

# 基于基因编码生物传感器的高通量植物钙信号动态检测



## 作者

杨菁喆，魏玉凤  
安捷伦科技（中国）有限公司

卢磊，（王超课题组）  
中国科学院分子植物科学卓越创新中心

## 摘要

本应用简报介绍了使用 安捷伦 BioTek Synergy Neo2 多功能微孔板检测系统，基于基因编码的钙离子指示剂 (Genetically Encoded Calcium Indicators, GECIs) 开展活体植物叶片的动态钙信号测定的方法。本氏烟草中 CC<sub>G10</sub>-NLR 蛋白激活后形成的抗病小体能够介导钙离子内流，进而导致细胞质钙浓度持续增加。通过精确分析钙信号的动态变化，可以评估抗病小体不同组装结构的作用效果。本文详细阐述了钙离子传感器的检测原理、在本氏烟草中监测胞质钙离子 ( $[Ca^{2+}]_{cyt}$ ) 的具体实验步骤、基于 Synergy Neo2 的仪器检测配置和 Gen5 软件程序设置步骤，以及利用该技术评价植物免疫反应的简要方案。

前言

植物利用胞质钙离子 ( $[Ca^{2+}]_{cyt}$ ) 波动作为关键的第二信使来响应各种生物和非生物胁迫，特别是病原体攻击触发的免疫反应。精确、定量地测量  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  动态对于理解免疫信号转导至关重要。而植物钙离子 ( $Ca^{2+}$ ) 信号检测技术自 20 世纪 70 年代以来，经历了从化学染料到基因编码生物传感器的重大革新。早期研究主要依赖于化学荧光探针（如 Quin-2、Fura-2）。此类染料虽能实现  $Ca^{2+}$  动态可视化，但存在装载效率低且难以靶向特定细胞器等局限性，无法用于活体植物钙信号检测。20 世纪 90 年代，基于水母发光蛋白 (Aequorin) 的转基因技术实现了植物活体  $Ca^{2+}$  检测，但其信号强度弱且需要外源性底物补充。21 世纪初，基因编码钙指示蛋白 (GECIs) 是关键的技术突破。其中，GCaMP 系列因其高灵敏度和易操作性而逐渐成为钙信号检测的重要工具。GCaMP3 通过将钙调蛋白 (CaM)、M13 肽与增强型绿色荧光蛋白 (EGFP) 耦合，显著提高了检测信噪比，支持多功能酶标仪和荧光显微镜等多种平台检测。目前，GCaMP3 已应用于拟南芥、烟草和水稻等模式植物中<sup>[1]</sup>。

植物细胞内免疫受体 (NLRs) 可分为两类：Toll/ 白细胞介素 -1 受体 / 抗性蛋白 NLRs (TIR-NLRs) 和 卷曲螺旋 NLRss (CC-NLRs)。在感知病原体效应物后，这两类 NLRs 都将寡聚化以形成称为“抗病小体” (Resistosome) 的复合物，从而执行特定的免疫信号传导功能。其中，由 CC-NLRs 形成的五聚体抗病小体的 N 端 CC 结构域形成漏斗状结构，插入质膜 (PM) 并作为钙通透性孔道，引发大量钙离子跨膜内流并提高细胞质  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  水平，从而诱导防御反应和细胞死亡<sup>[2]</sup>。

目前已经鉴定出多个不同的 CC-NLRs 系统发育亚进化枝，包括 RPW8 型 CC-NLRs (CC<sub>R</sub>-NLRs) 和 G10 型 CC-NLRs (CC<sub>G10</sub>-NLRs)<sup>[3]</sup>。虽然目前对于 NLR 的分子机制方面已经取得了重大进展，但 CC<sub>G10</sub>-NLRs 在植物免疫受体生物学中仍然未得到深入研究。小麦中功能获得性突变体 (WAI3<sup>GOF</sup>) 表现出自身免疫表型，包括自发性过敏反应 (HR) 和细胞死亡、组成型免疫激活和小麦白粉病抗性增强。WAI3<sup>GOF</sup> 编码属于 CC<sub>G10</sub>-NLRs 亚分支的自激活型 NLR<sup>[4]</sup>。为了确定 WAI3<sup>GOF</sup> 是否介导钙离子内流，王超与合作团队在表达  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  报告基因 GCaMP3 的稳定转基因本氏烟草植株中瞬时表达了 WAI3<sup>GOF</sup> 及其突变体，通过 Synergy Neo2 的动力学荧光强度读数模式对  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  的动态变化进行了监测。

