

重组水母发光蛋白及其在植物钙离子信号检测中的应用

郝小花¹, 张国增²

(1. 湖南文理学院 生命科学系, 湖南 常德 415000; 2. 河南大学 生命科学院, 河南 开封 475000)

摘要: 重组水母发光蛋白作为检测植物细胞钙信号的手段是近十几年发展起来的新方法, 本文介绍了重组水母发光蛋白作为 Ca^{2+} 检测探针的发展过程、测钙原理、 Ca^{2+} 浓度检测方法、 Ca^{2+} 浓度换算方法、优点与不足、及在植物细胞钙离子信号检测中的研究进展。并利用国外实验室提供的方法在国内首次得出冷激条件下植物细胞内细胞质中($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$)和液泡膜附近($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{md}}$)钙离子浓度动力学变化曲线。

关键词: 重组水母发光蛋白; 钙浓度换算; $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$; 钙信号

中图分类号: Q945, Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2009)04-0537-04

Recombinant aequorin luminous protein and its application in measuring calcium signal of plant cell

HAO Xiao-Hua¹, ZHANG Guo-Zeng²

(1. Department of Life Sciences, Hunan Art and Science College, Changde 415000, China;

2. Department of Life Sciences, Henan University, Kaifeng 475000, China)

Abstract: Recently, the application of recombinant aequorin luminous protein has appeared in measuring calcium signal of plant cell as a new method. This paper introduced mainly the development of the recombinant aequorin luminous protein as a probe, the principle and operates method of measuring calcium concentration, and how to conversion the calcium concentration. It summarized the advantages and deficiencies of the protein, and collected mainly the progress in development studies in measuring calcium signal of plant cell. Meanwhile, using the method provided by other laboratory, the authors got the cold shock kinetics of $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ and $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{md}}$ for the first time.

Key words: recombinant aequorin luminous protein; conversion to the calcium concentration; $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$; calcium signal

Ca^{2+} 作为普遍的第二信使在细胞信号转导过程中起着非常重要的作用(孙大业等, 2001; 常芳等, 2005), 而人们对 Ca^{2+} 在信号转导中作用的认识, 则很大程度上取决于 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 测定技术的发展(郭祎等, 2003)。最近十几年来出现的新型探针有 Aequorin(水母发光蛋白), yellow cameleon 2.1 等(Sanders 等, 1999)。而 Aequorin 发展最快也最受人们的关注。Aequorin 作为检测钙离子新型探针的使用, 极大地推动了人们对 Ca^{2+} 在细胞信号转导过程中作用的认识进程。十几年来, 国内外取得了

众多令人瞩目的成果。在钙离子信号研究过程中, 水母发光蛋白得到了广泛的应用, 迅速地使钙离子信号传导网络的研究打开了新的局面。

1 水母发光蛋白的发现及早期应用

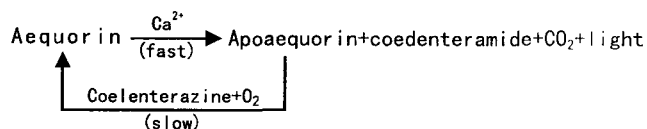
Shimomura 等(1962)首先从维多利亚多管水母(*Aequorea victoria*)中分离出一种蛋白(aequorin), 该蛋白在无氧情况下可以发射出波长为 469 nm 的蓝色光。与荧光素酶不同的是, 该蛋白发光

收稿日期: 2008-03-24 修回日期: 2008-09-17

基金项目: 湖南省自然科学基金(06JJ50042)[Supported by the Natural Science Foundation of Hunan Province(06JJ50042)]

