

钙荧光探针 Fura-2/AM 对大肠杆菌细胞的负载行为

邵 梅¹ 王洪梅¹ 刘志洪^{1,2*} 沈 萍² 蔡汝秀¹

(武汉大学¹ 化学与分子科学学院² 生命科学学院 武汉 430072)

摘 要 Fura-2/AM 作为一类高效的钙离子荧光探针,在动物细胞中已得到较成功的应用,但在微生物细胞分析方面鲜见报道。该文系统研究了该探针的荧光光谱特征及其在大肠杆菌细胞内的负载行为,并考察了在大肠杆菌细胞中钙离子与 Fura-2 的结合情况。为利用其研究大肠杆菌等微生物细胞内钙离子浓度及钙离子跨膜行为奠定了基础。

关键词 Fura-2/AM 荧光探针 大肠杆菌 负载

中图分类号:Q936 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2005)05-0805-03

大肠杆菌(*Escherichia coli*)是一种革兰氏阴性菌,因其结构简单、易培养,具有优良的遗传信息复制和表达能力,是基因工程研究中理想的模式细胞^[1]。钙离子诱导的大肠杆菌细胞感受态的建立及其水平基因的转移,是化学与生物学交叉学科领域的重要课题^[2]。从分子水平研究 Ca^{2+} 在此过程中的作用方式和机理具有重要意义,目前国内外在该领域还未有相关的研究方法报道。

Fura-2/AM 是一种荧光量子产率很高、性能优良的双波长 Ca^{2+} 荧光探针^[3],是较为理想的研究细胞外源性钙离子或稀土离子跨膜行为的手段^[4]。用 Fura-2/AM 研究 Ca^{2+} 在动物细胞中的行为并不鲜见^[5],但该方法如何用于测定微生物细胞尤其是革兰氏阴性菌细胞内 Ca^{2+} 的浓度及胞外 Ca^{2+} 的跨膜行为,特别是该探针分子在这类细胞内的负载情况,目前尚不十分清楚,相关文献报道很少。Futsaether 等曾报道了用酯化法和酸休克技术将 Fura-2 分子引入 *Propionibacterium acnes* 细胞的工作^[6];Nakamura 等考察了 Fura-2/AM 对 *Selenomonas ruminantium* 细胞的负载效率,通过添加 EDTA,溶菌酶,BSA 等分子增加细胞膜透性,并改善 Fura-2/AM 分子在孵育过程中的溶解性^[7]。近两年本实验室围绕此课题进行了初步的探索^[8]。本文详细研究了 Fura-2/AM 负载于大肠杆菌细胞前后的情况,以及后续 Ca^{2+} 检测过程中的光谱性质,为其分析应用提供实验依据,并为进一步研究大肠杆菌细胞内钙离子浓度及钙离子跨膜行为,揭示 Ca^{2+} 在细胞感受态建立过程中的作用位点及作用方式奠定方法基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

Fura-2/AM(Sigma);*E. coli* HB101(本室保存);LS-55 荧光分光光度计(PerkinElmer);Tu-1900 双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器);TGL-16G 高速冷冻离心机(上海安

亭)。

1.2 Fura-2/AM 在大肠杆菌细胞中的负载

取活化一夜后的菌液以 1% 量转接于含培养基的试管中,37℃ 振荡培养 3.5h 后离心弃上清液,用 buffer A(0.2mol/L Tris-HCl pH 7.5)含 1mmol/L $MgCl_2$,100mmol/L KCl 洗两次,加入 1mL 0.12 mol/L Tris-HCl 缓冲溶液(含 0.2mmol/L EDTA, pH 8.0)37℃ 温和振荡 2min,立即加入终浓度为 1mmol/L $MgCl_2$ 溶液终止反应,离心弃上清液,以 buffer A 洗两次。

将菌体悬浮于 0.2mL buffer A 中,加入终浓度为 $5\mu\text{mol/L}$ 的 Fura-2/AM($100\mu\text{g}$ Fura-2/AM 溶于 $100\mu\text{L}$ 重蒸 DMSO 中,再以 DMSO 稀释成 $5\mu\text{mol/L}$),37℃ 孵育 2h。孵育好的菌液用 buffer A 洗两次,调节至相同的 OD_{600} ,测荧光。

