

八种最佳绿色荧光钙指示剂

钙是一种普遍存在的离子，参与许多生理过程。例如，钙可以作为生理途径中的第二信使，其触发神经元中神经递质的释放。它作为调节酶活性的酶辅因子起着不可或缺的作用，对所有肌肉细胞的收缩至关重要。因为 Ca^{2+} 浓度的生理调节对于启动和维持这种重要的细胞过程是必需的，所以已经为此目的开发了许多定性和定量工具。调节细胞质 Ca^{2+} 浓度的常见信号传导途径是磷脂酶 C 途径。该途径由 G 蛋白偶联受体 (GPCR) 靶标的激活引发。为了监测 GPCR 活性，我们建议采用强大的 Ca^{2+} 通量测定法，该测定法使用能够检测 Ca^{2+} 信号的高灵敏度指示剂。细胞内 Ca^{2+} 的检测广泛用于表征药物发现中的 GPCR 激动剂和拮抗剂，以及监测神经科学研究中的突触活动。

表 1. 单波长，可见光可激发的绿色荧光 Ca^{2+} 指示剂的性质

Ca ²⁺ 指标	AM ⁺	盐 ⁺⁺	葡聚糖 ⁺⁺⁺	Ex / Em (nm)	F _{Ca} / F _{free} *	解离常数 (K _d)		亮度	S / B
						名称	K _d (nM)		
Fluo-3	是	是	否	506/526	~100	Fluo - 3	390	*	*
Fluo-4	是	是	否	494/516	~100	Fluo-4	345	**	**
Fluo-8	是	是	否	494/517	~200	Fluo-8	390	***	***
						Fluo-8H	232	***	***
						Fluo-8FF	10000	***	***
						Fluo-8L	1900	***	***
Cal-520	是	是	是	494/514	~100	Cal-520	320	***	***
						Cal-520-FF	9800	***	***
Calbryte-520	是	是	否	492/514	~300	Calbryte-520	1200	*****	*****
Calcium Green-1	是	是	是	506/531	~14	Calcium Green-1	190	***	***
Calcium Green-5N	是	是	否	506/531	~38	Calcium Green-5N	14000	***	***
Oregon Green 488 BAPTA-1	是	是	是	494/523	~14	Oregon Green 488 BAPTA-1	170	***	***

注:

AM⁺: 可透过细胞的乙酰氧基甲酯形式

盐⁺⁺: 细胞不可渗透的盐衍生物 (钠, 铵或钾盐)

葡聚糖⁺⁺⁺: 细胞不可渗透的葡聚糖缀合物

$F_{Ca} / F_{free} \cdot Ca^{2+}$ 结合指示剂相对于其无 Ca^{2+} 指示剂形式的荧光强度。

荧光亮度和信号背景比按比例* (低亮度) 分级为***** (强烈亮)

Fluo-3

Fluo-3 是最常用的绿色钙指标之一。它最早由 Tsien 及其同事在 20 世纪 80 年代后期开发 (Grynkiewicz 等人, 1985)。从那时起, Fluo-3 及其类似物已被用于许多 Ca^{2+} 成像应用中。为理解与 Ca^{2+} 信号传导途径相关的过程的空间动力学做出了相当大的贡献。

Fluo-3 是一种可见光可激发的单波长 Ca^{2+} 指示剂, 其光谱特征与荧光素相似。Fluo-3 受到 488 nm 氩激光线的良好激发, 可以使用 FITC 发射滤光片组进行观察。它的最大吸收和发射波长分别为 506nm 和 526nm。与其他 Ca^{2+} 指标相比, Fluo-3 对 Ca^{2+} 的亲合力相对较低。它表现出约 390nM 的钙解离常数 (K_d), 这可以减轻与 ~100nM 的静息 Ca^{2+} 水平的细胞溶质缓冲相关的缺点。在 Ca^{2+} 游离形式中, Fluo-3 基本上是非荧光的。在结合 Ca^{2+} 时, Fluo-3 的荧光强度增加 ~100 倍, 并且在饱和 Ca^{2+} 水平时, 量子产率为 ~0.14。