作者简介: 郝小花(1979-), 女, 河南巩义人, 硕士, 主要研究方向为植物生理与分子生物学, (E-mail)yybxiaohua@163.com。

时不需要低分子量的有机物质做为底物或者辅助因子,所以当时被称为光蛋白(photoprotein)。后来的研究发现光蛋白是由约 22 KD 的脱辅基水母发光蛋白(apoaequorin)、氧分子和辅基腔肠荧光素(coelenterazine)三部分形成的复合物。其中脱辅基水母发光蛋白由 189 个氨基酸组成,具有 3 个 Ca^{2+} 结合的 EF hand 结构。腔肠荧光素(coelenterazine)是一个分子量约 400 Da 的疏水基团,它可以自由穿越细胞膜。当 3 个 Ca^{2+} 与水母发光蛋白结合后,引起脱辅基水母发光蛋白和腔肠荧光素之间的共价键破裂,腔肠荧光素被氧化为 coelenteramide,并释放出 CO_2 和一个质子,同时放出波长为 469 nm 的蓝色光。即:



(Charbonneau 等,1985)。

此发射光可以通过生物发光仪来进行检测,反应的速度取决于 Ca^{2+} 的浓度。当 Ca^{2+} 的浓度足够高时(大于 100 $\mu\text{mol/L}$),反应速度达到最快,所有的水母发光蛋白都发生反应并释放出质子,同时发出波长为 469 nm 的蓝色光。当 Ca^{2+} 浓度较低时,则仅有部分水母发光蛋白发生反应。

此外,水母发光蛋白不能渗透通过完整细胞的细胞膜,因此早期实验中所用的水母发光蛋白是从水母中提取出来,通过显微注射的方法将水母发光蛋白注射到细胞内,用来监测细胞内 Ca^{2+} 的动态平衡(Shimomura,1997)。1967 年 Ridgway & Ashley(1967)就首次将纯化的水母发光蛋白显微注射到动物细胞中,并检测到了肌纤维细胞中钙信号的瞬时变化。但该方法对实验技术要求较高,因此限制了水母发光蛋白的应用。在此后 20 年间,其应用仅限于从水母中提取、纯化发光蛋白,并显微注射到细胞内用以研究感兴趣的钙信号。

2 水母发光蛋白的 cDNA 克隆及体外表达

1985 年,Prasher 等(1985)从维多利亚多管水母中克隆并分离出了脱辅基水母发光蛋白的 cDNA,并将其在大肠杆菌中表达,再孵育可自由穿越细胞膜的辅基腔肠荧光素后,腔肠荧光素和脱辅基

水母发光蛋白可以重组成有生物活性的水母发光蛋白,此次发现为水母发光蛋白的广泛应用打下了坚实的基础。

由此,水母发光蛋白在多种细胞类型(哺乳动物细胞、植物、酵母等)中得到表达,产生脱辅基水母发光蛋白(Inouye 等,1986; Rizzuto 等,1992)。检测细胞内 Ca^{2+} 浓度变化时,将腔肠素加入到细胞溶液后,腔肠素自由穿过细胞膜进入细胞与细胞内翻译、表达的脱辅基水母发光蛋白组合,形成功能性的水母发光蛋白,上述过程称为重组(recombinant)。水母发光蛋白和腔肠素重组后就可以检测不同刺激条件下细胞中 Ca^{2+} 浓度的瞬时变化。

Knight 等(1993)用体内重组实验证明 2 $\mu\text{mol/L}$ 的腔肠素黑暗过夜处理烟草和没处理的烟草相比腔肠素对烟草不产生毒性。而且不断的研究发现,水母发光蛋白能忍受一定范围高、低温的刺激,44 $^{\circ}\text{C}$ 时水母发光蛋白仍保持稳定状态,但是 50 $^{\circ}\text{C}$ 约 44% 的水母发光蛋白被破坏;0 $^{\circ}\text{C}$ 的低温不影响水母发光蛋白的生物活性。异博定、La、Ga、EGTA、TEA 的处理对于拟南芥也不会造成伤害(Knight 等,1997)。

此后,人们相继应用水母发光蛋白这一测钙手段测定了拟南芥烟草大豆等多种植物细胞在感受外界不同的刺激过程中细胞质内的钙信号情况。研究表明,机械(或吹拂、激烈摇晃、震动)触摸、低渗胁迫、冷热冲击、有氧和无氧胁迫、盐渍和干旱都可导致 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 水平快速而短暂的变化。变化的持续时间对每种信息而言是特有的,不同的 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 变化引发不同的生理反应。从而确立了水母发光蛋白在检测植物细胞钙信号中的地位。

