



基因编码荧光探针的构建与应用

崔萌萌¹, 王殿冰¹, 张先恩^{1,2*}

1. 中国科学院生物物理研究所生物大分子国家重点实验室, 北京 100101

2. 中国科学院深圳理工大学(筹)合成生物学院, 深圳 518055

*通讯作者, E-mail: zhangxe@ibp.ac.cn

收稿日期: 2022-04-13; 接受日期: 2022-05-11; 网络版发表日期: 2022-09-06

国家重点研发计划(编号: 2017YFA0205500, 2018YFA0902702)、国家自然科学基金重大项目(编号: 21890743)和中国科学院战略性先导科技专项(B类)(编号: XDB29050100)资助项目

摘要 基因编码荧光探针能够可视化探测活细胞中多种分析物及其相关分子事件, 已成为细胞生物学等生命科学研究的强大分子工具. 本文介绍了基因编码荧光探针的类型和主要应用场景, 归纳了现有探针的优点和存在的问题, 并对其未来发展进行了展望.

关键词 基因编码荧光探针, 荧光共振能量转移(FRET), 环状排列荧光蛋白(cpFP)

1 引言

基因编码荧光探针源于1962年Shimomura等^[1]在维多利亚多管发光水母中发现的野生型绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP). Chalfie等^[2]1994年将GFP用作基因表达标签. GFP由238个氨基酸组成, 分子量约为26.9 kD, 分子结构含有1个 α -螺旋和11个 β -片层, 形成一个“桶”状结构, 又称 β 桶, 发色团为三肽基团(Ser65-Tyr66-Gly67), 位于 β 桶的中心, 免受外界环境干扰淬灭. GFP在395和475 nm分别有主要和次要的激发峰, 在509 nm处为发射峰^[3,4]. 1995年, Heim等^[5]对野生型GFP完成首个重大改变——S65T, 这个突变不仅大幅提高了GFP的荧光强度和光稳定性, 也使主激发峰从395 nm迁移至488 nm, 而发射峰保持不变. 随后的突变F64L进一步增强了发射强度, 成为常用的增强型GFP (EGFP). 目前已经发展出多种颜色的GFP突变体,

广泛用作基因表达荧光标签^[6]. 1997年, Miyawaki等^[7]构建了第一个检测细胞内 Ca^{2+} 浓度的基因编码荧光探针——Cameleons, 正式开启了基因编码荧光探针的时代.

2 基因编码荧光探针的构建

基因编码荧光探针由识别元件和报告元件组成, 能够将探针与特定分析物的反应转化为荧光信号^[8], 其根据设计原理有以下几种(图1)^[9], 每种设计具体适合应用的被检测物种类详见表1.

(1) 具有识别和报告功能的单一荧光蛋白(图1A), 它们或依赖其发色团与分析物之间的直接相互作用产生信号(A1), 或依赖于分析物改变发色团附近的静水压力而产生信号(A2), 或依赖于荧光蛋白的特定修饰产生信号(A3)^[11,12,20].

引用格式: Cui M, Wang D, Zhang XE. Genetically encoded fluorescent sensing probes. *Sci Sin Chim*, 2022, 52: 1699–1711, doi: 10.1360/SSC-2022-0071

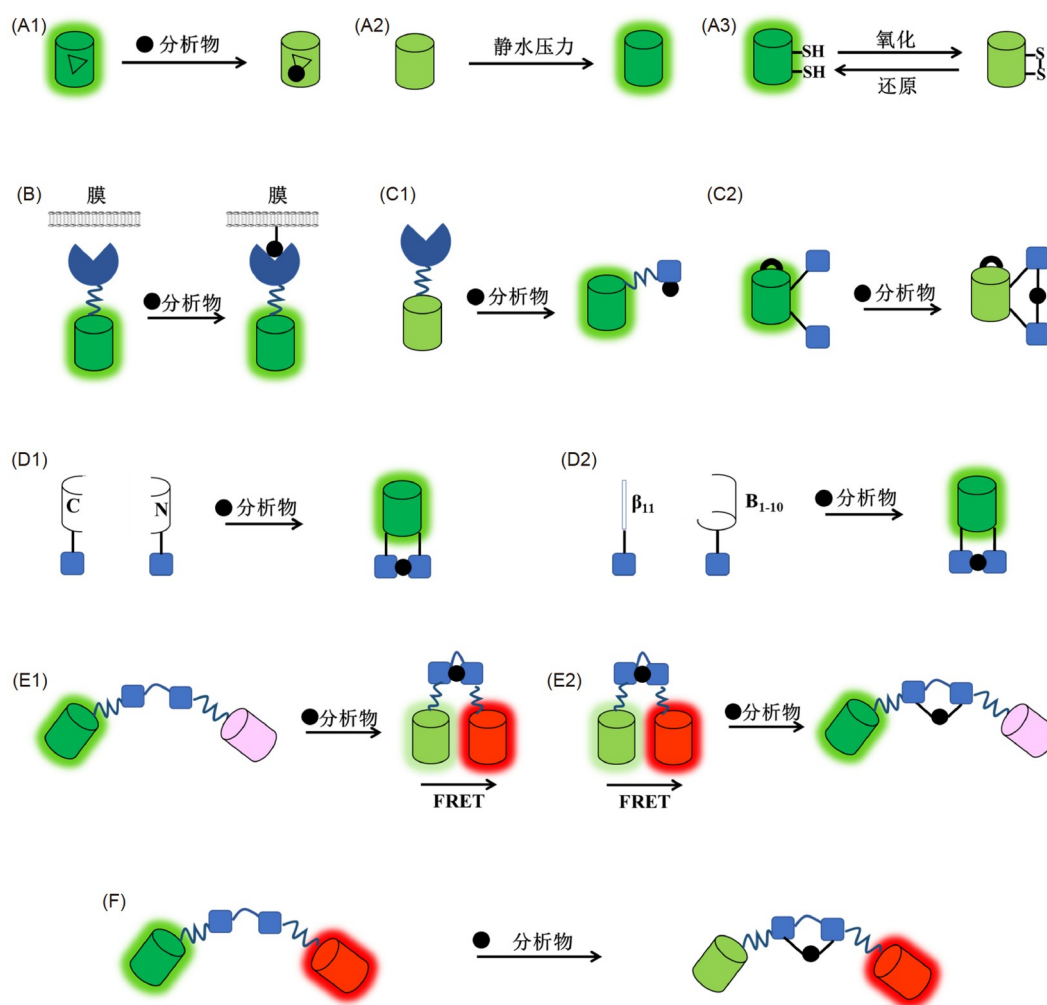


图 1 基因编码荧光探针的原理示意图. (A) 具有识别和报告功能的单一荧光蛋白探针示意图; (B) 基于荧光蛋白定位发生变化的探针示意图; (C) 由识别元件和荧光蛋白(报告元件)组成的荧光探针示意图; (D) 由识别元件与荧光蛋白互补系统组成的探针示意图; (E) 基于能产生荧光共振能量转移效应的荧光蛋白对的探针示意图; (F) 由两个荧光蛋白组成的比率式探针示意图^[9](网络版彩图)

Figure 1 (A) Schematic diagram of a single fluorescent protein probe with sensing and reporting function; (B) Schematic diagram of fluorescent sensing probe based on the change of fluorescent protein localization; (C) Schematic diagram of fluorescent sensing probe composed of sensing element and fluorescent protein (reporting element); (D) Schematic diagram of fluorescent sensing probe composed of sensing element and fluorescent protein complementary system; (E) Schematic diagram of fluorescent sensing probe based on two fluorescent protein that can produce fluorescence resonance energy transfer (FRET) effect; (F) Schematic diagram of ratiometric sensing probes composed of two fluorescent proteins ^[9] (color online).

(2) 基于分析物与识别元件作用, 荧光蛋白定位发生变化的探针(图1B).

(3) 由识别元件和荧光蛋白(报告元件)组成的荧光探针, 识别元件用于识别细胞特定分析物变化, 导致荧光蛋白信号强度改变(图1C); 主要可以分为两种: (i) 基于分析物与识别元件作用, 荧光蛋白光谱学性质改变的探针(C1); (ii) 由识别元件与环状排列荧光蛋白(circularly permuted fluorescent protein, cpFP)组成

的探针(C2)^[43].

