

植物钙信号指示剂的研究进展

陆雯艳, 刘金枝, 沈钰琪, 亓果宁, 柳参奎, 任慧敏

(浙江农林大学 林业与生物技术学院/省部共建亚热带森林培育国家重点实验室, 浙江 杭州 311300)

摘要: 钙离子 (Ca^{2+}) 是植物信号传递中重要的第二信使, 对植物的生长发育和胁迫响应起着至关重要的作用。近年来, 随着生物化学和分子生物学技术的不断进步, 钙信号指示剂在植物研究中的应用取得了显著进展。本文综述了关于钙信号指示剂在植物应用中的发展情况, 包括钙指示剂的分类、钙信号检测原理及其在植物应用中的发展。钙信号指示剂的应用提供了可视化观察植物细胞内钙离子动态变化的有效手段, 将植物细胞内的钙离子浓度转化为荧光信号。随着指示剂的发展, 从最早的化学荧光指示剂逐步向基因编码钙指示剂过渡, 能更加精确、实时、生物友好地观察到植物钙信号, 对植物应对外界刺激时分子水平的应激手段有了更加深入的认识, 成为研究植物应激分子水平上的重要生理指标。同时, 本文还对钙信号指示剂在植物研究中存在的挑战和未来发展方向进行了讨论, 指出了植物钙信号研究的特殊性与植物细胞中孵育钙指示剂的挑战性, 以期为进一步推动该领域的研究提供参考和启示。表 1 参 73

关键词: 钙离子; 钙信号指示剂; 植物; 生长发育; 胁迫响应

中图分类号: Q945 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2024)00-0001-08

Research progress on plant calcium signaling indicators

LU Wenyan, LIU Jinzhi, SHEN Yuqi, QI Guoning, LIU Shenkui, REN Huimin

(College of Forestry and Biotechnology/State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China)

Abstract: Calcium ion (Ca^{2+}) is the important second messenger that plays a crucial role in plant growth and development and stress response. In recent years, with the continuous progress of biochemistry and molecular biology technology, the application of calcium signaling indicators in plant research has made remarkable progress. This paper reviewed the recent developments on calcium signal indicators in plant applications, including the classification of calcium indicators, the principles of calcium signal detection and their development in plant applications. The application of calcium signal indicators provide an effective means to visualize and observe the dynamic changes of calcium ion in plant cells, converting calcium concentrations in plant cells into fluorescent signals. With the development of indicators, gradual transition changing from the earliest chemical fluorescent indicators to genetically encoded calcium indicators, calcium signals can be observed more accurate, real-time and biologically friendly in plant cells, and have a more in-depth understanding of the means of stress at the molecular level when the plant responds to external stimuli, and became an important physiological indicator at the molecular level of the study of plant stress. Meanwhile, the challenges and future development directions of calcium signaling indicators in plant research were discussed,

收稿日期: 2024-05-22; 修回日期: 2024-10-25

基金项目: 省部共建亚热带森林培育国家重点实验室开放基金 (SKLSS-KF2022-08); 国家重点研发计划青年科学家项目 (2021YFD2200900)

作者简介: 陆雯艳 (ORCID: 0000-0001-8181-5751), 从事生物学研究。E-mail: 542516531@qq.com。通信作者: 任慧敏 (ORCID: 0000-0003-3822-3288), 副教授, 博士, 从事植物响应逆境胁迫的分子机制以及林木再生和遗传改良研究。E-mail: hmren@zafu.edu.cn

pointing out the specificity of plant calcium signaling research with the challenges of incubating calcium indicators in plant cells, with a view to providing references and insights to further promote research in this field. [Ch, 1 tab. 73 ref.]

Key words: Ca^{2+} ; calcium signaling indicators; plant; growth and development; stress response

钙 (Ca) 信使系统是植物细胞内研究最广泛的信号传导系统之一。钙离子 (Ca^{2+}) 被称为“植物细胞代谢的总调控元素”，不仅参与调节植物细胞的结构和代谢，而且作为第二信使，在各种生命过程中起着至关重要的作用^[1]。此外钙信号在植物响应逆境环境中同样发挥关键的作用。

当植物面临胁迫时，胞质游离 Ca^{2+} 浓度会瞬时升高，进而激发细胞内各种生化反应，这种由 Ca^{2+} 浓度变化产生的信号就是钙信号^[2]。钙信号的形式主要包括钙瞬变、钙振荡和钙波^[3-6]。植物细胞受到刺激后产生的胞质游离 Ca^{2+} 浓度升高并不是持续的，质膜或细胞器膜上的 Ca^{2+} 通道会迅速将 Ca^{2+} 转运到胞内或胞外的钙库中使钙信号消失。这种 Ca^{2+} 浓度瞬时上升又瞬时下降的模式就是钙瞬变^[7]，是植物细胞中最为常见的一种信号模式。钙振荡是胞质 Ca^{2+} 浓度反复升降的一种形式，常见于植物的保卫细胞、根毛细胞、花粉管等部位，与根毛生长、花粉管伸长、蒸腾作用等生命过程密切相关^[8-12]。胞质 Ca^{2+} 由点向周围沿一定方向扩散的形式是钙波。