3 钙离子浓度的换算

水母发光蛋白一旦和 Ca^{2+} 反应即丧失发光功能,因此当一部分水母发光蛋白与 Ca^{2+} 反应时,被消耗水母发光蛋白的发光强度能反映出 Ca^{2+} 浓度变化,而且被消耗的水母发光蛋白的发光强度与 Ca^{2+} 浓度之间存在一种线形关系(Knight 等,1997)。因此通过生物发光仪检测水母发光蛋白发光强度就可以换算出 Ca^{2+} 的相对浓度(Cobbold & Rink,1987)。换算公式为: $\text{pCa} = 0.332588(-\log k) + 5.5593$

K 是一个常量,即每秒种记录的发光总和

(Knight 等, 1991)。由此, 人们可以得到直观的相对钙离子浓度, 单位为微摩尔($\mu\text{mol/L}$)。生物发光仪的检测一般可设定为每秒记录 5 次, 按照预测的细胞反应时间, 记录相应的时长, 得到原始数据。目前, 国内已有计算机专业人员将此计算方法编写程序可对输出的大量原始数据进行快速的批量处理。

4 细胞内定位表达及新应用

作为一个蛋白质, 加上特异性的靶序列后, 这种重组蛋白可以精确地在细胞内定位, 这是人们对水母发光蛋白感兴趣的另一个重要原因(Haley 等, 1995)。用这种方法, 可将水母发光蛋白定位于细胞内不同部位, 成为研究 Ca^{2+} 信号时空复杂性的新工具。

Knight 等(1991)构建了表达脱辅基水母发光蛋白定位于细胞质的质粒 pMAQ。并得到了转化的烟草(*Nicotiana plumbaginifolia*)植株, 利用转基因植物报告了触摸、冷休克和真菌激发子等因子刺激时细胞质中 Ca^{2+} 浓度的变化。而且该实验也证明 $2 \mu\text{mol/L}$ 的腔肠荧光素过夜处理烟草, 对烟草也不会产生毒性。

1996 年, Knight 等(1996)又构建了表达脱辅基水母发光蛋白定位于液泡的细胞质面的质粒 HVA1-2.2, 并检测得到了冷刺激下细胞质中钙离子浓度的变化, 得到了液泡膜附近钙离子浓度变化的动力学曲线。

本文利用 Heather Knight 教授提供的载体, 通过 Floral dip 法转化拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)野生型 Columbia(col-0), 获得在细胞质中和液泡膜附近特异表达脱辅基水母发光蛋白的植株。参照文献提供的方法(Cobbold & Rink 等, 1987; Knight 等, 1996), 得到了冷刺激(cold shock)下细胞质和液泡膜附近钙离子浓度变化的动力学曲线(图 1)(此实验在河南大学植物逆境生物学实验室完成)。

水母发光蛋白能进行选择性的定位, 因此该方法明显优于利用 Ca^{2+} 荧光染料的方法标定 Ca^{2+} 浓度。目前水母发光蛋白已被成功定位于细胞核(Pouly 等, 2001)、叶绿体(Sai & Johnson, 2002)、细胞外基质(Gao 等, 2004)及植物液泡的细胞质面(Knight 等, 1996)。并已获得转化植株。通过对这些转化植株的研究, 证实细胞器能和特异的 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 信号结合。

水母发光蛋白还能用来连续几周测定 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 的变化。比如, 查到在白光和红光下 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 的节律性震荡, 在黑暗下消失; 相反, 叶绿体中 Ca^{2+} 的节律性震荡却始于黑暗开始时。细胞内两个不同部分 $[\text{Ca}^{2+}]$ 的差别可能是形成光周期机理的基础。此外, 利用水母发光蛋白检测 Ca^{2+} 浓度变化可在整体水平进行, 也可在任何类型的细胞中进行。

