

# 结构导向的可逆光激活绿色荧光蛋白探针的研制

王 盛<sup>1,2,3</sup>, 陈轩泽<sup>1,2,3</sup>, 常 蕾<sup>1,2,3</sup>, 薛瑞莹<sup>1,2,3</sup>, 孙育杰<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>北京大学生物膜与膜生物工程国家重点实验室, 北京 100871;

<sup>2</sup>北京大学生物动态光学成像中心, 北京 100871; <sup>3</sup>北京大学生命科学学院, 北京 100871

**摘要** 近几年,可逆光激活荧光蛋白的研制越来越受到人们的重视,这类荧光蛋白极大地促进了活细胞超高分辨显微成像技术的发展及应用。可逆光激活荧光蛋白可被不同波长的光多次可逆地进行调制,因而被广泛地应用于高密度数据的光存储、光致变色荧光共振能量转移的测量以及基于可逆饱和和线性荧光跃迁原理的超高分辨率显微成像中。从研制这类荧光蛋白所涉及的关键氨基酸位点出发,本文综述了近几年可逆光激活绿色荧光蛋白的研制进展,并简要地讨论荧光蛋白结构与光学特性的关系,从而为后续结构导向的可逆光激活荧光蛋白的研制提供参考。

**关键词** 显微; 光学显微术; 可逆光激活; 荧光蛋白; 超分辨成像; 荧光探针; 绿色荧光蛋白

中图分类号 Q-336 文献标识码 A

doi: 10.3788/AOS201737.0318002

## Structure-Guided Development of Reversibly Photoswitchable Green Fluorescent Proteins Probe

Wang Sheng<sup>1,2,3</sup>, Chen Xuanze<sup>1,2,3</sup>, Chang Lei<sup>1,2,3</sup>, Xue Ruiying<sup>1,2,3</sup>, Sun Yujie<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>State Key Laboratory of Membrane Biology, Peking University, Beijing 100871, China;

<sup>2</sup>Biodynamic Optical Imaging Center, Peking University, Beijing 100871, China;

<sup>3</sup>School of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China

**Abstract** In recent years, people pay more and more attentions to the development of reversibly photoswitchable fluorescent proteins (RSFPs), because those fluorescent proteins can greatly promote the development and application of live-cell super-resolution imaging techniques. Reversibly photoswitchable fluorescent protein can be repeatedly and reversibly modulated by different wavelength lights, thus it can be widely applied in many fields such as high density data optical storage, the measurement of photochromic fluorescence resonance energy transfer, and super-resolution imaging based on reversible saturable linear fluorescence transitions (RESOLFT) principle. The recent development of green RSFPs is reviewed from the key amino acids involved in RSFPs design. We also make a brief discussion of the relationship between structure and optical characteristics of RSFPs, serving as the reference for further structure-guided development of better RSFPs.

**Key words** microscopy; optical microscopy; reversibly photoswitchable; fluorescent protein; super-resolution imaging; fluorescent probe; green fluorescent protein

**OCIS codes** 180.2520; 130.4815; 300.6390; 300.6320

## 1 引 言

1962年,日本科学家 Shimomura 等从水母类动物 *Aequorea Victoria* 中首次分离、纯化出一种荧光物质,并将其定性为蛋白质,称为绿色荧光蛋白(GFP)。30年后,GFP基因从水母中克隆,之后人们又从很多其他海洋生物物种如珊瑚、海葵和文昌鱼中克隆到了新的荧光蛋白。荧光蛋白可以通过基因编码的方式标记生物分子或细胞,借助荧光显微镜特异地显示出生物分子的时空信息,因此荧光蛋白已经成为研究细

收稿日期: 2016-10-31; 收到修改稿日期: 2016-12-28

基金项目: 国家自然科学基金(21573013,21390412,31271423,31327901)、国家 863 计划(SS2015AA020406)

作者简介: 王 盛(1981—),男,博士后,助理研究员,主要从事超分辨显微成像技术方面的研究。

E-mail: wangsheng9411@sina.com

\* 通信联系人。E-mail: sun\_yujie@pku.edu.cn

胞结构和功能必不可少的工具。除了普通的荧光蛋白外,近些年,一类特殊的可逆光激活荧光蛋白的发现与开发使超高分辨显微成像技术在细胞生物学研究中得到了更广泛的应用。本文综述近年来可逆光激活 GFP 的开发进展,并简要介绍了荧光蛋白结构与其光学性质间的关系,从而为后续结构导向的可逆光激活荧光蛋白的研制与开发提供参考。

