

重组发光蛋白及其在植物细胞钙信号检测中的应用

常芳 崔素娟*

河北师范大学生命科学学院, 石家庄 050016

Recombinant Luminous Protein and Its Application in Measuring Calcium Signal of Plant Cell

CHANG Fang, CUI Su-Juan*

College of Life Sciences, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016

提要 重组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。该文综述了目前用于钙信号测定的重组发光蛋白的类型、测钙原理、优点与不足及其在植物细胞钙信号检测中的应用研究进展。

关键词 钙信号; 重组; 水母发光蛋白; cameleon

固着生长的植物面对外界多种多样的刺激, 无法像动物那样采取快速有效的逃避手段, 但其具有独特的感受和应对外界刺激的机制, 从而适应生存环境。近几年的研究大大促进了人们对植物感受、转导外界刺激机制的认识。其中研究较为清楚的是, 多种生物和非生物因子刺激植物细胞后, 在细胞内往往产生第二信使——钙信号, 进而引发重要的生物学作用。植物细胞感受外界多种多样的刺激后产生的钙信号是如何变化的呢? 于是, 测定钙离子的方法就成为植物细胞钙信号系统研究的关键与制约因素。

1 钙信号的检测方法

钙信号通常指细胞中游离钙离子的变化, 从理论上讲, 细胞内 Ca^{2+} 测定方法有如下要求: (1) 指示剂与 Ca^{2+} 亲和专一性强, 亲合力高, 可检测低浓度的 Ca^{2+} ; (2) 应能获得 Ca^{2+} 浓度的绝对值; (3) 对 Ca^{2+} 水平的反应必须比细胞内 Ca^{2+} 信号引起的相关反应要快; (4) 指示剂与 Ca^{2+} 结合不损害细胞内正常的生理生化过程; (5) 容易进入细胞并在细胞溶质内扩散, 但为了测定胞质部分 Ca^{2+} 浓度, 不应跨内膜系统而进入细胞器; (6) 有可能显示胞内 Ca^{2+} 分布^[1]。但在实际工作中, 完全符合上述要求并适合各种实验条件是相当困难的。正因为如此, 所以人们常根据各种测钙方法的优缺点和具体的实验要求, 选择适当的方法, 或分别用不同的方法检测钙离子的变化。

细胞钙离子的测定方法较多, 主要分为物理

方法及荧光指示剂测定法。物理方法主要有: 原子吸收光谱法、X 射线微区分析技术、离子选择性微电极技术、核磁共振波谱技术、同位素示踪技术等; 荧光指示剂测定法是采用一些能与钙离子特异性结合的化学分子, 这些分子与钙离子特异性结合后, 其化学性质发生变化, 在一定波长的激发光下可发出特定波长的荧光, 这种荧光的强弱与溶液中钙离子浓度呈一定的相关性, 因此, 可通过测定荧光的强弱来反映细胞中钙离子浓度的变化。

根据细胞钙荧光指示剂的化学性质可主要分为两大类: 基于钙螯合剂 EGTA 合成的化学荧光指示剂和基于重组生物发光蛋白的钙指示剂。前一类钙荧光指示剂由于多为化学小分子, 在细胞内容易扩散, 这对细胞内特定部位钙离子的测定明显不利; 而后一类重组发光蛋白可人为构建, 若加各种定位信号序列, 更有利于钙信号时空特性的研究。国内已有多篇综述专门介绍小分子钙化学荧光指示剂^[2~4], 而重组发光蛋白测定是最近十几年刚发展起来的细胞钙信号测定方法, 其在植物生物学领域中的应用已引起研究人员的广泛关

收稿 2004-06-11 修定 2004-11-01

资助 国家自然科学基金重大研究计划(90208004)、国家自然科学基金面上项目(30470889)及河北省自然科学基金项目(C2004000152)。

* 通讯作者(E-mail: cell@mail.hebtu.edu.cn, Tel: 0311-5820649)。

注。

2 重组水母发光蛋白

生物发光(bioluminescence)作为一种有意思的自然现象多年来受到生物学家的广泛关注。20世纪60年代从深海水母(*Aequorin victoria*)中分离出两种在生物测钙中发挥了重要作用的蛋白:水母发光蛋白(aequorin)和绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)。前者与 Ca^{2+} 结合后发射出可见光,通过分析发出的光子数进而测定钙离子浓度变化。用它测钙应用较早,也是目前在测定植物细胞钙信号中应用较为广泛的方法之一。

