



基因编码的细胞器钙指示剂研究进展

谷文佳¹, 钟梓铤¹, 张涵涵¹, 张晓嫣², 王友军^{1,2*}

1. 北京师范大学生命科学学院生物系, 抗性基因资源与分子发育北京市重点实验室, 北京 100875;

2. 北京师范大学生命科学学院生物系, 细胞增殖及调控生物学教育部重点实验室, 北京 100875

* 联系人, E-mail: wyoujun@bnu.edu.cn

收稿日期: 2023-11-15; 接受日期: 2024-03-19; 网络版发表日期: 2024-08-07

国家自然科学基金(批准号: 91954205, 92254301)资助

摘要 真核细胞中的内质网、线粒体等含钙细胞器, 是细胞钙信号系统的重要组成部分. 揭示这些细胞器中的钙离子动态及稳态有着重要的生理和病理意义. 与化学钙探针相比, 细胞器特异性表达的基因编码的钙指示剂(genetically encoded Ca^{2+} indicator, GECI)的定位更准确, 使用更简便, 因而具有很广阔的应用前景. 本综述系统梳理了现有的线粒体、内质网、高尔基体、细胞内囊泡以及溶酶体等几种细胞器GECI的研究进展. 总结了现有工具的优缺点, 展望有待进一步优化的方向, 旨在为今后细胞器GECI的开发及优化提供助力.

关键词 细胞器钙指示剂, 钙成像, 细胞器钙信号

钙离子(calcium ion, Ca^{2+})是普遍存在的一种第二信使(图1). 多种刺激可以引起细胞的胞质或细胞器中游离 Ca^{2+} 浓度发生变化, 这就是钙信号. 在振幅、时间和空间等维度上有不同特征的钙信号编码复杂多样的刺激信息, 参与调控包括细胞迁移与增殖、分泌和神经递质释放以及肌肉收缩等许多基本的生理过程^[1-3]. 与多数第二信使靠对信号分子的合成和分解来完成对刺激的反应不同, 钙信号的产生和终止是靠对它的转运来实现的. 胞质钙信号的来源主要有两类, 一类是由胞外 Ca^{2+} 内流产生, 另一类则是由细胞器 Ca^{2+} 释放产生.

1 细胞器钙信号系统与疾病

真核细胞内含多种膜性细胞器, 构成了高度动态

化的线粒体和包括内质网、高尔基体、溶酶体、内体与分泌囊泡等在内的内膜系统^[4]. 各细胞器中pH以及氧化还原环境各异. 其中线粒体基质偏碱性, pH约为7.8~8.0, 内质网的pH约为7.2. 高尔基体腔内偏酸性, pH在6.0~7.0之间波动, 异质性很高^[5]. 整体而言, 其pH从顺式(pH $\approx$ 6.7)到中部(pH $\approx$ 6.5)和反式(pH $\approx$ 6.0)递减^[6]. 溶酶体、内体、分泌囊泡则属于酸性细胞器, pH在4.5~6.5左右^[7]. 与胞浆相比, 内质网环境往往更具有氧化性^[8], 而线粒体和细胞核则相反^[9]. 众多性质及形态各异的细胞器在 Ca^{2+} 的转运中起着关键的作用, 既是能产生胞浆钙信号的钙源(Ca^{2+} source), 又是用于收集进入胞质 Ca^{2+} 并终止钙信号的钙库或钙汇(Ca^{2+} pool or Ca^{2+} sink). 不同细胞器内游离 Ca^{2+} 水平不同, 线粒体基质中的 Ca^{2+} 浓度可在亚微摩尔级至几百微摩尔级之

引用格式: 谷文佳, 钟梓铤, 张涵涵, 等. 基因编码的细胞器钙指示剂研究进展. 中国科学: 生命科学, 2024, 54: 1386–1407

Gu W J, Zhong Z Y, Zhang H H, et al. Genetically encoded calcium indicators for organelles (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2024, 54: 1386–1407, doi: 10.1360/SSV-2023-0267

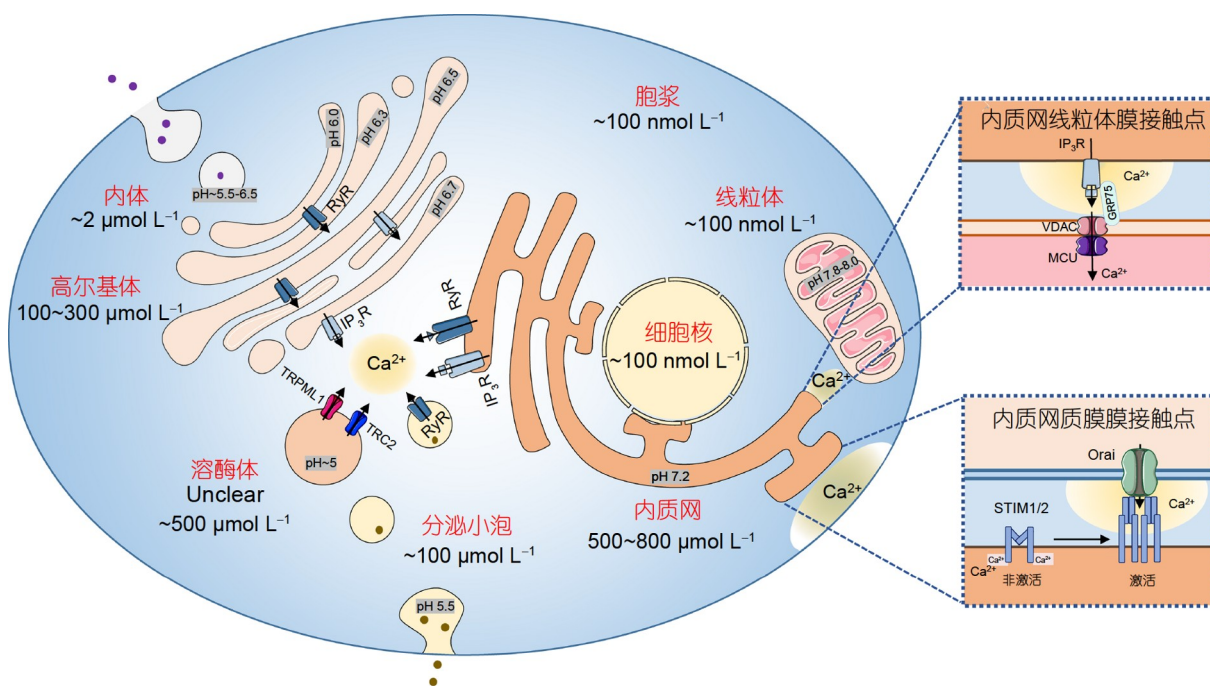


图 1 细胞钙信号系统示意图。细胞钙信号由胞外钙内流以及细胞器钙释放产生。胞外钙内流主要依赖于定位在内质网的基质相互作用分子(stromal interaction molecule, STIM)蛋白及质膜上的Orai通道蛋白共同介导的钙库操纵性钙内流(store operated calcium entry, SOCE)途径。参与钙信号调控的细胞器主要包括: 内质网、线粒体、高尔基体、溶酶体、囊泡等。这些细胞器内游离钙离子水平不同, pH环境也各异。图中缩写: 电压依赖性阴离子通道(voltage-dependent anion channel, VDAC), 线粒体钙单向转运蛋白(mitochondrial calcium uniporter, MCU), 葡萄糖调节蛋白75(glucose-regulated protein 75, GRP75), 双孔通道蛋白2(two-pore channel 2, TPC2)

Figure 1 | Diagram of cellular Ca^{2+} signaling system. Cytosolic Ca^{2+} signals are generated through the influx of extracellular Ca^{2+} and the release of Ca^{2+} from organelles. Ca^{2+} influx in non-excitable cells primarily relies on the store operated Ca^{2+} entry (SOCE) pathway, which is mediated by the stromal interaction molecule (STIM) proteins located in the ER membrane and Orai channel protein located in the plasma membrane. Intracellular organelles such as the endoplasmic reticulum, mitochondria, Golgi apparatus, lysosomes, and vesicles play vital roles in regulating Ca^{2+} signals. Notably, these organelles exhibit distinct free Ca^{2+} concentrations and pH environments. Abbreviations: voltage-dependent anion channel (VDAC), mitochondrial calcium uniporter (MCU), glucose-regulated protein 75 (GRP75), two-pore channel 2 (TPC2)

间波动。而在静息情况下，内质网中 Ca^{2+} 浓度为 $0.5\sim 1\text{ mmol/L}$ ，溶酶体中 Ca^{2+} 浓度约为 0.5 mmol/L ，高尔基体中 Ca^{2+} 浓度约为 0.3 mmol/L ^[10]。胞质和细胞器中的钙离子稳态及动态受到精细的调控，这是细胞维持正常钙反应的关键(图1)。

线粒体基质的钙信号主要由线粒体单向转运蛋白等多种通道蛋白及离子转运体共同介导产生, 进而调控氧化代谢、线粒体呼吸和ATP合成从而影响细胞代谢^[11]。而内质网作为动物细胞中最大的一个细胞器, 是蛋白质及脂类合成的关键场所, 同时还与其他多种细胞器存在广泛的互作。它的静息钙水平可以达到胞浆静息钙水平的几千倍, 因而在细胞稳态维持及钙信号转导中发挥着中心作用^[12]。内质网膜上的钙泵, 即肌/内质网Ca²⁺ATP酶(sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺

ATPase, SERCA), 包括跨膜卷曲螺旋结构域蛋白1 (transmembrane and coiled-coil domains 1, TMCO1) 在内的漏钙通道^[13], 钙释放通道1,4,5-三磷酸肌醇受体 (inositol-1,4,5-trisphosphate receptors, IP₃Rs) 和兰尼碱受体 (ryanodine receptors, RyRs) 共同维持内质网钙水平的稳态。当Ca²⁺从内质网释放到胞浆或通过内质网与细胞器之间的膜接触点流入各个细胞器时, 产生的钙信号会调控众多生理反应, 如内质网与线粒体之间的Ca²⁺传递参与调控脂类合成、细胞代谢等重要的细胞功能^[14]。

高尔基体是一个高度动态的极性结构,由多个扁平膜囊紧密地堆叠在一起,分为靠近细胞核一侧的顺式、圆盘状扁平的中部和面向质膜一侧的反式高尔基体三个主要的区室。这三个区室中的 Ca^{2+} 浓度和pH均

有一定的差异。高尔基体主要参与细胞内翻译后修饰、及脂质和蛋白质的分选, 已有大量的证据证明高尔基体可以作为细胞内的钙库来发挥作用^[15,16]。细胞中的各种囊泡是内膜系统的重要组成部分, 承担着细胞内蛋白分选、定向运输、物质储存及分泌等多种功能。细胞内的囊泡可大致分为: 分泌囊泡、内体等。囊泡可响应环境刺激, 释放或回收 Ca^{2+} , 进而调控下游反应^[17,18]。

而溶酶体作为细胞中负责降解回收大分子物质的酸性细胞器, pH低至4.5, 富含 Ca^{2+} , 静息游离钙水平维持在 $500\ \mu\text{mol/L}$ 左右, 是细胞中重要的“酸性钙库”。溶酶体腔会发生碱化和酸化, 引发它向胞质的钙释放或溶酶体腔内钙水平的升高, 以维持溶酶体生理功能正常进行^[19]。

线粒体及整个内体系统通过协调自身的钙转运蛋白质机器及细胞器互作来维持整个细胞的钙稳态。当这些机制出现异常时, 会损害细胞机能并导致各种疾病。内质网或线粒体钙水平的失衡会引发细胞凋亡、代谢损伤等病理现象^[20]。参与钙信号调控的相关蛋白功能异常, 如SERCA, Ca^{2+} 单向转运体等的功能性突变, 与细胞凋亡、免疫缺陷、心肌肥大、神经退行性疾病等的发生密切相关^[21,22]。高尔基体上的钙泵分泌通路 Ca^{2+} -ATP酶亚型1(secretory pathway Ca^{2+} -ATPase 1, SPCA1)突变会导致一种名为Hailey-Hailey(家族性良性天疱疮)的遗传性皮肤病^[23,24], 在人乳腺癌细胞系中也检测到SPCA1的升高^[25]。并且, SPCA1的活性和/或表达的降低会导致高尔基体结构破坏和囊泡运输功能障碍, 以及通过分泌途径影响细胞的蛋白质分选功能^[26]。溶酶体钙离子通道, 如瞬时受体电位通道黏蛋白1(transient receptor potential mucolipin channel 1, TRPML1)等, 介导的溶酶体钙信号, 会参与调节溶酶体膜与其他细胞器膜或质膜的膜融合, 这种膜融合会进而引发溶酶体胞吐作用、细胞自噬以及膜损伤修复等相关生理功能^[19]。而溶酶体钙信号失调会导致受损大分子积累, 进而引发胞内转运异常, 与IV型黏脂贮积症以及神经退行性疾病发生相关^[27]。

综上, 细胞器钙信号具有广泛的生物学功能及生理病理作用, 因而检测其中的 Ca^{2+} 稳态及动态会有助于解析细胞器钙信号产生及调控机制, 揭示相关疾病的发生机制。因而, 能准确可视化细胞器中钙稳态与钙信号的荧光钙成像技术, 已经成为细胞器钙信号相

关研究中不可或缺的工具。

2 细胞器钙成像的主要挑战及相应工具

如前所述, 与性质相对均一的胞质不同, 细胞器是高度特化的结构。不同细胞器中的氧化还原状态, pH及静息钙水平各有差异^[7,10]。因而相对胞质钙成像而言, 细胞器钙成像的挑战性更强, 需要能特异性定位并适应各细胞器内不同的环境及钙水平的钙探针^[28]。从构成或来源上分, 细胞器钙探针可以分为化学钙探针和基因编码的钙指示剂(genetically encoded calcium indicator, GECI)两大类。

化学类钙指示剂是在Fura-2及Fluo-4等^[29-31]的基础上进一步研发出来的。因此具有化学钙指示剂的固有问题, 即它们是脂溶性低的亲水分子, 无法直接穿过磷脂双分子层, 需通过显微注射等方式载入单个细胞, 操作十分繁琐。为此, 钱永健等人开发了在指示剂上添加脂溶性的乙酰氧基甲酯(acetoxymethyl ester, AM)基团的策略。钙探针-AM分子没有钙指示能力, 但脂溶性强, 可以通过胞外孵育的方式被加载到细胞中。进入细胞的钙探针-AM则会被胞内广泛存在的AM酶水解, 释放出可以指示钙信号的化学钙探针。对细胞器定位的化学钙探针而言, 在它们经由胞质进入细胞器的过程中, 会被胞质AM酶水解并驻留于胞浆中, 使其细胞器定位特异性变差, 通常需要特殊的操作来实现相对准确的细胞器定位。内质网钙水平较高, 因此需要低钙亲和力的指示剂检测其钙信号, 最初用于检测内质网钙活动的化学指示剂是Mag-Fura-2^[32], 钙亲和力低($K_d=53\ \mu\text{mol/L}$), 同时具备较高的动态范围(dynamic range, DR)(25)。此外Mag-indo-1^[33]的钙亲和力和约为 $35\ \mu\text{mol/L}$, 被用于检测促性腺激素细胞中激素诱导的内质网钙振荡。上述两种探针通常需要加入皂苷通透细胞膜或者采取其他方式来去除胞质中残留的钙探针, 实现内质网钙信号检测, 因而无法对完整细胞的内质网中钙信号进行检测。为此, 程和平实验室^[34]通过超表达肌浆网定位羧酸酯酶(endoplasmic/SR-targeted expression of carboxylesterase 2, srCES)实现了Fluo-5N在肌浆网中的定向富集, 并成功地在完整的小鼠(*Mus*)及大鼠(*Rattus*)心肌细胞中观测到了局部肌浆网钙信号。但由于胞质中仍存在有功能的内源AM酶, 使得胞质仍有部分Fluo-5N残留, 同时Fluo-5N的亲