(4) 由识别元件与荧光蛋白互补系统组成的探针. 双分子荧光互补技术(bimolecular fluorescence complementation, BiFC)将荧光蛋白在某些特定的位点切开, 形成不发荧光的N片段和C片段, 这两个片段在细胞内共表达时不能自发地组装成完整的荧光蛋白, 不能产生荧光; 但当这两个荧光蛋白的片段分别连接到一组有相互作用的目标蛋白(识别元件)上, 由于特定分析

表 1 基因编码荧光探针

Table 1 The genetically encoded fluorescent sensing probes

分析物	探针	原理示意图	文献
pH	pHluorin	图1A2	[10]
	mtAlpHi	图1A2	[11]
	pHmScarlet	图1A1	[12]
	FIRE-pHLy	图1F	[13]
Redox			
ROS	HyPer家族: HyPer、HyPer2,3,7、HyPerRed、TriPer	图1C2	[14~19]
	cpYFP	图1A3	[20]
GSH/GSSG	Grx1-roGFP2、Grx1-roGFP2-iL、hGrx1-sfroGFP2、Grx1-roCherry	图1C1	[21~25]
NAD ⁺ /NADH	SoNar	图1C2	[26]
能量代谢			
葡萄糖	FLIPglu系列: FLIPglu-170n、FLIPglu-600μ、FLIPglu-600μ-Δ(X)、FLII ^(X) Pglu-Y、FLII ¹² Pglu-Y;	图1E1	[27~30]
	GIP系列: GIP、GIP C ₀ Y ₁ 、AcGFP1-GBPCys-mCherry	图1E2	[31~33]
	Glifons系列: Green Glifons、Red Glifons	图1C1	[34,35]
ATP	ATeams	图1E1	[36]
	QUEEN、iATPSnFR	图1C2	[37,38]
Ca ²⁺	Cameleons、YC-Nano	图1E1	[7,39]
	TN系列、Twitch系列	图1E1	[40~42]
	Camgaroo、GCaMPs、GECOs	图1C2	[43~50]
	FRET类	图1E1, E2	[51~55]
caspase-3	自互补荧光蛋白类	图1D2	[56]
	荧光蛋白定位发生变化类	图1B	[57]
	环化荧光蛋白类	图1C2	[58]
神经递质	CNiFERs系列、FLIPE、GluSnFR、SuperGluSnFR	图1E1, E2	[59~64]
	iGluSnFR、R-iGluSnFR、iGABASnFR、GACH、GACH2.0、GRAB _{DA} 、GRAB _{NE} 、RdLight1、R-GenGAR-DA	图1C2	[65~74]
	GPCRs探针	图1E2	[75]
其他	磷脂酰丝氨酸探针	图1B	[76]
	乙酰化修饰探针	图1E1	[77]

物能够诱导识别元件之间的相互作用, 荧光蛋白的两个片段在空间上互相靠近互补, 重新构建成完整的具有活性的荧光蛋白分子, 发射荧光^[78,79](D1); GFP可以拆分为 $\beta_{1\sim10}$ 和 β_{11} 两部分, 可以在无外力参与的情况下自发完成组装; 将 $\beta_{1\sim10}$ 和 β_{11} 分别与识别元件相连, 在无分析物时, 识别元件可使 $\beta_{1\sim10}$ 和 β_{11} 无法靠近而不能组装成完整的荧光蛋白, 因此不能产生荧光; 而当识别元件识别分析物时, $\beta_{1\sim10}$ 和 β_{11} 在空间上互相靠近, 重新构建成完整的具有活性的荧光蛋白分子, 发射荧光(1D2)^[56,80].

(5) 由一对能产生荧光共振能量转移(fluorescence

resonance energy transfer, FRET)效应的荧光蛋白组成, 其中供体荧光基团的发射光谱与受体基团的吸收光谱有一定重叠, 当这两个荧光基团间的距离合适时(一般小于100 Å), 荧光能量由供体向受体转移, 即以供体的激发波长激发时, 可观察受体发射的荧光. 当探针识别特定分析物时, FRET信号发生变化(图1E1, E2)^[7,31].

(6) 由两个荧光蛋白组成的比率式探针, 其中一个荧光蛋白的荧光信号改变依赖于分析物的变化, 而另一个荧光蛋白的荧光信号不受影响, 作为内参信号, 通过测定二者的比值对分析物进行比率式测定(图1F)^[13].

3 基因编码荧光探针的应用

3.1 细胞pH测定

细胞内pH在多项生理活动中起着至关重要的作用,如直接影响酶的活性,调控细胞增殖与凋亡,与细胞离子运输及内吞作用等密切相关^[81,82]。细胞内pH正常水平在7.2左右^[83],其水平异常往往与细胞功能的异常密切相关^[84]。目前检测细胞内pH的基因编码荧光探针主要是pH敏感荧光蛋白(pH-sensitive fluorescent proteins, pHluorins),分为比率式和强度式。如1998年被报道的pHluorin蛋白,其有两个激发峰(395和475 nm)和一个发射峰(508 nm),在pH从7.5到5.5的变化过程中,395 nm激发峰下的荧光强度显著降低,而475 nm激发峰下的荧光强度显著升高,可利用两个激发峰荧光强度的比值测定pH,以此为代表的pHluorins称为比率式pHluorins^[10],而强度式pHluorins荧光信号强度随pH的变化而变化,如由pH敏感的GFP突变蛋白与线粒体靶向序列组成的mtAlpHi可以特异检测线粒体的pH值,其激发峰(498 nm)和发射峰(522 nm)的荧光强度随着pH的降低而减弱^[11]。2021年, Liu等^[12]开发出一个亮度高、稳定性好、pH敏感性强的红色荧光蛋白探针pHmScarlet,其激发峰为562 nm,发射峰为585 nm,荧光强度随着pH从5.5到7.5,可增强26倍,在现有pH红色荧光蛋白探针中灵敏度最高。最新的pH荧光蛋白探针是2021年报道的FIRE-pHly,该探针由一对荧光蛋白(mTFP1和mCherry)与LAMP1 (lysosomal associated membrane protein 1)串联组成;在pH 3.5~6.0范围内,mTFP1的荧光强度随着pH的升高而增强,而mCherry的荧光强度保持不变,可以通过测定二者的荧光强度比值而检测pH。FIRE-pHly是第一个靶向高酸性环境溶酶体的pH荧光探针^[13]。

3.2 氧化还原测定

氧化还原(reduction-oxidation reaction, Redox)是细胞内一系列氧化还原反应的统称,参与调节多种细胞功能,如细胞稳态、分化、增殖及凋亡等,保持细胞中Redox平衡对维持细胞的正常功能发挥着关键作用^[9,85]。活性氧(reactive oxygen species, ROS)是具有活跃化学反应性的含氧物质的统称,其中H₂O₂是细胞内含量最多的ROS种类之一,可作为第二信使,通过多条信号通路调控细胞增殖、凋亡等多项生理活动^[86]。