钙信号的形成实际上是胞内游离的自由钙离子的汇集和迁移。植物细胞中的钙主要分为结合态和自由离子 2 种形式。大多数钙以结合态存在，与细胞壁、线粒体、叶绿体、液泡、内质网等亚细胞结构或钙结合蛋白结合，构成植物细胞的“钙库”。相对于高浓度的“钙库”，植物细胞中自由 Ca^{2+} 浓度却比较低。在静息状态下，胞质中游离 Ca^{2+} 浓度 ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$) 约为 $100\sim 200 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ，在受到外界刺激时，结合态的钙迅速被释放并转化为自由钙，以此来维持胞内 Ca^{2+} 的动态平衡，为 Ca^{2+} 发挥信使作用提供充分的保障^[2]。除了胞内的“钙库”，胞外 Ca^{2+} 通过位于细胞质膜上的 Ca^{2+} 通道进入细胞，这也是钙信号产生的主要来源。 Ca^{2+} 内流到胞内形成钙信号，随后又转变为结合态，降低胞质 Ca^{2+} 浓度，维持胞质的钙稳态^[13-15]。

近年来，随着钙信号检测技术的不断发展，研究先后鉴定获得植物中多个能够感知由不同环境变化引起的钙信号受体，包括温度感受器 COLD1 (CHILLING TOLERANCE DIVERGENCE 1)^[16]、渗透感受器 OSCA1 (hyperosmolality-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase channel)^[17]、GIPC 鞘脂盐受体 (glycosyl inositol phosphorylceramide)^[18]、醌类化合物受体 CARD1 (CANNOT RESPOND TO DMBQ 1)^[19] 以及过氧化氢 (H_2O_2) 的感受器 HPCA1 (HYDROGEN PEROXIDE-INDUCED Ca^{2+} INCREASES1)^[20]。

在鉴定各种 Ca^{2+} 通道蛋白及胁迫感受器的研究中，利用 Ca^{2+} 化学荧光指示剂和 Ca^{2+} 荧光指示蛋白对钙信号进行可视化检测发挥着关键作用。本文系统汇总了植物钙信号研究过程中 Ca^{2+} 化学荧光指示剂和 Ca^{2+} 荧光指示蛋白，为更好地了解并检测钙信号以及区分不同的钙信号提供经验。

1 生物钙信号检测技术发展历程

RINGER^[21] 最早发现了 Ca^{2+} 在信号传递中的重要性。随后，电生理技术的应用发现了 Ca^{2+} 具有区别于其他金属离子的作用。这一发现让人们们对 Ca^{2+} 在细胞内的作用产生了极大的兴趣^[22-23]。1970 年，CHEUNG^[24] 发现了钙调素 (calmodulin, CaM)。1976 年 NEHER 和 SAKMANN^[25] 首次在青蛙 *Rana spp.* 肌细胞上记录到乙酰胆碱 (acetylcholine, Ach) 激活的单通道离子电流，从而产生了膜片钳技术这一用途极其广泛的电生理学工具。之后，TSIEN^[26] 开发了第 1 个化学荧光 Ca^{2+} 探针 Quin-2，开启了直接通过荧光观测胞内 Ca^{2+} 浓度变化的时代。接着，第 2 代化学荧光指示剂 Fura-2 荧光探针和于 1989 年开发的第 3 代化学荧光指示剂 Fluo 与 Rhod 系列不断发展，使化学荧光指示剂的检测技术逐渐成熟^[27-28]。1962 年，发现水母荧光蛋白 (aequorin) 对胞内 Ca^{2+} 浓度具有指示作用^[29]，并基于此研发了 Yellow Cameleon 蛋白，不仅可以更加精确地检测更大浓度范围的胞质 Ca^{2+} 浓度变化，还可以检测经改造后定位到不同细胞器的 Ca^{2+} 浓度^[30-31]。2001 年，由绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 改造而来的 GCaMP (GFP-Calmodulin-M13 Peptide) 荧光蛋白的出现使胞内 Ca^{2+} 检测技术得到了进一步发展^[32]。

2 植物钙信号检测指示剂的原理及应用

2.1 化学荧光指示剂

第 1 代化学荧光指示剂包括 Quin-1、Quin-2、Quin-3 等 8 种，其中 Quin-2 对 Ca^{2+} 具有较高的亲和性，能很好地检测胞内静态 Ca^{2+} 。但是由于 Quin-2 的激发光波长较短，光稳定性较差，因此不适合测定浓度较高的细胞钙^[26]。

第 2 代化学荧光指示剂有 Fura-1、Fura-2、Fura-3、Indo-1 等 6 种，其中以 Fura-2 和 Indo-1 为代表在植物中应用较多。该指示剂在与 Ca^{2+} 结合后，发射光波长的最大峰值出现位移，因此采用双波长比率法进行测定。当 Fura-2 与 Ca^{2+} 达到最大结合浓度时，在 340 nm 处的激发荧光强度瞬时增加 3 倍，而在 380 nm 处的激发荧光强度则会下降 10 倍。因此，340 nm/380 nm 的荧光强度比值能更准确地反映植物细胞 Ca^{2+} 浓度变化。Indo-1 在 350 nm 激发后，发射峰由游离态时的 485 nm 移至饱和态时的 410 nm。410 nm/480 nm 的荧光强度比值与 Ca^{2+} 浓度成正比。与非比率指示剂 (Calcium Green) 相比，这种比率指示剂受细胞内指示剂浓度及细胞间分布变化影响更小，使定量分析更加简单^[33]。与 Quin-2 相比，第 2 代荧光指示剂的离子选择性和荧光强度都有所提升，有效地减少了测量条件的微小变化对游离 Ca^{2+} 测定误差的影响，包括试剂浓度、光波长、仪器灵敏度、光漂白效应、指示剂泄漏以及细胞厚度和细胞内荧光指示剂分布的不均匀性等因素，因此，该方法具有更高的准确性。然而，这些指示剂在某些类型细胞中无法完全水解，并且有时会出现区域化现象^[34-35]。相较于动物细胞，在酸性条件下使用 Indo-1 可以成功测量植物细胞胞质中 Ca^{2+} ，如大麦糊粉原生质体、经细胞分裂素处理后的苔藓 *Funaria hydrometrica* 原丝体细胞^[36]、虞美人 *Papaver rhoeas* 花粉管^[37]。目前，由美国 AAT Bioquest 最新开发的 Fura-8 比值型指示剂具有更高的信噪比，同时保持了对 Ca^{2+} 相似的亲和力，其吸收和发射波长在红色光谱方向上移动，可以通过监测 530 nm 处的发射强度计算 354 和 415 nm 处的激发强度比，进而求得信号/背景荧光的比值，同时可以通过相对更具有性价比的大功率发光二极管 (LED) 激发，并与常见的发射滤波器组兼容^[38]。