在过去的比较研究中, 装载 Fluo-3 的细胞在检测基本和全球 Ca^{2+} 通量时显示出有利的大动态范围。然而, Fluo-3 需要在 37°C 温育, 通过增加对相同温度敏感的阴离子转运蛋白的活性导致显著的指示剂损失。为了改善细胞保留, 在细胞加载过程中使用丙磺舒 (一种有机阴离子转运蛋白抑制剂)。不幸的是, 丙磺舒可能对细胞有毒, 并且当它抑制某些阴离子转运蛋白时, 它可能激活其他阴离子转运蛋白。除了对温度变化敏感外, Fluo-3 还具有 pH 敏感性, 对蛋白质结合敏感。

Fluo-4

Fluo-4 是一种可见光可兴奋的钙指示剂，来自其前身 Fluo-3。与 Fluo-3 一样，Fluo-4 是一种非荧光指示剂，其结合 Ca^{2+} 后强度增加约 100 倍。此外，Fluo-4 是 Fluo-3 的类似物，表现出微小的结构修饰，归因于更亮和更稳定的指示剂。通过用氟取代两个氯取代基，Fluo-4 显示出 ~12nm 的波长偏移向蓝色光谱。这在 494nm 处建立了新的最大吸收波长，使得 488nm 氩激光线可以更有效地激发 Fluo-4。这归因于较低染料浓度下更亮的荧光信号，使 Fluo-4 与 Fluo-3 相比具有更低的光毒性。Fluo-4 的 Ca^{2+} 略高结合亲和力比 Fluo-3， K_d 值为 345 nM。由于这些原因，与 Fluo-3 相比，Fluo-4 是使用共聚焦显微镜的更好选择。

尽管 Fluo-4 在分析贴壁细胞的 Ca^{2+} 通量时显示出更亮的信号和改善的信号与背景比，但在活体样品中它仍然只是中等荧光。正如其前身 Fluo-3 一样，Fluo-4 也使用丙磺舒来改善染料保留，这已知对细胞有毒。

Fluo-8

Fluo-8 是一种新型的绿色钙指示剂，含有相同的荧光素核心，用于 Fluo-3 和 Fluo-4，用于监测细胞中的 Ca^{2+} 浓度和通量。这使 Fluo-8 能够保持与 Fluo-4 相同的光谱特性，同时改善困扰 Fluo-3 和 Fluo-4 的限制。由 Fluo-8 开始的微小结构修改导致了与其就业相关的一些改进，一个是 Fluo-8 改进的装载条件。与需要在 37°C 温度下加载指示剂的 Fluo-3 和 Fluo-4 相比，Fluo-8 可在室温下成功加载，将所需的加载时间缩短至仅 20 分钟。

与其他 Fluo 染料一样，Fluo-8 在无 Ca^{2+} 形式下是非荧光的。在与 Ca^{2+} 结合后，Fluo-8 显示出更大的荧光强度增加 ~200 倍。这比 Fluo-4 亮两倍，比 Fluo-3 亮四倍。与其他探针相比，Fluo-8 的温度依赖性较低，可在室温或 37°C 下获得更一致和可重复的结果。Fluo-8 及其类似物有四种不同的形式，每种形式表达不同的钙结合亲和力。Fluo-8 的 $k_d \sim 389$ 纳米，Fluo-8H 的 $k_d \sim 232$ 纳米，Fluo-8L 的 k_d 的 $\sim 1.86 \mu\text{M}$ 和 Fluo-8FF 的 $k_d \sim 10 \mu\text{M}$ 。Fluo-8L 和 Fluo-

8FF 具有显著较低的 Ca^{2+} 结合亲和力，使其更适合检测微摩尔范围内的细胞内 Ca^{2+} 水平。

Cal-520

Cal-520 是一种新型荧光钙指示剂，与老一代的 Ca^{2+} 相比具有几项值得注意的改进和优势 Fluo-3 和 Fluo-4 等指标。Cal-520 的一个改进是其最佳吸收和发射波长的变化比 Fluo-3 短~12nm，导致最大吸收波长为 494nm。当由 488nm 氩激光线激发时，这显著地将 Cal-520 的激发效率提高到其峰值最大值的 94%，这比 Fluo-3 的 40% 更有效。Cal-520 的最大发射波长为 514 nm，是使用红色荧光指示剂进行多路复用的理想指标。此外，Cal-520 的激发效率得到提高，可以在毒性较低或染料浓度较低的情况下使用。这对于设计用于研究细胞内 Ca^{2+} 的实验是有利的 通过共聚焦显微镜测量，通过降低荧光饱和度对成像的影响。