GSH是细胞内含量最丰富的抗氧化剂,在生理条件下,GSH主要以还原型谷胱甘肽(GSH)和氧化型谷胱甘肽(GSSG)两种形式存在^[87]。GSH/GSSG不仅决定着生物系统中的氧化还原状态,还发挥着许多其他功能,如影响细胞周期进程、细胞死亡、转录因子活性等^[88,89]。还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(reduced nicotinamide adenine dinucleotide, NADH)和氧化型NAD⁺是一种广泛存在的生物分子,NAD⁺/NADH是生物体内重要的辅酶I,参与诸多能量代谢过程中的氧化还原反应^[90]。目前最广泛使用的H₂O₂探针是HyPer家族^[14]。HyPer是由H₂O₂特异识别的调控元件Oxy-RD和环状排列荧光蛋白cpYFP组成,有两个激发峰(420和500 nm)和一个发射峰(516 nm);当HyPer暴露于H₂O₂微环境中,420 nm激发峰下的荧光强度下降,而500 nm激发峰下的荧光强度成比增加,因此可通过测定其荧光比值,对H₂O₂进行比率式探测,灵敏度可达微摩尔级,对H₂O₂具有高选择性,对其他Redox指标如O₂^{·-}、NO以及ONOO⁻等均无显著响应^[14]。近年来,经过对HyPer的改造,已发展出具有广泛检测范围的HyPer2^[15]和HyPer3^[16]、基于红色荧光蛋白的HyPerRed^[17]以及可用于内质网中H₂O₂检测的TriPer^[18];最新的Hyper家族成员是2020年报道的能对H₂O₂超灵敏检测且对pH不敏感的HyPer7^[19]。此外,Wang等^[20]利用cpYFP作为O₂^{·-}探针发现了线粒体超氧炫现象。探测GSH/GSSG的经典探针是Grx1-roGFP2^[21]。该探针由对GSH/GSSG特异识别的调控元件谷氧还蛋白Grx1和荧光蛋白roGFP2组成,有两个激发峰和一个发射峰(510 nm)。如果GSH/GSSG比值升高,390 nm激发峰下的荧光强度下降,而480 nm激发峰下的荧光强度成比增加,因此可通过测定其荧光比值,对GSH/GSSG进行比率式探测^[21];后来经过对roGFP2的改造发展出可用于内质网GSH/GSSG检测的Grx1-roGFP2-iL^[22]和适用于小型细胞和细胞器内GSH/GSSG检测的hGrx1-sfroGFP2^[23,24]。2019年最新报道的GSH/GSSG红色荧光蛋白探针Grx1-roCherry,由mCherry改造而来,激发峰和发射峰分别是589和610 nm,可适用于活细胞中GSH/GSSG的检测^[25]。Zhao等^[26]发展的SoNar探针是目前应用较为广泛的NAD⁺/NADH探针,其设计是将cpYFP插入到嗜热水生菌来源的NADH结合转录因子T-Rex中,该探针有两个激发峰(418和500 nm)和一个发射峰(518 nm)。如果NAD⁺/NADH比值升高,418 nm

激发峰与500 nm激发峰下的荧光强度比值降低. So-Nar已在活细胞和活体动物水平实现了 NAD^+/NADH 的高时空分辨检测和成像^[91].

本团队利用经典的Redox荧光蛋白探针(HyPer、TriPer和Grx1-roGFP2、Grx1-roGFP2-iL)在急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)细胞中建立了可以检测线粒体、内质网、细胞质及细胞核四种亚细胞结构中多参数Redox (H_2O_2 和GSH/GSSG)的传感平台(图2), 实现了AML亚细胞中Redox的实时监测, 并评估了主要化疗药物对AML多种细胞器中Redox水平的影响, 或能贡献以氧化还原平衡为基础的肿瘤精准医学^[92].

3.3 细胞能量代谢探测

葡萄糖和三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)分别是各种生物体的主要能量来源和能量货币. 哺乳动物细胞葡萄糖水平的异常与多种疾病密切相

关, 如糖尿病、肥胖等. 因此探测细胞内的葡萄糖水平可以预防糖尿病及相关的并发症^[93]. 目前探测细胞内葡萄糖的荧光蛋白探针主要包括基于FRET原理的FLIPglu系列探针^[27~30]和GIP系列探针^[31~33]以及基于单个荧光蛋白的Glifons系列探针^[34,35]. FLIPglu-170n是将细菌的周质结合蛋白(periplasmic-binding proteins, PBP)与一对FRET荧光蛋白相结合形成的葡萄糖探针, 当葡萄糖浓度升高时, FRET信号增强, 检测范围为0.02~1.5 μM , 但不适用于生理条件下细胞内葡萄糖的检测^[28]; 经过对PBP改造得到的FLIPglu-600 μ , 其检测范围为0.07~5.3 mM, 已应用于非洲绿猴肾细胞(COS7细胞)中葡萄糖的检测^[27]. 近年来, 通过对FLIPglu系列改造, 已发展出具有广泛的检测范围的FLIPglu-600 μ - Δ (X)、FLII^(X)Pglu-Y^[28]和FLII¹²Pglu-Y等探针^[29,30]. GIP探针是将大肠杆菌葡萄糖结合蛋白(glucose-binding protein, GBP)与一对FRET荧光蛋白相结合形成的, 当葡萄糖浓度升高时, FRET信号减弱, 可检

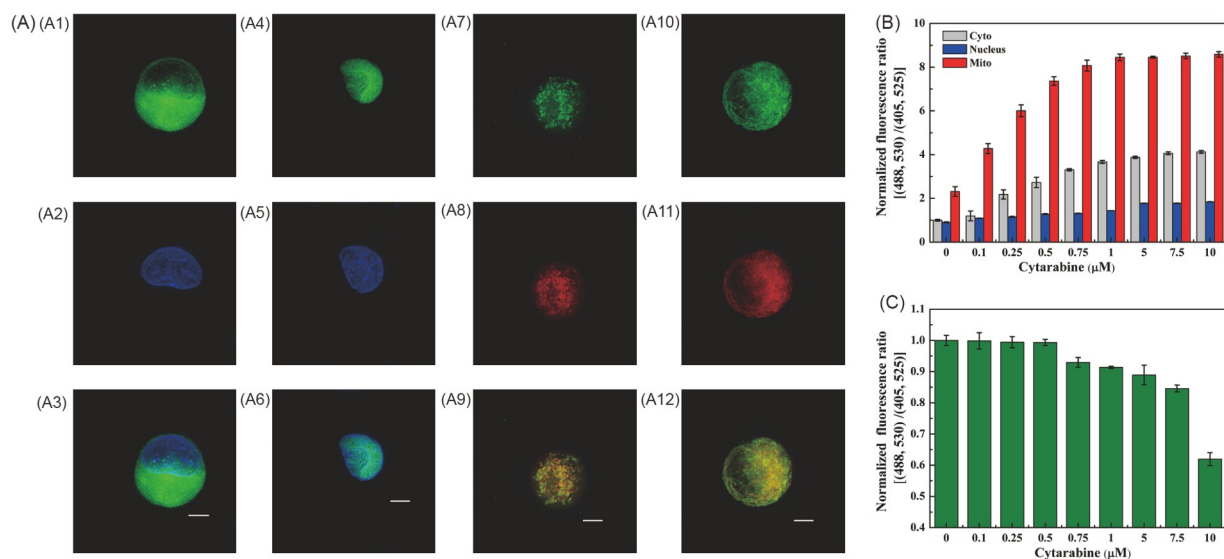


图 2 H_2O_2 传感元件在HL60不同亚细胞结构中的分布及其对化疗药物阿糖胞苷(Cytarabine)的响应. (A) 利用结构照明超分辨显微镜观察HyPer在HL60细胞的细胞质(A1~A3)、细胞核(A4~A6)和线粒体(A7~A9)以及TriPer在内质网(endoplasmic reticulum, ER) (A10~A12)中的稳定表达; 图A2和A5显示细胞核染料Hoechst 33342染色, 图A8显示线粒体染料Mito-Tracker Red染色, 图A11显示ER染料ER-Tracker Red染色; 图A3和A6显示绿色和蓝色荧光通道合并结果, 图A9和A12显示绿色和红色荧光通道合并结果; 比例尺: 5 μm . HL60细胞中稳定表达的 H_2O_2 探针阿糖胞苷的响应: (B) Cyto-HyPer、NLS-HyPer和MLS-HyPer, (C) ER-TriPer; 作用时间: 24 h^[92](网络版彩图)

Figure 2 Intracellular localization of HyPer and TriPer targeted to various subcellular compartments in HL60 cells and their response to chemotherapeutic drugs (cytarabine). (A) Panels represent the live-cell imaging of HyPer stably expressed in the cytosol (A1–A3), nucleus (A4–A6), and mitochondria (A7–A9) while TriPer stably expressed in the endoplasmic reticulum (ER) (A10–A12) of HL60 cells by SIM. Panels A2 and A5 show staining with Hoechst 33342, A8 with Mito-Tracker Red, and A11 with ER-Tracker Red. Panels A3 and A6 are merged with Hoechst 33342 staining, A9 with Mito-Tracker Red, and A12 with ER-Tracker Red. Scale bar: 5 μm . The normalized response ratio (488/405 nm) of Cyto-HyPer, NLS-HyPer, and MLS-HyPer (B), and ER-TriPer (C) to cytarabine by flow cytometry ($\geq 10,000$ cells). Drug treatment time: 24 h^[92] (color online).