2.1 水母发光蛋白的结构及其用于测钙的原理 水母发光蛋白复合体由三部分组成:脱辅基蛋白(apoeaequorin, 189个氨基酸, 分子量为22 kD)、亲脂发光辅基(coelenterazine, 分子量为423 D)和氧分子。脱辅基蛋白具有3个EF-手型 Ca^{2+} 结合位点。当蛋白复合体与 Ca^{2+} 结合后,发光辅基发生氧化反应而解离下来,同时发射出波长为469 nm的蓝光^[5](图1)。在整个反应过程中,水母发光蛋白发射的光子数与钙离子浓度成正相关。

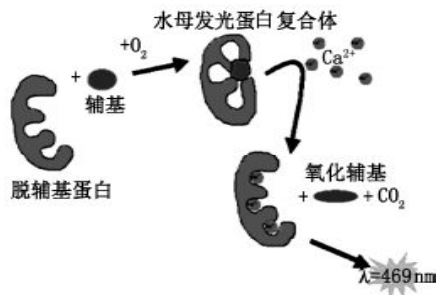


图1 水母发光蛋白结构模式及其用于测钙的原理^[5]

2.2 水母发光蛋白测钙的沿革及其在植物系统中的应用 20世纪60年代, Shimomura等^[6]从深海水母中分离并纯化出水母发光蛋白。1967年, Redgway和Ashley^[7]首次将纯化的水母发光蛋白显微注射到动物细胞中,检测到了肌纤维细胞中钙信号的瞬时变化。在此后近30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以研究感兴趣的钙信号。由于整个过程涉及技术操作比较繁琐,加之植物细胞壁的存在,因而纯化水母发光蛋白在动植物细胞钙离子测定中的应用均没有得到较大范围的推广。所幸的是,

1985年,水母发光蛋白的cDNA成功克隆^[8],之后,由于基因重组及转基因技术的日益成熟,水母发光蛋白在细胞钙离子测定中的应用才翻开了新篇章。1991年, Knight等^[9]首次将水母发光蛋白引入植物体系,检测了风、冷、触摸等刺激对拟南芥胞质钙离子浓度的影响。随后,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^[10~35],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。之后,能准确定位在细胞不同区域中的水母发光蛋白出现,使这一技术的应用又向前推进了一大步。通过水母发光蛋白基因与细胞特定区域定位信号构建成的重组基因和在植物体内重组表达,使这项技术不仅能检测细胞质内钙离子的变化,而且还能准确定位到大多数的亚细胞结构中,如细胞核^[25,30,31]、叶绿体^[23,24]、细胞外基质^[20]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。如今,人们应用重组水母发光蛋白测定了不同物理、化学及生物激发子等刺激条件下多种植物细胞不同区域中钙信号的变化特征(表1)。

2.3 重组水母发光蛋白测钙的优点与不足 重组水母发光蛋白之所以在测定植物细胞钙信号中得到这么广泛的应用,是由于此法有以下优点:(1)一般对细胞无伤害,不影响其正常的生长发育;(2)测钙范围广,可以检测 $10^{-7} \sim 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Ca^{2+} 浓度变化;(3)不外泌,不在细胞内区室化或凝集,能在较长时间内检测;(4)不需光源激发,因而消除了细胞自发荧光的干扰;(5)加信号肽后能准确定位到特定的细胞器及亚细胞结构中。此法的不足之处主要是:(1)需要预先与发光辅基孵育结合;(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,不适用于单个细胞中钙信号的研究;(4)不能绝对避免在目的刺激以前由于水母发光蛋白复合体与胞内较高浓度钙离子作用而造成的损耗。因此,人们针对水母发光蛋白测钙的不足之处,又开发出了一类操作简便、可定位到细胞特定部位,并且可对单个活细胞的特定部位钙进行检测