1.2 大肠杆菌的破膜处理

取培养好的大肠杆菌以 buffer A 洗两次,悬浮于 buffer A 中调节至相同的 OD_{600} ,用超声波破碎细胞,离心后取上清液测荧光。

2 结果和讨论

2.1 Fura-2/AM 的荧光光谱特征

Fura-2 具亲水性,不能或很难直接进入细胞内部,需要使用它的乙酰羟甲基酯形式(Acetoxymethyl ester,即 Fura-2/AM 的形式)^[3],从而成为不带电荷的亲脂性分子,才能通过细胞膜进入细胞。在细胞内,分子上的酯基很快被酯酶水解掉成为游离的 Fura-2,继而与 Ca^{2+} 快速结合,且结合后的配合物不能透出细胞膜,能够有效地发挥作用。Fura-2/AM 探针在发挥作用的过程中,实际上经历了 3 种不同的存在形式,即 Fura-2/AM 酯化分子,游离的 Fura-2 以及 Fura-2- Ca^{2+} 的结合产物。为了准确地作出定性的判断,有必要知悉其具体的荧光光谱特征。如图 1-A 所示,在弱极性溶剂 DMSO 中,Fura-2/

基金项目 国家自然科学基金资助项目(20275027)

* 通讯作者。Tel 86-27-62710603 E-mail: zhlliu.whu@163.com

作者简介 邵 梅(1983-)女,湖北武汉人,本科生,研究方向为动态分子光谱。E-mail: sunsunberyl@yahoo.com.cn

收稿日期 2005-03-18,修回日期 2005-05-27

AM的发射峰位于510nm处,激发峰位于380nm附近。且在DMSO中,Fura-2/AM分子很稳定,37℃孵育6h后基本上不发生变化。但是在极性的水溶液中,Fura-2/AM并不稳定,会缓慢发生水解。如图1-B所示,水解后生成的游离Fura-2分子,其荧光发射峰在480nm,而其激发峰则位于360nm附近(曲线a0)。随着游离Fura-2不断地与溶液中的钙离子结合,激发峰最后紫移到340nm处(曲线a1-a4)。以上实验现象表明,Fura-2/AM在极性的水溶液中并不稳定,自身会缓慢水解,因此其储备液必须溶在DMSO这样的弱极性或非极性溶剂中。

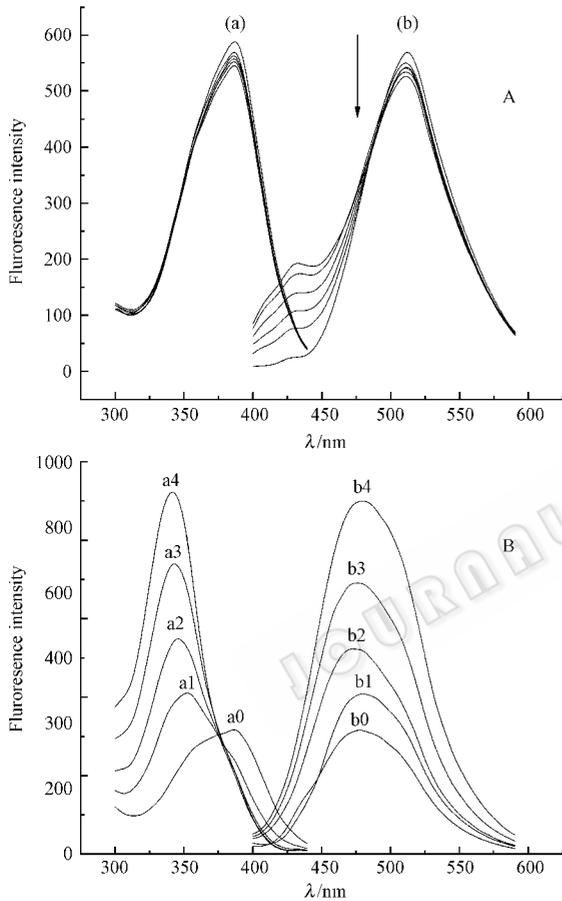


图1 Fura-2/AM在DMSO(A)和CaCl₂(B)中的荧光光谱特征

Fig. 1 Fluorescence spectra of Fura-2/AM in DMSO(A) and CaCl₂(B) solution

(A) In DMSO a: Excitation spectra; b: Emission spectra, curves from up to down represent 0~6h respectively.