测浓度低于20 μM 的葡萄糖^[31]; 后续发展的GIP C₀Y_i在pH 5.3~7.3之间较为稳定, 适用于酸性环境如高尔基体中葡萄糖的检测^[32]; 由FRET对和GBP组成的AcGFP1-GBPcys-mCherry葡萄糖探针的稳定期高达三周, 适用于长期持续监测^[33]. 2019年, Mita等^[34]将甲基半乳糖苷B (MglB)中的葡萄糖结合域与GFP的突变体Citrine相结合构建了Green Glifons葡萄糖探针, 可用于HeLa细胞线粒体、细胞膜和细胞质以及秀丽隐杆线虫咽肌和小鼠血液中葡萄糖的检测. 2022年最新报道的Red Glifons是由MglB葡萄糖结合域与红色荧光蛋白mApple组成, 也已应用于HeLa细胞及肠内分泌细胞中葡萄糖的检测^[35].

ATP水平是反映细胞生理状态的重要指标, 其水平异常与多种疾病相关, 如帕金森、恶性肿瘤等^[94~96]. 因此探测细胞内ATP对研究外部因素对细胞能量代谢的影响、细胞生化反应、能量异常相关的疾病等都具有重要意义. 2009年, Imamura等^[36]报道了首个基因编码的ATP探针ATeams, 该探针利用枯草芽孢杆菌F₀F₁-ATP合酶的 ϵ 亚基将一对FRET荧光蛋白串联起来, 当ATP浓度升高时, FRET信号升高, 实现了HeLa细胞中ATP的检测. 2015年报道的ATP荧光蛋白探针QUEEN是将cpEGFP插入到嗜热芽孢杆菌F₀F₁-ATP合酶 ϵ 亚基两个 α 螺旋之间而形成, 该探针有两个激发峰(400和494 nm)和一个发射峰(513 nm), 可通过测定两个激发峰的荧光比值, 对ATP进行比率式探测, 灵敏度可达微摩尔级^[37]. 2019年, Lobas等^[38]将cpsfGFP插入到嗜热芽孢杆菌F₀F₁-ATP合酶 ϵ 亚基中构建成iATPSnFR, 激发峰为488 nm, 发射峰为525 nm; 检测范围为30 μM ~3 mM, 该探针对于pH敏感性较低, 适用于探测pH波动较大环境(如线粒体)中的ATP.

3.4 细胞Ca²⁺测定

Ca²⁺是整个细胞生命的主要调节者, 它控制着所有真核细胞从起源(受精)到结束(细胞死亡)最重要的活动, 包括基因表达、酶活性、ATP生成、突触传递、肌肉收缩、增殖和学习记忆等^[97~99]. 检测细胞内Ca²⁺浓度的荧光蛋白探针大致可分为两类(图3): (1)含有两个荧光蛋白, 如基于FRET效应的Cameleons和肌钙蛋白C (TN)系列^[7,39~42]. 1997年, 钱永健等^[7]构建了第一个检测细胞内Ca²⁺浓度的基因编码荧光探针——Cameleons, 它由一对能发生FRET的荧光蛋白、

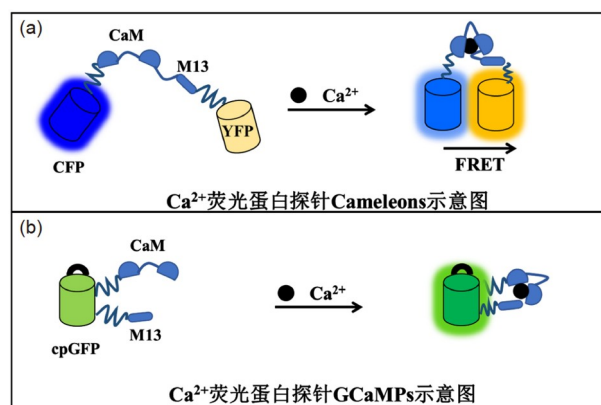


图3 基因编码Ca²⁺探针Cameleons (a)和GCaMPs (b)示意图^[100](网络版彩图)

Figure 3 Schematic diagram of genetically encoded Ca²⁺ sensing probes: Cameleons (a) and GCaMPs (b) ^[100] (color online).

钙调素(CaM)和钙调素结合肽M13串联组成, Cameleons与Ca²⁺结合后, CaM包裹M13进而增强FRET信号, 实现Ca²⁺浓度的检测. 后续在Cameleons的基础上发展了一系列基于FRET的Ca²⁺浓度探针, 如经过对CaM和M13之间的接头(linker)改造而得到的超敏Ca²⁺浓度探针YC-Nano, 灵敏度可达纳摩尔级, 可应用于检测细胞间交流和神经元活动导致的细胞内轻微Ca²⁺浓度瞬时变化^[39]. TN系列的Ca²⁺浓度探针是由肌钙蛋白C (troponin C, TnC)作为Ca²⁺识别元件, 与一对FRET荧光蛋白串联组成^[40]; 后来利用蟾蜍鱼中TnC的C末端结构域与FRET荧光蛋白对组成的Twitch系列探针, 可用于神经元强直性放电过程和T淋巴细胞中Ca²⁺浓度的高灵敏检测^[41]. (2)含有一个荧光蛋白, 如Camgaroo、GCaMPs和GECOs^[43~50]. Camgaroo是由CaM、M13和cpGFP组成的Ca²⁺浓度荧光蛋白探针, 灵敏度可达毫摩尔级^[43]. GCaMPs同样是基于CaM-M13与单个荧光蛋白(如cpEGFP等)相结合的策略构建的一系列Ca²⁺浓度探针^[44~46], 在检测灵敏度和信号强度等方面不断改进, 如超灵敏的GCaMP6适用于不同应用场景中Ca²⁺浓度的检测, 如神经元胞体中导致单一动作电位的Ca²⁺浓度变化或单一树突棘中定向调节突触中的Ca²⁺浓度瞬时变化等^[47]. jGCaMP7探针荧光信号强度更强, 能够更好地检测单一神经元、神经突和神经毡中的Ca²⁺浓度^[48]. GECOs与GCaMPs原理类似, 选用多种荧光蛋白, 如蓝色、绿色以及红色等, 开启了Ca²⁺浓度检测的“多彩”时代^[49,50].

3.5 细胞凋亡测定

细胞凋亡指为维持内环境稳定, 由基因严格控制的细胞自主有序性死亡, 涉及一系列基因的激活、表达以及调控等的作用. 它并不是病理条件下自体损伤的一种现象, 而是为更好地适应生存环境而主动争取的一种死亡过程, 在多细胞生物去除不需要或异常的细胞中起着必要的作用. 诱导细胞凋亡是许多癌症治疗药物的策略; 建立一种在单细胞水平能够方便可靠地检测药物导致的细胞凋亡, 将是研究药物作用机制及效果的强有力工具^[101~103]. 凋亡信号通过级联放大激活细胞内多种caspase, 切割不同的底物而引起细胞凋亡. caspase是一类非常保守的半胱氨酸依赖的蛋白酶家族, 在介导细胞凋亡中起着核心作用. 其中作为caspase中心效应因子的caspase-3是常见细胞凋亡途径中的下游效应器, 能够传递和放大凋亡信号, 是细胞凋亡的标志物之一^[104]. 目前caspase-3荧光蛋白探针是由它的通用切割序列(如DEVD、DMQD)与荧光蛋白相结合组成^[51~58], 可分为以下4种: (1) FRET类. 在一对FRET荧光蛋白中插入caspase-3通用切割序列, 当caspase-3切割后, FRET信号降低, 供体荧光蛋白信号增强^[51~55]; (2) 自互补荧光蛋白类. GFP可以拆分为 $\beta_{1\sim10}$ 和 β_{11} 两部分, 二者之间相互作用力较强可以在无外力参与的情况下完成自互补组装, 产生荧光; E5和K5是类似于亮氨酸拉链的异二聚卷曲线圈, 能够形成异源

二聚体; 在 $\beta_{1\sim10}$ 和 β_{11} 之间插入E5, 在 β_{11} 末端通过DEVD与K5连接, E5/K5可以形成异源二聚体阻止 $\beta_{1\sim10}$ 和 β_{11} 的结合; 当DEVD被caspase-3切割后 $\beta_{1\sim10}$ 和 β_{11} 顺反结构得到矫正, 进而正确组装产生荧光^[56]; (3) 荧光蛋白定位发生变化类. 将核定位序列NLS (nuclear localization sequence)与GFP的N端融合, C端通过DEVD和细胞质膜定位序列PLS (plasma membrane localization sequence)融合; 正常情况下PLS强于NLS, 绿色荧光信号位于细胞膜上; 当DEVD被caspase-3切割后, GFP与PLS断开连接, NLS将引导GFP进入细胞核, 荧光信号位于细胞核^[57]; (4) 环化荧光蛋白类. 将荧光蛋白的N端和C端通过DEVD进行连接, 在恰当的位点利用内含肽使荧光蛋白进行环化, 环化后的荧光蛋白失去其天然构象而荧光消失, 当DEVD被caspase-3切割后环化荧光蛋白恢复天然构象而产生荧光^[58]. 总体而言, 已有caspase-3活细胞荧光传感器在荧光强度、响应时间等方面仍有提升空间. 为此, 我们团队基于最亮单体荧光蛋白(mNeonGreen2)发展了一种新型基因编码荧光探针, 其原理是在荧光蛋白mNeonGreen2合适位置插入DEVD序列, 利用内含肽将荧光蛋白进行环化; 环化后的荧光蛋白因构象变化而失去荧光. 当caspase-3将荧光蛋白中酶切位点(DEVD)进行切割后, 荧光蛋白恢复天然构象而产生荧光. 该探针具有响应时间短、灵敏度高等优势, 已用于评价药物对肿瘤细胞的凋亡诱导及抗病毒感染等(图4)^[105].