实验部分

试剂和样品

表达 WAI3<sup>GOF</sup> 及其突变体的本氏烟草叶片（表达  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  报告基因 GCaMP3）来自中国科学院分子植物科学卓越创新中心王超团队，刺激物：携带表达质粒的农杆菌，或 100 mM CaCl<sub>2</sub> 溶液，或 100 nM–1 μM 的 flg22（细菌鞭毛蛋白衍生肽，经典的免疫激发子）；抑制剂：2 mM LaCl<sub>3</sub>（钙通道抑制剂），96 孔黑色平底微孔板（不透明底板，如 Corning #3991），打孔器（直径 0.4 cm）。

仪器和设备

采用 Agilent BioTek Synergy Neo2 多功能微孔板检测仪。该套检测系统采用专有的 Hybrid 技术，具有独立的光路。同时，滤光片模块配置双 PMT 检测器，可同时进行两次测量，比传统系统更快提供结果。这种快速 PMT 检测是 FP、FRET、TR-FRET、BRET 和其他比率测定的理想选择；同时，双 PMT 配置的机型也能够根据检测需求灵活调整为单 PMT 检测，例如本实验中使用的荧光传感器为单波长型，可相应地选择单 PMT 检测所需的荧光模块。

实验选用 1035101 号滤光片 cube 作为下部模块，搭配 1035003 号 cube 作为上部模块，可支持 Ex485nm/Em516nm 的荧光检测。采用仪器的动力学检测模块，非常便于开展钙信号长时程监测。

配套软件采用 Gen5 3.16 标准仪器控制和分析软件，主要参数设置和步骤分别见表 1 和图 1。

表 1. Gen5 软件程序主要参数设置

| Agilent BioTek Synergy Neo2 Read Parameters |                                     |
|---------------------------------------------|-------------------------------------|
| Mode                                        | Fluorescence intensity with kinetic |
| Filter Sets                                 | Single PMT                          |
| Excitation/Emission                         | Ex 485/Em 516nm                     |
| Gain (PMT1, PMT2)                           | 35                                  |
| Read Speed                                  | Normal                              |
| Delay After Plate Movement                  | 0                                   |
| Measurements Per Data Point                 | 10                                  |
| Read Height                                 | 5.00 mm                             |
| Dynamic Range                               | Standard                            |

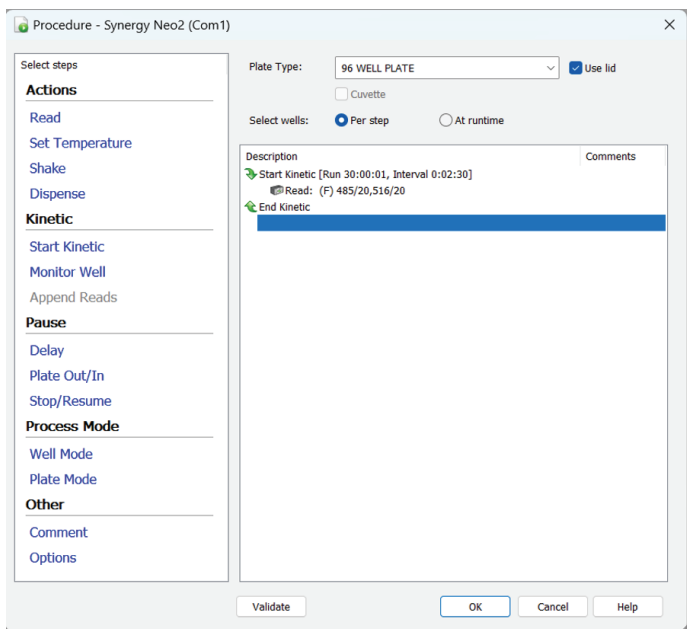


图 1. Gen5 软件主要程序步骤

## 植物培养和钙信号检测步骤

将携带相关构建物的农杆菌菌株通过注射渗透法导入本氏烟草 (*Nicotiana benthamiana*) 叶片中, 该烟草表达胞质钙离子 ( $[Ca^{2+}]_{cyt}$ ) 荧光报告蛋白 GCaMP3。渗透培养 5 小时后, 使用打孔器取直径为 0.4 cm 的叶盘, 转移至 96 孔黑色平底 Corning 检测板中, 每孔预先加入 200  $\mu$ L 蒸馏水 (见图 2)。将叶盘在室温静置孵育 1 小时, 以消除取样过程诱导的  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  变化。随后使用 BioTek Synergy Neo2 多功能微孔板检测仪, 以 2.5 分钟的间隔持续检测 GCaMP3 的荧光信号 (485 nm 激发和 516 nm 发射), 动态监测 30 小时。