表1 重组水母发光蛋白在植物钙信号测定中的应用

物种	测定细胞亚区	刺激因素	钙信号特征	参考文献		
拟南芥	细胞质	冷	↑	14		
		蓝光	↑	11		
		重力	↑	12		
		铜	↑	13		
		铝	↑	14		
		蔗糖	↑	15		
		谷氨酸	↑	16		
		氧化胁迫	↑	17		
		干旱	↑	18		
		渗透胁迫	↑	18		
		培养基酸化	↑	13, 14		
		培养基碱化	↑	19		
		盐	↑	20		
		生长素	↑	13		
		胞外基质	干旱	↑	20	
			盐	↑	20	
		烟草	细胞质	风	↑	10
				冷	↑	9
				触摸	↑	9
热	↑			21		
蓝光	↑			22		
黑暗	↑			23		
昼夜节律	↑			24		
渗透胁迫	上升呈双峰			18, 25		
氧化胁迫	↑			26		
脱落酸	↑			27		
cAMP, cGMP	↑			28		
激发子	↑			9, 29		
叶绿体	Mastoparan			↑	25, 30	
	黑暗			↑	23	
	昼夜节律			↑	24	
细胞核	渗透胁迫			↑	25	
	Mastoparan			↑	30, 31	
大豆	细胞质			摆动	↑	32
				激发子	↑	33, 34
欧芹	细胞质	激发子	↑	35		

cAMP: 环腺苷单磷酸; cGMP: 环鸟苷单磷酸; Mastoparan: 肥大(细胞)脱粒肽; ↑指钙离子浓度升高。

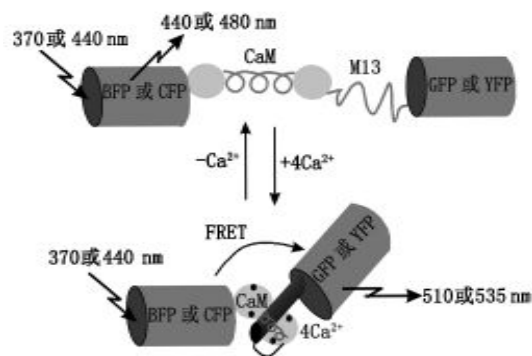
的重组荧光蛋白。

3 重组cameleon

cameleon 是一种根据荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 原理人工构建的重组荧光蛋白。所谓 FRET 是一种物理化学现象, 当光谱互相交迭的两个发色团距离接近到一定程度(一般在 2~7 nm 范围内)时, 受激发的供体发色团的能量就会传递给受体发色团,

而使后者发出荧光的现象。

3.1 cameleon的结构及其测钙原理 cameleon分子是由能量供体——蓝色或蓝绿色荧光蛋白(BFP 或 CFP)、钙调素(calmodulin, CaM)、CaM 结合多肽 M13 及能量受体——绿色或黄色荧光蛋白(GFP 或 YFP)融合而成的重组蛋白(图 2)。当细胞处于静息状态时, 分子中的两个荧光蛋白距离较远, 分别被特定波长的激发光激发而发射出相应波长的荧光; 当外界刺激引起钙离子浓度升高时, CaM 与 Ca^{2+} 结合而活化, 进而结合分子内的 M13, 从而使两个荧光蛋白空间距离拉近。此时, 在供体荧光蛋白(BFP 或 CFP)受到特定波长荧光激发的条件下, 其发射出的荧光可进一步激发受体荧光蛋白 (GFP 或 YFP) 发出荧光, 即发生 FRET 现象。

图2 cameleon结构组成及其测钙原理^[36]