## 2 荧光蛋白简介

华裔科学家钱永健率先研究并阐述了 GFP 发光的化学机制<sup>[1]</sup>。GFP 是一个分子量 27 kD 的筒状结构蛋白,由 11 个  $\beta$  折叠和一个中心  $\alpha$  螺旋构成,如图 1 所示。GFP 的荧光生色基团 4-(对-羟基苯亚甲基)咪唑-5-咪酮是由处于筒状结构中心的三个氨基酸:丝氨酸(Ser)65、酪氨酸(Tyr)66 和甘氨酸(Gly)67 在氧气存在下进行环化、脱水、氧化形成。野生型 GFP(WT-GFP)的生色基团有两种状态:质子化状态,在 395 nm 出现一个激发峰;非质子化状态,在 475 nm 处出现另一个激发峰。而荧光最大发射在 507 nm。钱永健课题组随后通过随机突变加定向筛选的方式研制出很多光谱性质发生改变的 GFP 变体,如蓝色荧光蛋白 BFP,青色荧光蛋白 CFP/Cerulean 以及黄色荧光蛋白 YFP/Venus/Citrine。研究人员随后又从珊瑚海葵等物种中克隆出光谱红移的红色荧光蛋白(RFP),大大拓展了荧光蛋白多色成像的应用<sup>[2-3]</sup>。除了上述的普通荧光蛋白外,研究人员在珊瑚中寻找红色荧光蛋白的同时还发现另一类“特殊”的荧光蛋白。这类荧光蛋白的