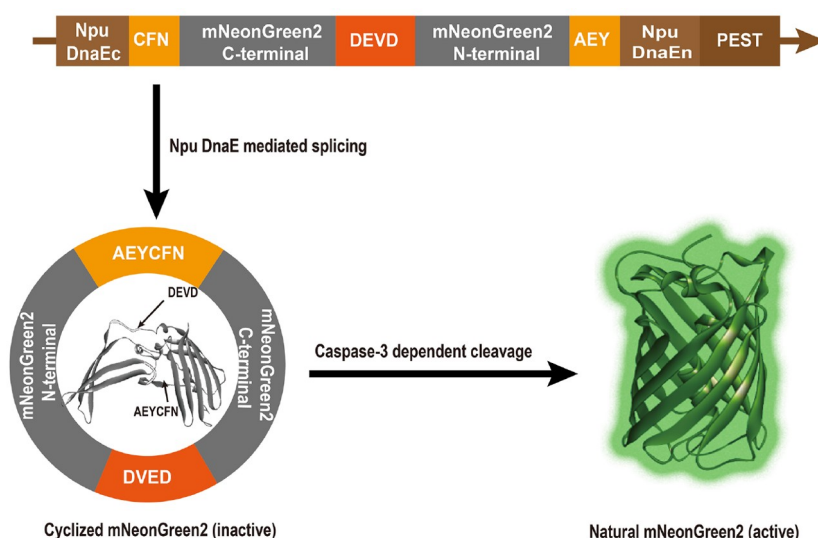


图4 基于mNeonGreen2的caspase-3基因编码探针的原理示意图^[105] (网络版彩图)

Figure 4 Schematic diagram of genetically encoded caspase-3 sensing probe based on mNeonGreen2 ^[105] (color online).

3.6 神经递质测定

神经递质是神经元之间或神经元与效应器细胞(如肌肉细胞、腺体细胞等)之间突触中传递信息的化学物质^[106]。神经递质在神经、肌肉和感觉系统的各个角落都有分布,它的正常释放对于维持机体正常生理功能发挥着重要作用;神经递质的释放与调节出现异常时也与一系列的病理过程相关,如帕金森和阿尔兹海默病等^[107,108]。目前检测体内神经递质的荧光蛋白探针大致可分为以下两种:(1) FRET类。CNiFERs是将代谢型神经递质受体与 Ca^{2+} 敏感型FRET探针相耦合的荧光探针。当神经递质与受体结合后,会引起 Ca^{2+} 浓度变化而被 Ca^{2+} 探针检测到,通过荧光信号的改变反应神经递质浓度的变化,目前已发展应用于乙酰胆碱、5-羟色胺、多巴胺和去甲肾上腺素的CNiFERs探针^[59-61];神经递质谷氨酸探针FLIPE^[62]、GluSnFR和SuperGluSnFR^[63,64]由谷氨酸PBP和FRET组成,两种荧光的比值与谷氨酸之间存在剂量-效应关系。(2) cpFP类。2013年,Marvin等^[65]用cpGFP替换SuperGluSnFR中的FRET荧光蛋白对构建的谷氨酸探针iGluSnFR,提升了信噪比,并用于检测秀丽隐杆线虫、斑马鱼和小鼠体内谷氨酸的释放;2018年,Wu等^[66]利用cpRFP替换iGluSnFR中的cpGFP进而发展了红色的谷氨酸探针R-iGluSnFR;2019年,Marvin等^[67]利用从荧光假单胞菌中筛选出的 γ 氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)结合蛋白替换iGluSnFR中的PBP,发展了GABA探针iGABASnFR,用于检测斑马鱼和小鼠体内GABA的释放;2018和2020年,Jing等^[68,69]利用乙酰胆碱(acetylcholine, ACh) G蛋白偶联受体(G protein-coupled receptors, GPCRs)与cpGFP构建了ACh荧光蛋白探针GACH及灵敏度更高的GACH2.0,原理是GPCRs与ACh结合后第五和第六个跨膜区的构象改变进而导致cpGFP荧光发生变化,已用于小鼠神经细胞和脑切片中ACh的检测;2018年,Patriarchi等^[70]和Sun等^[71]利用相似的原理,将cpGFP与多巴胺(dopamine, DA)的GPCRs串联组合发展了DA荧光蛋白探针dLight和GRAB_{DA};2019年,Feng等^[72]将cpEGFP与去甲肾上腺素(norepinephrine, NE) GPCRs串联组合构建了NE荧光蛋白探针GRAB_{NE};Patriarchi等^[73]和Nakamoto等^[74]分别在2020和2021年将荧光蛋白cpmApple与DA的GPCRs串联组合发展了DA红色荧光探针RdLight1和R-GenGAR-DA,可与不同颜色的探针联用。

3.7 其他应用

基因编码荧光探针还应用于检测GPCRs^[75,109-112]、细胞脂类^[76]、蛋白翻译后修饰^[77,113]以及实时追踪病毒在活细胞中的过程等。如Janetopoulos等^[75]设计的检测GPCRs的FRET探针;Yeung等^[76]利用磷脂酰丝氨酸荧光蛋白探针检测了磷脂酰丝氨酸在巨噬细胞中线粒体膜和内质网膜的分布;Nakaoka等^[77]利用FRET探针检测COS7细胞中H3乙酰化修饰;本团队^[114-116]采用荧光蛋白示踪病毒及其与宿主相互作用的研究,创造了“彩色病毒”技术(多组分标记技术),分别示踪了HIV-I病毒和Zika病毒进入细胞的途径及其在细胞中的命运。

4 总结与展望

基因编码荧光探针具有以下优点:(1)它是细胞本身基因编码的产物,对细胞而言属于内源性物质,生物相容性较好。(2)它通过与细胞内不同亚细胞结构定位序列融合表达,能够定位于细胞的不同亚结构中,可真实反映细胞的动态变化,且能够在细胞中稳定存在,为长时程准确探测提供保障;它通过基因工程的方法能够在细胞中稳定存在,为检测结果的稳定性和再现性提供了保障。(3)基因编码荧光探针在活细胞中具有高选择性和反应可逆性。

基因编码荧光探针也存在一些不足:(1)许多荧光蛋白探针的检测信号会受到pH的影响,尤其是基于cpFP类的探针;(2)荧光蛋白探针的荧光强度和检测范围有待进一步提高,响应时间也需要改善;(3)光在生物组织内穿透深度达到最大值的波长区间被称为生物组织光学窗口,一般处于近红外波长范围内,而大多数荧光蛋白探针都是基于绿色荧光蛋白发展而来,在生物组织内穿透深度有限,不利于其应用于活体检测。