3.2 cameleon在钙信号测定中的应用 1997年, Tsien实验室首先构建了重组cameleon^[36]。之后, 在动物系统中, 它被转化入多种细胞中, 广泛用于不同刺激条件下细胞不同部位钙信号变化的检测(表 2)^[36~46]。重组 cameleon 在植物中的应用起于 1999年, Allen等首次将重组cameleon2.1基因转入模式植物拟南芥中, 测定了无外界刺激时保卫细胞胞质中钙离子的自主振荡, 发现细胞外的高钙、脱落酸(ABA)均能引起胞质钙离子浓度的瞬时升高, 但是不同刺激因素引起钙信号的变化模式不同。即使对同一种刺激因素, 不同气孔以及同一气孔的两个单独的保卫细胞的反应也并不完全一致^[42]。这种重组 cameleon 测钙法使检测同一气孔的两个保卫细胞各自的钙信号成为可能, 从而大大促进了保卫细胞钙信号的研究。随后在以转

表2 *cameleon*在动植物细胞钙信号测定中的应用比较

物种	细胞类型	表达部位	外界刺激	钙信号特征	参考文献
动物	Hela 细胞	细胞质	组氨酸、ATP	钙离子浓度迅速上升	36, 37
	海马细胞	核	组氨酸、ATP	钙离子浓度瞬时升高	37
	Hela 细胞	内质网	组氨酸、ATP、毒胡萝卜素	在很短时间的延迟后, 钙离子浓度下降	36
	小鼠骨骼肌细胞	线粒体	神经刺激	升高并很快下降	38
	Hela 细胞	线粒体基质	组氨酸	钙离子浓度瞬时升高	39
	内皮细胞	质膜	Ca ²⁺ 、ATP 等	近质膜区钙波	40
	胰腺β 细胞	分泌泡	ATP	分泌泡内钙离子浓度升高	41
	内皮细胞	衣被小窝	EGTA、Ca ²⁺ 、ATP、离子霉素等	胞内钙库调节的钙流入	40
	植物	拟南芥保卫细胞	细胞质	ABA、细胞外高Ca ²⁺ 、H ₂ O ₂ 、低温、NaCl	胞质钙离子浓度升高, 钙振荡

*cameleon*基因的拟南芥保卫细胞为材料的胞内钙信号研究中发现: ABA、过氧化物、低温、胞外高钙等刺激都是通过胞内钙信号的变化调节气孔关闭的^[43]。胞质钙信号通过短期钙反应关闭(short-term calcium-reactive closure)和长期永久性关闭(long-term steady-state closure)两种机制调节气孔的关闭^[44]。后来, 有的报道表明: 盐胁迫、低温、H₂O₂等刺激也可引起细胞质钙信号的变化^[44~46]。相对于动物系统来说, *cameleon*在植物细胞钙信号测定中的应用还有待进一步开拓, 尤其是针对不同生长发育阶段和外界刺激条件下的不同细胞类型和不同细胞器中钙信号的检测(表2)。

3.3 *cameleon*测钙的优点、不足和改进 与荧光指示剂及水母发光蛋白测钙相比, *cameleon*测钙具有更大的优越性: (1) 测钙范围更广, 可以检测10⁻⁸~10⁻² mol·L⁻¹的Ca²⁺浓度变化; (2) 荧光更强, 可长时间检测而不分解; (3) 钙依赖的荧光反应可逆, 且无需其他辅助因子; (4) 表达浓度不影响其钙结合特性和测钙的灵敏度; (5) 可定位于细胞器中, 不扩散, 不渗漏。此种测钙方法以其独具的优势引起植物细胞钙信号研究人员的关注, 它的应用将大大促进植物细胞钙信号的研究。

与其他测钙方法相比, *cameleon*虽然有诸多优势, 但其本身也有不足之处, 主要为: (1) 钙结合后荧光信号变化幅度相对较小; (2) 由于FRET荧光供体和受体蛋白的光谱学特性, 因此, 即使在不发生FRET的情况下, 也会有部分的背景荧光; (3) 构成*cameleon*分子的大部分GFP突变蛋白的荧光强度对pH敏感; (4) 重组分子较大, 在某种程度上可能影响其定位效率。

针对*cameleon*重组蛋白测钙中的不足之处, 对其进行的进一步改进主要集中在以下几方面: (1) 采用荧光强度更强、对pH更不敏感的GFP突变蛋白^[37], 以增强信号强度, 避免细胞不同部位中pH变化的影响。(2) 选择具有更高亲和力的钙调素和结合肽对。例如, 对钙调素的钙结合域进行改进^[37]或者选择亲和力更高的钙调素结合多肽^[47]以提高测定钙信号的灵敏度与准确性。(3) 连接不同的信号肽将*cameleon*定位到更多的细胞特定区域, 以检测钙信号变化的时空特征。