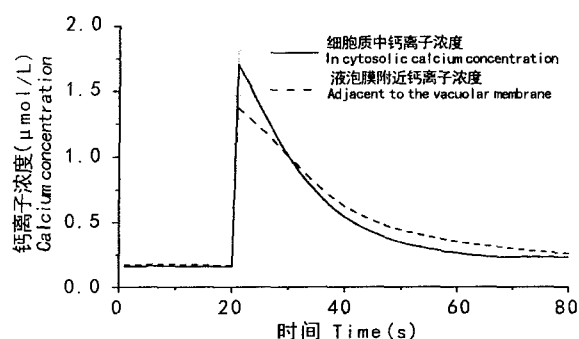


图 1 冷激条件下, 细胞质(CYT)中、液泡膜附近(MD)钙离子浓度变化动力学曲线(每个结果重复 5 次以上)

Fig. 1 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ and $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{md}}$ Cold Shock Kinetics (Traces are averages of five individual seedlings)

2000 年, Knight 利用水母发光蛋白的细胞内特异表达载体(Kiegle 等, 2000)转化拟南芥, 从而得到在拟南芥根的表皮、表皮和皮层伸长区、内皮、中柱鞘等部位定位表达脱辅基水母发光蛋白的植株, 在一定的刺激条件下, 得到不同的钙离子浓度变化的动力学曲线, 证实对于一定的刺激, 不同类型的细胞反应也不同。

水母发光蛋白除在检测植物细胞内钙离子浓度方面有很大的应用和发展之外, 在其它方面的应用也十分广阔。以前因为技术困难, 很少有人注意植物细胞信号传导过程中线粒体钙离子的作用。2003 年, David 等(2003)通过能稳定表达水母发光蛋白的拟南芥, 并定点到线粒体中以用于研究分析植物线粒体中钙离子变化和揭示 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{m}}$ 的独立调节。同样, 钙离子信号途径在丝状真菌中的情况了解得非常少。2004 年, Nelson 发展了一种基于重组水母发光蛋白的方法来进行此研究(Nelson & Kozlova, 2004)。通过密码子优化, 已得到高水平表达水母蛋白的 *Neurospora crassa*, *Aspergillus niger* 和 *Aspergillus awamori* 菌株。

2007 年, 舒柏华等(2007)利用水母发光蛋白生物发光分析技术建立了一种 PCR 产物定量检测技术。实验证实, 该定量检测技术是一种灵敏的、可靠

的、非放射性的基因微量定量方法。

5 优缺点及展望

对于植物细胞而言,叶绿体有自发的荧光,同时植物体内也存在其它微弱荧光。但这两种荧光的强度与植物体内重组的水母发光蛋白的发光强度相比非常微弱,对于应用水母发光蛋白检测细胞内 Ca^{2+} 浓度的变化不会产生太大干扰(Knight 等,1993)。将水母发光蛋白转入到植物中,获得细胞内稳定表达水母发光蛋白的转基因植物,可以在整体水平上简便而快速地测定细胞内 Ca^{2+} 浓度的瞬间变化。避免了以原生质体为材料的诸多不便,同时也使实验得以在更接近自然状态的情况下进行。

重组水母发光蛋白之所以在测定植物细胞钙信号中得到广泛应用,主要是因该方法有以下优点:(1)对细胞无伤害,不影响其正常的生长发育;(2)不外泌,不在细胞内区室化或凝集,能在较长时间内检测钙离子信号;(3)不需激发光源,因而消除了细胞自发荧光的干扰;(4)加信号肽后能准确定位。因此,在钙离子信号研究过程中,水母发光蛋白迅速得到广泛应用,并极大地推进了钙离子信号研究进程。