因此,未来可分别对基因编码荧光探针的识别元件和荧光蛋白(报告元件)进行改造或重新设计,以提升其传感性能。(1)识别元件。随着多组学的发展有望挖掘来源于新物种的识别元件;结合人工智能(artificial intelligence, AI)指导的分子进化,有望产生灵敏度更高、响应时间更短等性能优越的识别元件;(2)荧光蛋白(报告元件)。发展可用于活体深处探测的近红外荧光蛋白系统依然是重要研究方向。本团队曾发展发射波长最长的GFP-like单体红色荧光蛋白mNep-

tune684, 并建立了基于近红外荧光蛋白iRFP和iRFP2.0的BiFC系统^[79,117~119], Fabritius等^[120]建立了荧光蛋白可视化筛选平台, 并通过对mNeptune684高通量分子改造, 获得了荧光强度更强的近红外荧光蛋白; 此外还可利用基因密码子扩展技术^[121]将金属结合或化学反应性非天然氨基酸引入荧光蛋白用于发展性能优越的基因编码荧光探针^[122], 如将能够识别H₂S的非天然氨基酸pAzF (*p*-azidophenylalanine)引入cpGFP构建的H₂S荧光探针cpGFP-Tyr66pAzF^[123]; 将非天然氨基酸

p-boronophenylalanine (pBoF)引入cpsGFP构建的荧光探针pnGFP和pnGFP-Ultra可用于检测ONOO⁻^[124,125]. 先进的分子进化手段、高通量分子筛选平台, 以及机器学习等人工智能算法的联合运用已成为开发新型蛋白的主流趋势之一. 同时, 合成生物学的迅猛发展也将从头合成全新荧光蛋白的梦想照进现实, 如2021年, Klima等^[126]成功合成全新的小型敏感荧光蛋白mFAPs, 其分子量比GFP的一半还少. 该策略或可拓展用于更多基因编码探针的设计与合成.

致谢 谨以此文庆祝分析化学前辈汪尔康教授90寿辰.

参考文献

- Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y. *J Cell Comp Physiol*, 1962, 59: 223–239
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. *Science*, 1994, 263: 802–805
- Yang F, Moss LG, Phillips Jr. GN. *Nat Biotechnol*, 1996, 14: 1246–1251
- Zimmer M. *Chem Rev*, 2002, 102: 759–782
- Heim R, Cubitt AB, Tsien RY. *Nature*, 1995, 373: 663–664
- Chudakov DM, Matz MV, Lukyanov S, Lukyanov KA. *Phys Rev*, 2010, 90: 1103–1163
- Miyawaki A, Llopis J, Heim R, McCaffery JM, Adams JA, Ikura M, Tsien RY. *Nature*, 1997, 388: 882–887
- Berlin S, Carroll EC. *Front Cell Neurosci*, 2020, 14: 627792
- Kostyuk AI, Panova AS, Bilan DS, Belousov VV. *Free Radical Biol Med*, 2018, 128: 23–39
- Miesenböck G, De Angelis DA, Rothman JE. *Nature*, 1998, 394: 192–195
- Abad MFC, Di Benedetto G, Magalhães PJ, Filippin L, Pozzan T. *J Biol Chem*, 2004, 279: 11521–11529
- Liu A, Huang X, He W, Xue F, Yang Y, Liu J, Chen L, Yuan L, Xu P. *Nat Commun*, 2021, 12: 1413
- Chin MY, Patwardhan AR, Ang KH, Wang AL, Alquezar C, Welch M, Nguyen PT, Grabe M, Molofsky AV, Arkin MR, Kao AW. *ACS Sens*, 2021, 6: 2168–2180
- Belousov VV, Fradkov AF, Lukyanov KA, Staroverov DB, Shakhbazov KS, Tersikh AV, Lukyanov S. *Nat Methods*, 2006, 3: 281–286
- Markvicheva KN, Bilan DS, Mishina NM, Gorokhovatsky AY, Vinokurov LM, Lukyanov S, Belousov VV. *Bioorg Med Chem*, 2011, 19: 1079–1084
- Bilan DS, Pase L, Joosen L, Gorokhovatsky AY, Ermakova YG, Gadella TWJ, Grabher C, Schultz C, Lukyanov S, Belousov VV. *ACS Chem Biol*, 2013, 8: 535–542
- Ermakova YG, Bilan DS, Matlashov ME, Mishina NM, Markvicheva KN, Subach OM, Subach FV, Bogeski I, Hoth M, Enikolopov G, Belousov VV. *Nat Commun*, 2014, 5: 5222
- Melo EP, Lopes C, Gollwitzer P, Lortz S, Lenzen S, Mehmeti I, Kaminski CF, Ron D, Avezov E. *BMC Biol*, 2017, 15: 24
- Pak VV, Ezeriņa D, Lyublinskaya OG, Pedre B, Tyurin-Kuzmin PA, Mishina NM, Thauvin M, Young D, Wahni K, Martínez Gache SA, Demidovich AD, Ermakova YG, Maslova YD, Shokhina AG, Eroglu E, Bilan DS, Bogeski I, Michel T, Vriz S, Messens J, Belousov VV. *Cell Metab*, 2020, 31: 642–653.e6
- Wang W, Fang H, Groom L, Cheng A, Zhang W, Liu J, Wang X, Li K, Han P, Zheng M, Yin J, Wang W, Mattson MP, Kao JPY, Lakatta EG, Sheu SS, Ouyang K, Chen J, Dirksen RT, Cheng H. *Cell*, 2008, 134: 279–290
- Gutscher M, Pauleau AL, Marty L, Brach T, Wabnitz GH, Samstag Y, Meyer AJ, Dick TP. *Nat Methods*, 2008, 5: 553–559
- Aller I, Rouhier N, Meyer AJ. *Front Plant Sci*, 2013, 4: 506
- Schuh AK, Rahbari M, Heimsch KC, Mohring F, Gabryszewski SJ, Weder S, Buchholz K, Rahlfs S, Fidock DA, Becker K. *ACS Infect Dis*, 2018, 4: 1601–1612