4 展望

正是由于钙信号的复杂性和广泛性, 通常要从以下几个方面着手对其进行研究: 它的来源、浓度以及随时间变化的模式等^[48]。理想的测钙方法应该具有较大的安全性、较高的钙结合能力、较强的灵敏度、较高的准确性和特异性(对钙的测定不受其他因素如pH等的影响)以及能准确定位到不同的细胞结构, 从而精确地测定不同刺激条件下钙离子浓度的时空特征。

在过去的30年间, 对钙荧光指示剂的开发和利用虽然已取得了巨大进展, 已有众多的测钙方法可应用于植物钙信号的研究, 尤其是重组荧光蛋白这种无损伤、简便而有效的测钙方法, 解决了钙信号研究中最难解决的细胞钙定位测定问题, 从而大大推动了植物钙信号研究的进程。但无论是用水母发光蛋白, 还是用*cameleon*测钙, 都还远远称不上完美, 尚有待进一步改进。例如, 迄今为止, 关于*cameleon*测钙的优点和不足还没有作详细的方法学上的验证。另外, 虽然有结果显示在*cameleon*分子内的CaM和M13会优先的彼此

结合^[37], 但是众所周知, CaM 是植物信号转导网络中的重要元件, 事实上还需要更有力的证据证明 cameleon 分子内的 CaM 不会干扰植物正常的信号转导通路。再者, 鉴于 cameleon 分子量较大的特点, 如何开发出分子量较小的检测钙信号的重

组荧光蛋白已成为一种需要。在动物体系中, 虽然现在也有用单个 GFP 突变蛋白和 CaM 分子构建而成的新的测钙指示剂——Camgaroos^[49]和 Pericams^[50], 并且也已得到应用, 但在植物系统中的应用尚未见报道。从表 3 可见, 植物中目前

表3 植物中现有钙指示剂和理想钙指示剂的比较

指示剂	荧光强度	钙结合特性	细胞毒性	定位	是否对pH敏感	检测
理想指示剂	强	特异性高, 结合可逆	无	能	否	易检测
钙荧光指示剂	强	特异性好, 结合可逆	低	多数不能	酸性环境下不敏感	单或双通道激光共聚焦显微镜
水母发光蛋白	弱	特异性好, 结合可逆	无	能	否	生物发光检测仪
cameleon	强	特异性好, 结合可逆	未测定	能	多数敏感, 但 cameleon-YC2.1 不敏感	双通道激光共聚焦显微镜、显微数字成像系统

应用的测钙指示剂与理想指示剂相比尚有这样或那样的不足, 但随着细胞生物学和分子生物学技术的不断发展, 相信不久的将来会有更多、更理想的钙指示剂尤其是测钙重组荧光蛋白涌现出来, 它们的应用将有助于我们了解不同刺激条件下, 不同生长发育阶段植物细胞中的钙信号特征。