力(K_d 值约为90 $\mu\text{mol/L}$)相对于内质网静息钙水平仍偏高. 常用的线粒体化学钙指示剂有单色的Rhod2, 其具备较低的钙亲和力($K_d=1.3 \mu\text{mol/L}$), 较大的动态范围(10), 应用最为广泛. Rhod2水解前带AM基团富含阳离子, 可富集于带负电荷的线粒体基质中, 用于线粒体钙信号的监测, 而mt-Fura-2通过连接亲脂性三苯基磷(triphenylphosphonium, TPP)阳离子, 可以选择性地积累在线粒体基质中, 并实现线粒体基质内 Ca^{2+} 的比值测量. 虽然mt-Fura-2动态范围较小(接近3), 但是比值信号能排除染料泄漏以及细胞运动造成的伪影等问题. 激发它的紫外光对线粒体的光毒性损伤较严重^[35-37]. 此外, AM在胞内被水解后的产物是对细胞功能存在潜在危害的乙酸盐和甲醛, 具有细胞毒性. 并且由于这些染料的费用较高, 加载操作较为繁琐, 且在胞内的驻留时间较短, 因而它们的在体应用比较受限. 对于溶酶体、内体等细胞器, 化学类钙指示剂可通过内吞的方式载入细胞, 并在腔内富集, 从而较为容易地实现细胞器定位. 然而, 这类细胞器腔内均处于酸性或偏酸性($\text{pH}=4.5\sim6$)环境, 化学探针的发光特性及 Ca^{2+} 结合能力会发生变化. 针对这一问题, 研究人员开发出耐酸或含有pH校正功能的化学类钙探针. 其中, BAPTA-5N($K_d=20 \mu\text{mol/L}$)在 $\text{pH}>6.0$ 时, 能够保持较高的稳定性, 用于早期内体($\text{pH}=6.0$)中钙信号的监测^[38]. 而在腔内pH更低的溶酶体($\text{pH}=4.5$)中, 早期常通过联合使用钙指示剂及pH指示剂, 以校正pH对钙探针的影响. 如有研究人员使用钙探针Fura Dextran(FuraDx)及pH探针Oregon Green Dextran(OGDx)的混合物检测HEK-293/HeLa细胞中pH变化及内质网钙信号对于溶酶体钙的影响^[39-41]. 尽管上述化学钙探针能够一定程度上屏蔽溶酶体腔内pH波动的影响, 反映真实钙水平的变化, 但由于很难控制每个溶酶体中两种指示剂的量, 因此, 无法在单细胞器水平上实现信号的校正. 为此, Narayanaswamy等人^[42,43]开发了一系列基于DNA的内体-溶酶体荧光钙指示剂——CalipHluor. 该工具分别将pH探针I-switch及钙探针Rhod-5F与互补的两条DNA单链融合, 并通过DNA杂交, 控制pH探针与钙探针的量始终保持1:1的比例. 在 $\text{pH}=4.6$ 时, CalipHluor_{Ly}的 K_d 值约为100 $\mu\text{mol/L}$, 适用于溶酶体钙信号的检测. 尽管如此, 目前CalipHluor无法实现在特定的组织中定位, 在注射后需要经过各种生物屏障, 限制了其在在体水平的应用^[44]. 关于其他化学类钙指示剂的详细

介绍, 可参看Pihán等人^[45]的综述.

与化学类钙探针相反, GECI具有导入简单、能在体长期存在、靶向性好等优点. GECI可以通过转基因的方式载入细胞, 并能以稳定表达的方式在细胞中长期存在. 还可以通过融合细胞器靶向序列, 实现在特定的细胞器中的精准定位(表1). 通过结合使用组织细胞特异性启动子和细胞器靶向序列, 以及多种转基因技术, GECI可以在特定细胞器及细胞中稳定长期表达, 从而使得在细胞、组织、器官乃至在体水平进行长时程的细胞器钙成像成为可能, 极大地推动了细胞器钙信号转导领域的科研进展.

GECI蛋白包含钙传感器(sensor)和钙报告子(reporter)两个元件(图2A). 基本原理是钙传感器结合或解离 Ca^{2+} 时发生构象变化, 并传递到报告子上, 使后者发光的颜色或强度发生变化. 因而可以用报告子的信号(signal, S)来指示钙信号.

GECI所使用的钙传感器有水母素(aequorin, AEQ)、钙调蛋白(calmodulin, CaM)及肌钙蛋白(troponin C, TnC)等含有EF-hand钙离子结合功能域的蛋白或人工设计的钙结合位点等几大类(图2B). 大多数GECI使用钙调蛋白及靶肽(CaM-binding region of chicken myosin light chain kinase, M13/RS20)或利用肌钙蛋白检测钙信号变化, 主要通过优化钙调蛋白及靶肽的互作界面改进其各项指标. 但是每个CaM上含有四个 Ca^{2+} 结合位点, 这导致荧光信号随钙信号浓度变化的线性化程度较差, 而截短后的TnC仅含两个 Ca^{2+} 结合位点, 相比之下线性度更高. 为了进一步提高其钙响应速度, 也有团队直接在荧光蛋白上设计 Ca^{2+} 结合位点. 这类直接含有钙结合位点的探针虽然有线性度高和反应快速的优点, 但目前的缺点是动态范围低和只有低亲和力版本. 为了降低过表达人源蛋白对内源生理活动的影响, 通过将两种水母蛋白GFP和Apo-aequorin融合得到胞浆指示剂GAP^[46], 不需要借助底物也可以监测钙信号, 但是动态范围也较小.

GECI中的钙传感器是CaM等钙结合蛋白, 这使得GECI有两大缺点. 首先, GECI也是一类钙螯合剂, 因而在高表达时有改变细胞 Ca^{2+} 稳态和动态的风险. 其次, 在静息时, 部分GECI中的CaM不与它的靶肽结合. 这部分游离态的CaM会结合细胞中的钙离子通道及钙依赖性酶在内的多种蛋白质, 改变它们的功能, 使得基因转录等多种钙调控的信号通路发生异常, 产生细胞

表 1 常见细胞器GECI靶向策略^{a)}

Table 1 Conventional targeting strategies for GECIs^{a)}

定位	N端	C端	参考文献
内质网腔	Calreticulin	KDEL	[77]
	Immunoglobulin Vh	KDEL	[72]
	1×COX [*] VIII	—	[62]
线粒体基质	2×COX [*] VIII	—	[63]
	4×COX [*] VIII	—	[64]
	1×COX [*] IV	—	[74]
高尔基体	N69 of ST [*]	—	[16]
	N32 of C2gnT [*]	—	[101]
	N81 of GT [*]	—	[99]
	phogrin	—	[102]
	VAMP2 [*]	—	[103]
囊泡	hCgA [*]	—	[106]
	tpA [*]	—	[111]
	TiVAMP [*]	—	[112]
溶酶体腔	CathD [*]	—	[98]
溶酶体外膜	TRPML1 [*]	—	[108]
	LAMP1 [*]	—	[110]

a) *, 英文缩写. 以下为缩写的全称: COX: cytochrome C oxidase; ST: sialyltransferase; C2gnT: 1,6 *N*-acetyl glucosaminyl transferase; GT: galactosyltransferase II; VAMP2: vesicle associated membrane protein 2; hCgA: human chromogranin A; TiVAMP: tetanus-insensitive vesicle-associated membrane protein; tpA: tissue plasminogen activator, CathD: cathepsin D; TRPML1: transient receptor potential mucolipin 1; LAMP1: lysosome associated membrane protein 1

毒性. 例如, GCaMP3和TN-XXL的过表达会干扰皮质锥体细胞和未成熟中间神经元的形态分化^[47], GCaMP的过表达会引发部分神经元死亡^[48]. GCaMP2^[49]转基因小鼠会发生心肌梗大^[50], GCaMP5G转基因小鼠的海马神经元的放电速率较高^[51], 多种表达GCaMP6的小鼠品系大脑神经元的活动异常^[52], 等等. 为了解决这类问题, 2018年刘晓冬团队在GCaMP3和GCaMP6的N末端引入一段apoCaM结合序列(apoCaM binding motif, CBM), 来封闭低钙时GCaMP中游离的CaM, 避免过表达的GECI中CaM对神经元L型钙通道等介导的钙信号通路的影响, 开发出了低细胞毒性的GCaMP-X^[53], 并进一步构建了反应更灵敏的jGCaMP7b-X^[54]. 该类低细胞毒性的工具在神经元分化发育等研究方向上展示出了很好的应用价值, 但目前此类GECI较少, 仍有待进一步丰富开发.

根据GECI的报告子颜色, 可以将其分为单色或双

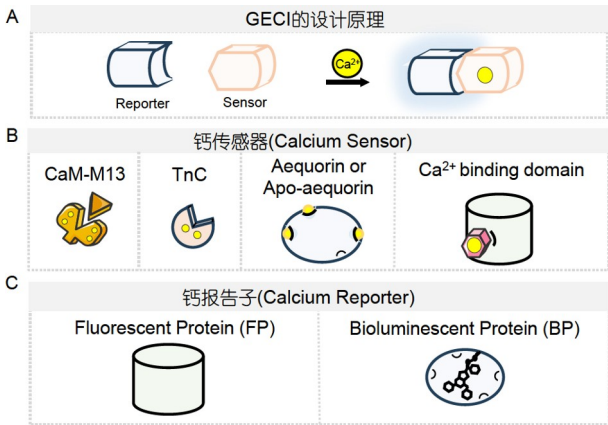


图 2 GECI设计原理示意图. A: GECI由钙报告子(reporter)和钙传感器(sensor)组成; B: 钙传感器的常见种类, 钙调蛋白(CaM, TnC)及其靶肽(如M13), 水母素(aequorin)或不结合底物的水母素(Apo-aequorin), 以及人工引入的钙结合域等几类; C: 钙报告子的常见种类: 荧光蛋白型(fluorescent protein, FP)和生物发光蛋白型(bioluminescent protein, BP)

Figure 2 Diagram illustrating the design principles of GECIs. A: GECI is composed of a Ca²⁺ reporter and a Ca²⁺ sensor; B: major types of Ca²⁺ sensors include calmodulin (CaM) and its target peptides (e.g., M13), troponin C (TnC), aequorin, or its substrate-free form (Apo-aequorin), as well as artificially introduced Ca²⁺-binding domains; C: major categories of Ca²⁺ reporters include fluorescent protein (FP) and bioluminescent protein (BP)

色型. 根据其发光原理的不同, 则又可以分为荧光型和生物发光型两大类(图2C). 单色荧光型指示剂通过在荧光蛋白中嵌入钙传感器构建而成(图3A), 在钙传感器结合或解离Ca²⁺的过程中, 其构象变化会导致荧光蛋白的发光效率改变, 因此可以用其荧光强度来直接反映钙浓度的变化. 这类探针的优势在于反应高度可逆, 并可以通过改变激发光强度来改变其本底信号强弱. 而且其光谱较窄, 反应幅度大. 而生物发光型GECI大多是基于水母素蛋白构建的(图3B). 水母素与钙结合后会分解其底物腔肠素并释放光子, 因而可以用其生物发光的强度来指示钙信号. 其优势在于不需要激发光, 因而几乎没有光毒性, 也没有串色问题. 且由于其来自于水母, 在其他动植物细胞中几乎没有同源蛋白, 因而对内源钙信号转导的干扰也较小. 生物发光型指示剂最大的缺点在于反应不可逆而且需要持续消耗底物, 难于实现长时程监测^[55]. 在内质网、高尔基体等这类Ca²⁺浓度较高的细胞器中使用, 静息情况下就会发光并持续消耗底物, 导致信号很快衰竭^[56]. 尽管可以通过对消耗速率进行计算并加以线性矫正^[57], 或者使用腔肠素类似物降低水母素对Ca²⁺的

亲和力等方式来延长测量的时间^[16], 但该缺点仍导致这类GECI难以长时程指示钙信号的变化. 它们另外的缺点是发光强度较低, 导致产生的信号较弱, 信噪比差. 这些缺点均限制了其应用范围.

单色报告子的问题均在于其本底信号(S_0)既与 Ca^{2+} 水平相关, 也与其自身的表达量或局部浓度成正比. 因此只含有单色报告子的GECI不能指示静息钙水平, 一般以 S/S_0 或 $(S-S_0)/S_0$ 的方式去掉报告子浓度不同所带来的差异, 只指示 Ca^{2+} 浓度的相对静息水平的变化. 为解决这一问题, 研究者开发出了双色GECI, 其中一个颜色是钙报告子, 另一个颜色或者是钙不敏感的参比报告子, 用来指示GECI表达量或局部浓度

(图3C); 或者也是钙报告子, 但其对钙的反应与第一个的相反, 其信号一般是随钙浓度增加而降低(图3C). 双色GECI利用两种颜色的报告子信号的比值来消除GECI表达量或局部浓度变化等的影响, 结合校正, 能直接指示 Ca^{2+} 的绝对浓度, 因而可用于钙稳态水平的检测.