- 24 Heimsch K, Gertzen C-GW, Schuh K, Nietzel T, Rahlfs S, Przyborski J, Gohlke H, Schwarzlender M, Becker K, Fritz-Wolf K. *Antioxid Redox Signal*, 2022, doi: 10.1089/ars.2021.0234
- 25 Shokhina AG, Kostyuk AI, Ermakova YG, Panova AS, Staroverov DB, Egorov ES, Baranov MS, van Belle GJ, Katschinski DM, Belousov VV, Bilan DS. *Redox Biol*, 2019, 21: 101071
- 26 Zhao Y, Hu Q, Cheng F, Su N, Wang A, Zou Y, Hu H, Chen X, Zhou HM, Huang X, Yang K, Zhu Q, Wang X, Yi J, Zhu L, Qian X, Chen L, Tang Y, Loscalzo J, Yang Y. *Cell Metab*, 2015, 21: 777–789
- 27 Fehr M, Lalonde S, Lager I, Wolff MW, Frommer WB. *J Biol Chem*, 2003, 278: 19127–19133
- 28 Deuschle K, Okumoto S, Fehr M, Looger LL, Kozhukh L, Frommer WB. *Protein Sci*, 2005, 14: 2304–2314
- 29 Deuschle K, Chaudhuri B, Okumoto S, Lager I, Lalonde S, Frommer WB. *Plant Cell*, 2006, 18: 2314–2325
- 30 Takanaga H, Chaudhuri B, Frommer WB. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Biomembranes*, 2008, 1778: 1091–1099
- 31 Ye K, Schultz JS. *Anal Chem*, 2003, 75: 3451–3459
- 32 Garrett JR, Wu X, Jin S, Ye K. *Biotechnol Prog*, 2008, 24: 1085–1089
- 33 Veetil JV, Jin S, Ye K. *Biosens Bioelectron*, 2010, 26: 1650–1655
- 34 Mita M, Ito M, Harada K, Sugawara I, Ueda H, Tsuboi T, Kitaguchi T. *Anal Chem*, 2019, 91: 4821–4830
- 35 Mita M, Sugawara I, Harada K, Ito M, Takizawa M, Ishida K, Ueda H, Kitaguchi T, Tsuboi T. *Cell Chem Biol*, 2022, 29: 98–108.e4
- 36 Imamura H, Huynh Nhat KP, Togawa H, Saito K, Iino R, Kato-Yamada Y, Nagai T, Noji H. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 15651–15656
- 37 Yaginuma H, Kawai S, Tabata KV, Tomiyama K, Kakizuka A, Komatsuzaki T, Noji H, Imamura H. *Sci Rep*, 2014, 4: 6522
- 38 Lobas MA, Tao R, Nagai J, Kronschräger MT, Borden PM, Marvin JS, Looger LL, Khakh BS. *Nat Commun*, 2019, 10: 711
- 39 Horikawa K, Yamada Y, Matsuda T, Kobayashi K, Hashimoto M, Matsu-ura T, Miyawaki A, Michikawa T, Mikoshiba K, Nagai T. *Nat Methods*, 2010, 7: 729–732
- 40 Mank M, Reiff DF, Heim N, Friedrich MW, Borst A, Griesbeck O. *Biophys J*, 2006, 90: 1790–1796
- 41 Thestrup T, Litzlbauer J, Bartholomäus I, Mues M, Russo L, Dana H, Kovalchuk Y, Liang Y, Kalamakis G, Laukat Y, Becker S, Witte G, Geiger A, Allen T, Rome LC, Chen TW, Kim DS, Garaschuk O, Griesinger C, Griesbeck O. *Nat Methods*, 2014, 11: 175–182
- 42 Waldeck-Weiermair M, Alam MR, Khan MJ, Deak AT, Vishnu N, Karsten F, Imamura H, Graier WF, Malli R. *PLoS ONE*, 2012, 7: e45917
- 43 Baird GS, Zacharias DA, Tsien RY. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 11241–11246
- 44 Nakai J, Ohkura M, Imoto K. *Nat Biotechnol*, 2001, 19: 137–141
- 45 Tian L, Hires SA, Mao T, Huber D, Chiappe ME, Chalasani SH, Petreanu L, Akerboom J, McKinney SA, Schreiter ER, Bargmann CI, Jayaraman V, Svoboda K, Looger LL. *Nat Methods*, 2009, 6: 875–881
- 46 Akerboom J, Chen TW, Wardill TJ, Tian L, Marvin JS, Mutlu S, Calderón NC, Esposti F, Borghuis BG, Sun XR, Gordus A, Orger MB, Portugues R, Engert F, Macklin JJ, Filosa A, Aggarwal A, Kerr RA, Takagi R, Kracun S, Shigetomi E, Khakh BS, Baier H, Lagnado L, Wang SSH, Bargmann CI, Kimmel BE, Jayaraman V, Svoboda K, Kim DS, Schreiter ER, Looger LL. *J Neurosci*, 2012, 32: 13819–13840
- 47 Chen TW, Wardill TJ, Sun Y, Pulver SR, Renninger SL, Baohan A, Schreiter ER, Kerr RA, Orger MB, Jayaraman V, Looger LL, Svoboda K, Kim DS. *Nature*, 2013, 499: 295–300
- 48 Dana H, Sun Y, Mohar B, Hulse BK, Kerlin AM, Hasseman JP, Tsegaye G, Tsang A, Wong A, Patel R, Macklin JJ, Chen Y, Konnerth A, Jayaraman V, Looger LL, Schreiter ER, Svoboda K, Kim DS. *Nat Methods*, 2019, 16: 649–657
- 49 Zhao Y, Araki S, Wu J, Teramoto T, Chang YF, Nakano M, Abdelfattah AS, Fujiwara M, Ishihara T, Nagai T, Campbell RE. *Science*, 2011, 333: 1888–1891
- 50 Qian Y, Piatkevich KD, Mc Larney B, Abdelfattah AS, Mehta S, Murdock MH, Gottschalk S, Molina RS, Zhang W, Chen Y, Wu J, Drobizhev M, Hughes TE, Zhang J, Schreiter ER, Shoham S, Razansky D, Boyden ES, Campbell RE. *Nat Methods*, 2019, 16: 171–174
- 51 Ai H, Hazelwood KL, Davidson MW, Campbell RE. *Nat Methods*, 2008, 5: 401–403
- 52 Rehm M, Dussmann H, Janicke RU, Tavaré JM, Kogel D, Prehn JHM. *J Biol Chem*, 2002, 277: 24506–24514
- 53 Luo KQ, Yu VC, Pu Y, Chang DC. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 283: 1054–1060
- 54 Tyas L, Brophy VA, Pope A, Rivett AJ, Tavaré JM. *EMBO Rep*, 2000, 1: 266–270
- 55 Karasawa S, Araki T, Nagai T, Mizuno H, Miyawaki A. *Biochem J*, 2004, 381: 307–312
- 56 To TL, Schepis A, Ruiz-González R, Zhang Q, Yu D, Dong Z, Coughlin SR, Shu X. *Cell Chem Biol*, 2016, 23: 875–882
- 57 Balderstone LA, Dawson JC, Welman A, Serrels A, Wedge SR, Brunton VG. *Methods Appl Fluoresc*, 2018, 7: 015001

- 58 Zhang J, Wang X, Cui W, Wang W, Zhang H, Liu L, Zhang Z, Li Z, Ying G, Zhang N, Li B. *Nat Commun*, 2013, 4: 2157
- 59 Nguyen QT, Schroeder LF, Mank M, Muller A, Taylor P, Griesbeck O, Kleinfeld D. *Nat Neurosci*, 2010, 13: 127–132
- 60 Yamauchi JG, Nemecz Á, Nguyen QT, Muller A, Schroeder LF, Talley TT, Lindstrom J, Kleinfeld D, Taylor P. *PLoS ONE*, 2011, 6: e16519
- 61 Muller A, Joseph V, Slesinger PA, Kleinfeld D. *Nat Methods*, 2014, 11: 1245–1252
- 62 Okumoto S, Looger LL, Micheva KD, Reimer RJ, Smith SJ, Frommer WB. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 8740–8745
- 63 Tsien RY. *FEBS Lett*, 2005, 579: 927–932
- 64 Hires SA, Zhu Y, Tsien RY. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 4411–4416
- 65 Marvin JS, Borghuis BG, Tian L, Cichon J, Harnett MT, Akerboom J, Gordus A, Renninger SL, Chen TW, Bargmann CI, Orger MB, Schreiter ER, Demb JB, Gan WB, Hires SA, Looger LL. *Nat Methods*, 2013, 10: 162–170
- 66 Wu J, Abdelfattah AS, Zhou H, Ruangkittisakul A, Qian Y, Ballanyi K, Campbell RE. *ACS Chem Biol*, 2018, 13: 1832–1837
- 67 Marvin JS, Shimoda Y, Magloire V, Leite M, Kawashima T, Jensen TP, Kolb I, Knott EL, Novak O, Podgorski K, Leidenheimer NJ, Rusakov DA, Ahrens MB, Kullmann DM, Looger LL. *Nat Methods*, 2019, 16: 763–770
- 68 Jing M, Zhang P, Wang G, Feng J, Mesik L, Zeng J, Jiang H, Wang S, Looby JC, Guagliardo NA, Langma LW, Lu J, Zuo Y, Talmage DA, Role LW, Barrett PQ, Zhang LI, Luo M, Song Y, Zhu JJ, Li Y. *Nat Biotechnol*, 2018, 36: 726–737
- 69 Jing M, Li Y, Zeng J, Huang P, Skrzewski M, Kljakic O, Peng W, Qian T, Tan K, Zou J, Trinh S, Wu R, Zhang S, Pan S, Hires SA, Xu M, Li H, Saksida LM, Prado VF, Bussey TJ, Prado MAM, Chen L, Cheng H, Li Y. *Nat Methods*, 2020, 17: 1139–1146
- 70 Patriarchi T, Cho JR, Merten K, Howe MW, Marley A, Xiong WH, Folk RW, Broussard GJ, Liang R, Jang MJ, Zhong H, Dombeck D, von Zastrow M, Nimmerjahn A, Gradinaru V, Williams JT, Tian L. *Science*, 2018, 360: 1420–1427
- 71 Sun F, Zeng J, Jing M, Zhou J, Feng J, Owen SF, Luo Y, Li F, Wang H, Yamaguchi T, Yong Z, Gao Y, Peng W, Wang L, Zhang S, Du J, Lin D, Xu M, Kreitzer AC, Cui G, Li Y. *Cell*, 2018, 174: 481–496.e19
- 72 Feng J, Zhang C, Lischinsky JE, Jing M, Zhou J, Wang H, Zhang Y, Dong A, Wu Z, Wu H, Chen W, Zhang P, Zou J, Hires SA, Zhu JJ, Cui G, Lin D, Du J, Li Y. *Neuron*, 2019, 102: 745–761.e8
- 73 Patriarchi T, Mohebi A, Sun J, Marley A, Liang R, Dong C, Puhger K, Mizuno GO, Davis CM, Wiltgen B, von Zastrow M, Berke JD, Tian L. *Nat Methods*, 2020, 17: 1147–1155
- 74 Nakamoto C, Goto Y, Tomizawa Y, Fukata Y, Fukata M, Harpsøe K, Gloriam DE, Aoki K, Takeuchi T. *Mol Brain*, 2021, 14: 173
- 75 Janetopoulos C, Jin T, Devreotes P. *Science*, 2001, 291: 2408–2411
- 76 Yeung T, Gilbert GE, Shi J, Silvius J, Kapus A, Grinstein S. *Science*, 2008, 319: 210–213
- 77 Nakaoka S, Sasaki K, Ito A, Nakao Y, Yoshida M. *ACS Chem Biol*, 2016, 11: 729–733
- 78 Ghosh I, Hamilton AD, Regan L. *J Am Chem Soc*, 2000, 122: 5658–5659
- 79 Chen M, Li W, Zhang Z, Liu S, Zhang X, Zhang XE, Cui Z. *Biomaterials*, 2015, 48: 97–107
- 80 Kamiyama D, Sekine S, Barsi-Rhyné B, Hu J, Chen B, Gilbert LA, Ishikawa H, Leonetti MD, Marshall WF, Weissman JS, Huang B. *Nat Commun*, 2016, 7: 11046
- 81 Han J, Burgess K. *Chem Rev*, 2010, 110: 2709–2728
- 82 Berezhnov AV, Soutar MPM, Fedotova EI, Frolova MS, Plun-Favreau H, Zinchenko VP, Abramov AY. *J Biol Chem*, 2016, 291: 8701–8708
- 83 Webb BA, Chimenti M, Jacobson MP, Barber DL. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11: 671–677
- 84 Wong P, Lee C, Tannock IF. *Clin Cancer Res*, 2005, 11: 3553–3557
- 85 Wu R, Li S, Hudlikar R, Wang L, Shannar A, Peter R, Chou PJ, Kuo HCD, Liu Z, Kong AN. *Free Radical Biol Med*, 2022, 179: 328–336
- 86 Bilan DS, Belousov VV. *Free Radical Biol Med*, 2017, 109: 167–188
- 87 Kaweme NM, Zhou S, Changwe GJ, Zhou F. *Biomark Res*, 2020, 8: 63
- 88 Hanschmann EM, Godoy JR, Berndt C, Hudemann C, Lillig CH. *Antioxid Redox Signal*, 2013, 19: 1539–1605
- 89 Chaiswing L, St. Clair WH, St. Clair DK. *Antioxid Redox Signal*, 2018, 29: 1237–1272
- 90 Rich PR. *Biochem Soc Trans*, 2003, 31: 1095–1105
- 91 Zhao Y, Yang Y. *Free Radical Biol Med*, 2016, 100: 43–52
- 92 Cui M, Abbas G, Wang D, Liu Q, Gong R, Li M, Zhang X-E. *Sci China-Life Sci*, 2022, doi: 10.1007/s11427-021-2049-6
- 93 Kojima I, Medina J, Nakagawa Y. *Diabetes Obes Metab*, 2017, 19: 54–62
- 94 Hong S, Pedersen PL. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2008, 72: 590–641