参考文献

- 孙大业, 郭艳林, 马力耕等. 细胞信号转导. 第3版. 北京: 科学出版社, 2001. 211
- 孙天恩, 周平, 叶梦炜. 荧光指示剂测定植物细胞内游离钙离子的研究进展. 植物生理学通讯, 1996, 32(2): 91~99
- 张川里, 吴本玠. 钙荧光探针的研究及其在生命科学中的应用. 生理科学进展, 1999, 27(1): 37~42
- 郭祎, 任兆玉, 侯洵. 细胞内第二信使——钙离子荧光测定方法的研究进展. 激光杂志, 2003, 24(1): 1~5
- Axel M, Christian M. Aequorin-based measurements of intracellular Ca²⁺-signatures in plant cells. Biol Proced Online, 2002, 4(1): 105~118
- Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, Aequorea I. Cell Comp Physiol, 1962, 59: 223~239
- Ridgeway EB, Ashley CC. Calcium transients in single muscle fibers. Biochem Biophys Res Commun, 1967, 29: 229~234
- Prasher D, MaCann RO, Cormier MJ. Cloning and expression of the cDNA coding for aequorin, a bioluminescent calcium-binding protein. Biochem Biophys Res Commun, 1985, 126: 1259~1268
- Knight MR, Campbell AK, Smith SM. Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium. Nature, 1991, 352: 524~526
- Knight MR, Smith SM, Trewavas AJ. Wind-induced plant motion immediately increases cytosolic calcium. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89(11): 4967~4971
- Lewis BD, Karlin-Neumann G, Davis RW et al. Ca²⁺-activated anion channels and membrane depolarizations induced by blue light and cold in *Arabidopsis* seedlings. Plant Physiol, 1997, 114: 1327~1334
- Plieth C, Trewavas AJ. Reorientation of seedlings in the earth's gravitational field induces cytosolic calcium transients. Plant Physiol, 2002, 129: 786~796
- Plieth C. Plant calcium signaling and monitoring: pros and cons and recent experimental approaches. Protoplasma, 2001, 218: 1~23
- Plieth C, Sattelmacher B, Hansen UP et al. Low-pH-mediated elevations in cytosolic calcium are inhibited by aluminium: a potential mechanism for aluminium toxicity. Plant J, 1999, 18: 643~650
- Furuichi T, Mori IC, Takahashi K et al. Sugar induced increase in cytosolic Ca²⁺ in *Arabidopsis thaliana* whole plants. Plant Cell Physiol, 2001, 42: 1149~1155
- Dennison KL, Spalding EP. Glutamate-gated calcium fluxes in *Arabidopsis*. Plant Physiol, 1998, 117:1023~1030
- Clayton H, Knight MR, Knight H et al. Dissection of the ozone-induced calcium signature. Plant J, 1999, 17: 575~579
- Knight H, Trewavas AJ, Knight MR. Calcium signaling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. Plant J, 1997, 12: 1067~1078
- Plieth C, Sattelmacher B, Knight MR. Ammonium uptake and cellular alkalinisation in roots of *Arabidopsis thaliana*: the involvement of cytoplasmic calcium. Plant Physiol, 2000, 110: 518~523.
- Gao DJ, Knight MR, Trewavas AJ. Self-reporting *Arabidopsis* expressing pH and Ca²⁺ indicators unveil ion dynamics in the cytoplasm and in the apoplast under abiotic stress. Plant Physiol, 2004, 34: 898~908