荧光比值型GECI, 除利用可以发两种不同荧光的单个荧光蛋白构建的少数探针外, 通常是由两种荧光蛋白构成. 其中一种是通过在单色GECI上连接另一种对钙不敏感的参比荧光蛋白而构建的, 其优点是动态范围大一些, 缺点是光谱比较宽(图3C). 另一种特殊的比值型钙探针是福斯特共振能量转移型(Förster reso-

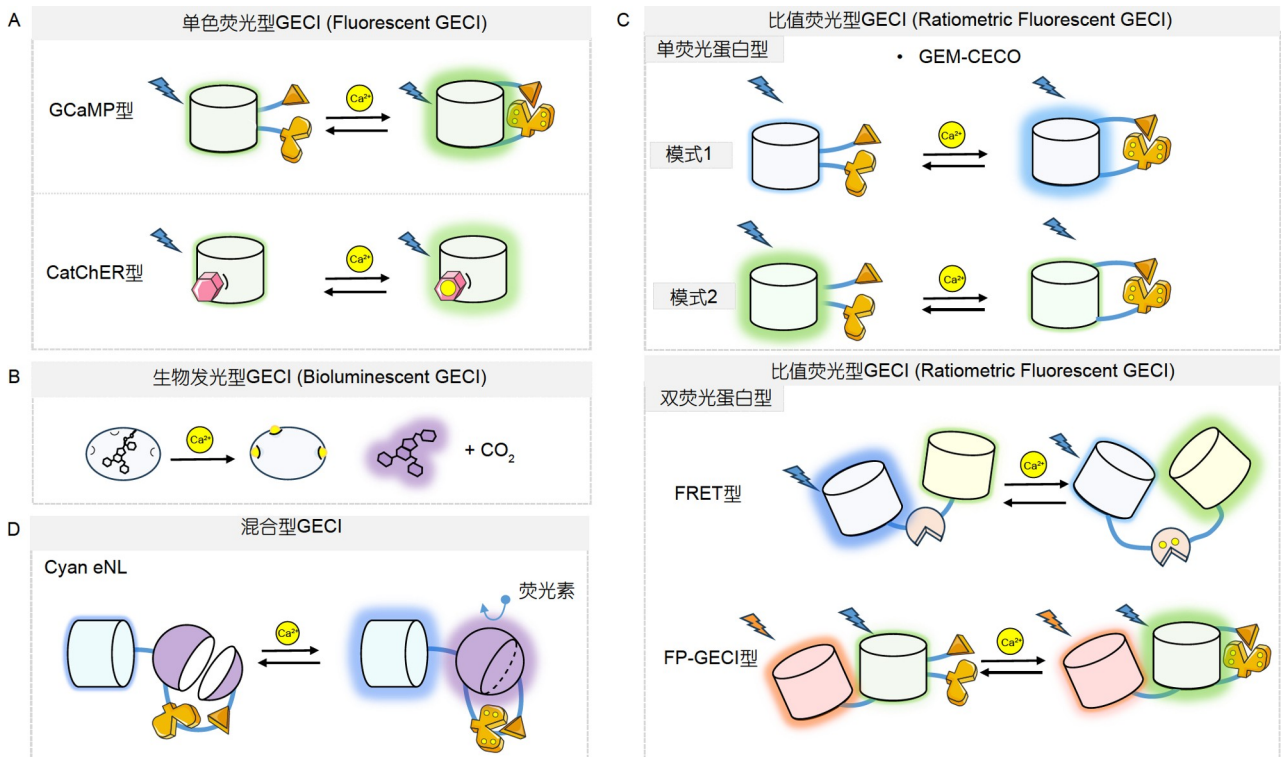


图 3 常见GECI分类示意图. A: 单色荧光型GECI典型代表有利用cpEGFP通过CaM-M13响应钙活动的GCaMP系列以及利用EGFP含钙结合位点的CatChER系列; B: 生物发光型GECI典型代表为自身有钙结合位点的水母素; C: 比值荧光型GECI分为单荧光蛋白型和双荧光蛋白型, 前者的典型代表为单激发双发射的GEM-GECO, 后者的典型代表为基于FRET原理利用荧光蛋白mCerulean3和cpVenus通过Tnc响应钙活动开发的Twitch2B和利用荧光蛋白GCaMP连接上参比蛋白mKate构建的miG6m; D: 混合型GECI典型代表有利用mTurquoise2, Nluc和钙传感结构域CaM-M13构建的Cyan enhanced Nano-lantern (eNL)

Figure 3 Major classes of GECIs. A: Monomeric fluorescent GECIs, represented by the classical GCaMP series that utilizes CaM-M13 as the Ca^{2+} sensor, and also by the CatChER series that employ Ca^{2+} -binding sites engineered into fluorescent proteins; B: bioluminescent GECIs. Aequorin that possesses intrinsic calcium-binding sites is shown as an example; C: ratiometric fluorescent GECIs has two subclasses, one contains single fluorescent protein and the other type has two-fluorescent proteins. GEM-GECO serves as a typical example of the former, exhibiting single excitation and dual emission characteristics. The latter is showcased by Twitch2B, a FRET based GECI, and miG6m, constructed by linking the monomeric fluorescent GECI with a reference fluorescent protein; D: hybrid GECIs. Cyan enhanced Nano-lantern (eNL) is shown as an example. It is constructed by a fluorescent protein mTurquoise2, the bioluminescent protein Nluc, and the calcium-sensing domain CaM-M13

nance energy transfer, FRET)型GECI. 它可以通过串联在钙传感器两端的供受体荧光蛋白之间的FRET信号来直接指示钙浓度及其变化, 其缺点在于动态范围较小. 还有一类特殊的可用作比值成像的钙探针是生物发光共振能量转移(bioluminescence resonance energy transfer, BRET)型GECI, 原理类似FRET型指示剂, 但使用的供体是发光蛋白, 如水母素或荧光素酶, 不需要外部光激发的荧光蛋白(图3D).

目前已经通过将胞质GECI添加靶向序列及进行其他改造, 开发出了许多特异性定位于线粒体、内质网、高尔基体、细胞内囊泡以及溶酶体等细胞器的GECI(表2). 跟胞质GECI一样, 细胞器钙探针也需要高动态范围, 以获得对钙信号幅度更好的解析能力. 此外, 各种细胞器中所特有的环境, 构成了细胞器钙探针开发所面临的挑战.

2.1 线粒体GECI

优良的线粒体基质GECI应该具备以下特点: (i) 定位准确: 单荧光钙指示剂一般都可以被准确转运到线粒体基质中, 但是双荧光钙指示剂如FRET指示剂, 难以准确定位在线粒体基质中, 原因可能是由于分子量较大的指示剂结构较为复杂, 阻碍其向线粒体基质定位^[58]; (ii) 能指示较大的 Ca^{2+} 浓度变化: 线粒体基质静息钙浓度在亚微摩尔级^[55], 产生钙信号后浓度可高达几百微摩尔, 跨度可达1000倍, 因此指示剂的钙亲和力是否合适是线粒体指示剂开发过程需要考虑的问题; (iii) 对偏碱性的pH波动不敏感: 线粒体基质的pH值估计为8.0^[59], 生理活动中线粒体基质pH会发生波动, 例如“线粒体炫”的发生会伴随基质pH碱化等, 因此pH敏感性是影响线粒体GECI开发的另一个重要因素; (iv) 较亮的荧光强度: 光毒性在荧光成像过程中普遍存在, 产生原理是荧光蛋白发色团从基态跃迁到三线态后会产生活性氧(reactive oxygen species, ROS), 迅速破坏线粒体内嵴, 使线粒体发生肿胀、变圆^[60]. 为了尽可能降低光毒性的破坏, 主要途径是减少作用在样品上由激发光强和曝光时间决定的光剂量, 通过降低光强度和缩短曝光时间可以减轻光毒性发生^[61]. 因此静息荧光较亮的线粒体钙指示剂更适用于线粒体钙信号检测.

(1) 生物发光型线粒体GECI. 1992年, Rizzuto等人^[55]将水母素的N端融合入源细胞色素C氧化酶VIII

(subunit VIII of human cytochrome C oxidase, COX VIII) 信号肽, 构建了mtAeq, 并监测了活细胞内ATP引发的线粒体钙信号的增加. 水母素用于线粒体钙信号监测的最大优势是不需要外部激发光, 可以避免光毒性的发生, 同时在偏碱性环境中光信号稳定, 不易受到pH波动的影响. 然而其缺点是发出的光信号弱, 并且会持续消耗底物因而反应的可逆性差, 因此未能在之后的研究中得到广泛应用.

(2) 荧光型线粒体GECI. (i) FRET型. 为了监测线粒体钙水平变化, 2001年, Demaurex实验室^[62]通过融合单个COX VIII信号肽, 基于低钙亲和力FRET型指示剂Cameleons构建了几种线粒体定位的钙探针, 如YC2mt, YC3.1mt和YC4.1mt. 但这一系列的工具定位特异性差, 在细胞中有较为明显的胞浆分布. 为此, Tullio Pozzana和钱永健实验室^[63,64]先后通过增加COX VIII重复数(2×, 4×, 6×, 8×), 开发了如2mt8YC2, 2mtD2cpv, 4mtD1cpv等一系列FRET型指示剂. 其中8×COX VIII设计的线粒体基质靶向性最好, 仅有1%的胞质分布. 但是该探针的细胞毒性大, 表达钙探针的细胞线粒体呈圆形, 并大量死亡. 而采用4×COX VIII版本的YC系列通过牺牲部分定位特异性(20%的胞质分布)来获得了更小的细胞毒性, 应用较广. 为了达到能与Fura-2胞浆化学钙探针同时成像的目的, 2012年Malli实验室^[65]利用OFP蛋白变体mKO_k和cp173-mEGFP替换掉ECFP和EYFP并使用D1ER的钙传感器, 构建了线粒体基质定位的D1GO-Cam. 通过与Fura-2联用, 成功实现了对胞质与线粒体基质中钙信号的同步监测. 研究发现, 线粒体钙信号滞后于胞浆中的钙信号, 表明胞质 Ca^{2+} 浓度达到一定阈值时, 线粒体才能摄取 Ca^{2+} . 当前的线粒体FRET指示剂存在的问题是主要是钙响应范围小, 不适用于监测线粒体发生微小信号的变化.

(ii) 单荧光型. 研究者们基于GCaMP和GECO等胞浆钙指示剂, 构建出了高钙亲和力的线粒体靶向单荧光指示剂, 如GCaMP2mt, mito-GCaMP2, mito-GCaMP5G, mito-GCaMP6s等^[66~70]. 其中mito-GCaMP6s的体外动态范围高达62, 较FRET型指示剂动态范围有了较大提升. 以上基于GCaMP设计的线粒体基质GECI已经用于检测心肌细胞、星形胶质细胞等多种细胞类型中线粒体钙信号, 解析钙信号调控的生理及病理活动机制. 而基于红色LAR-GECO1.2开发

表 2 常见细胞器GECI特征参数^{a)}

Table 2 Characteristics of organellar GECIs^{a)}

定位	类型	名称	钙亲和力 ($\mu\text{mol/L}$)	希尔系数	动态 范围	钙传感器	钙报告子	激发峰 (nm)	发射峰 (nm)	参考 文献
内质网腔	生物发光	AEQER	13	—	—	Aequorin	Aequorin	—	466	[57]
	生物发光	AEQ-D119A	260	—	—	Aequorin	Aequorin	—	466	[57]
	生物发光	ER-2mutAEQ	—	—	—	Aequorin	Aequorin	—	466	[76]
	FRET	YC3er	4.4	0.76	—	CaM, M13	ECFP, EYFP	430	475, 525	[77]
	FRET	YC4er	0.083, 700	1.5, 0.87	—	CaM, M13	ECFP, EYFP	430	475, 525	[77]
	FRET	apoK1er	124	1.148~1.245	—	kringle	ECFP, EYFP	430	475, 525	[82]
	FRET	D1ER	0.81, 60	1.18, 1.67	—	CaM, M13	ECFP, Citrine	430	477, 529	[78]
	FRET	D4ER	195	—	—	CaM, M13	ECFP, Citrine	430	477, 529	[64,113]
	FRET	D1ERCmR2	215.9	0.5	~0.11	CaM, M13	Clover, mRuby2	490	510, 560	[80]
	FRET	split-YC7.3er	130	1.4	—	CaM, M13	ECFP, Citrine	430	477, 529	[81]
	FRET	T1ER	—	—	—	CaM, M13	mTurquoise, Citrine	434	474, 529	[114]
	单荧光型	G-CEPIA1er	672	1.95	4.7	CaM, M13	cpEGFP	498	512	[72]
	单荧光型	R-CEPIA1er	565	1.7	8.8	CaM, M13	cpmApple	561	584	[72]
	单荧光型	ER-LAR-GECO1	24	1.3	10	CaM, M13	cpmApple	574	598	[71]
	单荧光型	GCaMPER(10.19)	400	1.9	14	CaM, M13	cpEGFP	498	512	[84]
	单荧光型	CatchER	180	0.94	~3.8	钙结合位点	EGFP	395, 488	510	[88]
	单荧光型	ER-GCaMP6-150	150	1.6	45	CaM, M13	cpEGFP	498	512	[85]
	单荧光型	ER-GCaMP6-210	210	1.6	48	CaM, M13	cpEGFP	498	512	[85]
	单荧光型	ER-GCaMP3-44	44	1.1	13.1	CaM, M13	cpEGFP	498	512	[85]
	单荧光型	GCaMP-ER2	388	—	40	CaM, M13	cpEGFP	498	512	[86]
	单荧光型	R-CatChER	361	0.98	4.2	钙结合位点	mapple	~560	~590	[90]
	单荧光型	G-CatChER ⁺	1200	—	1.6	钙结合位点	EGFP	496	513	[89]
	比值型	GEM-CEPIA1er	558	1.37	21.7	CaM, M13	cpEGFP	381, 394	462, 510	[72]
	比值型	Ca-G1-ER	800	1	1.8	钙结合位点	EGFP	398, 490	510	[87]
	比值型	miGer	425	1.7	—	CaM, M13	cpEGFP, mKate	498, 588	510, 635	[75]
	比值型	GCEPIA1-SNAPER	514	1.26	—	CaM, M13	cpEGFP, SNAP	488, 652	512,670	[91]
	比值型	erGAP1	12	1	2.7	Aequorin	GFP, Aequorin	403, 470	510	[46]
	比值型	erGAP2	407	1	—	Aequorin	GFP, Aequorin	403, 470	510	[92]
	比值型	erGAP3	489	0.9	—	Aequorin	GFP, Aequorin	403, 470	510	[92]
	混合型	CeNL	110	2.18	1.08	CaM, M13	Nluc, mTurquoise2	—	475	[115]
	混合型	ReBLICO	1576, 1526	—	11, 2.4	CaM, M13	cpmApple, NBit	—, 576	450, ~600	[93]
线粒体 基质	生物发光	mtAeq	—	—	—	Aequorin	Aequorin	—	466	[55]
	FRET	YC2mt	1.24	0.79	—	CaM, M13	EGFP, EYFP	433	475, 529	[62]
	FRET	YC3.1mt	3.98	0.67	—	CaM, M13	EGFP, EYFP	433	475, 529	[62]
	FRET	YC4.1mt	0.105, 104	0.81, 0.62	—	CaM, M13	EGFP, EYFP	433	475, 529	[62]
	FRET	2mt8YC2	1.24	—	—	CaM, M13	EGFP, EYFP	433	475, 528	[63]
	FRET	2mt8YC2.1	1.24	—	—	CaM, M13	EGFP, EYFP	433	475, 528	[63]
	FRET	2mt8YC2.12	1.24	—	—	CaM, M13	EGFP, EYFP	433	475, 528	[63]
	FRET	2mt8YC2.3	1.24	—	—	CaM, M13	EGFP, EYFP	433	475, 528	[63]
	FRET	2mtD1cpv	—	—	—	CaM, M13	ECFP, cpVenus	433	475, 528	[116]
	FRET	2mtD2cpv	0.097, 7.67	1.34, 0.77	5.3	CaM, M13	ECFP, cpVenus	433	475, 528	[64]
	FRET	2mtD3cpv	0.76	0.74	5.1	CaM, M13	ECFP, cpVenus	433	475, 528	[64]
	FRET	2mtD4cpv	49.68	1.35	3.8	CaM, M13	ECFP, cpVenus	433	475, 528	[64]
	FRET	4mtD1cpv	—	—	—	CaM, M13	ECFP, cpVenus	433	475, 528	[117]