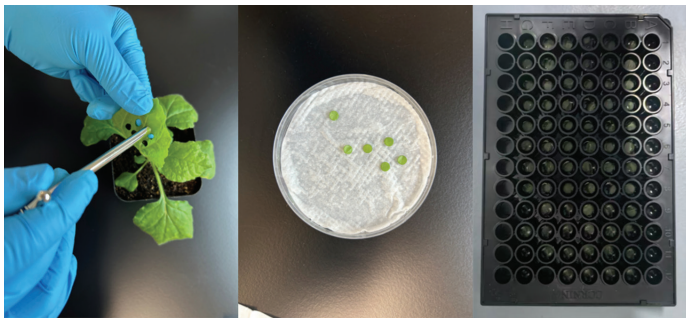


图 2. 烟草植株叶盘取样及置入 96 孔板中用于高通量检测

## 结果与讨论

### WAI3 抗病小体引发植物细胞质 $Ca^{2+}$ 持续内流

WAI3 属于  $CC_{G10}$ -NLRs 亚支, 并且是一个与其他 CC-NLRs 存在显著差异的独特谱系<sup>[4]</sup>, 并且激活的  $CC_{G10}$ -NLRs WAI3 能够形成八聚体抗病小体。为了确定 WAI3<sup>GOF</sup> 能否介导  $Ca^{2+}$  内流, 研究团队在表达  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  报告基因 GCaMP3 的稳定转基因本氏烟草植株 (*N. benthamiana*) 中瞬时表达了 WAI3<sup>GOF</sup> 及其突变体。通过 SynergyNeo2 的荧光滤光片模块, 动态检测荧光强度变化来监测  $Ca^{2+}$  动态, 确保数据更稳定可靠。

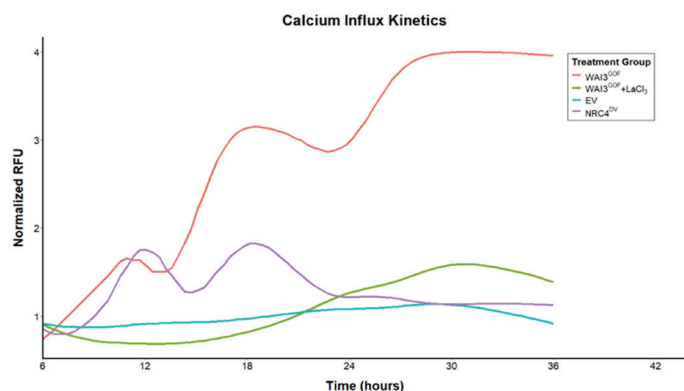


图 3. 采用表达钙离子报告蛋白 GCaMP3 的本氏烟草叶片进行  $Ca^{2+}$  动态时程分析, 通过渗入携带特定载体的农杆菌菌株处理叶片, 随后通过 SynergyNeo2 持续监测叶盘 GCaMP3 荧光强度 36 小时。从图中可以看出, WAI3<sup>GOF</sup> 的表达诱导本氏烟草细胞持续且强烈的  $Ca^{2+}$  内流, 该现象受到 2 mM  $LaCl_3$  抑制。分别以空载体 (EV) 和自激活突变体  $NRC4^{DV}$  作为阴性与阳性对照 (借助 Gen5 计算 Normalized 原始数据后使用 R studio 绘图)

本实验对比了三种情况: 作为对照组的理论上不会引起钙内流的空载体 (EV); 已知能够形成抗病小体并引发钙内流的  $NRC4^{DV}$  突变体; 以及目标研究突变体 WAI3<sup>GOF</sup>。实验结果如图 3 所示。这些结果表明, WAI3<sup>GOF</sup> 能够使钙离子信号长时间、稳定地升高, 其效果显著强于  $NRC4^{DV}$  和空载体 EV。这一过程分为两个阶段 (即短暂的快速上升期和长时间的稳定期), 表明 WAI3<sup>GOF</sup> 诱导钙信号过程在初始激活信号后存在正反馈调节。 $NRC4^{DV}$  虽然也能够升高钙离子, 但维持时间相对较短, 表明 WAI3<sup>GOF</sup> 的作用更持久, 反映这两个基因在本氏烟草叶片中的组装机制或蛋白质稳定性可能存在差异。添加钙通道抑制剂  $LaCl_3$  后, WAI3<sup>GOF</sup> 引起的钙内流被完全阻断, 表明其作用依赖钙离子通道活性并且对  $LaCl_3$  抑制敏感。研究团队的其他实验结果还表明, WAI3<sup>GOF</sup> 引发的细胞死亡 (HR) 也随着  $LaCl_3$  的添加而消失, 证明钙信号是细胞死亡的关键调控因素。