第 3 代荧光指示剂包括 Rhod-1、Rhod-2、Fluo-1、Fluo-2 和 Fluo-3 等 5 种单波长指示剂。其中 Fluo-3 表现最佳，在植物中的应用也最多，其激发波长位于可见光区，最大激发波长为 506 nm，最大发射波长为 526 nm，有效避免了第 1、2 代钙荧光指示剂由于紫外光激发而引起的细胞自发荧光的干扰和对细胞的损伤^[28]。在监测受精过程中的玉米 *Zea mays* 离体卵细胞的 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 时，相较于可能被水解的 Fura-2 及微注射时可能造成的损伤，Fluo-3 是最优选择，其灵敏性高，结合 Ca^{2+} 后，荧光强度提升了 35~40 倍^[39]。目前，Fluo-3 已经广泛应用于植物组织器官中的 Ca^{2+} 测定^[40]。激光扫描共聚焦显微镜与 Fluo-3 的结合使用，使活体植物细胞中 Ca^{2+} 动态的可视化成为可能^[41]。与 Indo-1 等第 2 代荧光指示剂不同的是，Fluo-3 不能以酸性形式渗透进入细胞，常常在细胞壁内被酯酶在胞外裂解。利用 Fluo-3 和 Fura Red 的混合物，借助激光扫描共聚焦显微镜可以直观地检测出不同生理状态下红叶藜 *Chenopodium rubrum* 根尖组织细胞中游离胞质 Ca^{2+} 水平的真实差异^[42]。此外，花粉管是研究信号分子和顶端生长的重要的单细胞模型。在探究花粉细胞负载 Fluo-3 的最适温度时，发现高温 (37 °C) 更有利于钙敏感探针进入花粉，并且高温孵育对花粉的细胞活性影响也更小^[43]。

尽管第 3 代荧光指示剂较之前已有极大发展，但是与之后的基因编码 Ca^{2+} 指示剂相比仍具有较大的缺陷。在研究棉花 *Gossypium hirsutum* 纤维的发育过程时，相较于基因编码 Ca^{2+} 指示剂 Yellow Cameleon 3.6 (YC3.6)，Fluo-3 的光沉积问题十分严重，导致由该指示剂提供的胞内 Ca^{2+} 分布的信息相对来说并不准确^[44]。根据最新报道，除了 Fluo-3 以外，Fluo-4 也是常用的第 3 代荧光指示剂。该指示剂的乙酰甲氧基 (AM) 酯形式有助于指示剂大量加载到活体细胞中，且不需要转染，是一种灵活、快速、无细胞毒性的指示剂。该指示剂在不同加载对象中的加载温度和时间都不同。在沙梨 *Pyrus pyrifolia* 花粉管中需要 25 °C 加载 15 min，在拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 根毛中需在 4 °C 下加载 30 min，而在苹果 *Malus pumila* 果肉原生质体中则要 37 °C 30 min^[45]。

2.2 基因编码 Ca^{2+} 指示剂

目前，各类荧光指示剂已经广泛应用于监测不同状态、不同组织和器官中 Ca^{2+} 的动态变化。引入基因编码 Ca^{2+} 指示器 (genetically encoded calcium indicator, GECI) 进行 Ca^{2+} 动态监测是一种革命性的发展，

这些 GECI 包括 aequorin、基于 GFP 的 Ca^{2+} 探针、基于生物发光共振能量转移 (bioluminescence resonance energy transfer, BRET) 的指示剂等^[46]。