(表2续1)

定位	类型	名称	钙亲和力 ($\mu\text{mol/L}$)	希尔系数	动态 范围	钙传感器	钙报告子	激发峰 (nm)	发射峰 (nm)	参考 文献
线粒体 基质	FRET	4mtD3cpv	0.76	0.74	5.1	CaM, M13	ECFP, cpVenus	433	475, 528	[64]
	FRET	D1GO-Cam	1.53	—	—	CaM, M13	cpEGFP, mKOk	477	510, 560	[65]
	单荧光型	GCaMP2mt	0.124	—	—	CaM, M13	cpEGFP	488	510	[67]
	单荧光型	mito-GCaMP2	0.2	—	—	CaM, M13	cpEGFP	488	510	[66]
	单荧光型	mito-GCaMP6s	0.14	2.9	63.2	CaM, M13	cpEGFP	497	515	[69]
	单荧光型	2mtGCaMP6m	0.17	2.96	38.1	CaM, M13	cpEGFP	497	515	[68]
	单荧光型	CEPIA2mt	0.16 ^{a)}	—	1.7 ^{a)}	CaM, M13	cpEGFP	487	508	[72]
	单荧光型	CEPIA3mt	11 ^{a)}	—	1.6 ^{a)}	CaM, M13	cpEGFP	487	508	[72]
	单荧光型	CEPIA4mt	59 ^{a)}	—	1.5 ^{a)}	CaM, M13	cpEGFP	487	508	[72]
	单荧光型	mitGC3	0.542	2.73	12	CaM, M13	cpEGFP	497	515	[118]
	单荧光型	mito-GCaMP5G	0.46	2.46	45.4	CaM, M13	cpEGFP	497	515	[69]
	单荧光型	4mt-GCaMP	—	—	—	CaM, M13	cpEGFP	497	515	[119]
	单荧光型	mitochondrial R-GECO1	0.48	2.06	16	CaM, M13	cpmApple	561	589	[120]
	单荧光型	mt-LAR-GECO1.2	12	1.4	8.7	CaM, M13	cpmApple	557	584	[71]
	单荧光型	R-GECO1mt	0.14 ^{a)}	2.12 ^{a)}	8.8 ^{a)}	CaM, M13	cpmApple	562	584	[72]
	单荧光型	R-CEPIA3mt	3.3 ^{a)}	8.9 ^{a)}	0.93 ^{a)}	CaM, M13	cpmApple	562	584	[73]
	单荧光型	R-CEPIA4mt	21 ^{a)}	4.7 ^{a)}	1.86 ^{a)}	CaM, M13	cpmApple	562	584	[73]
	单荧光型	GCaMP3.0mito	0.151 ^{a)}	—	4.8 ^{a)}	CaM, M13	cpEGFP	497	515	[70]
	单荧光型	mito-Case12	12	1	—	CaM, M13	cpEGFP	491	516	[121]
	单荧光型	Mitycam-E31Q	1.8	—	—	CaM, M13	cpEYFP	498	515	[122]
	单荧光型	Mitycam-E67Q	0.255	—	—	CaM, M13	cpEYFP	498	515	[123]
	单荧光型	mtCamgaroo-2	5.3	7	1.24	CaM	cpEYFP	490	515	[99]
	单荧光型	2mt8CG2	5.3	7	1.24	CaM	cpEYFP	490	515	[63]
	比值型	mitGAP	0.2	1	—	Aequorin	GFP, Aequorin	403, 470	510	[46]
	比值型	mt-riG6m	0.25	1.3	26	CaM, M13	cpEGFP, mKate	498, 588	510, 635	[75]
	比值型	mito-GEM-GECO1	0.34	2.94	110	CaM, M13	cpEGFP	390	455, 510	[124]
	比值型	Ratio- Pericam-mt	1.7	1.1	—	CaM, M13	cpEYFP	415, 494	517	[74]
	比值型	RP3.1mt	—	—	—	CaM, M13	cpEYFP	410, 480	510	[125]
高尔基 体腔	生物发光	GoAEQmut	—	—	—	Aequorin	Aequorin	—	466	[16]
	生物发光	cGo-GA/tGo-GA	—	—	—	Aequorin	Aequorin	—	466	[126]
	FRET	GT-YC3.3	1.5	—	—	CaM, M13	ECFP, Citrine	433	475, 529	[99]
	FRET	Go-D1cpv	—	—	—	CaM, M13	ECFP, Citrine	433	475, 529	[100]
	FRET	medialGO-D1cpv	27.4	—	—	CaM, M13	ECFP, Citrine	433	475, 529	[101]
	比值型	goGAP1	12	1	4	Aequorin	GFP varian	403, 470	510	[46]
囊泡	生物发光	phogrin-AEQ	—	—	—	Aequorin	Aequorin	—	466	[102]
	FRET	phogrin-Ycam2	—	—	—	CaM-M13	—	433	475	[107]
	生物发光	VAMP2-mutAEQ	—	—	—	Aequorin	Aequorin	—	466	[103]
	生物发光	hCgA-AEQ	—	—	—	Aequorin	Aequorin	—	466	[106]
	FRET	D1-SG	—	—	—	CaM-M13	—	433	475, 529	[111]
	比值型	TiVAMP- GEM-GECO-1	—	—	—	CaM, M13	cpEGFP	390	453, 513	[112]
溶酶体	生物发光	CathD-mutAEQ	—	—	—	Aequorin	Aequorin	—	466	[98]
溶酶体 外膜	单荧光型	GCaMP3-ML1	—	—	—	CaM, M13	cpEGFP	498	512	[108]
	单荧光型	GECO-ML1	—	—	—	CaM, M13	cpEGFP	498	512	[109]
	FRET	LAMP1-YCaM	—	—	—	CaM, M13	ECFP, EYFP	430	475, 525	[110]

a) pH=8时测定的数据

的线粒体指示剂具有较低的钙亲和力, 利用mt-LAR-GECO1.2^[71]和Fura-2可以同时监测海马神经元线粒体钙信号和胞质钙信号. 2014年报道的CEPIA系列探针中, 通过在cfGCaMP2的CaM上引入E31D以及E31D/F92W/D133E突变, 构建了包含CEPIA2mt, CEPIA3mt, CEPIA4mt在内的具有不同钙亲和力的绿色线粒体基质GECI^[72], 它们在pH=8的溶液中钙亲和力分别为0.16, 11, 59 $\mu\text{mol/L}$, 适用于检测不同 Ca^{2+} 动态范围的线粒体基质钙信号变化, 可通过多色成像同时监测胞浆、内质网以及线粒体 Ca^{2+} 活动. 但是它们的荧光对pH在8附近的波动比较敏感. 而2020年开发的红色R-CEPIA3mt^[73], pKa约为6.5, 对线粒体基质pH的生理性波动更不敏感, 借助光控工具Opto- α 1AR-YFP成功检测到线粒体基质钙信号增加. 但是目前单色线粒体GECI静息荧光较弱, 而高激发光强对细胞有光毒性, 不利于长时程检测其中的钙信号.

(iii) 比值型. 2001年, Miyawaki 实验室^[74]将cpEYFP与CaM-M13融合表达, 获得了Pericam并在此基础上构建了线粒体定位的Ratio-Pericam-mt. Ca^{2+} 结合后, Pericam最佳激发波长可以从494 nm移动到418 nm, 因此可以通过比值成像监测线粒体基质钙信号变化, 但其动态范围较小. 为了提高动态范围, 2020年研究者将RFP与GCaMP6m相连并于线粒体定位序列融合构建了mt-riG6m, 它可以实现对线粒体钙水平进行比值监测, 胞内动态范围高达26^[75], 但当前的比值型钙指示剂的线粒体定位不够准确, 呈现部分的胞质分布, 因而其信号会部分受到胞浆钙波动的干扰.

2.2 内质网GECI

跟线粒体GECI相比, 内质网GECI的特异性靶向性比较容易达到. 在添加常见的内质网靶向序列如Calreticulin或Immunoglobulin Vh的N端靶向肽以及内质网驻留序列KDEL(表1)之后, GECI均能呈现很好的内质网定位. 由于肌质网参与肌肉细胞的兴奋-收缩偶联活动, 其 Ca^{2+} 信号动力学在毫秒级别, 因此开发内质网GECI的一个挑战是提高其反应速度. 而内质网腔内游离钙浓度高达500~1000 $\mu\text{mol/L}$, 因此获得钙亲和力足够低的钙传感器是构建内质网定位GECI的最大挑战. 相应的构建或优化策略主要是通过点突变降低胞质版GECI钙传感器的钙亲和力, 或直接在荧光蛋白上引入钙结合位点等方式.

(1) 生物发光型内质网GECI. 1992年, Kendall等人^[57]首次将水母素靶向到内质网腔, 检测到内质网在受到离子霉素刺激前后, Ca^{2+} 水平从5 $\mu\text{mol/L}$ 降到1 $\mu\text{mol/L}$, 实现了对内质网钙信号的监测. 但是无论是野生型水母素的钙亲和力($K_d=13 \mu\text{mol/L}$)或其低亲和力突变体(AEQ-D119A, $K_d=0.26 \text{ mmol/L}$), 都达不到能准确指示内质网静息钙水平(500~1000 $\mu\text{mol/L}$)的程度. 2013年, de la Fuente等人^[76]通过双突变D119A和N28L进一步降低水母素的钙亲和力, 获得了ER-2mutAEQ, 发现超过50%的HeLa细胞内质网钙水平大于1 mmol/L. 该类探针的问题是它们在结合钙后需要消耗外源性底物腔肠素才能发光. 因而在实验前需要一定的底物孵育时间, 以便让足量的腔肠素进入细胞, 保证水母素通过生物发光来指示钙信号, 操作较为繁琐. 由于内质网钙水平高, 水母素在静息时就会持续消耗底物而发光, 使底物浓度下降而导致水母素发光强度的持续衰减, 导致最多只能进行十多分钟的记录. 而且在实验后还需要对持续衰减的发光信号进行校正, 去掉因底物消耗带来的假象. 这些缺陷使得其应用不广, 下述荧光型GECI则更适用于内质网钙信号的检测.

(2) 荧光型内质网GECI. 该类探针多数使用CaM作为钙传感器, 其研发难度主要集中在如何降低它的钙亲和力上. CaM中含有四个EF-hand结构域, 每个EF-hand的loop区可结合1个 Ca^{2+} (图4A). 每个loop区均由12个氨基酸组成, 其中第1, 3, 5, 7, 9, 12位氨基酸参与结合 Ca^{2+} . 它们主链或侧链上的氧, 以及一个水分子中的氧与loop中的 Ca^{2+} 形成7个五角双锥形中的配位键(图4B). 研究者经近20年的尝试和努力, 发现通过对于CaM的loop区中上述 Ca^{2+} 结合氨基酸, 特别是第12, 3, 1和5位的酸性氨基酸, 进行点突变, 是降低其钙亲和力的最有效的方式(图4C, 表3). 此外, 对loop区的邻近氨基酸进行突变, 也可以对其钙亲和力进行微调. 在CaM其他部位, 以及CaM与其靶肽界面上的突变, 则可以改善其反应速度和动态范围.

(i) FRET型. 1997年, 在胞浆FRET型指示剂Yellow Cameleon-2(YC2)的基础上, 钱永健实验室对其CaM第一或第三loop区的第12位AA进行了E104Q或E31Q 突变, 构建了名为YC3er($K_d=4.4 \mu\text{mol/L}$)和YC4er(K_d 最低可达700 $\mu\text{mol/L}$)两种内质网钙指示剂^[77]. 之后利用这些探针测定了内质网静息 Ca^{2+} 水平

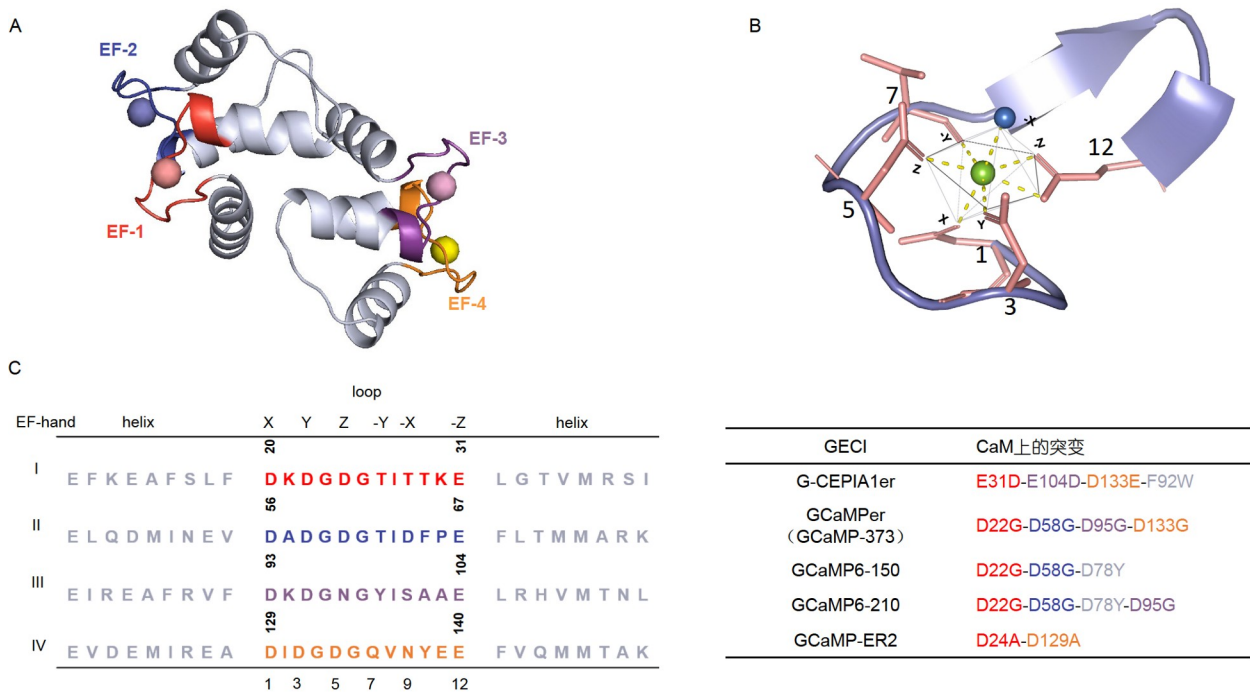


图4 经典钙传感器CaM及EF-hand结构示意图及关键钙亲和力改造位点。A: NCaMP7结合 Ca^{2+} 后CaM结构示意图。CaM中含有四个EF-hand结构, 每个EF-hand结合一个 Ca^{2+} ; B: EF-Loop区螯合 Ca^{2+} 成五角双锥形。Loop区的第1, 3, 5, 7, 12位氨基酸(粉色)直接提供配基, 第9位氨基酸通过氢键结合的水分子(蓝色球体)提供配基。与 Ca^{2+} (绿色球体)螯合的配体分布在正交坐标系中: 1(+X), 3(+Y), 5(+Z), 7(-Y), 9(-X), 12(-Z); C: CaM中四个EF-hand结构由29位氨基酸组成。Loop区(12氨基酸)连接E-helix及F-helix。通过对loop区或CaM其他位点氨基酸进行突变, 降低钙亲和力, 构建适用于内质网的钙指示剂