## 参考文献

1. Allan C, Morris R J, Meisrimler C N. Encoding, transmission, decoding, and specificity of calcium signals in plants. J Exp Bot, 2022,73(11):3372-3385
2. Jones J D, Vance R E, Dangl J L. Intracellular innate immune surveillance devices in plants and animals. Science, 2016,354(6316)
3. Contreras M P, Ludke D, Pai H, et al. NLR receptors in plant immunity: making sense of the alphabet soup. EMBO Rep, 2023,24(10):e57495
4. Guanghao Guo, He Zhao, et al. An activated wheat CCG10-NLR immune receptor forms an octameric resistosome. biorxiv, 2025(2025.08.26.672026)

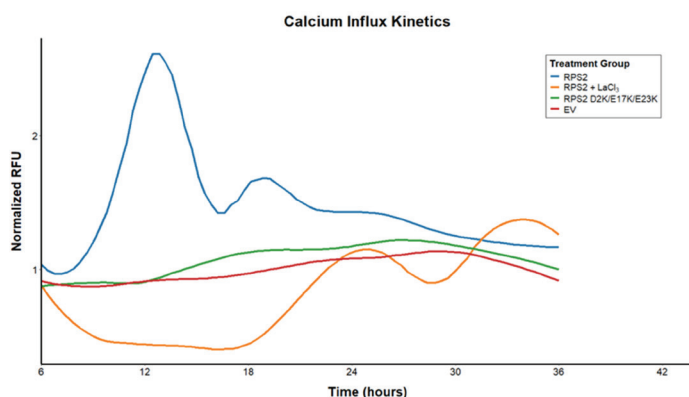


图 4. 野生型 RPS2 的表达在本氏烟草细胞中引发强烈的细胞质钙离子内流，使用 2 mM  $\text{LaCl}_3$  处理则可抑制这种内流。相反，RPS2<sup>D2K/E17K/E23K</sup> 通道突变体无法引发钙离子内流（借助 Gen5 计算 Normalized 原始数据后使用 R studio 绘图）

与 WAI3<sup>GOF</sup> 引发的持续  $\text{Ca}^{2+}$  急剧升高不同，破坏膜结合的 L12E/L15E 突变体或破坏通道  $\alpha 1$ -螺旋的酸性内层功能的突变体 D3K/E17K/D20K 基本无法显著提高细胞内钙水平，也不会引发过敏反应 (HR) 导致的细胞死亡，其进一步支持 WAI3<sup>GOF</sup> 在介导跨膜钙离子内流中的重要作用。此外，除 WAI3 之外的 CC<sub>G10</sub> 家族 NLRs，例如 RPS2，在激活后也会驱动较强的  $\text{Ca}^{2+}$  信号（见图 4）。这些发现表明， $\text{Ca}^{2+}$  信号是 NLR 免疫激活的核心枢纽，在多种免疫反应中均作为关键的第二信使发挥作用。

## 结论

本研究使用安捷伦 BioTek Synergy Neo2 多功能微孔板检测仪对表达 GCaMP3 报告基因的本氏烟草 (*N. benthamiana*) 进行了胞质  $\text{Ca}^{2+}$  动态变化实时监测。实验结果表明，WAI3 功能获得型突变体能够诱导持续的  $\text{Ca}^{2+}$  内流，这一过程参与植物免疫受体的可塑性调控。其中，Synergy Neo2 的滤光片光路为植物活体钙离子检测提供了高灵敏度硬件基础，而 Gen5 软件的灵活的程序编辑能够支持 96 孔板体系的高通量长时程钙离子动态监测和动力学曲线的定量分析。除使用 GCaMP3 单荧光蛋白传感器以外，王超团队还使用基因编码的比率型钙传感器，消除了非生理学变异带来的误差；且结合 Synergy Neo2 的双平行 PMT 同步监测，能够快速、精准地获得钙离子定量结果；通过比率型传感器升级，能够从植物整体到单细胞甚至亚细胞水平精准量化钙动态，推动植物逆境响应的分子机制研究。

查找当地的安捷伦客户中心：

[www.agilent.com/chem/contactus-cn](http://www.agilent.com/chem/contactus-cn)

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

[LSCA-China\\_800@agilent.com](mailto:LSCA-China_800@agilent.com)

在线询价：

[www.agilent.com/chem/erfq-cn](http://www.agilent.com/chem/erfq-cn)



微信搜一搜

Q 安捷伦细胞与基因组学 |

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

DE-011392

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本文中的信息、说明和技术指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2025  
2025 年 12 月 18 日，中国出版  
5994-8857ZHCN