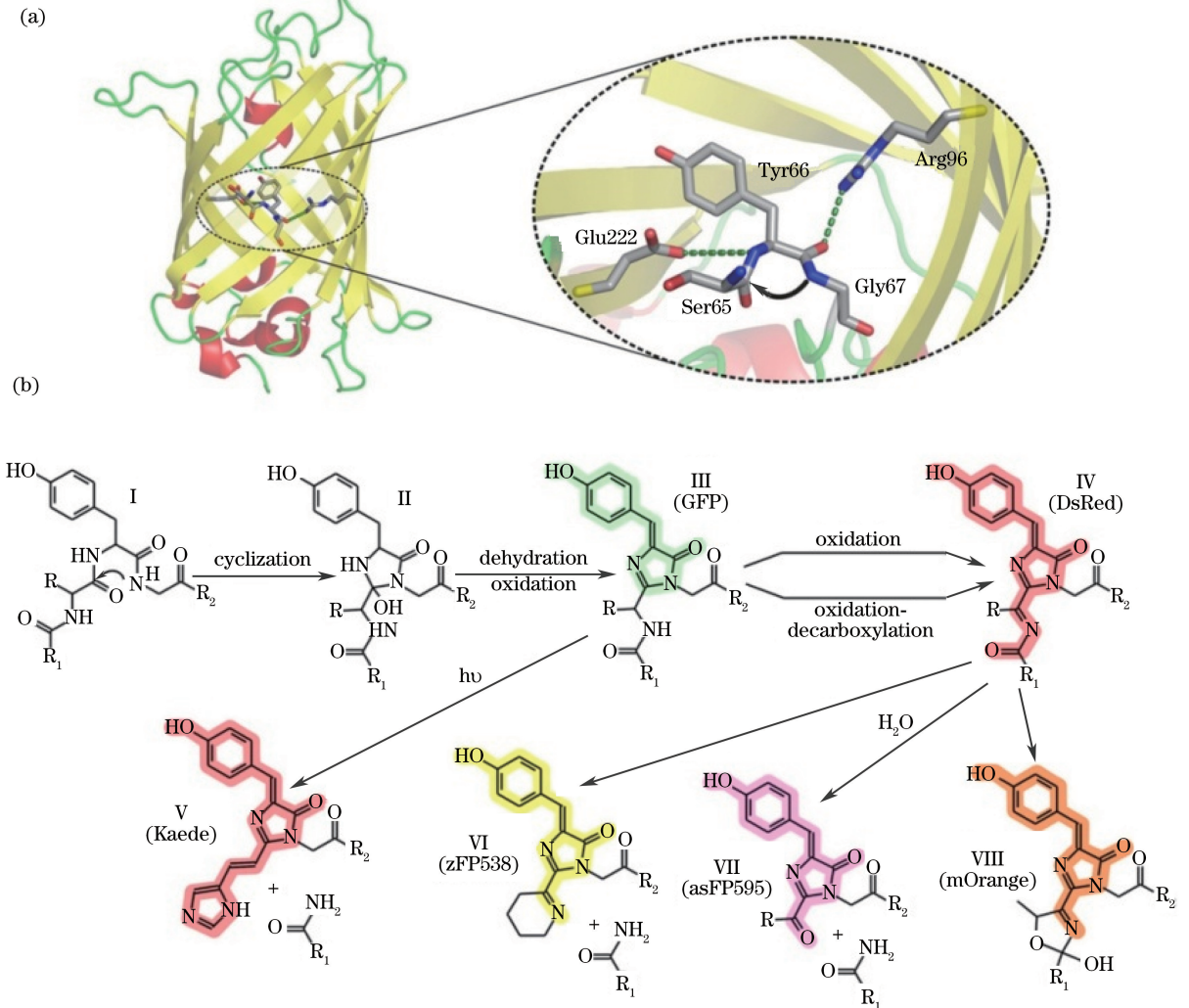


图 1 各色荧光蛋白生色团结构。(a) 荧光蛋白及其生色团结构示意图; (b) 各色荧光蛋白生色团生成步骤及化学结构  
Fig. 1 Chromophore structure of various color fluorescent proteins. (a) Schematic diagram of fluorescent proteins and their chromophore structures; (b) various color fluorescent proteins chromophore biosynthesis steps and chemical structures

荧光可以被外界不同颜色的光调控,所以人们称其为光可变荧光蛋白(phototransformable FPs)<sup>[4-5]</sup>。这类蛋白极大地促进了超高分辨显微成像技术在细胞生物学研究中的发展及应用。光可变荧光蛋白通常可被分为三类:1) 光激活荧光蛋白<sup>[6]</sup>,这类蛋白最初处于没有荧光的暗态,在405 nm紫色光激活后,才可释放出荧光,例如 PA-GFP, PA-mCherry; 2) 光转化荧光蛋白<sup>[7]</sup>,这类蛋白最初发出一种颜色光(如绿色),在405 nm光激发下,不可逆地转化发出另一种颜色光(如红色),例如 mEosFP, Dendra2, mMaple 等; 3) 可逆光激活荧光蛋白<sup>[8]</sup>,这类蛋白可在暗态和亮态之间来回多次切换,如近年来报道的 Dronpa 及其变体, rsEGFP 及其变体, Dreiklang<sup>[9]</sup>以及刚报道的用于 NL-SIM 成像的 Skylan-NS<sup>[10]</sup>和用于并行 RESOLFT 成像的 GMars-Q<sup>[11]</sup>。前两类荧光蛋白的特性依赖于荧光生色团和荧光蛋白内环境的不可逆化学变化,而后一类荧光蛋白的特性大多依赖于荧光生色团可逆的顺反异构<sup>[12]</sup>,如图 2 所示, Dronpa 荧光蛋白在亮态时其生色团处于顺式构象,而当其在暗态时其生色团处于反式构象。

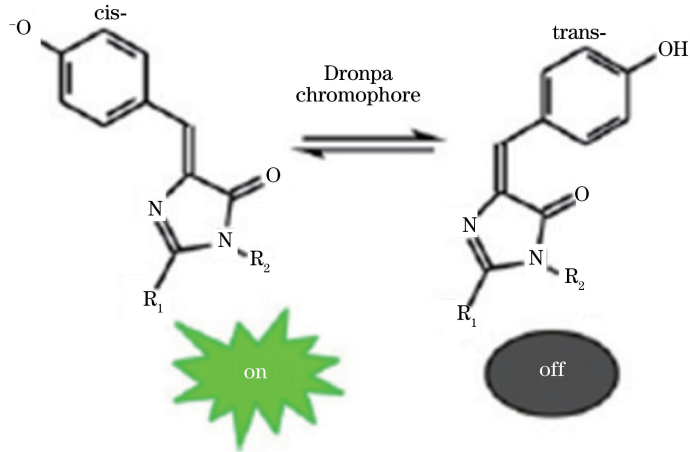


图 2 可逆光激活荧光蛋白 Dronpa 生色团在其亮态和暗态的结构

Fig. 2 Chromophore structure of reversibly photoswitchable fluorescent protein Dronpa in on and off state