Figure 4 Structure of a typical Ca^{2+} -bound CaM and EF-hand, along with key Ca^{2+} affinity-modifying residues within the loop regions of EF-hands. A: Cartoon illustration of structure of the Ca^{2+} -bound CaM in NCaMP7. CaM contains four EF-hand motifs, each binding one Ca^{2+} ion; B: enlarged view of one EF-Loop region showing Ca^{2+} -chelating molecular bonds take a form of pentagonal bipyramids. Residues at positions 1, 3, 5, 7, and 12 (highlighted in pink) in the loop region directly provide ligand bonds, while the amino acid at position 9 interacts with a water molecule (blue sphere) through hydrogen bonding (blue lines) to provide a ligand bond. The ligands coordinating with Ca^{2+} (green spheres) are distributed in an orthogonal coordinate system: 1 (+X), 3 (+Y), 5 (+Z), 7 (-Y), 9 (-X), 12 (-Z); C: each of the EF-hand domain in CaM consists of 29 amino acids. The loop region (12 amino acids) connects the E-helix and F-helix. By mutating amino acids in the loop region or other sites of CaM, the Ca^{2+} affinity can be reduced, facilitating the construction of GECIs suitable for the endoplasmic reticulum

的范围(60~400 $\mu\text{mol/L}$)。该团队在2001年使用另外一种降低钙亲和力的策略, 将位于CaM-靶肽互作界面上负责盐桥的氨基酸的三个氨基酸进行突变(表3), 得到了钙亲和力降低的D1ER^[78]。后来他们又进一步通过计算机辅助设计, 改造CaM-靶肽互作界面, 获得了D2-D4版本的CaM-M13钙传感器及相应的D4cpv内质网钙探针($K_d=60 \mu\text{mol/L}$)和D4ER($K_d=195 \mu\text{mol/L}$)^[64]。Greotti等人^[79]对D4ER进行了进一步测试。Waldeck-Weiermair等人^[80]将D1ER中的青色和黄色荧光蛋白FRET对替换为光毒性整体更小的绿色(Clover)和红色(mRuby2)荧光蛋白, 得到了D1ERCmR2, 并成功检测活细胞内质网 Ca^{2+} 活动。此外, Ishii等人^[81]在Cameleon的CaM中第一个loop区的第12位氨基酸进行了降低钙

亲和力的E31D突变, 并将该突变体拆分为ECFP-CaM和M13-Citrine两部分, 分别连接内质网靶向序列, 构建了split-YC7.3er。该工具的动态范围也较小, 体外检测仅有0.11左右。

上述基于CaM-M13的FRET型内质网GECI的钙亲和力和都偏高, 动态范围也偏小。他们也都含有干扰内源钙信号系统的CaM。为此Osibow等人^[82]将自身不与 Ca^{2+} 结合的apolipoprotein(a)的kringle结构域作为“间接”的钙传感器, 在其两端分别连接青色和黄色荧光蛋白作为FRET工具对, 开发了apoK1er。apoK1er真正的钙传感器是钙网蛋白这种内质网钙结合蛋白。细胞内源的钙网蛋白及二硫键异构酶以钙依赖的方式与apoK1er中的kringle结构域结合并改变其构象, 进而引发apo-

表 3 CaM-M13中用于降低GECI钙亲和力的突变
Table 3 Reported mutations in CaM-M13 that reduce Ca^{2+} affinities of GECIs

钙指示剂	CaM					RS20	模板	钙亲和力 ($\mu\text{mol/L}$)	动态 范围
	Loop1 20~31 aa	Loop2 56~67 aa	Loop3 93~104 aa	Loop4 129~140 aa	其他				
D1-ER	—	—	—	—	E11K/E84R/E87K	—		0.81, 60	—
D2	—	—	—	—	F68L/M72L	A13I		0.8, 28	—
D3	—	—	—	—	F19L/V35A/M36L	I14F		1.2	—
D4	—	—	—	—	F92A/V108A/L112I	V11W		195	—
LAR-GECO1	—	—	—	—	N53S/D78Y/F92A/ V108A/L112I	V11W	R-GECO1	24	10
LAR-GECO1.2	K21E	—	—	—	—	NSI/A7R	R-GECO1.2	12	8.7
YC3er	—	—	E104Q	—	—	—		4.4	—
YC4er	E31Q	—	—	—	—	—	Cameleon	0.083, 700	—
split-YC7.3er	E31D	—	—	—	—	—		130	—
CEPIA1er	E31D	—	E104D	D133E	F92W	—	cfGCaMP2	368	4.2
G-CEPIA1er	E31D	—	E104D	D133E	F92W	—	G-GECO1.1	672	4.7
R-CEPIA1er	E31D	E67D	E104D	D133E	F92W	—	R-GECO1	565	8.8
GEM-CEPIA1er	E31D	—	—	D133E/E140D	F92W	—	GEM-GECO1	558	21.7
GCaMPer	D22G	D58G	D95G	D133G	—	—	GCaMP3	373	14
GCaMP6-150	D22G	D58G	—	—	D78Y	—		150	—
GCaMP6-210	D22G	D58G	D95G	—	D78Y	—	GCaMP6f	210	—
GCaMP-ER2	D24A	—	—	D129A	—	—	GGECO1.2	388	40

K1er探针FRET信号变化以指示钙信号. 该工具的优势在于它本身不与 Ca^{2+} 结合, 因此在细胞中过表达不会影响内质网中游离 Ca^{2+} 的生理活动, 但是缺点是依赖内源蛋白, 且含有很多巯基, 因而对内质网的氧化还原状态十分敏感.

由于FRET型内质网GECI具有光谱比较宽, 动态范围较小等缺点, 近年来研究者们逐步将重心转移到光谱更窄, 动态范围更大的单荧光内质网GECI的开发与优化上.

(ii) 单荧光型. 类似的, 研究者在GCaMP或GECO系列胞浆单色GECI探针的基础上, 引入降低钙亲和力的点突变, 获得了单荧光性内质网GECI. 2014年, Iino团队^[72]构建的CEPIA1er系列蛋白是目前应用十分广泛的内质网钙指示蛋白. 他们首先用D1ER的CaM-M13替换掉GCaMP2的钙传感器, 获得了钙亲和力降低至 $14.5\ \mu\text{mol/L}$ 的cfGCaMP2. 在此基础上, 继续在钙调蛋白上引入前期研究发现的能降低其钙亲和力的突变并引入新的突变, 如EF-hand区域“-Z-position”即第12个氨基酸残基E突变成Q/D可以显著降低钙亲和力,

以及能抑制CaM上IV位点上 Ca^{2+} 结合的F92W/D133E突变等^[77,81,83](图4), 获得了一组低钙亲和力且动态范围有改善的CEPIA多色指示剂, 包含红色荧光R-CEPIA1er($K_d=565\ \mu\text{mol/L}$, $F_{\text{max}}/F_{\text{min}}=8.8$)、绿色荧光G-CEPIA1er($K_d=672\ \mu\text{mol/L}$, $F_{\text{max}}/F_{\text{min}}=4.7$). G-CEPIA1er是当前灵敏度、反应速度和动态范围三个指标均较为优秀的内质网GECI. 利用钙亲和力较低的比值型GEM-CEPIA1er, 监测到内质网静息钙水平高达 $500\sim700\ \mu\text{mol/L}$, 同时由于GEM-CEPIA1er的钙动态范围较之前的FRET型指示剂得到极大的提升, 可以灵敏地指示D1ER难以检测到 $10\ \mu\text{mol/L}$ 组胺引发的胞浆钙振荡所对应的内质网钙振荡^[72].

近十年来, 其他实验室也陆续报告了基于GECO或GCaMP3为蓝本而改造的内质网GECI, 如对R-GECO1中钙结合位点进行随机诱变和定点诱变得到了ER-LAR-GECO1^[71], 动态范围为10左右, 但是 K_d 值仅为 $24\ \mu\text{mol/L}$, 钙亲和力不够低. 与GCaMP3相比, GCaMPer(10.19)^[84]的CaM的前三个loop区的第三位氨基酸和第四个loop区的第五位氨基酸被突变为甘氨酸

酸(D22G/D58G/D95G/D133G), K_d 降低至400 $\mu\text{mol/L}$. 利用GCaMP6(10.19)可以监测到从多功能干细胞诱导分化成的心肌细胞自发跳动期间, 内质网周期性的 Ca^{2+} 释放. 为了检测神经元轴突区域内质网中的快速钙活动, Ryan实验室^[85]改用反应更快的GCaMP6f作为模板, 在它的CaM中引入同GCaMP6一样的降低钙亲和力的四个点突变, 获得了ER-GCaMP6-210($K_d=210 \mu\text{mol/L}$), 或仅将前两个loop区的第三位天冬氨酸突变为甘氨酸(D22G/D58G), 获得了ER-GCaMP6-150($K_d=150 \mu\text{mol/L}$). 用该探针测得的神经元静息钙水平约为150 $\mu\text{mol/L}$. 两者的体外动态范围较高(>40), 但钙亲和力相对非兴奋细胞而言稍偏高. 在G-GECO1.2的基础上, 2019年程和平团队^[86]在其CaM第一个loop区的第五位氨基酸及第四个loop区的第一位氨基酸处引入D24A/D129A两个点突变, 获得了GCaMP-ER2. 其体外动态范围可达到40. 利用这种工具, 他们证实肿瘤干细胞特有的内质网钙振荡由 $\text{IP}_3\text{R}2$ 控制. 该探针的缺点是反应速度较慢. 另外, 与ER-GCaMP6相比, GCaMP-ER2虽然具有更低的钙亲和力($K_d=388 \mu\text{mol/L}$), 但仍偏高. 静息时GCaMP-ER2的荧光亮度基本已经达到饱和状态.

以上GECI都需要借助外源钙结合蛋白, 含有多个钙结合位点, 无法实现1:1的线性化程度指示 Ca^{2+} 结合与信号变化之间的关系, 同时通过钙结合蛋白的构象变化调控荧光发色团的构象变化速度较慢, 因此需要借助其他策略提高钙响应速度.

通过在荧光蛋白上直接引入 Ca^{2+} 结合位点的方式构建的GECI, 使荧光蛋白既是钙感受器又是报告子, 这样在理论上可以提高钙响应速度. 近十几年来, Jenny J. Yang实验室在这个方向进行了深入探究. 2007年, 他们在EGFP的E172和D173之间融入CaM中 Ca^{2+} 结合的短肽并添加内质网定位序列, 构建了低钙亲和力($K_d=800 \mu\text{mol/L}$)的内质网探针Ca-G1-ER^[87]. 其吸收光谱具有两个光吸收峰, Ca^{2+} 结合会导致398 nm光吸收增加, 490 nm光吸收减少, 两个波长的发射(510 nm)荧光强度之比可以反映钙水平, 监测钙变化速度快($k_{\text{obs}}=16.9/\text{s}$). Ca-G1-ER通过靶向BHK-21细胞的内质网, 可以监测到激动剂刺激下内质网钙水平的变化. 但是Ca-G1-ER动态范围仅为1.8, 仍有待优化. 随后通过结构计算以及实验验证, 他们在EGFP中引入S147E/S202D/Q204E/F223E/T225E五种突变, 直接在EGFP发

色团附近构建了 Ca^{2+} 结合位点, 通过 Ca^{2+} 结合前后发色团附近静电势改变, 进而改变荧光强度, 得到的CatChER^[88]的动态范围提升至3.8, Ca^{2+} 解离速率提高($k_{\text{off}}\approx 700/\text{s}$). 利用CatChER研究者发现HeLa, HEK293和C2C12几种细胞的内质网钙动力学和浓度均存在显著差异. 但是CatChER的荧光较弱, 而且钙亲和力较高($K_d=180 \mu\text{mol/L}$). 近两年, 该团队又通过在CatChER的基础上增加S30R/Y39N/S175G三种突变, 得到了钙亲和力更低的G-CatChER⁺($K_d=1200 \mu\text{mol/L}$)^[89]. 其钙检测的反应速度与CatChER相当, 但静息荧光亮度可以大概达到CatChER的5倍, 可以监测到低温诱导下果蝇(*Drosophila*)幼虫肌细胞内质网发生钙释放. 最近他们又结合分子动力学方法(molecular dynamic, MD)模拟计算等手段, 在红色荧光蛋白mApple中引入A145E/K198D/R215D突变得得到R-CatchER($K_d=361 \mu\text{mol/L}$)^[90]. R-CatchER在体外具有非常快的钙反应速度($k_{\text{on}}>7\times 10^6 \text{ L/mol/s}$, $k_{\text{off}}>2\times 10^3/\text{s}$), 是当前最快的内质网GECI. 利用R-CatchER的记录结果表明, 神经元和树突多级分支点内的内质网钙信号具有时空特异性. R-CatChER的缺点是钙亲和力稍偏高, 且动态范围(4.2)仍有较大的提升空间.

(iii) 比值型. 单色的GECI具有无法直接指示钙水平的缺陷, 而能做到这一点的比值型GECI中. FRET型指示剂这类特殊的比值荧光型GECI的动态范围较小. 以单荧光蛋白比值型探针GEM-GECO为模板, Iino团队^[72]所构建的GEM-CEPIA1er($K_d=558 \mu\text{mol/L}$)的动态范围有了较大的提升(体外 $R_{\text{max}}/R_{\text{min}}=21.7$). 用该工具可以较好地监测到组胺引发的胞浆钙振荡所对应的内质网钙振荡. 但其缺点是需要使用光毒性较大的紫外光激发.