(B) In CaCl₂ solution a: Excitation spectra; b: Emission spectra, curves 0~4 represent 1~5h respectively.

2.2 Fura-2/AM在大肠杆菌细胞内的负载

2.2.1 Fura-2/AM对大肠杆菌的跨膜及胞内酯酶的水解能力 能否跨膜进入细胞并在胞内水解,是判断Fura-2/AM能否作为钙离子荧光探针应用于大肠杆菌的先决条件。分别采用胞内孵育和胞外处理两种方法,考察了Fura-2/AM的跨膜能力以及大肠杆菌对Fura-2/AM的水解能力(图2)。将培养

好的大肠杆菌洗涤后以buffer A悬浮,取两份进行处理,一份直接对细胞进行冰浴超声处理,使之破碎,离心分离,取内容物,向其中加入Fura-2/AM至终浓度为5μmol/L,立即测定荧光(曲线b)。另一份则向细胞悬液中加入Fura-2/AM,使其终浓度为5μmol/L,孵育两小时后以buffer A充分洗涤菌体,以洗掉胞外溶液中的探针分子,再将细胞破碎,测定其细胞内容物的荧光(曲线c)。图中曲线a为空白(即大肠杆菌细胞内容物的荧光基底),曲线b表明大肠杆菌胞内含有酯酶,能迅速催化水解Fura-2/AM使其转变为游离的Fura-2,且游离Fura-2分子的激发峰确实在360nm处。虽然Fura-2/AM在水中不稳定会缓慢水解,但因本实验是在加入Fura-2/AM后立即测定,所以其水解应是胞内所含的酯酶催化的结果。曲线c则清晰地显示Fura-2/AM能够成功地负载于大肠杆菌,即跨膜进入大肠杆菌细胞并在胞内水解,且经过2h的孵育后Fura-2已部分与胞内含有的Ca²⁺结合(激发峰已紫移至340nm处)。

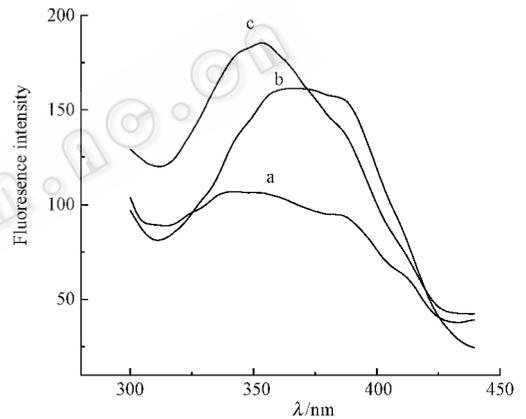


图2 Fura-2/AM的负载情况

Fig. 2 Load of Fura-2/AM in *E. coli* Cells

a: Cell inclusion (blank); b: Cell inclusion + 5μmol/L Fura-2/AM; c: Cells incubated together with 5μmol/L Fura-2/A for 2h.

2.2.2 大肠杆菌胞外Ca²⁺的跨膜行为 确定Fura-2/AM能在大肠杆菌细胞内负载后,进一步考察了胞外钙离子的跨膜行为。在Fura-2/AM与细胞共同孵育、负载的过程中加入CaCl₂(终浓度0.1mol/L)溶液,考察胞外Ca²⁺跨越细胞膜的情况。细胞孵育后用buffer A充分洗涤菌体,以除掉溶液中的探针分子,然后对细胞破膜,取内容物测荧光。图3中曲线a是无外加钙离子的情况,其340nm处的荧光激发峰表明Fura-2/AM负载后与胞内本身存在的Ca²⁺结合;曲线b中,340nm处荧光强度显著升高,说明有胞外的Ca²⁺跨膜进入细胞并与游离的Fura-2结合(两组细胞调节至相同的OD₆₀₀值)。