2.2.1 水母荧光蛋白 第 1 个基因靶向的生物发光传感器是 Ca^{2+} 传感器 aequorin, 一种源自生物发光水螅水母 *Aequorea victoria* 的蛋白^[47]。aequorin 由腔肠素 (coelenterazine)、脱辅基水母荧光蛋白 (apoaequorin) 和氧气 (O_2) 反应生成。当 aequorin 和 Ca^{2+} 结合后, 原有的复合物结构被破坏, 腔肠素被氧化生成高能产物 (coelenteramide), 同时释放出二氧化碳 (CO_2) 和蓝色光 (465 nm)^[48]。根据 aequorin 蛋白的这一特性, 可以实时监测 Ca^{2+} 的浓度。1991 年, KNIGHT 等^[49] 首次在转基因植物中转入重组 aequorin, 并且通过该蛋白报告了由触摸、冷休克和真菌诱导物引起的钙变化。1995 年, JOHNSON 等^[50] 利用 aequorin 蛋白靶向胞质和叶绿体, 检测出了通过明暗信号相移的昼夜节律下的钙振荡。随后, 利用 aequorin 蛋白证实 Ca^{2+} 在氧迸发信号转导中的作用以及细胞骨架在调节胞外刺激引起的钙强度中的作用^[51-52]。2000 年, 将钙指示剂 aequorin 蛋白靶向特定的组织和细胞类型, 通过测量拟南芥体内急性寒冷、渗透和盐胁迫期间特定细胞类型的 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$, 揭示了拟南芥根部钙信号的复杂性^[53]。2001 年, 通过检测 aequorin 在转基因株系幼苗的不同组织和细胞之间的差异积累, 表明了细胞和组织的 Ca^{2+} 节律振荡具有明显的相位差异^[54]。2008 年, TRACY 等^[55] 利用 aequorin 发现氯化钠在拟南芥根部诱导的 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 的增加是异质性的。

利用 aequorin 蛋白测定植物细胞钙信号具有一定优势。首先, 该方法不会对细胞造成伤害; 其次, aequorin 蛋白不会外泌, 不会在细胞内区室化或凝集; 第三, 该蛋白不需要激发光源; 最后, 该蛋白在添加信号肽后能准确定位钙离子信号的亚细胞位置。因此, aequorin 蛋白能在不影响植物正常的生长发育的同时进行较长时间的检测, 该荧光蛋白的应用极大地推进了钙信号的研究进程^[49, 56]。然而, aequorin 的量子产率非常低, 需要数百甚至数千个蛋白同时反应才能达到可以检测的光子发射量水平, 因此早期也难以将 Ca^{2+} 浓度和发光水平校准, 无法高分辨率成像而停滞发展^[57]。而近些年相机灵敏度的不断发展重振了 aequorin 成像的应用, 从而为基因筛选提供了基础^[48]。

在最新的研究进展中, 针对植物内质网 (ER) 腔内游离 Ca^{2+} 浓度动态变化的精确测量中, Ca^{2+} 敏感生物发光蛋白 aequorin 仍然是在动态浓度值范围内精确监测 Ca^{2+} 处理的最合适的工具^[15]。

2.2.2 Yellow Cameleon (YC) 荧光蛋白 YC 是基于荧光共振能量转移 (FRET) 的指示蛋白。这种蛋白包含 2 个 GFP 变体, 即青色荧光蛋白 (cyan fluorescent protein, CFP) 和黄色荧光蛋白 (yellow fluorescent protein, YFP), 这 2 个变体通过 Ca^{2+} 结合蛋白钙调蛋白和钙调蛋白结合肽 M13 连接在一起。 Ca^{2+} 和 YC 的钙调蛋白结合导致指示剂的构象变化, 使 CFP 和 YFP 接近, 并使 CFP 和 YFP 之间的 FRET 增强。通过记录 FRET 随时间的比率变化从而定量测量 Ca^{2+} 的动态^[46]。

1999 年, 首次报道了 YC 在植物中的成功应用, 即使用 YC2.1 测量拟南芥保卫细胞中的 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ ^[58]。之后, 通过对 cameleon 蛋白的迭代改进, 用 circularly permuted (cp) YFP (cpCitrine 或 cpVenus) 来代替 YFP 蛋白, 降低对 pKa、Cl⁻ 以及光漂白的敏感性^[47, 59-60]。在 YC 蛋白的更新过程中, 尽管还有 YC3.1、YC4.6 的研究报道, 但是这些 YC 蛋白对 Ca^{2+} 的亲合力要低于 YC3.6, 因此之后常用的 YC 通常为 YC3.6^[61-62]。已经有利用 YC3.6 监测 Ca^{2+} 动态变化的研究报道, 如检测拟南芥活体根部不同区域在有金属离子刺激下 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 的动态变化、生长花粉管以及根系胞质和细胞核的 Ca^{2+} 动态^[63-66]。4mt-YC3.6 和 NLS-YC3.6 也可以研究同一细胞线粒体和细胞核 Ca^{2+} 动力学的相互作用^[67]。

不同生物中 YC3.6 的表达情况也各不相同, 不同模式生物的 Ca^{2+} 动力学也有显著差异。如拟南芥中的 UBQ10 启动子要比 35S 启动子更适合在水稻 *Oryza sativa* 中表达 YC3.6, 而且 UBQ10 更有助于 YC3.6 在复杂组织中的统一表达^[68]。

不同的基因编码探针针对不同细胞器内的 Ca^{2+} 变化水平的灵敏度也不同。Cameleon D3cpv 对内源性线粒体 CaM 的变化水平更加敏感, 因此要比 YC3.6 更适合用于监测植物细胞线粒体内 Ca^{2+} 动态^[69]。

2.2.3 GCaMP 荧光蛋白 GCaMP 是一种用于监测胞内 Ca^{2+} 浓度的荧光蛋白传感器, 通过基因工程将 CaM、M13 肽和环形排列的增强型绿色荧光蛋白 (circularly permuted enhanced GFP, cpEGFP) 结合而成^[70-71]。cpEGFP 的 N 端由增强型绿色荧光蛋白 EGFP (enhanced GFP) 第 149~238 位氨基酸组成, C 端