为此, 徐平勇团队^[91]将G-CEPIA1er与SNAP标签连接, 利用SNAP标签添加化学荧光标记分子作为参比信号, 开发了可见光激发的比值型内质网钙探针GCEPIA1-SNAPER. 并以之证明了内质网钙分布的不均一性. 该方法的缺陷是操作较为繁琐, 且添加化学荧光标记分子时无法实现对所有G-CEPIA1er, 可能会引入假象. 王友军实验室^[75]则将红色的参比荧光蛋白mKate与G-CEPIA1er相连, 构建了比值型miGer, 对细胞进行了长时间成像, 发现细胞分裂过程中内质网钙信号不随分裂而发生改变. 该类工具保留了G-CEPIA1er的动态范围, 但问题是光谱较宽, 不利于多色

成像。

为了降低过表达人源蛋白对内源内质网生理活动的影响, Alonso团队^[46]在GAP的基础上, 通过在水母素中引入D117A/D119A/D163A突变降低钙亲和力, 并添加内质网定位序列, 获得erGAP1($K_d=12\ \mu\text{mol/L}$)。但是erGAP1的钙亲和力过高, 随后在erGAP1的水母素上进一步引入D24N/D119A突变, 构建了低钙亲和力的erGAP2($K_d=407\ \mu\text{mol/L}$)并在此基础上进一步优化, 提高亮度获得了erGAP3($K_d=489\ \mu\text{mol/L}$)^[92], 监测了转基因果蝇肌肉中肌浆网钙活动。

(3) 基于生物发光与荧光结合的GECI。2019年, Nagai实验室^[93]使用分裂(split)荧光素酶(luciferase, Luc)互补成像技术, 将高亮度的生物发光蛋白Nano-Luc的C和N侧片段分别连接到R-CEPIA1er的N和C末端, 得到的ReBLICO在其中的R-CEPIA1er结合钙时生物发光增加, 因而可以同时用荧光和生物发光来指示内质网钙信号($K_d=1576, 1526\ \mu\text{mol/L}$), 并在荧光和生物发光模式下对内质网进行了成像。ReBLICO这种可以在荧光和生物发光模式之间切换的能力, 使得它成为在病理及生理条件监测内质网 Ca^{2+} 活动的潜在有力工具。但是ReBLICO仍有生物发光钙探针用于高钙细胞器时的难解问题, 即发光信号的持续衰减, 无法有效持续检测内质网钙活动。

总体而言, 继GEM-CEPIA1er之后, 内质网GECI的开发过程中钙亲和力并没有进一步降低以进一步检测内质网钙水平, 同时静息荧光亮度受到EGFP的局限, 此外动态范围也有潜力进一步提升, 基于此内质网GECI仍有很大的优化空间。

2.3 高尔基体GECI

高尔基体被分为三个主要的区室: 顺式、中部和反式, 每个区室都具有其独特的结构和功能特征, 因而实现GECI对不同区室的靶向特异性是最大的挑战。高尔基体可能同内质网一样具有较高浓度的钙水平^[94], 因此, 高尔基体GECI开发的一个难点也是需具有较低的钙亲和力。当前的高尔基体GECI基本是由内质网版本GECI更换上高尔基体靶向序列后获得的。此外, 因为高尔基体腔内偏酸性, 平均pH水平在6.5左右, 并从顺式到反式逐渐降低^[6]。所以, 高尔基体GECI开发需要克服的第三个难题是降低其对弱酸环境的敏感性。

(1) 生物发光型高尔基体GECI。之前有大量间接证据提示高尔基体可能作为细胞内的钙库发挥作用^[15,94-96], 但缺乏直接证据。为此, 1998年Pinton等人^[16]通过在AEQ($K_d=13\ \mu\text{mol/L}$)或其低亲和力突变体(AEQ-D119A, $K_d=0.26\ \text{mmol/L}$)^[97]的N端添加高尔基体靶向定位肽唾液酸转移酶1-69(sialyltransferases₁₋₆₉, ST₁₋₆₉)构建了可以定位在反式高尔基体的钙探针——GoAEQ及GoAEQmut(D119A)。根据免疫细胞化学实验的结果, 两者超表达时并不影响高尔基体的结构, 且均呈现出明显的核周卷曲样分布。在大部分细胞中它们与高尔基体标记物 α -D-甘露糖苷酶II (α -D-mannosidase II, MAN)高度共定位, 但约有不到5%的细胞有非高尔基体样的弥散定位。利用GoAEQmut所测得的反式高尔基体钙库的钙水平约为0.3 mmol/L, 与其内质网版本所指示的内质网钙水平(0.4 mmol/L)相当^[16]。但与内质网钙库不同的是, 内质网钙泵SERCA的抑制剂仅能部分抑制反式高尔基体钙库的钙重填, 提示它具有独立于SERCA的 Ca^{2+} 积累机制^[16]。水母素的耐酸性较好, 在pH=3.85时发射荧光强度的变化与中性pH下无显著差异^[98]。因而GoAEQmut的优点是其钙反应不受反式高尔基体酸性环境的影响。但是, 如前文中所提到的, 水母素在使用上存在可逆性差, 产生信号较弱, 操作较为复杂等缺点, 这些极大地限制了其应用范围。

(2) 荧光型高尔基体GECI。现有的荧光型高尔基体GECI都属于荧光比值型GECI。

GT-YC3.3是一种基于Cameleon改造的FRET型GECI^[99]。通过在YC3.3添加中/反式高尔基体的靶向序列半乳糖基转移酶1-81(galactosyltransferase₁₋₈₁, GT₁₋₈₁)后即得到了GT-YC3.3。在HeLa细胞中超表达的GT-YC3.3呈现近核的点状分布, 与超表达的高尔基体标记物GT-EYFP或对中/反式高尔基体标记物MAN染色后观察到的定位相似, 但由于缺乏共定位的数据以及严谨的数据分析, 因此并不确定GT-YC3.3是否能特异地定位于中/反式高尔基体中^[99]。GT-YC3.3的FRET受体YFP被替换为对pH敏感度较低的EYFP Q69M变体, 即Citrine($\text{p}K_a=5.7$), 从而可以被用于pH环境偏酸的高尔基体中。该探针的问题是钙亲和力($K_d=1.5\ \mu\text{mol/L}$)偏高, 在静息条件下已经处于饱和状态, 并且Citrine荧光仍会受反式高尔基体腔内的pH波动的影响。这两个问题导致其无法对高尔基体钙库静息钙

水平直接进行指示^[99]。

2010年Lissandron等人^[100]将同GoAEQmut一样的高尔基体靶向序列与 Ca^{2+} 亲和力更低一点($K_d=60\text{ }\mu\text{mol/L}$)的D1cpv^[64]融合, 构建了Go-D1cpv探针。免疫荧光实验结果表明, 探针与反式高尔基体标志物反式高尔基体网状结构蛋白2(trans-Golgi network protein 46, TGN46)共定位较好, 与顺式标记物高尔基体基质蛋白(Golgi matrix protein 130, GM130)则存在很大差异, 但仍有部分重叠^[100]。虽然D1cpv的 Ca^{2+} 亲和力比YC3.3的低一个数量级, 但其静息信号仍然接近钙饱和时的读数, 说明其钙亲和力仍偏高, 所测得的高尔基体游离 Ca^{2+} 浓度(约 $130\text{ }\mu\text{mol/L}$)可能仍不够准确^[100]。在使用内质网钙泵SERCA抑制剂CPA对HeLa细胞进行处理后, 观察到其 Ca^{2+} 重填速度完全不受抑制, 反而更快, 说明高尔基体对 Ca^{2+} 的摄取完全不依赖于SERCA。而敲减高尔基体定位的SPCA1后, Ca^{2+} 重填速度则显著减慢。这提示反式高尔基体中的钙泵是SPCA1而不是SERCA。与使用相同靶向序列的GoAEQ的检测结果相斥, 其原因可能是Go-D1cpv对于定位于反式高尔基体的准确度要优于GoAEQ^[100]。之后, 利用1,6 N-乙酰氨基葡萄糖转移酶1-32(1,6 N-acetyl glucosaminyl transferase₁₋₃₂, C2gnT₁₋₃₂)定位肽, 将D1-cpv定位在了高尔基体中部, 成功构建了高尔基体中部钙探针——medialGo-D1cpv^[101]。免疫细胞化学实验结果表明, medialGo-D1cpv与内源性中部高尔基体标记物giantin的分布有很好的重叠, 与顺式高尔基体标记物GM130定位于明显不同的结构中, 而与反式高尔基体标记物TGN46存在有部分的共定位^[101]。对其钙反应的原位滴定结果表明, 其钙亲和力($K_d=27.4\text{ }\mu\text{mol/L}$)比GT-YC3.3更低, 因此可以获得更多的关于高尔基体钙信号的信息^[101]。在HL-1细胞中, 用分别能激活IP₃R及RyR的舒缓激肽和咖啡因都能降低medialGo-D1cpv信号, 提示中部高尔基体上有IP₃R及RyR钙释放通道^[101]。进一步的结果表明, 内质网钙泵抑制剂CPA或高尔基体钙泵SPCA1的抑制剂均可部分降低由medialGo-D1cpv所指示的中部高尔基体的钙水平。这提示SERCA和SPCA1两者共同参与了中部高尔基体钙稳态的维持^[101]。通过使用莫能霉素提高高尔基pH, 观察到Go-D1cpv的中的CFP和YFP信号均有增加, 这与它们指示 Ca^{2+} 浓度变化时的荧光强度的反向变化模式不同, 说明此时荧光信号的增加是受到pH升高的

影响, 且CFP增加的倍数要大于YFP约20%, 说明CFP荧光相对于YFP荧光对pH变化要更加敏感^[100]。这说明D1cpv型GECI仍旧存在对高尔基体内的pH波动敏感的问题。

除了FRET型钙探针, 前文提到的比值型GAP探针也被用于指示高尔基体钙信号。通过基因工程手段, 将低亲和力版本GAP1与反式高尔基体靶向序列GT₁₋₈₁融合, 得到了goGAP1这一反式高尔基体钙探针^[46]。其亲和力($K_d=12\text{ }\mu\text{mol/L}$), 虽然比GT-YC3.3稍低一点, 但比medialGo-D1cpv高^[46]。基于Cameleon改造的FRET型GECI存在动态范围小(约两倍)的问题^[100,101], 而GAP1在内质网中测得其动态范围为4^[46], 相对来说有所提高。但与其他细胞器钙探针对比仍有很大的提升空间, 如熟知的CEPIA1er系列, 其中GEM-CEPIA1er的体外测试动态范围能达到20^[72]。另外, 虽然GAP1中的报告子是pH敏感的GFP, 但pH滴定结果表明, GAP1仅对6.2~8.2范围内的pH波动轻度敏感, 因而它能相对稳定地指示高尔基体钙信号^[46]。

当前对于高尔基体钙探针的开发还较少, 多为生物发光或荧光比值型探针, 尚缺少具有高信噪比, 高动态范围的单色型高尔基体钙指示剂。并且当前的高尔基体探针定位采用的策略为对糖基化酶进行改造, 该策略并不能实现定位的完全准确。这导致领域内对高尔基体各腔室中存在的钙转运机器具体种类, 比如反式高尔基体中是否有IP₃R和SERCA等, 有一定争议^[16,100]。因而也需要开发新的特异性高尔基体靶向探针。总之, 目前大多认为高尔基体的不同区室通过不同的 Ca^{2+} 转运体和钙通道的异质表达来维持不同的钙水平, 中部高尔基体同时表达SERCA和SPCA1, 不仅表达IP₃R在部分细胞中还表达RyR, 而反式高尔基体中则主要表达SPCA1和RyR, 并且 Ca^{2+} 浓度沿顺式到反式递减。

2.4 细胞内囊泡及溶酶体中的GECI

囊泡及溶酶体中GECI开发面临的首要的问题是腔内偏酸的环境, 内体(pH $\approx 5.5\sim 6.5$)、分泌囊泡(pH ≈ 5.5)、溶酶体(pH ≈ 4.5)内基质中的pH均较低。这一方面使得荧光蛋白的发色基团质子化, 影响荧光强度; 另一方面也会影响钙结合基序的功能, 限制了荧光型钙探针的使用。早期囊泡中钙探针的开发, 主要基于两种思路: 一是基于pH低敏感的水母素及其突变

体构建生物发光型钙探针; 二是将探针锚定在囊泡膜表面, 朝向近中性pH的胞浆, 对钙信号进行间接测量.

(1) 生物发光型细胞内囊泡及溶酶体GECI. 1998年, Pouli等人^[102]在分泌囊泡膜定位的跨膜蛋白(phosphatase homologue in granules of insulinoma C, phogrin C)C端连接水母素, 将后者定位到分泌囊泡胞浆一侧, 并间接记录到了由囊泡产生的钙信号. 利用水母素对于酸性pH敏感性较低的优点, Mitchell等人^[103]将带有HA标签的水母素突变体AEQ-D119A与VAMP2进行融合表达, 构建了能直接定位在分泌囊泡基质中的钙探针. 免疫组化验证及免疫电镜成像的结果表明, VAMP2-mutAEQ与囊泡定位的胰岛素有很好的共定位. 利用VAMP2-AEQ测得分泌囊泡中 Ca^{2+} 浓度在静息状态下约为30~90 $\mu\text{mol/L}$, 其上有ATP依赖的钙泵和钙释放通道RyRs. 该团队等借助VAMP2-mutAEQ发现在多种不同分泌细胞中, SERCA可参与分泌囊泡中 Ca^{2+} 的摄入, 而IP₃Rs和RyRs可介导从分泌囊泡向胞质的钙释放^[104,105]. 2004年Mahapatra等人^[106]通过hCgA将野生型水母素锚定在分泌囊泡基质, 得到hCgA-AEQ, 进一步丰富了生物发光型GECI的工具库.

此外, 也有研究人员基于水母素, 成功开发出定位于溶酶体腔中的GECI. 2015年, Ronco等人^[98]在钙亲和力较低的水母素突变体AEQ-D119A的N端连接组织蛋白酶D(cathepsin D, CathD), 成功构建出定位于溶酶体腔内的钙探针CathD-mutAEQ. 利用这一工具, 研究者发现溶酶体中 Ca^{2+} 重填的速率及钙稳态水平与内质网相近, 跟之前间接测试的结果一致.

(2) 荧光型细胞内囊泡及溶酶体GECI. 如前所述, 此类荧光探针有很多是从胞浆一侧间接指示酸性细胞器钙信号的GECI. 1999年, Emmanouilidou等人^[107]将生物发光型phogrin-Aequorin中的水母素用FRET型钙探针YC2替换掉, 得到了phogrin-Ycam2这一定位于囊泡外膜的荧光钙探针. 并以之检测在PC12及MIN6细胞中囊泡附近的钙信号. Shen等人^[108]以及Cao等人^[109]分别将单色钙指示剂GCaMP3或G-GECO连接到溶酶体膜上主要的钙离子通道TRPML1的N端胞质一侧, 即GCaMP3-TRPML1及GECO-ML1. 这两个探针均可以间接监测到溶酶体钙释放, 但动态范围都偏小(<2). 类似的, McCue等人^[110]将FRET型钙指示剂YC3.6与LAMP1连接, 锚定在溶酶体外膜上, 构建了溶酶体膜外钙指示剂LAMP1-YCaM, 能够在HeLa细胞中响应组

胺刺激引发的钙信号.