- 21 Gong M, Van de Luit AH, Knight MR et al. Heat-shock-induced changes in intracellular Ca^{2+} level in tobacco seedlings in relation to thermotolerance. *Plant Physiol*, 1998, 116: 429~437
- 22 Baum G, Long JG, Jenkins GI et al. Stimulation of the blue light phototropic receptor NPH1 causes a transient increase in cytosolic Ca^{2+} . *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 13554~13559
- 23 Sai J, Johnson CH. Dark-stimulated calcium ion fluxes in the chloroplast stroma and cytosol. *Plant Cell*, 2002, 14: 1279~1291
- 24 Johnson CH, Knight MR, Kondo T et al. Circadian oscillations of cytosolic and chloroplastic free calcium in plants. *Science*, 1995, 269: 1863~1865
- 25 Takahashi K, Isobe M, Knight MR et al. Hypoosmotic shock induces increases in cytosolic Ca^{2+} in tobacco suspension-cultured cells. *Plant Physiol*, 1997, 113: 587~594
- 26 Prics AH, Taylor A, Ripley SJ et al. Oxidative signals in tobacco increase cytosolic calcium. *Plant Cell*, 1994, 6: 1301~1310
- 27 Wood NT, Allan AC, Haley A et al. The characterization of differential calcium in tobacco guard cells. *Plant J*, 2000, 24: 335~344
- 28 Volotovskii ID, Sokolovsky SG, Molchan OV et al. Second messengers mediate increases in cytosolic calcium in tobacco protoplasts. *Plant Physiol*, 1998, 117: 1023~1030
- 29 Candra S, Stennis MJ, Low PS. Measurement of Ca^{2+} fluxes during elicitation of the oxidative burst in aequorin-transformed tobacco cells. *J Biol Chem*, 1997, 272: 28274~28280
- 30 Pouly N, Knight MR, Thuleau P et al. The nucleus together with the cytosol generates patterns of specific cellular calcium signatures in tobacco suspension-cultured cells. *Cell Calcium*, 2001, 30: 413~421
- 31 Takahashi K, Isobe M, Muto S. Mastoparan induced an increase in cytosolic calcium ion concentration and subsequent activation of protein kinases in tobacco suspension-cultured cells. *Biochem Biophys Acta*, 1998, 1401: 339~346
- 32 Muller J, Staechelin C, Xie Z-P et al. NOD factors and chito oligomers elicit an increase in cytosolic calcium in aequorin-expressing soybean cells. *Plant Physiol*, 2000, 124: 733~740
- 33 Mithofer A, Ebel J, Bhagwat AA et al. Transgenic aequorin monitors cytosolic calcium transients in soybean cells challenged with β -glucan or chitin elicitors. *Planta*, 1999, 207: 566~574
- 34 Mithofer A, Fliegmann J, Daxberger A et al. Induction of H_2O_2 synthesis by β -glucan elicitors in soybean is independent of cytosolic calcium transients. *FEBS Lett*, 2001, 508: 191~195
- 35 Blume B, Nurnberger T, Nass N et al. Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium requires for activation of pathogen defense in parsley. *Plant Cell*, 2000, 12: 1425~1440
- 36 Miyawaki A, Lopis J, Heim R et al. Fluorescent indicators for Ca^{2+} based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature*, 1997, 388: 882~887
- 37 Miyawaki A, Griesbeck O, Heim R et al. Dynamic and quantitative Ca^{2+} measurements using improved cameleons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 2135~2140
- 38 Rudolf R, Mongillo M, Magalhaes PJ et al. *In vivo* monitoring of Ca^{2+} uptake into mitochondria of mouse skeletal muscle during contraction. *J Cell Biol*, 2004, 166(4): 527~536
- 39 Arnaudeau S, Kelley WL, Walsh JV 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
- 40 Isshiki M, Ying YS, Fujita T et al. A molecular sensor detects signal transduction from caveolae in living cells. *J Biol Chem*, 2002, 277: 43389~43398
- 41 Emmanouilidou E, Teschemacher AG, Pouli AE et al. Imaging Ca^{2+} concentration changes at the secretory vesicle surface with a recombinant targeted cameleon. *Curr Biol*, 1999, 9(16): 915~918
- 42 Allen GJ, Kwak JM, Chu SP et al. Cameleon calcium indicator reports cytoplasmic calcium dynamics in *Arabidopsis* guard cells. *Plant J*, 1999, 19(6): 735~747
- 43 Schroeder JI, Kwak JM, Allen GJ. Guard cell abscisic acid signalling and engineering drought hardness in plants. *Nature*, 2001, 410: 327~330
- 44 Allen GJ, Chu SP, Harrington CL et al. A defined range of guard cell calcium oscillation parameters encodes stomatal movements. *Nature*, 2001, 411: 1053~1057
- 45 Allen GJ, Chu SP, Schumacher K et al. Alteration of stimulus-specific guard cell calcium oscillations and stomatal closing in *Arabidopsis det3* mutant. *Science*, 2000, 289: 2338~2342
- 46 Pei ZM, Murata Y, Benning G et al. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature*, 2000, 406: 731~734
- 47 Truong K, Sawano A, Mizuno H et al. FRET-based *in vivo* Ca^{2+} imaging by a new calmodulin-GFP fusion molecule. *Nat Struct Biol*, 2001, 8: 1069~1073
- 48 Pozzan T, Mongillo M, Rudolf R. Investigating signal transduction with genetically encoded fluorescent probes. *Eur J Biochem*, 2003, 270: 2343~2352
- 49 Baird GS, Zacharias DA, Tsien RY. Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 11241~11246
- 50 Nakai T, Sawano A, Park ES et al. Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense Ca^{2+} . *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 3197~3202