由 EGFP 第 1~144 位氨基酸构成，而六肽 GGTGGS 将 cpEGFP 的 N 端与 C 端相连。cpEGFP 的 N 端和 C 端分别与 M13 肽和 CaM 进一步连接，形成 GCaMP^[32]。在低钙状态下，GCaMP 的 cpEGFP 发出弱荧光信号；而在高钙状态下，胞内 Ca²⁺结合到 CaM，使其与 M13 肽结合，导致 cpEGFP 的荧光信号增强。通过监测 cpEGFP 的荧光信号变化，可以实时反映胞内 Ca²⁺浓度的动态变化。GCaMP 作为一种胞内 Ca²⁺监测工具，具有高灵敏度、实时成像、单蛋白传感器的优势，可通过基因转染在不同细胞和生物系统中广泛应用。然而，其响应速度相对较慢，过高的表达水平可能对细胞产生不良影响，而且在一些特定条件下可能受到背景噪声和钙亲和性的影响。目前，GCaMP 在植物中的应用主要以拟南芥为主，但通过制定针对性的转化方案，该荧光蛋白也可用于其他作物或光合生物，如浮游植物^[72]。对上述几种钙信号指示剂的原理与特点进行总结，如表 1。

表 1 钙信号指示剂比较

Table 1 Comparison of calcium signal indicators				
种类	名称	发明年份	激发波长/ 发射波长/nm	检测原理
化学荧光指示剂	Quin-2	1980	339/492	与Ca ²⁺ 结合后分子构象发生变化，吸收峰从短波向长波方向移动，荧光强度增加
	Fura、Indo	1985	369/478	与Ca ²⁺ 结合后长波长处荧光信号增强，短波长处减弱，通过双波长激发的比值表示钙离子浓度变化
	Fluo、Rhod	1989	506/526	与Ca ²⁺ 结合后仅在长波长处荧光信号增强
基因编码钙指示剂	Aequorin	1962	-/465	多肽 apoaequorin 和疏水性发光体 coelenterazine 形成水母发光蛋白复合体，与Ca ²⁺ 结合后发出蓝光
	Cameleon	1997	425/535	Cameleon 由 CFP、YFP、CaM 和 M13 融合而成，CaM 与 Ca ²⁺ 结合形成复合物，使 M13 与 CaM 结合的亲和性增强，进而使 CFP 激发 YFP 产生长波长荧光
	GCaMP	2001	489/509	GCaMP 由 CaM、M13 和 cpGFP 结合而成，CaM 与 Ca ²⁺ 结合形成复合物，使 M13 与 CaM 结合的亲和性增强，导致 cpGFP 的荧光信号增强

3 结论与展望

广泛的研究已经充分证明了 Ca²⁺是生物体内极其重要的细胞内信使，参与大部分生物的生长发育过程。钙信号的表现方式包括钙瞬变、钙振荡等。Ca²⁺动力学也表明了 Ca²⁺复杂的时间和空间动力学，且这种信号信息需要通过 Ca²⁺信号签名形成并传递^[73]。植物中的钙信号检测技术仍在不断发展，部分动物学与医学上对钙信号检测的手段也对植物中的应用具有巨大的参考价值。目前，尽管对部分生物与非生物胁迫下的钙信号产生途径已经有了一定的了解，但是对其具体感应受体以及由该受体调节的通道蛋白仍然存在未知，因此，通过正向遗传分析筛选突变体构建突变体库，从而确定 Ca²⁺信号产生及传递过程中的各类基因、受体、调节因子等仍是研究钙信号通路的重要手段。由于植物细胞具有细胞壁的特点，使对植物进行化学荧光指示剂孵育等技术存在与动物细胞不同的技术壁垒，因此，研发针对植物细胞专用的化学荧光指示剂对探究植物钙信号具有重大的研究价值。与此同时，分析不同钙信号检测技术的利弊，及对不同研究的适用性，对未来更多不同物种中的钙信号检测及其分子通路的研究具有重要意义。

4 参考文献

- [1] POOVAIAH B W, MCFADDEN J J, REDDY A S. The role of calcium ions in gravity signal perception and transduction [J]. *Physiologia Plantarum*, 1987, 71(3): 401 – 407.
- [2] BUSH, DOUGLAS S. Calcium regulation in plant cells and its role in signaling [J]. *Annual Review of Plant Physiology & Plant Molecular Biology*, 1995, 46(1): 95 – 122.
- [3] ASAI N, NISHIOKA T, TAKABAYASHI J, et al. Plant volatiles regulate the activities of Ca²⁺-permeable channels and promote cytoplasmic calcium transients in *Arabidopsis* leaf cells [J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2009, 4(4): 294 – 300.
- [4] DUPONT G, COMBETTES L, BIRD G S, et al. Calcium oscillations [J/O]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2011, 3(3): a004226 [2024-05-01]. doi: 10.1101/cshperspect.a004226.
- [5] STEPHAN A B, SCHROEDER J I. Plant salt stress status is transmitted systemically via propagating calcium waves [J].

- Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014, **111**(17): 6126 – 6127.
- [6] TIAN Wang, WANG Chao, GAO Qifei, *et al.* Calcium spikes, waves and oscillations in plant development and biotic interactions [J]. *Nature Plants*, 2020, **6**(7): 750 – 759.
- [7] LI Feng, WANG Jing, MA Chunli, *et al.* Glutamate receptor-like channel3.3 is involved in mediating glutathione-triggered cytosolic calcium transients, transcriptional changes, and innate immunity responses in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2013, **162**(3): 1497 – 1509.
- [8] HOLDAWAY-CLARKE T L, FEIJO J A, HACKETT G R, *et al.* Pollen tube growth and the intracellular cytosolic calcium gradient oscillate in phase while extracellular calcium influx is delayed [J]. *The Plant Cell*, 1997, **9**(11): 1999 – 2010.
- [9] YANG Huimin, ZHANG Xiaoyan, WANG Genxuan. Cytosolic calcium oscillation signaling in guard cell [J]. *Plant Science*, 2004, **166**(3): 549 – 556.
- [10] DODD A N, LOVE J, WEBB A A. The plant clock shows its metal: circadian regulation of cytosolic free Ca^{2+} [J]. *Trends in Plant Science*, 2005, **10**(1): 15 – 21.
- [11] MONSHAUSEN G B, MESSERLI M A, GILROY S. Imaging of the Yellow Cameleon 3.6 indicator reveals that elevations in cytosolic Ca^{2+} follow oscillating increases in growth in root hairs of *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2008, **147**(4): 1690 – 1698.
- [12] KEINATH N F, WAADT R, BRUGMAN R, *et al.* Live cell imaging with R-GECO1 sheds light on flg22- and chitin-induced transient $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ patterns in *Arabidopsis* [J]. *Molecular Plant*, 2015, **8**(8): 1188 – 1200.
- [13] GRADOGNA A, CARPANETO A. Electrophysiology and fluorescence to investigate cation channels and transporters in isolated plant vacuoles [J/OL]. *Stress Biology*, 2022, **2**(1): 42 [2024-05-01]. doi: [10.1007/s44154-022-00064-z](https://doi.org/10.1007/s44154-022-00064-z).
- [14] CARAFOLI E, SANTELLA L, NICOTERA P. Calcium signaling in the cell nucleus [J]. *Cell Calcium*, 1997, **22**(5): 313 – 319.
- [15] CORTESE E, MOSCATELLO R, PETTITI F, *et al.* Monitoring calcium handling by the plant endoplasmic reticulum with a low- Ca^{2+} -affinity targeted aequorin reporter [J]. *The Plant Journal*, 2022, **109**(4): 1014 – 1027.
- [16] MA Yun, DAI Xiaoyan, XU Yunyuan, *et al.* *COLD1* confers chilling tolerance in rice [J]. *Cell*, 2015, **160**(6): 1209 – 1221.
- [17] YUAN Fang, YANG Huimin, YAN Xue, *et al.* OSCA1 mediates osmotic-stress-evoked Ca^{2+} increases vital for osmosensing in *Arabidopsis* [J]. *Nature*, 2014, **514**(7522): 367 – 371.
- [18] JIANG Zhonghao, ZHOU Xiaoping, TAO Ming, *et al.* Plant cell-surface GIPC sphingolipids sense salt to trigger Ca^{2+} influx [J]. *Nature*, 2019, **572**(7769): 341 – 346.
- [19] LAOHAVISIT A, WAKATAKE T, ISHIHAMA N, *et al.* Quinone perception in plants via leucine-rich-repeat receptor-like kinases [J]. *Nature*, 2020, **587**(7832): 92 – 97.
- [20] WU Feihua, CHI Yuan, JIANG Zhongbao, *et al.* Hydrogen peroxide sensor HPCA1 is an LRR receptor kinase in *Arabidopsis* [J]. *Nature*, 2020, **578**(7796): 577 – 581.
- [21] RINGER S. A further contribution regarding the influence of the different constituents of the blood on the contraction of the heart [J]. *The Journal of Physiology*, 1883, **4**(1): 29 – 42, 23.
- [22] HEILBRUNN L V, WIERCINSKI F J. The action of various cations on muscle protoplasm [J]. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 1947, **29**(1): 15 – 32.
- [23] KINOSITA H. Discovery of the role of Ca^{2+} in muscle contraction. My days with the late Professor Takeo Kamada [J]. *Advances in Biophysics*, 1984, **17**: 1 – 4, 23.
- [24] CHEUNG W. Cyclic 3', 5'-nucleotide phosphodiesterase. Demonstration of an activator [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1970, **38**(3): 533 – 538.
- [25] NEHER E, SAKMANN B. Noise analysis of drug induced voltage clamp currents in denervated frog muscle fibres [J]. *The Journal of Physiology*, 1976, **258**(3): 705 – 729.
- [26] TSIEN R Y. New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures [J]. *Biochemistry*, 1980, **19**(11): 2396 – 2404.
- [27] TSIEN R Y, RINK T J, POENIE M. Measurement of cytosolic free Ca^{2+} in individual small cells using fluorescence microscopy with dual excitation wavelengths [J]. *Cell Calcium*, 1985, **6**(1/2): 145 – 157.
- [28] MINTA A, KAO J P, TSIEN R Y. Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1989, **264**(14): 8171 – 8178.
- [29] SHIMOMURA O, JOHNSON F H, SAIGA Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein

- from the luminous hydromedusan, *Aequorea* [J]. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 1962, **59**: 223 – 239.
- [30] LORO G, DRAGO I, POZZAN T, *et al.* Targeting of Cameleons to various subcellular compartments reveals a strict cytoplasmic/mitochondrial Ca^{2+} handling relationship in plant cells [J]. *The Plant Journal*, 2012, **71**(1): 1 – 13.
- [31] COSTA A, CANDEO A, FIERAMONTI L, *et al.* Calcium dynamics in root cells of *Arabidopsis thaliana* visualized with selective plane illumination microscopy [J/OL]. *PLoS One*, 2013, **8**(10): e75646[2024-05-01]. doi: [10.1371/journal.pone.0075646](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075646).
- [32] NAKAI J, OHKURA M, IMOTO K. A high signal-to-noise Ca^{2+} probe composed of a single green fluorescent protein [J]. *Nature Biotechnology*, 2001, **19**(2): 137 – 141.
- [33] MCAINSH M R, NG C K. Measurement of cytosolic-free Ca^{2+} in plant tissue [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2005, **312**: 289 – 302.
- [34] GRYNKIEWICZ G, POENIE M, TSIEN R Y. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1985, **260**(6): 3440 – 3450.
- [35] 王永祥, 刘斌. 细胞内游离 Ca^{2+} 的荧光指示剂研究进展 [J]. 西安文理学院学报 (自然科学版), 2006, **9**(1): 21 – 24.
WANG Yongxiang, LIU Bin. Development of fluorescent indicators of intracellular free Ca^{2+} [J]. *Journal of Xi'an University of Arts & Science (Natural Science Edition)*, 2006, **9**(1): 21 – 24.
- [36] BUSH D S, JONES R L. Measurement of cytoplasmic calcium in aleurone protoplasts using indo-1 and fura-2 [J]. *Cell Calcium*, 1987, **8**(6): 455 – 472.
- [37] CALDER G M, FRANKLIN-TONG V E, SHAW P J, *et al.* Ca^{2+} oscillations in plant cells: initiation by rapid elevation in cytosolic free Ca^{2+} levels [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1997, **234**(3): 690 – 694.
- [38] JOHNSON I. Just-right light: inherently adaptive for application-specific needs [J]. *Laser Focus World*, 2017, **53**(2): 30 – 33.
- [39] DIGONNET C, ALDON D, LEDUC N, *et al.* First evidence of a calcium transient in flowering plants at fertilization [J]. *Development*, 1997, **124**(15): 2867 – 2874.
- [40] 姚洁, 孙津歌, 史乐谦, 等. 细胞内自由钙离子的测定 —— 荧光指示剂法 [J]. *资源节约与环保*, 2019(7): 136 – 137.
YAO Jie, SUN Jin'ge, SHI Leqian, *et al.* Determination of intracellular free calcium ions by fluorescence indicator method [J]. *Resources Economization & Environmental Protection*, 2019(7): 136 – 137.
- [41] WILLIAMS D A, CODY S H, GEHRING C A, *et al.* Confocal imaging of ionised calcium in living plant cells [J]. *Cell Calcium*, 1990, **11**(4): 291 – 297.
- [42] WALCZYNSKO P, WAGNER E, ALBRECHTOVÁ J T. Use of co-loaded fluo-3 and fura Red fluorescent indicators for studying the cytosolic Ca^{2+} concentrations distribution in living plant tissue [J]. *Cell Calcium*, 2000, **28**(1): 23 – 32.
- [43] QU Haiyong, JIANG Xueting, SHI Zebin, *et al.* Fast loading ester fluorescent Ca^{2+} and pH indicators into pollen of *Pyrus pyrifolia* [J]. *Journal of Plant Research*, 2012, **125**(1): 185 – 195.
- [44] ZHANG Mi, CAO Huizhen, HOU Lei, *et al.* In vivo imaging of Ca^{2+} accumulation during cotton fiber initiation using fluorescent indicator YC3.60 [J]. *Plant Cell Reports*, 2017, **36**(6): 911 – 918.
- [45] QIU Li'na, HUANG Daqing, WANG Yongzhang, *et al.* Staining the cytoplasmic Ca^{2+} with fluo-4/AM in apple pulp [J/OL]. *Journal of Visualized Experiments*, 2021(177): e62526[2024-05-01]. doi: [10.3791/62526](https://doi.org/10.3791/62526).
- [46] BEHERA S, KREBS M, LORO G, *et al.* Ca^{2+} imaging in plants using genetically encoded Yellow Cameleon Ca^{2+} indicators [J]. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2013(8): 700 – 703.
- [47] PALMER A E, QIN Yan, PARK J G, *et al.* Design and application of genetically encoded biosensors [J]. *Trends in Biotechnology*, 2011, **29**(3): 144 – 152.
- [48] GRENZI M, RESENTINI F, VANNESTE S, *et al.* Illuminating the hidden world of calcium ions in plants with a universe of indicators [J]. *Plant Physiology*, 2021, **187**(2): 550 – 571.
- [49] KNIGHT M R, CAMPBELL A K, SMITH S M, *et al.* Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium [J]. *Nature*, 1991, **352**(6335): 524 – 526.
- [50] JOHNSON C H, KNIGHT M R, KONDO T, *et al.* Circadian oscillations of cytosolic and chloroplastic free calcium in plants [J]. *Science*, 1995, **269**(5232): 1863 – 1865.
- [51] CHANDRA S, STENNIS M, LOW P S. Measurement of Ca^{2+} fluxes during elicitation of the oxidative burst in aequorin-transformed tobacco cells [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, **272**(45): 28274 – 28280.
- [52] MAZARS C, THION L, THULEAU P, *et al.* Organization of cytoskeleton controls the changes in cytosolic calcium of cold-