近年来, 各种耐酸荧光型GECI的出现, 使得对囊泡腔内钙水平及钙信号进行直接监测成为可能. 2012年, Dickson等人^[111]去除D1-ER原本的内质网定位序列, 在N端连接组织型纤溶酶原激活物(tissue plasminogen Activator, tpA)构建得到定位于分泌囊泡腔的D1-SG(K_d 约为60 $\mu\text{mol/L}$). 虽然D1-SG中的两个荧光蛋白的信号都受囊泡中pH变化的影响, 但D1-SG的FRET信号仍能在pH=5.5~7.4的范围内指示 Ca^{2+} 浓度变化. 在PC12细胞中利用D1-SG进行的检测结果表明, 在静息状态下, 分泌囊泡中pH约为5.8, 游离 Ca^{2+} 浓度约为69 $\mu\text{mol/L}$. 除分泌囊泡中的钙探针外, 2015年, Albrecht等人^[112]成功开发了定位于内体的荧光型钙探针TiVAMP-GEM-GECO-1, 且通过共表达pH探针TiVAMP-mKeima, 实现了对于内体中pH和 Ca^{2+} 的同步测定. 通过该工具, 他们发现以Ras analog in brain 5 (Rab5)为标志的早期内体及以Ras analog in brain 7 (Rab7)为标志的晚期内体中的pH和 Ca^{2+} 浓度存在差异. 在早期内体中, pH约为6.25, 静息状态下基质中的 Ca^{2+} 浓度约为0.5 $\mu\text{mol/L}$; 而在晚期内体中, pH约为5.75, 基质中的 Ca^{2+} 浓度则升至约2.5 $\mu\text{mol/L}$.

综上, 目前已开发的细胞内囊泡及溶酶体GECI种类相对较少, 受到酸性环境的限制, 以生物发光型及比值型GECI为主. 前者反应信号弱, 且不可逆, 操作复杂; 后者光谱覆盖面广, 灵敏度不够高, 仍存在很大的优化空间.

3 总结与展望

本文围绕各细胞器GECI开发过程中需要解决的问题, 简要介绍了细胞器钙指示剂的开发历程以及研究现状, 并对各类工具的优缺点进行了总结. 现有的细胞器GECI仍然存在一些局限性. 首先是细胞器靶向效率的局限性. 虽然细胞器特异性靶向序列可以使GECI高效定位于特定细胞器, 但靶向效率受到GECI本身的影响, 如分子量大小, 成熟速度等等, 不合适的靶向肽会改变GECI的性能, 如动态范围、动力学特征等. 其次是pH波动导致的假象. 多数细胞器中生理活动会引发pH波动, 而现有较为灵敏的GECI的pKa接近生理浓度, 荧光亮度极易受到pH波动影响. 另外针对不同细胞器内部复杂多变的钙环境, 开发钙亲和力合

适的GECI一直是研究者始终致力于解决的一个问题。此外, GECI的静息荧光亮度也至关重要, 荧光亮度高有助于高灵敏的对比成像, 更适用于在体实验中对细胞器等微区中的钙活动进行监测; 而较大的动态范围则有助于解析亚细胞微区中的生理性钙活动。最后GECI过表达会产生细胞毒性。因此GECI的亮度、动

态范围、动力学, 对 Ca^{2+} 的亲合力以及减少细胞毒性等指标有必要根据实际需求进一步改进。

随着细胞器钙信号研究的深入发展, 我们相信在不久的将来, 经过研究者的逐步优化, 会开发出一系列更高灵敏的细胞器靶向GECI, 助力于解析细胞器系统中 Ca^{2+} 调控的生理或病理机制。

参考文献

- Berridge M J. Calcium signalling remodelling and disease. *Biochem Soc Trans*, 2012, 40: 297–309
- Emrich S M, Yeast R E, Trebak M. Physiological functions of CRAC channels. *Annu Rev Physiol*, 2022, 84: 355–379
- Clapham D E. Calcium signaling. *Cell*, 2007, 131: 1047–1058
- Prinz W A, Toulmay A, Balla T. The functional universe of membrane contact sites. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21: 7–24
- Burgstaller S, Bischof H, Gensch T, et al. pH-lemon, a fluorescent protein-based pH reporter for acidic compartments. *ACS Sens*, 2019, 4: 883–891
- Khosrowabadi E, Kellokumpu S. *Organelles in Disease*. Cham: Springer, 2023. 1–23
- Rivinoja A, Pujol F M, Hassinen A, et al. Golgi pH, its regulation and roles in human disease. *Ann Med*, 2012, 44: 542–554
- Wang L, Wang C. Oxidative protein folding fidelity and redox tasis in the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem Sci*, 2023, 48: 40–52
- Schafer F Q, Buettner G R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med*, 2001, 30: 1191–1212
- Berridge M J, Bootman M D, Roderick H L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, 4: 517–529
- Filadi R, Greotti E. The yin and yang of mitochondrial Ca^{2+} signaling in cell physiology and pathology. *Cell Calcium*, 2021, 93: 102321
- Berridge M J. The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium*, 2002, 32: 235–249
- Wang Q C, Zheng Q, Tan H, et al. TMCO1 is an ER Ca^{2+} load-activated Ca^{2+} channel. *Cell*, 2016, 165: 1454–1466
- Rowland A A, Voeltz G K. Endoplasmic reticulum-mitochondria contacts: function of the junction. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13: 607–615
- Zha X, Chandra S, Ridsdale A J, et al. Golgi apparatus is involved in intracellular Ca^{2+} regulation in epithelial LLC-PK1 cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 1995, 268: C1133–C1140
- Pinton P, Pozzan T, Rizzuto R. The Golgi apparatus is an inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca^{2+} store, with functional properties distinct from those of the endoplasmic reticulum. *EMBO J*, 1998, 17: 5298–5308
- Platta H W, Stenmark H. Endocytosis and signaling. *Curr Opin Cell Biol*, 2011, 23: 393–403
- Patel S, Muallem S. Acidic Ca^{2+} stores come to the fore. *Cell Calcium*, 2011, 50: 109–112
- Qian Y, Piatkevich K D, Mc Larney B, et al. A genetically encoded near-infrared fluorescent calcium ion indicator. *Nat Methods*, 2019, 16: 171–174
- Filadi R, Theurey P, Pizzo P. The endoplasmic reticulum-mitochondria coupling in health and disease: molecules, functions and significance. *Cell Calcium*, 2017, 62: 1–15
- Lim D, Dematteis G, Tapella L, et al. Ca^{2+} handling at the mitochondria-ER contact sites in neurodegeneration. *Cell Calcium*, 2021, 98: 102453
- Giorgi C, Marchi S, Pinton P. The machineries, regulation and cellular functions of mitochondrial calcium. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19: 713–730
- Hu Z, Bonifas J M, Beech J, et al. Mutations in ATP2C1, encoding a calcium pump, cause Hailey-Hailey disease. *Nat Genet*, 2000, 24: 61–65
- Sudbrak R. Hailey-Hailey disease is caused by mutations in ATP2C1 encoding a novel Ca^{2+} pump. *Hum Mol Genet*, 2000, 9: 1131–1140
- Grice D M, Vetter I, Faddy H M, et al. Golgi calcium pump secretory pathway calcium ATPase 1 (SPCA1) is a key regulator of insulin-like growth factor receptor (IGF1R) processing in the basal-like breast cancer cell line MDA-MB-231. *J Biol Chem*, 2010, 285: 37458–37466
- Fairclough R J, Dode L, Vanoevelen J, et al. Effect of Hailey-Hailey disease mutations on the function of a new variant of human secretory pathway $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -ATPase (hSPCA1). *J Biol Chem*, 2003, 278: 24721–24730

- 27 Fraldi A, Klein A D, Medina D L, et al. Brain disorders due to lysosomal dysfunction. *Annu Rev Neurosci*, 2016, 39: 277–295
- 28 Suzuki J, Kanemaru K, Iino M. Genetically encoded fluorescent indicators for organellar calcium imaging. *Biophys J*, 2016, 111: 1119–1131
- 29 Gee K R, Brown K A, Chen W N U, et al. Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca^{2+} -indicator dyes. *Cell Calcium*, 2000, 27: 97–106
- 30 Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien R Y. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*, 1985, 260: 3440–3450
- 31 Tsien R Y. A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. *Nature*, 1981, 290: 527–528
- 32 Hofer A M, Machen T E. Direct measurement of free Ca in organelles of gastric epithelial cells. *Am J Physiol*, 1994, 267: G442–G451
- 33 Tse F W, Tse A, Hille B. Cyclic Ca^{2+} changes in intracellular stores of gonadotropes during gonadotropin-releasing hormone-stimulated Ca^{2+} oscillations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 9750–9754
- 34 Lu F, Zhao Y, Xie W, et al. Imaging sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} signaling in intact cardiac myocytes. *Circulation*, 2020, 142: 1503–1505
- 35 Minta A, Kao J P Y, Tsien R Y. Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *J Biol Chem*, 1989, 264: 8171–8178
- 36 Pendin D, Norante R, De Nadai A, et al. A synthetic fluorescent mitochondria-targeted sensor for ratiometric imaging of calcium in live cells. *Angew Chem Int Ed*, 2019, 58: 9917–9922
- 37 Collins T J, Lipp P, Berridge M J, et al. Mitochondrial Ca^{2+} uptake depends on the spatial and temporal profile of cytosolic Ca^{2+} signals. *J Biol Chem*, 2001, 276: 26411–26420
- 38 Gerasimenko J V, Tepikin A V, Petersen O H, et al. Calcium uptake via endocytosis with rapid release from acidifying endosomes. *Curr Biol*, 1998, 8: 1335–1338
- 39 Garrity A G, Wang W, Collier C M, et al. The endoplasmic reticulum, not the pH gradient, drives calcium refilling of lysosomes. *eLife*, 2016, 5: e15887
- 40 Pihán P, Lisbona F, Borgonovo J, et al. Control of lysosomal-mediated cell death by the pH-dependent calcium channel RECS1. *Sci Adv*, 2021, 7: eabe5469
- 41 Christensen K A, Myers J T, Swanson J A. pH-dependent regulation of lysosomal calcium in macrophages. *J Cell Sci*, 2002, 115: 599–607
- 42 Narayanaswamy N, Chakraborty K, Saminathan A, et al. A pH-correctable, DNA-based fluorescent reporter for organellar calcium. *Nat Methods*, 2019, 16: 95–102
- 43 Suresh B, Saminathan A, Chakraborty K, et al. Tubular lysosomes harbor active ion gradients and poise macrophages for phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, 118: e2113174118
- 44 Zajac M, Modi S, Krishnan Y. The evolution of organellar calcium mapping technologies. *Cell Calcium*, 2022, 108: 102658
- 45 Pihán P, Nunes-Hasler P, Demareux N, et al. Simultaneous determination of intraluminal lysosomal calcium and pH by dextran-conjugated fluorescent dyes. *Methods Cell Biol*, 2021, 165: 199–208
- 46 Rodriguez-Garcia A, Rojo-Ruiz J, Navas-Navarro P, et al. GAP, an aequorin-based fluorescent indicator for imaging Ca^{2+} in organelles. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: 2584–2589
- 47 Gasterstädt I, Jack A, Stahlhut T, et al. Genetically encoded calcium indicators can impair dendrite growth of cortical neurons. *Front Cell Neurosci*, 2020, 14: 570596
- 48 Resendez S L, Jennings J H, Ung R L, et al. Visualization of cortical, subcortical and deep brain neural circuit dynamics during naturalistic mammalian behavior with head-mounted microscopes and chronically implanted lenses. *Nat Protoc*, 2016, 11: 566–597
- 49 Tallini Y N, Ohkura M, Choi B R, et al. Imaging cellular signals in the heart *in vivo*: cardiac expression of the high-signal Ca^{2+} indicator GCaMP2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 4753–4758
- 50 Colomer J M, Terasawa M, Means A R. Targeted expression of calmodulin increases ventricular cardiomyocyte proliferation and deoxyribonucleic acid synthesis during mouse development. *Endocrinology*, 2004, 145: 1356–1366
- 51 Gee J M, Smith N A, Fernandez F R, et al. Imaging activity in neurons and glia with a Polr2a-based and Cre-dependent GCaMP5G-IRES-ttdTomato reporter mouse. *Neuron*, 2014, 83: 1058–1072
- 52 Steinmetz N A, Buetfering C, Lecoq J, et al. Aberrant cortical activity in multiple GCaMP6-EXPRESSING TRANSGENIC MOUSE LINES. *eNeuro*, 2017, 4: ENEURO.0207-17.2017
- 53 Yang Y, Liu N, He Y, et al. Improved calcium sensor GCaMP-X overcomes the calcium channel perturbations induced by the calmodulin in