在试验过程中,也存在一些问题,虽然水母发光蛋白可以在植物体内广泛或选择性表达,但腔肠荧光素的过膜渗透可能不太理想。腔肠荧光素可能很难进入深层组织细胞,对 Ca^{2+} 浓度的检测可能存在一些影响。同时,由于细胞壁的物质障碍,使得植物表层 2~3 层以下细胞发出的荧光无法测量,发光读数主要来自于表层细胞(Rizzuto 等,1992)。因此,也有研究者利用悬浮培养的细胞进行试验,并证明螯合细胞外的钙离子可以诱发细胞内钙库钙离子的释放(Stephen 等,2001)。同时,aequorin 也还存在其它的一些不足:(1)需预先与发光辅基进行重组;(2)测钙过程中发光辅基为不可逆消耗;(3)产生的光信号较弱需要用高灵敏度的生物发光仪检测;(4)不适用于单个细胞中钙信号的研究。

对于辅基腔肠素来说,目前除了标准的腔肠荧光素外,还合成了几种腔肠荧光素的类似物:h-coelenterazine、ip-coelenterazine、coelenterazine 18 及 e-coelenterazine (Knight 等,1991)。这些腔肠荧光素类似物重组的半合成水母发光蛋白具有不同的光发射特征和 Ca^{2+} 敏感度(Shimomura 等,1993)。从理论上讲,这些半合成的水母发光蛋白具有更大的

Ca^{2+} 浓度应用范围和测量准确度。但实际上,半合成的水母发光蛋白缺少稳定性且量子产率明显低于天然的水母发光蛋白,因此限制了其应用(Shimomura 等,1993;Montero 等,1997)。

通过水母发光蛋白基因与细胞特定区域定位信号构建的重组基因和在植物体内重组表达,使该技术既能检测细胞质内钙离子的变化,又能准确定位到大多数的亚细胞结构等细胞器,进而检测这些细胞器中的钙离子变化。这对植物细胞钙信号的局部与整体变化的研究无疑是一个推动,大大促进了植物细胞钙信号的研究进程。在其它方面,如舒柏华等利用水母发光蛋白与 PCR 相结合,建立的 PCR 产物定量检测技术就是在新领域的新发展。但一段时间内,水母发光蛋白还需一定的改进和完善。

参考文献:

- 孙大业,郭艳林,马力耕,等. 2001. 细胞信号转导[M]. 第3版. 北京:科学出版社,211
- Chang F(常芳),Cui SJ(崔素娟). 2005. Recombinant luminous protein and its application in measuring calcium signal of plant cell(重组发光蛋白及其在植物细胞钙信号检测中的应用)[J]. *Plant Physiol Commun*(植物生理学通讯),41(1):77-83
- Charbonneau H, Walsh KA, McCann RO, et al. 1985. Amino acid sequence of the calcium-dependent photoprotein aequorin[J]. *Biochemistry*,24:6 762-6 771
- Cobbold PH, Rink TJ. 1987. Fluorescence and bioluminescence measurement of cytoplasmic free calcium[J]. *Biochem J*,248:313-328
- David C. Logan, Marc R. Knight. 2003. Mitochondrial and cytosolic calcium dynamics are differentially regulated in plants[J]. *Plant Physiol*,133:21-24
- Gao DJ, Knight MR, Trewavas AJ. 2004. Self-reporting *Arabidopsis* expressing pH and Ca^{2+} indicators unveil ion dynamics in the cytoplasm and in the apoplast under abiotic stress[J]. *Plant Physiol*,34:898-908
- Guo W(郭伟),Ren ZY(任兆玉),Hou X(侯洵). 2003. Fluorescence methods for analyzing intracellular second messenger-calcium ion(细胞内第二信使——钙离子荧光测定方法的研究进展)[J]. *Laser J*(激光杂志),24(1):1-5
- Haley A, Russell AJ, Wood N, et al. 1995. Effects of mechanical signaling on plant cell cytosolic calcium[J]. *Proceedings National Academy Sci, USA*, 92:4 124-4 128
- Inouye S, Sakaki Y, Goto T, et al. 1986. Expression of apoaquorin complementary DNA in *Escherichia coli* [J]. *Biochemistry*, 25:8 425-8 429
- Kiegle E, Moore CA, Haseloff J, et al. 2000. Cell-type-specific calcium responses to drought, salt and cold in the *Arabidopsis* root [J]. *Plant J*, 23:267-278
- Knight H, Trewavas AJ, Knight MR. 1996. Cold calcium signal-(下转第 501 页 Continue on page 501)