以上实验结论进一步证实,Fura-2/AM可被引入有细胞壁的大肠杆菌细胞中,并且在细胞内酯酶催化作用下迅速水解而与钙离子结合,因此其有望作为适宜的钙荧光探针应用于大肠杆菌这样的微生物细胞,研究胞内Ca²⁺浓度以及胞外Ca²⁺的细胞跨膜行为。

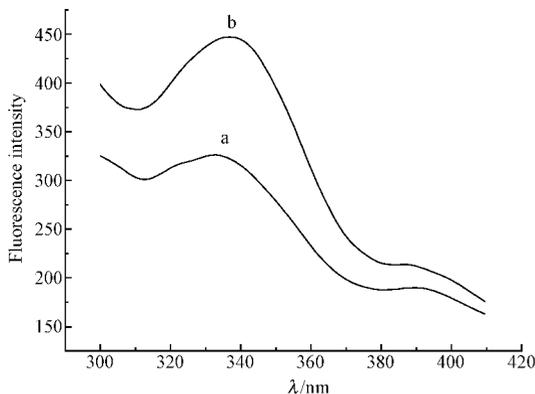


图3 大肠杆菌胞外 Ca^{2+} 跨膜行为

Fig.3 Transmembrane behaviors of extracellular Ca^{2+} to *E. coli* cells

a: Without extracellular Ca^{2+} ; b: With 0.1mol/L extracellular Ca^{2+} ;

Fura-2/AM : 5 μ mol/L.

参 考 文 献

- [1] Mandel M, Higa A. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol*, 1970 **53**(1):159 – 162.
- [2] Li W, Xie H, Xie Z, et al. Exploring the mechanism of competence development in *Escherichia coli* using quantum dots as fluorescent probes. *J Biochem Biophys Methods* 2004 **58**(1) 59 – 66.
- [3] Gryniewicz G, Poenit M, Tsien RY. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *Biol Chem*, 1985 **260**(6) 3440 – 3450.
- [4] 杨 频 魏春英 陈 娟. 稀土离子跨人血红细胞膜的荧光法研究. 高等学校化学学报 2002 **23**(6) 985 – 990.
- [5] 黄 勋 孙爱民 乔小蓉 等. 用 Fura-2 测定人外周血中性粒细胞内游离钙浓度. 光谱实验室 2003 **20**(2) 209 – 211.
- [6] Futsaether C M, Johnsson A. Using fura-2 to measure intracellular free calcium in *Propionibacterium acnes*. *Can J Microbiol*, 1994 **40**(6) 439 – 445.
- [7] Nakamura I, Nakai Y, Izumi H. Use of fura-2/AM to measure intracellular free calcium in *Selenomonas ruminantium*. *Tohoku J Exp Med*, 1996, **179**(4) 291 – 294.
- [8] 刘志洪 李文化 沈 萍 等. FURA-2 荧光探针研究 Ca^{2+} 对大肠杆菌细胞的跨膜作用. 化学学报 2004 **62**(4) 445 – 448.

Load of calcium probe Fura -2/AM in *Escherichia coli* cells

SHAO Mei¹ WANG Hong-mei¹ LIU Zhi-hong^{1,2*} SHEN Ping² CAI Rui-xiu¹

(¹ College of Chemistry and Molecular Sciences, ² College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract : The fluorescence characteristics of Fura-2/AM, a kind of calcium probe normally used in analysis of animal cells, were studied in detail in this work. The load of the probe into *Escherichia coli* cells was elucidated through fluorescence spectra. The combination of Fura-2 with calcium ions inside *Escherichiacoli* cells was observed, and the transmembrane behaviors of extracellular calcium to *Escherichia coli* cells were also investigated. The work was aimed at further researches on the calcium-induced horizontal gene transfer in *Escherichia coli* cells.

Key words : Fura-2/AM, Fluorescent probe, *Escherichia coli*, Load

Foundation item : National Natural Science Foundation of China(20275027)

* Corresponding author. Tel : 86-27-62710603 ; E-mail : zhhlui.whu@163.com

Received date : 05-27-2005