- GCaMP. *Nat Commun*, 2018, 9: 1504
- 54 Geng J, Tang Y, Yu Z, et al. Chronic Ca^{2+} imaging of cortical neurons with long-term expression of GCaMP-X. *eLife*, 2022, 11: e76691
- 55 Rizzuto R, Simpson A W M, Brini M, et al. Rapid changes of mitochondrial Ca^{2+} revealed by specifically targeted recombinant aequorin. *Nature*, 1992, 358: 325–327
- 56 Granatiero V, Patron M, Tosatto A, et al. The use of aequorin and its variants for Ca^{2+} measurements. *Cold Spring Harb Protoc*, 2014, 2014: 9–16
- 57 Kendall J M, Dormer R L, Campbell A K. Targeting aequorin to the endoplasmic reticulum of living cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992, 189: 1008–1016
- 58 De Michele R, Carimi F, Frommer W B. Mitochondrial biosensors. *Int J Biochem Cell Biol*, 2014, 48: 39–44
- 59 Casey J R, Grinstein S, Orlowski J. Sensors and regulators of intracellular pH. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 11: 50–61
- 60 Yang Z, Li L, Ling J, et al. Cyclooctatetraene-conjugated cyanine mitochondrial probes minimize phototoxicity in fluorescence and nanoscopic imaging. *Chem Sci*, 2020, 11: 8506–8516
- 61 Icha J, Weber M, Waters J C, et al. Phototoxicity in live fluorescence microscopy, and how to avoid it. *BioEssays*, 2017, 39: 1700003
- 62 Arnaudeau S, Kelley W L, Walsh Jr. J V, et al. Mitochondria recycle Ca^{2+} to the endoplasmic reticulum and prevent the depletion of neighboring endoplasmic reticulum regions. *J Biol Chem*, 2001, 276: 29430–29439
- 63 Filippin L, Abad M C, Gastaldello S, et al. Improved strategies for the delivery of GFP-based Ca^{2+} sensors into the mitochondrial matrix. *Cell Calcium*, 2005, 37: 129–136
- 64 Palmer A E, Giacomello M, Kortemme T, et al. Ca^{2+} indicators based on computationally redesigned calmodulin-peptide pairs. *Chem Biol*, 2006, 13: 521–530
- 65 Waldeck-Weiermair M, Alam M R, Khan M J, et al. Spatiotemporal correlations between cytosolic and mitochondrial Ca^{2+} signals using a novel red-shifted mitochondrial targeted cameleon. *PLoS ONE*, 2012, 7: e45917
- 66 Chen M, Wang Y, Hou T, et al. Differential mitochondrial calcium responses in different cell types detected with a mitochondrial calcium fluorescent indicator, mito-GCaMP2. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2011, 43: 822–830
- 67 Iguchi M, Kato M, Nakai J, et al. Direct monitoring of mitochondrial calcium levels in cultured cardiac myocytes using a novel fluorescent indicator protein, GCaMP2-mt. *Int J Cardiol*, 2012, 158: 225–234
- 68 Logan C V, Szabadkai G, Sharpe J A, et al. Loss-of-function mutations in MICU1 cause a brain and muscle disorder linked to primary alterations in mitochondrial calcium signaling. *Nat Genet*, 2014, 46: 188–193
- 69 Li H, Wang X, Zhang N, et al. Imaging of mitochondrial Ca^{2+} dynamics in astrocytes using cell-specific mitochondria-targeted GCaMP5G/6s: mitochondrial Ca^{2+} uptake and cytosolic Ca^{2+} availability via the endoplasmic reticulum store. *Cell Calcium*, 2014, 56: 457–466
- 70 Kempmann A, Gensch T, Offenhäusser A, et al. The functional characterization of GCaMP3.0 variants specifically targeted to subcellular domains. *Int J Mol Sci*, 2022, 23: 6593
- 71 Wu J, Prole D L, Shen Y, et al. Red fluorescent genetically encoded Ca^{2+} indicators for use in mitochondria and endoplasmic reticulum. *Biochem J*, 2014, 464: 13–22
- 72 Suzuki J, Kanemaru K, Ishii K, et al. Imaging intraorganellar Ca^{2+} at subcellular resolution using CEPIA. *Nat Commun*, 2014, 5: 4153
- 73 Kanemaru K, Suzuki J, Taiko I, et al. Red fluorescent CEPIA indicators for visualization of Ca^{2+} dynamics in mitochondria. *Sci Rep*, 2020, 10: 2835
- 74 Nagai T, Sawano A, Park E S, et al. Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense Ca^{2+} . *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 3197–3202
- 75 Li J, Wang L, Chen Y, et al. Visible light excited ratiometric-GEICs for long-term in-cellulo monitoring of calcium signals. *Cell Calcium*, 2020, 87: 102165
- 76 de la Fuente S, Fonteriz R I, Montero M, et al. Ca^{2+} homeostasis in the endoplasmic reticulum measured with a new low- Ca^{2+} -affinity targeted aequorin. *Cell Calcium*, 2013, 54: 37–45
- 77 Miyawaki A, Llopis J, Heim R, et al. Fluorescent indicators for Ca^{2+} based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature*, 1997, 388: 882–887
- 78 Palmer A E, Jin C, Reed J C, et al. Bcl-2-mediated alterations in endoplasmic reticulum Ca^{2+} analyzed with an improved genetically encoded fluorescent sensor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 17404–17409

- 79 Greotti E, Wong A, Pozzan T, et al. Characterization of the ER-targeted low affinity Ca^{2+} probe D4ER. *Sensors*, 2016, 16: 1419
- 80 Waldeck-Weiermair M, Bischof H, Blass S, et al. Generation of red-shifted cameleons for imaging Ca^{2+} dynamics of the endoplasmic reticulum. *Sensors*, 2015, 15: 13052–13068
- 81 Ishii K, Hirose K, Iino M. Ca^{2+} shuttling between endoplasmic reticulum and mitochondria underlying Ca^{2+} oscillations. *EMBO Rep*, 2006, 7: 390–396
- 82 Osibow K, Malli R, Kostner G M, et al. A new type of non- Ca^{2+} -buffering Apo(a)-based fluorescent indicator for intraluminal Ca^{2+} in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 2006, 281: 5017–5025
- 83 Wu X, Reid R E. Conservative D133E mutation of calmodulin site IV drastically alters calcium binding and phosphodiesterase regulation. *Biochemistry*, 1997, 36: 3608–3616
- 84 Henderson M J, Baldwin H A, Werley C A, et al. A low affinity GCaMP3 variant (GCaMPer) for imaging the endoplasmic reticulum calcium store. *PLoS ONE*, 2015, 10: e0139273
- 85 de Juan-Sanz J, Holt G T, Schreier E R, et al. Axonal endoplasmic reticulum Ca^{2+} content controls release probability in CNS nerve terminals. *Neuron*, 2017, 93: 867–881.e6
- 86 Sun C, Shui B, Zhao W, et al. Central role of IP3R2-mediated Ca^{2+} oscillation in self-renewal of liver cancer stem cells elucidated by high-signal ER sensor. *Cell Death Dis*, 2019, 10: 396
- 87 Zou J, Hofer A M, Lurtz M M, et al. Developing sensors for real-time measurement of high Ca^{2+} concentrations. *Biochemistry*, 2007, 46: 12275–12288
- 88 Tang S, Wong H C, Wang Z M, et al. Design and application of a class of sensors to monitor Ca^{2+} dynamics in high Ca^{2+} concentration cellular compartments. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 16265–16270
- 89 Reddish F N, Miller C L, Deng X, et al. Rapid subcellular calcium responses and dynamics by calcium sensor G-CatchER+. *iScience*, 2021, 24: 102129
- 90 Deng X, Yao X, Berglund K, et al. Tuning protein dynamics to sense rapid endoplasmic-reticulum calcium dynamics. *Angew Chem Int Ed*, 2021, 60: 23289–23298
- 91 Luo C, Wang H, Liu Q, et al. A genetically encoded ratiometric calcium sensor enables quantitative measurement of the local calcium microdomain in the endoplasmic reticulum. *Biophys Rep*, 2019, 5: 31–42
- 92 Navas-Navarro P, Rojo-Ruiz J, Rodriguez-Prados M, et al. GFP-aequorin protein sensor for *ex vivo* and *in vivo* imaging of Ca^{2+} dynamics in high- Ca^{2+} organelles. *Cell Chem Biol*, 2016, 23: 738–745
- 93 Farhana I, Hossain M N, Suzuki K, et al. Genetically encoded fluorescence/bioluminescence bimodal indicators for Ca^{2+} imaging. *ACS Sens*, 2019, 4: 1825–1834
- 94 Chandra S, Kable E P W, Morrison G H, et al. Calcium sequestration in the golgi apparatus of cultured mammalian cells revealed by laser scanning confocal microscopy and ion microscopy. *J Cell Sci*, 1991, 100: 747–752
- 95 Oda K. Calcium depletion blocks proteolytic cleavages of plasma protein precursors which occur at the Golgi and/or trans-Golgi network. Possible involvement of $\text{Ca}(2+)$ -dependent Golgi endoproteases. *J Biol Chem*, 1992, 267: 17465–17471
- 96 Carnell L, Moore H P. Transport via the regulated secretory pathway in semi-intact PC12 cells: role of intra-cisternal calcium and pH in the transport and sorting of secretogranin II. *J Cell Biol*, 1994, 127: 693–705
- 97 Kendall J M, Sala-Newby G, Ghalaut V, et al. Engineering the Ca^{2+} -activated photoprotein aequorin with reduced affinity for calcium. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992, 187: 1091–1097
- 98 Ronco V, Potenza D M, Denti F, et al. A novel Ca^{2+} -mediated cross-talk between endoplasmic reticulum and acidic organelles: Implications for NAADP-dependent Ca^{2+} signalling. *Cell Calcium*, 2015, 57: 89–100
- 99 Griesbeck O, Baird G S, Campbell R E, et al. Reducing the environmental sensitivity of yellow fluorescent protein. *J Biol Chem*, 2001, 276: 29188–29194
- 100 Lissandron V, Podini P, Pizzo P, et al. Unique characteristics of Ca^{2+} homeostasis of the *trans*-Golgi compartment. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 9198–9203
- 101 Wong A K C, Capitanio P, Lissandron V, et al. Heterogeneity of Ca^{2+} handling among and within Golgi compartments. *J Mol Cell Biol*, 2013, 5: 266–276
- 102 Pouli E A, Karagenc N, Wasmeier C, et al. A phogrin-aequorin chimera to image free Ca^{2+} in the vicinity of secretory granules. *Biochem J*,

- 1998, 330: 1399–1404
- 103 Mitchell K J, Pinton P, Varadi A, et al. Dense core secretory vesicles revealed as a dynamic Ca^{2+} store in neuroendocrine cells with a vesicle-associated membrane protein aequorin chimera. *J Cell Biol*, 2001, 155: 41–52
- 104 SantoDomingo J, Vay L, Camacho M, et al. Calcium dynamics in bovine adrenal medulla chromaffin cell secretory granules. *Eur J Neurosci*, 2008, 28: 1265–1274
- 105 SantoDomingo J, Fonteriz R I, Lobatón C D, et al. Ca^{2+} dynamics in the secretory vesicles of neurosecretory PC12 and INS1 cells. *Cell Mol Neurobiol*, 2010, 30: 1267–1274
- 106 Mahapatra N R, Mahata M, Hazra P P, et al. A dynamic pool of calcium in catecholamine storage vesicles. *J Biol Chem*, 2004, 279: 51107–51121
- 107 Emmanouilidou E, Teschemacher A G, Pouli A E, et al. Imaging Ca^{2+} concentration changes at the secretory vesicle surface with a recombinant targeted cameleon. *Curr Biol*, 1999, 9: 915–S1
- 108 Shen D, Wang X, Li X, et al. Lipid storage disorders block lysosomal trafficking by inhibiting a TRP channel and lysosomal calcium release. *Nat Commun*, 2012, 3: 731
- 109 Cao Q, Zhong X Z, Zou Y, et al. BK channels alleviate lysosomal storage diseases by providing positive feedback regulation of lysosomal Ca^{2+} release. *Dev Cell*, 2015, 33: 427–441
- 110 McCue H V, Wardyn J D, Burgoyne R D, et al. Generation and characterization of a lysosomally targeted, genetically encoded Ca^{2+} -sensor. *Biochem J*, 2013, 449: 449–457
- 111 Dickson E J, Duman J G, Moody M W, et al. Orai-STIM-mediated Ca^{2+} release from secretory granules revealed by a targeted Ca^{2+} and pH probe. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: E3539–E3548
- 112 Albrecht T, Zhao Y, Nguyen T H, et al. Fluorescent biosensors illuminate calcium levels within defined beta-cell endosome subpopulations. *Cell Calcium*, 2015, 57: 263–274
- 113 Ravier M A, Daro D, Roma L P, et al. Mechanisms of control of the free Ca^{2+} concentration in the endoplasmic reticulum of mouse pancreatic β -cells. *Diabetes*, 2011, 60: 2533–2545
- 114 Bandara S, Malmersjö S, Meyer T. Regulators of calcium homeostasis identified by inference of kinetic model parameters from live single cells perturbed by siRNA. *Sci Signal*, 2013, 6
- 115 Hossain M N, Suzuki K, Iwano M, et al. Bioluminescent low-affinity Ca^{2+} indicator for ER with multicolor calcium imaging in single living cells. *ACS Chem Biol*, 2018, 13: 1862–1871
- 116 Giacomello M, Drago I, Bortolozzi M, et al. Ca^{2+} hot spots on the mitochondrial surface are generated by Ca^{2+} mobilization from stores, but not by activation of store-operated Ca^{2+} channels. *Mol Cell*, 2010, 38: 280–290
- 117 Zampese E, Fasolato C, Kipanyula M J, et al. Presenilin 2 modulates endoplasmic reticulum (ER)- mitochondria interactions and Ca^{2+} cross-talk. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 2777–2782
- 118 Isshiki M, Nishimoto M, Mizuno R, et al. FRET-based sensor analysis reveals caveolae are spatially distinct Ca^{2+} stores in endothelial cells. *Cell Calcium*, 2013, 54: 395–403
- 119 Vicario M, Cali T. Measuring Ca^{2+} levels in subcellular compartments with genetically encoded GFP-based indicators. *Methods Mol Biol*, 2019, 1925: 31–42
- 120 Lynes E M, Raturi A, Shenkman M, et al. Palmitoylation is the switch that assigns calnexin to quality control or ER calcium signaling. *J Cell Sci*, 2013, 126: 3893–3903
- 121 Chang K T, Niescier R F, Min K T. Mitochondrial matrix Ca^{2+} as an intrinsic signal regulating mitochondrial motility in axons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 15456–15461
- 122 Haviland S, Cleemann L, Kettlewell S, et al. Diversity of mitochondrial Ca^{2+} signaling in rat neonatal cardiomyocytes: evidence from a genetically directed Ca^{2+} probe, mitycam-E31Q. *Cell Calcium*, 2014, 56: 133–146
- 123 Kettlewell S, Cabrero P, Nicklin S A, et al. Changes of intra-mitochondrial Ca^{2+} in adult ventricular cardiomyocytes examined using a novel fluorescent Ca^{2+} indicator targeted to mitochondria. *J Mol Cell Cardiol*, 2009, 46: 891–901
- 124 Zhao Y, Araki S, Wu J, et al. An expanded palette of genetically encoded Ca^{2+} indicators. *Science*, 2011, 333: 1888–1891
- 125 Frieden M, James D, Castelbou C, et al. Ca^{2+} homeostasis during mitochondrial fragmentation and perinuclear clustering induced by hFis1. *J Biol Chem*, 2004, 279: 22704–22714

- 126 Aulestia F J, Alonso M T, García-Sancho J. Differential calcium handling by the *cis* and *trans* regions of the Golgi apparatus. *Biochem J*, 2015, 466: 455–465

Genetically encoded calcium indicators for organelles

GU WenJia¹, ZHONG ZiYi¹, ZHANG HanHan¹, ZHANG XiaoYan² & WANG YouJun^{1,2}

¹ Beijing Key Laboratory of Gene Resource and Molecular Development, College of Life Sciences, Beijing Normal University, Beijing 100875, China;

² Key Laboratory of Cell Proliferation and Regulation Biology, Ministry of Education, College of Life Sciences, Beijing Normal University, Beijing 100875, China

In eukaryotic cells, calcium (Ca^{2+}) signal plays a vital role in regulating a wide range of physiological and pathological processes. Endoplasmic reticulum (ER), mitochondria and other Ca^{2+} containing organelles help precisely control the spatiotemporal Ca^{2+} dynamics and Ca^{2+} homeostasis. Compared with chemical Ca^{2+} indicators, the genetically encoded Ca^{2+} indicators (GECIs) are more convenient to use, show better site-specific localization, enabling broad applications. In this review, we summarized recent advances in the development of organellar GECIs, especially those for mitochondria, ER, Golgi apparatus, endosomes and lysosome. We mainly focused on their limitations and possible future optimization strategies, aiming to provide hints to help accelerate the development of better organellar GECIs.

organelle GECIs, calcium imaging, calcium signaling in subcellular compartments

doi: [10.1360/SSV-2023-0267](https://doi.org/10.1360/SSV-2023-0267)