与 Fluo-3 和 Fluo-4 相比，Cal-520 对 Ca^{2+} 具有略高的亲和力， K_d 值为 320 nM。此外，Cal-520 优化了胞质溶胶的定位。这减少了细胞器（例如线粒体）中的指示剂区室化，并确保检测到的信号准确反映了细胞溶质游离 Ca^{2+} 浓度的变化。Cal-520 是一种强大的探针，用于基于荧光的检测细胞内钙动员。它对评估 GPCR 和钙通道靶标以及筛选其激动剂和拮抗剂具有高度敏感性。

Cal-520 有 AM 酯，盐，葡聚糖结合物和生物共轭形式，可适应任何实验设计。使用 Cal-520 AM 的一个显著优点是消除了对活细胞有毒的丙磺舒。Cal-520 生物共轭物，如 Cal-520 生物胞素和生物素，可以与抗生物素蛋白和链霉抗生物素蛋白结合，而不会改变其检测 Ca^{2+} 反应的敏感性。Cal-520 葡聚糖偶联物可以通过胞吞作用显微注射或被细胞摄取。取决于所研究的组织类型，Ca1-520 葡聚糖缀合物可与 3,000 或 10,000 分子量的葡聚糖分子缀合。

Calbryte-520

Calbryte-520 是最近推出的下一代 Ca^{2+} 指示剂，作为 Fluo-3 和 Fluo-4 等传统绿色钙指标的优异替代品。Calbryte-520 的荧光激发和发射最大值分别为 492 nm 和 514 nm，是此列表中的最佳指示器，适用于 488 nm 氩激光线的高效激发。Calbryte-520 的光谱特性与 Fluo-4，Calcium Green-1 和 Oregon Green 488 BAPTA-1 的光谱特性非常接近，可实现 Calbryte 520 与这三个指标中的任何一个之间的无缝过渡。Calbryte 520 有 AM 酯形式或钾盐衍生物。Calbryte 520, AM 的细胞渗透性使其非常适合测定 Ca^{2+} 活细胞中的浓度，而 Calbryte 520, 钾盐的细胞不可渗透性使其适用于 Ca^{2+} 指标的校准。

在 Calbryte 520 的开发过程中，改进的重点是显著提高其信号背景比。为了减少背景干扰，Calbryte 520, AM 保持无活性，非荧光显示对细胞外溶液中存在的痕量 Ca^{2+} 的响应最小。AM 酯促进 Calbryte 520 在细胞膜上的被动扩散，其中非特异性细胞内酯酶切割 AM 酯官能团，激活 Calbryte-520 的荧光和对 Ca^{2+} 的反应。Calbryte-520 的一个显著优势是消除丙磺舒以提高染料保留率（Cal-520 除外，所有其他 Ca^{2+} 此列表中提到的指标需要 probenecid）。活化的 Calbryte-520 在细胞质内表现出优异的细胞保留和定位。这确保了检测到的信号是细胞内 Ca^{2+} 水平的准确评估。

与所有钙指示剂一样，Calbryte-520 在螯合成游离 Ca^{2+} 后荧光强度增加。Calbryte-520 显示的荧光强度增加约 300 倍，其次是 Fluo-8 增加约 200 倍，然后 Fluo-3，Fluo-4，Cal-520 显示增加 ~100 倍。和 Oregon Green 488 BAPTA-2。Calbryte-520 的量子产率是 Fluo-3 或 Fluo-4 的三倍，并且其 K_d 值为 1200 nM。这些特性使 Calbryte-520 成为钙通量检测和 GPCR 激动剂和拮抗剂高通量筛选的高度敏感指标。Calbryte-520 经过优化，可与共聚焦激光显微镜，荧光酶标仪和流式细胞仪配合使用。