- 95 Ludtmann MHR, Angelova PR, Horrocks MH, Choi ML, Rodrigues M, Baev AY, Berezhnov AV, Yao Z, Little D, Banushi B, Al-Menhali AS, Ranasinghe RT, Whiten DR, Yapom R, Dolt KS, Devine MJ, Gissen P, Kunath T, Jaganjac M, Pavlov EV, Klenerman D, Abramov AY, Gandhi S. *Nat Commun*, 2018, 9: 2293
- 96 Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2: 48–58
- 97 Kanchiswamy CN, Malnoy M, Occhipinti A, Maffei ME. *Int J Mol Sci*, 2014, 15: 3842–3859
- 98 Burgess J, Raven E. *Adv Inorg Chem*, 2009, 61: 251–366
- 99 Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2000, 1: 11–21
- 100 Zhou X, Belavek KJ, Miller EW. *Biochemistry*, 2021, 60: 3547–3554
- 101 Hanahan D, Weinberg RA. *Cell*, 2011, 144: 646–674
- 102 Chabner BA. *Oncologist*, 2002, 7: 34–41
- 103 Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW. *Cell*, 2002, 108: 153–164
- 104 Degterev A, Boyce M, Yuan J. *Oncogene*, 2003, 22: 8543–8567
- 105 Gong R, Wang D, Abbas G, Li S, Liu Q, Cui M, Zhang XE. *Sci China Life Sci*, 2022, 65: 540–549
- 106 Pereda AE. *Nat Rev Neurosci*, 2014, 15: 250–263
- 107 Berke JD, Hyman SE. *Neuron*, 2000, 25: 515–532
- 108 Lotharius J, Brundin P. *Nat Rev Neurosci*, 2002, 3: 932–942
- 109 Vilardaga JP, Bünemann M, Krasel C, Castro M, Lohse MJ. *Nat Biotechnol*, 2003, 21: 807–812
- 110 Jensen JB, Lyssand JS, Hague C, Hille B. *J Gen Physiol*, 2009, 133: 347–359
- 111 Adjoho-Hermans MJW, Goedhart J, van Weeren L, Nijmeijer S, Manders EMM, Offermanns S, Gadella TWJ. *BMC Biol*, 2011, 9: 32
- 112 Malik RU, Dysthe M, Ritt M, Sunahara RK, Sivaramakrishnan S. *Sci Rep*, 2017, 7: 7749
- 113 Ganesan S, Ameer-Beg SM, Ng TTC, Vojnovic B, Wouters FS. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 4089–4094
- 114 Li S, Wang D, Ghulam A, Li X, Li M, Li Q, Ma Y, Wang L, Wu H, Cui Z, Zhang XE. *J Virol*, 2022, 96:
- 115 Li X, Wang D, Cui Z, Li Q, Li M, Ma Y, Hu Q, Zhou Y, Zhang XE. *Sci China Life Sci*, 2021, 64: 66–76
- 116 Li W, Liu J, Liu Y, Li Q, Yin W, Wanderi KK, Zhang X, Zhang Z, Zhang XE, Cui Z. *J Virol*, 2021, 95:
- 117 Li ZY, Wang DB, Zhang ZP, Bi LJ, Cui ZQ, Deng JY, Zhang XE. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2014, 46: 802–809
- 118 Li ZY, Zhang ZP, Bi LJ, Cui ZQ, Deng JY, Wang DB, Zhang XE. *PLoS ONE*, 2016, 11: e0148749
- 119 Chen M, Yan C, Ma Y, Zhang XE. *Biomaterials*, 2021, 268: 120544
- 120 Fabritius A, Ng D, Kist AM, Erdogan M, Portugues R, Griesbeck O. *Cell Chem Biol*, 2018, 25: 1554–1561.e8
- 121 Wang L, Brock A, Herberich B, Schultz PG. *Science*, 2001, 292: 498–500
- 122 Pang Y, Zhang H, Ai HW. *Chem Res Toxicol*, 2021, 34: 1826–1845
- 123 Chen S, Chen Z, Ren W, Ai H. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 9589–9592
- 124 Chen Z, Ren W, Wright QE, Ai H. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 14940–14943
- 125 Chen Z, Zhang S, Li X, Ai HW. *Cell Chem Biol*, 2021, 28: 1542–1553.e5
- 126 Klima JC, Doyle LA, Lee JD, Rappleye M, Gagnon LA, Lee MY, Barros EP, Vorobieva AA, Dou J, Bremner S, Quon JS, Chow CM, Carter L, Mack DL, Amaro RE, Vaughan JC, Berndt A, Stoddard BL, Baker D. *Nat Commun*, 2021, 12: 856

Genetically encoded fluorescent sensing probes

Mengmeng Cui¹, Dianbing Wang¹, Xian-En Zhang^{1,2*}

¹ National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

² Faculty of Synthetic Biology, Shenzhen Institute of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China

*Corresponding author (email: zhangxe@ibp.ac.cn)

Abstract: Genetically encoded fluorescent sensing probes can image various molecular events in living cells and have become powerful tools in studies of cell biology. This paper introduces their categories, designs and applications. We also discuss their advantages, existing problems and solutions, and highlight the future development.

Keywords: genetically encoded fluorescent sensing probes, fluorescence resonance energy transfer (FRET), circularly permuted fluorescent protein (cpFP)

doi: [10.1360/SSC-2022-0071](https://doi.org/10.1360/SSC-2022-0071)