。③Fura-2光漂白：激发光能量过强会造成荧光探针化学键断裂，从而损失荧光。减少光漂白效应可降低激发光强度和缩短光照时间。④淬灭剂：包括卤酸盐、氧化剂、重金属离子等。实验时要求采用纯水，以去除水中重金属离子对Fura-2荧光的影响和防止水中$Ca^{2+}$饱和Fura-2。另外，由于玻璃管壁可释放出$Ca^{2+}$，所以实验中应使用塑料试管。⑤贮存：Fura-2和Fura-2/AM贮存液分装置－20℃保存，每次测定取一管，有效期大于2个月，干粉于－20℃保存1年有效。

### 4.3 缺陷及改善办法

①染料的泄漏：染料随时间延长而漏到细胞外是较常见的问题，可以通过测定前冲洗细胞、添加牛血清白蛋白或缩短测量时间(<10 min)来解决。②房室化现象：部分Fura-2/AM进入亚细胞器官如胞浆网、分泌囊泡、线粒体等变成Fura-2，后者与Fura-2荧光相似，但无$Ca^{2+}$结合能力，因而影响Fura-2的测定结果。降低Fura-2/AM的量、缩短负载时间、在室温负载Fura-2可能减少这一现象。

**关键词** 钙/分析；突触体；荧光探针

**中图法分类号** Q582；R322.8

## 参考文献

1 Tsien RY. Fluorescence measurement and photochemical manipulation of cytosolic calcium. TINS,1988;11(10):419

2 Bradford HF. The synaptosome, an in vitro model for the synapse, in Chemical Neurobiology. Freeman Press, New York,1986:311～323

3 Komulainen H, Bondy SC. The estimation of free calcium within synaptosomes and mitochondria with Fura-2; comparison to Quin-2. Neurochem Int,1987;10(1):55

4 Grynkiewicz G. A new generation of $Ca^{2+}$ indicators with greatly improved fluorescence properties. J Biol Chem, 1985;260:3440

5 Verhage M, Besselsen E, Silva LD et al. Evaluation of the $Ca^{2+}$ contration in Purified nerve terminals:Relationship between $Ca^{2+}$ homeostasis and synaptosomal preparation. J Neurochem,1988;51:1667

(收稿：1994-09-02；修回：1995-05-22)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net