可逆光激活荧光蛋白又可根据激活光和激发光的不同分为三类<sup>[12]</sup>: 1) 正向可逆光激活荧光蛋白, 例如 Pardon, Kohinoor 等。这种蛋白在用激发光(如 488 nm)激发蛋白发出荧光的同时, 蛋白荧光被开启, 而在用紫色光(如 405 nm)或青色光照射时, 蛋白荧光被关闭; 2) 负向可逆光激活荧光蛋白, 例如 Dronpa, rsTagRFP 等。这种蛋白在激发光(如 488 nm)激发蛋白发出荧光的同时, 蛋白荧光被关闭, 而在用紫色激活光(如 405 nm)或青色光照射时, 蛋白荧光被开启; 3) 激发光解偶联可逆光激活荧光蛋白, 例如 Dreiklang。这种蛋白可以在激发光(例如 514 nm 绿光)的光照下发出黄绿色荧光, 当用 405 nm 光照射时, 蛋白荧光被关闭, 而用 365 nm 光照射时蛋白荧光则又被开启。

由于可逆光激活荧光蛋白可被不同波长的光多次可逆地进行调制, 因而其可被广泛地应用于高密度数据的光存储, 光致变色荧光共振能量转移的测量以及基于可逆饱和线性荧光跃迁原理(RESOLFT)的超高分辨率显微成像中<sup>[12]</sup>。表 1 归纳总结了常用的可逆光激活 GFP 的关键突变位点及其物理特性, 并简要罗列了其在超分辨显微成像上的应用<sup>[13-30]</sup>。

### 3 基于水母来源荧光蛋白开发的可逆光激活荧光蛋白

基于水母 GFP 开发的可逆光激活荧光蛋白主要有两类: 1) 负向可逆光激活荧光蛋白如 E<sup>2</sup>GFP, rsEGFP 及其变体[包括 rsEGFP2, rsEGFP(N205S), rsGreen 系列, rsFolder 系列等]; 2) 激发光解偶联可逆光激活荧光蛋白, 例如 Dreiklang。

#### 3.1 单一 E222Q 突变将 EGFP 变成可逆光激活荧光蛋白

荧光蛋白的可逆光激活特性最早在水母来源的 YFP 中被报道, 但这种可逆光激活的特性只能在单分子层面被观测到。群体层面的可逆光激活现象只有在超低温下的 GFP 中才能被观测到<sup>[13]</sup>。2009 年, Bizzarri 等<sup>[14]</sup>发现将水母来源 GFP 的第 222 位的谷氨酸替换成谷氨酰胺后, 荧光蛋白变体 Mut2Q, EQ1, EYQ1 和

表 1 常用的可逆光激活荧光蛋白物理特性

Table 1 Physical characteristics of commonly-used reversibly photoswitchable fluorescent proteins

Fluorescent protein	Key mutation(s)	Characteristics	Applications
rsEGFP <sup>[15]</sup>	Q69L	Large on-off ratio Slow maturation	Point scanning RESOLFT
rsEGFP2 <sup>[16]</sup>	T65A	Fast switching Fatigue resistant	Point scanning RESOLFT Parallelized RESOLFT
rsEGFP(N205S) <sup>[17]</sup>	N205S	Slow switching Not fatigue resistant	Parallelized RESOLFT
rsGreens <sup>[18]</sup>	sfGFP mutation	Superfolder rsFPs with different characteristics	Point scanning RESOLFT SOFI
rsFolders <sup>[19]</sup>	sfGFP mutation	Superfolder two rsFPs function at oxidative environments	Point scanning RESOLFT
Dronpa(M159T) <sup>[22]</sup>	M159T	Very fast switching fatigue resistant Low photon number	Point scanning RESOLFT Parallelized RESOLFT
Skylan-NS <sup>[10]</sup>	H62L	Slow switching fatigue resistant Large photon number	NL-SIM
GMars-Q <sup>[11]</sup>	H71Q/M168A	Slow switching as rsEGFP(N205S) Extremely fatigue resistant	Parallelized RESOLFT
Kohinoor <sup>[30]</sup>	M159Y	Positive rsFP RESOLFT imaging under ultra-low laser power	Point scanning RESOLFT