甘蔗种茎尖生长锥的微管阵列已经发生了很大的变化,更加利于甘蔗茎的增粗。

参考文献:

- A. FAHN. 1990. 植物解剖学[M]. 天津:南开大学出版社
- 李扬汉. 1984. 植物学[M]. 上海:上海科学技术出版社
- 王鉴明. 1985. 中国甘蔗栽培学[M]. 北京:农业出版社
- 张泽林. 1999. 细胞分裂相的决定因素——取材时间[J]. 生物学通报, 34(8):22
- 张新成. 2007. 甘蔗茎尖微管骨架的初步研究[D]. 硕士学位论文文
- 徐是雄,朱微. 1996. 植物细胞骨架[M]. 北京:科学出版社
- Abe H, Funada R, Imaizumi H, et al. 1995. Dynamic changes in the arrangement of cortical microtubules in conifer tracheids during differentiation[J]. *Planta*, 197:418—421
- Chafey N. 1999. Cambium: old challenges-new opportunities[J]. *Trees*, 13:138—151
- Cyr RJ. 1994. Microtubules in plant morphogenesis: role of the cortical array[J]. *Annu Rev Cell Biol*, 10:153—180
- Gu YH(顾月华), Cheng YH(程颖红), Lu JH(罗江虹). 1997. Study on the pattern of developmental change of the microtubule cytoskeleton during mitosis in phaseolus aureus root-tip cells(绿豆根尖细胞微管骨架有丝分裂时相发育变化的研究)[J]. *Acta Laser Biol Sin(激光生物学报)*, 6(4):1 241—1 246
- He Q(何群), You RL(尤瑞麟). 2004. Steedman's wax sectioning for observation of the microtubule cytoskeleton in plant cells(应用 Steedman's S wax 切片法观察植物细胞微管骨架)[J]. *Chin Bull Bot(植物学通报)*, 21(5):547—555
- Holdaway NJ, White RG, Overall RL. 1995. Is the recovery of microtubule orientation in pea roots depend on the cell wall[J]. *Cell Biol*, 19:913—919
- Kerstetter RA, Hake S. 1997. Shoot meristem formation in vegetative development[J]. *Plant Cell*, 9:1 001—1 010
- Li SL(李素丽), Lin JZ(林鉴钊), Wang JL(王俊丽). 2004. Study on the cell division rhythm of different sugarcane varieties[J]. *Guihaia(广西植物)*, 24(2):188—192
- Li ZG(李志刚), Zhang XC(张新成), Lin L(林丽), et al. 2008a. Microtubule cytoskeleton change during mitosis in the shoot apex of sugarcane(甘蔗茎尖细胞有丝分裂过程中微管骨架的变化)[J]. *Chin Bull Bot(植物学通报)*, 25(3):276—283
- Li ZG(李志刚), Zhao HB(赵洪波), Li SL(李素丽), et al. 2008b. The change of microtubule cytoskeleton in the stem-tip cells of sugarcane during mitosis(甘蔗茎尖细胞有丝分裂过程中微管骨架的变化)[J]. *J Anhui Agri Sci(安徽农业科学)*, 36(16):6 805—6 808
- Laskowski, MJ. 1990. Microtubule orientation in pea stem cells; a change in orientation follows the initiation of growth rate decline[J]. *Planta*, 181:44—52
- Oladele FA. 1986. Secondary thickening of the stem in *Amaranthus hybridus* ssp *crentus*[J]. *Korean J Bot*, 29(2):129—134
- Stevenson DW. 1980. Fisher JB. The development relationship between primary and secondary thickening growth in cordyline(Agavaceae)[J]. *Bot Gaz*, 141(3):264—268
- Tian GW, Smith D, Gluck S, et al. 2004. Higher plant cortical microtubule array analyzed *in vitro* in the presence of the cell wall[J]. *Cell Motil Cytoskeleton* 57:26—36
- WANG Junli(王俊丽), LIN Jianzhao(林鉴钊), LI Suli(李素丽), et al. 2004. Studies on the cell division of primary thickening meristem and apical meristem for the shoot apex in sugarcane[J]. *J Guangxi Agric Biol Sci(广西农业生物科学)*, 23(1):11—14
- Wick SM, Seagull RW, Osborn M, et al. 1981. Immunofluorescence microscopy of organized microtubule arrays in structurally stabilized meristem plant cells[J]. *J Cell Biol*, 89:685—690