Calcium Green-1

Calcium Green-1 是来自荧光化合物荧光素的可见光可激发指示剂。与上述前人 Fluo-3 和 Fluo-4 一样，钙绿-1 在与游离 Ca^{2+} 结合后表现出荧光发射强度的

增加。最大吸收和发射波长分别为 506nm 和 531nm，钙绿-1 适合于通过氩激光线激发并使用 FITC 发射滤光器组可视化。

与 Fluo-3 和 Fluo-4 的强度增加~100 倍相比，钙绿-1 显著低于~14 倍。然而，它对 Ca^{2+} 具有更强的亲和力，表现出 K_d 值为 190 nM，并且在饱和 Ca^{2+} 浓度下显著更大的量子产率为 0.75。在较低的 Ca^{2+} 浓度下，钙绿-1 比 Fluo-3 更具荧光性，这提高了静息细胞的可见性，使其更容易建立基线荧光和 Ca^{2+} 水平。这些特性也会降低钙绿-1 的光毒效应。因为钙绿-1 本质上更荧光，所以它需要比 Fluo-3 更低的照射强度和更低的染料浓度。不幸的是，与 Fluo-3 和 Fluo-4 一样，钙绿-1 需要丙磺舒以改善细胞保留，这可能对细胞有毒。

Calcium Green-1 可作为细胞渗透性 AM 酯，或作为细胞不可渗透的葡聚糖缀合物和盐衍生物，适用于各种钙信号传导研究，包括 Ca^{2+} 通量测定和活组织中 Ca^{2+} 的多光子激发成像。钙绿-1 适用于各种荧光平台，如荧光显微镜和流式细胞仪。

Calcium Green-5N

Calcium Green-5N 是一种相对低亲和力的 Ca^{2+} 指示剂，具有与 Calcium Green-1 相同的光谱特性。在该列表中提到的所有 Ca^{2+} 指示剂中，钙绿-5N 对 Ca^{2+} 具有显著较弱的亲和力，在 $\sim 14\mu\text{M}$ 时具有较大的解离常数。与 K_d 值 $< 1\mu\text{M}$ 的指标相比，钙绿-5N 的 K_d 更大，使其更适合追踪快速钙动力学的动力学。在过去的研究中，钙绿 5N 已被证明是测量 Ca^{2+} 浓度至少 $50\mu\text{M}$ 的合适方法。与高亲和力 Ca^{2+} 一起使用时指示剂，钙绿 5N 可以提供细胞内 Ca^{2+} 尖峰绝对量级的指示。

在与游离 Ca^{2+} 结合后，钙绿-5N 的荧光强度增加约 38 倍，这是钙绿-1 增加约 14 倍的两倍。然而，即使具有更好的发射强度增加，钙绿-5N 表现出相对较少的荧光，除了在经历高振幅 Ca^{2+} 通量的细胞中。由于这些特性及其对 Ca^{2+} 的低亲和力，钙绿 5N 可能在检测适度或瞬态 Ca^{2+} 通量时不敏感。

Oregon Green 488 BAPTA

Oregon Green 488 BAPTA-1 (OG488 BAPTA-1) 是一组明亮的荧光钙指示剂，与钙绿-1 具有相似的光谱特征。两者之间的主要区别是 OG488 BAPTA-1 的荧光吸收变化和激发最大值~10nm 更短，导致最大吸收波长为 494nm。这显著改善了 488nm 氩激光线上的 OG488 BAPTA-1 激发效率。在不含 Ca^{2+} 的溶液中，OG488 BAPTA-1 具有中度荧光。与游离 Ca^{2+} 结合后，OG488 BAPTA-1 经历荧光发射强度增加~14 倍。与钙绿-1 一样，OG488 BAPTA-1 具有约 0.7 的量子产率，同时保持~140nM 的小解离常数。OG488 BAPTA-1 的这种光谱特性允许其在较低染料浓度下使用，使其适合于使用共聚焦激光扫描显微镜研究细胞内 Ca^{2+} 浓度。此外，已知研究使用 OG488 BAPTA-1 实施双钙指示系统。例如，OG488 BAPTA-1 和 Fluo-4 的组合已用于研究将有限基础信号水平与大的刺激依赖性增加相结合的响应。