- shocked *Nicotiana plumbaginifolia* protoplasts [J]. *Cell Calcium*, 1997, **22**(5): 413 – 420.
- [53] KIEGLE E, MOORE C A, HASELOFF J, *et al.* Cell-type-specific calcium responses to drought, salt and cold in the *Arabidopsis* root [J]. *The Plant Journal*, 2000, **23**(2): 267 – 278.
- [54] WOOD N T, HALEY A, VIRY-MOUSSAÏD M, *et al.* The calcium rhythms of different cell types oscillate with different circadian phases [J]. *Plant Physiology*, 2001, **125**(2): 787 – 796.
- [55] TRACY F E, GILLIHAM M, DODD A N, *et al.* NaCl-induced changes in cytosolic free Ca²⁺ in *Arabidopsis thaliana* are heterogeneous and modified by external ionic composition [J]. *Plant Cell Environment*, 2008, **31**(8): 1063 – 1073.
- [56] KNIGHT M R, READ N D, CAMPBELL A K, *et al.* Imaging calcium dynamics in living plants using semi-synthetic recombinant aequorins [J]. *The Journal of Cell Biology*, 1993, **121**(1): 83 – 89.
- [57] SEDBROOK J C, KRONEBUSCH P J, BORISY G G, *et al.* Transgenic AEQUORIN reveals organ-specific cytosolic Ca²⁺ responses to anoxia and *Arabidopsis thaliana* seedlings [J]. *Plant Physiology*, 1996, **111**(1): 243 – 257.
- [58] ALLEN G J, KWAK J M, CHU S P, *et al.* Cameleon calcium indicator reports cytoplasmic calcium dynamics in *Arabidopsis* guard cells [J]. *The Plant Journal*, 1999, **19**(6): 735 – 747.
- [59] MIYAWAKI A, GRIESBECK O, HEIM R, *et al.* Dynamic and quantitative Ca²⁺ measurements using improved cameleons [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, **96**(5): 2135 – 2140.
- [60] GRIESBECK O, BAIRD G S, CAMPBELL R E, *et al.* Reducing the environmental sensitivity of yellow fluorescent protein. Mechanism and applications [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, **276**(31): 29188 – 29194.
- [61] TANAKA K, SWANSON S J, GILROY S, *et al.* Extracellular nucleotides elicit cytosolic free calcium oscillations in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2010, **154**(2): 705 – 719.
- [62] IWANO M, ENTANI T, SHIBA H, *et al.* Fine-tuning of the cytoplasmic Ca²⁺ concentration is essential for pollen tube growth [J]. *Plant Physiology*, 2009, **150**(3): 1322 – 1334.
- [63] RINCÓN-ZACHARY M, TEASTER N D, SPARKS J A, *et al.* Fluorescence resonance energy transfer-sensitized emission of yellow cameleon 3.60 reveals root zone-specific calcium signatures in *Arabidopsis* in response to aluminum and other trivalent cations [J]. *Plant Physiology*, 2010, **152**(3): 1442 – 1458.
- [64] KREBS M, SCHUMACHER K. Live cell imaging of cytoplasmic and nuclear Ca²⁺ dynamics in *Arabidopsis* roots [J]. *Cold Spring Harbor protocols*, 2013, **2013**(8): 776 – 780.
- [65] BARBERINI M L, MUSCHIETTI J. Imaging of calcium dynamics in pollen tube cytoplasm [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2015, **1242**: 49 – 57.
- [66] BARBERINI M L, SIGAUT L, HUANG Weijie, *et al.* Calcium dynamics in tomato pollen tubes using the Yellow Cameleon 3.6 sensor [J]. *Plant Reproduction*, 2018, **31**(2): 159 – 169.
- [67] LORO G, COSTA A. Imaging of mitochondrial and nuclear Ca²⁺ dynamics in *Arabidopsis* roots [J]. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2013(8): 781 – 785.
- [68] BEHERA S, WANG Nili, ZHANG Chunxia, *et al.* Analyses of Ca²⁺ dynamics using a ubiquitin-10 promoter-driven Yellow Cameleon 3.6 indicator reveal reliable transgene expression and differences in cytoplasmic Ca²⁺ responses in *Arabidopsis* and rice (*Oryza sativa*) roots [J]. *New Phytologist*, 2015, **206**(2): 751 – 760.
- [69] LORO G, RUBERTI C, ZOTTINI M, *et al.* The D3cpv Cameleon reports Ca²⁺ dynamics in plant mitochondria with similar kinetics of the YC3.6 Cameleon, but with a lower sensitivity [J]. *Journal of Microscopy*, 2013, **249**(1): 8 – 12.
- [70] AKERBOOM J, RIVERA J D, GUILBE M M, *et al.* Crystal structures of the GCaMP calcium sensor reveal the mechanism of fluorescence signal change and aid rational design [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2009, **284**(10): 6455 – 6464.
- [71] TALLINI Y N, OHKURA M, CHOI B-R, *et al.* Imaging cellular signals in the heart *in vivo*: Cardiac expression of the high-signal Ca²⁺ indicator GCaMP2 [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, **103**(12): 4753 – 4758.
- [72] NAKAI J, OHKURA M, IMOTO K. A high signal-to-noise Ca²⁺ probe composed of a single green fluorescent protein [J]. *Nature Biotechnology*, 2001, **19**(2): 137 – 141.
- [73] ZHANG Yachun, ZHANG Donghui, HUANG Shanjin, *et al.* Real-time calcium imaging in living plants [J]. *Trends in Plant Science*, 2023, **28**(11): 1326 – 1327.
- [74] CHOI W G, SWANSON S J, GILROY S. High-resolution imaging of Ca²⁺, redox status, ROS and pH using GFP biosensors [J]. *The Plant Journal*, 2012, **70**(1): 118 – 128.