- Zhang XC(张新成), Li ZG(李志刚), Li SL(李素丽), et al. 2008. Cryosectioning method for the observation of microtubule cytoskeleton in plant cells(冰冻切片法在植物微管骨架研究中的应用)[J]. *Guihaia(广西植物)*, 28(2):164—166
-
- (上接第 540 页 Continue from page 540)
- ling in *Arabidopsis* involves two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation[J]. *Plant Cell*, 8:489—503
- Knight H, Trewavas AJ, Knight MR. 1997. Calcium signaling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity[J]. *Plant J*, 12:1 067—1 078
- Knight MR, Campbell AK, Smith SM, et al. 1991. Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium[J]. *Nature*, 352:524—526
- Knight MR, Read ND, Campbell AK, et al. 1993. Imaging calcium dynamics in living plants using semi-synthetic recombinant aequorins[J]. *J Cell Biol*, 121(1):83—90
- Montero M, Barrero MJ, Alvarez J. 1997. $[Ca^{2+}]$ microdomains control agonist-induced Ca^{2+} release in intact HeLa cells[J]. *FASEB J*, 11:881—885
- Nelson G, Kozlova-Zwinderman O, et al. 2004. Calcium measurement in living filamentous fungi expressing codon-optimized aequorin[J]. *Mole Microbiol*, 52(5):1 437—1 450
- Pouly N, Knight MR, Thuleau P, et al. 2001. The nucleus together with the cytosol generates patterns of specific cellular calcium signatures in tobacco suspension-cultured cells[J]. *Cell Calcium*, 30:413—421
- Prasher DC, McCann RO, Cormier MJ. 1985. Cloning and expression of the cDNA cloning for aequorin, a bioluminescence calcium-binding protein[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 126:1 259—1 268
- Ridgeway EB, Ashley CC. 1967. Calcium transients in single muscle fibers[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 29:229—234
- Rizzuto R, Simpson AWM, Brini M, et al. 1992. Rapid changes in mitochondrial Ca^{2+} revealed by specifically targeted recombinant aequorin[J]. *Nature*, 358:325—328
- Sai J, Johnson CH. 2002. Dark-stimulated calcium ion fluxes in the chloroplast stroma and cytosol[J]. *Plant Cell*, 14:1 279—1 291
- Sanders D, Brownlee C, Harper JF. 1999. Communicating with Calcium[J]. *Plant Cell*, 11:691—706
- Shimomura O. 1997. Membrane permeability of coelenterazine analogues measured with fish eggs[J]. *Biochem J*, 326:297—298
- Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y. 1962. Extraction purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan aequorea[J]. *J Cell Comp Physiol*, 59:223—240
- Shimomura O, Musicki B, Kishi Y, et al. 1993. Light-emitting properties of recombinant semi-synthetic aequorins and recombinant fluorescein-conjugated aequorin for measuring cellular calcium[J]. *Cell Calcium*, 14:373—378
- Shu BH(舒柏华), Wang SL(王胜利), He LY(何丽芸). 2007. Development of a method for quantitative determining PCR products by bioluminescent assay(PCR 产物生物发光分析技术研究)[J]. *Chin J Public Health(中国公共卫生)*, 22(7):820—821
- Stephen G Cessna1, Philip S Low. 2001. An apoplastic Ca^{2+} sensor regulates internal Ca^{2+} release in aequorin transformed tobacco cells[J]. *The J Biol Chem*, 276(14):10 655—10 662