E<sup>2</sup>GFP 都表现出显著的可逆光激活特性。后续研究发现第 222 位的谷氨酸是荧光蛋白激发态质子转移 (ESPT) 过程中的质子受体, 将谷氨酸突变成谷氨酰胺后, 质子转移通路被打断, 生色团中的质子传递受阻并伴随着荧光蛋白内部大量氢键重排, 从而解除了生色团顺反异构的阻力, 进而使得在光照时生色团可以灵活地顺反异构, 荧光蛋白变体才具有可逆光激活的特性。因此对荧光蛋白第 222 位的氨基酸进行突变, 可有效地将水母来源的荧光蛋白变成具有可逆光激活特性的荧光蛋白。但是第 222 位氨基酸的突变也会影响荧光蛋白其他的光学性质, 比如亮度、抗光漂白特性等。所以结合第 222 位氨基酸定向取代后的随机突变和大规模突变文库筛选是获得性能改进的可逆光激活荧光蛋白有效途径之一。

### 3.2 Q69L 突变将 EGFP 变成可逆光激活荧光蛋白

虽然 E222Q 突变可以有效地将水母来源的 GFP 转变成具有可逆光激活特性的荧光蛋白, 但 Grotjohann 等<sup>[15]</sup>发现 E222Q 的突变却减少了可逆光激活荧光蛋白开关的有效次数。通过对 EGFP 结构的分析, Grotjohann 将 EGFP 第 69 位的谷氨酰胺用亮氨酸替代后, 变体 EGFP(Q69L) 表现出可逆光激活的特性, 但这种变体的亮暗态荧光对比度不是很大。通过再对一些位点的随机突变 Grotjohann 从 3 万个克隆中成功筛选出 5 个位点突变的 EGFP 变体 rsEGFP。这个变体展示出更大的亮暗态荧光对比度、更高的可逆光激活效率和更好的光稳定性。Grotjohann 将 rsEGFP 标记中间纤维 Keratin, 在活细胞内实现了小于 40 nm 的点扫描式 RESOLFT 超高分辨显微成像。

### 3.3 T65A 突变将 EGFP 变成快速开关的可逆光激活荧光蛋白

虽然 rsEGFP 可以用于活细胞点扫描式 RESOLFT 超高分辨显微成像, 但 rsEGFP 开关速度还是显得太慢, 从而导致采用点扫描 RESOLFT 显微镜成像时, 光点在单个像素上的扫描驻留时间太长, 采集一张超分辨率图像需要很长时间, 这限制了活细胞超高分辨成像的时间分辨率。2012 年, Grotjohann 等<sup>[16]</sup>发现仅仅将 EGFP 生色团第一个氨基酸从苏氨酸变成丙氨酸就可以使得 EGFP 变成一个快速开关的可逆光激活荧光蛋白 EGFP(T65A)。但这种变体的亮暗态荧光对比度不高, 于是 Grotjohann 又将改造 rsEGFP 中的突变应用到 EGFP(T65A) 变体中, 经过筛选获得了亮暗态荧光对比度较高, 开关速度更快, 更抗光漂白的可逆光激活绿色荧光蛋白 rsEGFP2。rsEGFP2 非常适合用于点扫描的 RESOLFT 超分辨率显微术, 可以对活细胞内的细胞器如内质网、过氧化物酶体的动态行为进行超高分辨率长时间成像。



### 3.4 N205S 突变将 rsEGFP 变成慢速开关的可逆光激活荧光蛋白

2013年, Chmyrov 等<sup>[17]</sup>提出了并行 RESOLFT 显微术, 这种超分辨显微术使用正交的驻波产生十万个“面包圈”式的光点, 可对样品进行并行扫描超分辨成像, 从而大大提高了成像速度。这种并行 RESOLFT 技术可以使用开关较快的可逆光激活荧光蛋白如 rsEGFP2 或 Dronpa(M159T) 进行快速大视野成像, 也同时因为快速开关的可逆光激活荧光蛋白通常具有较好的抗光漂白特性<sup>[18]</sup>, 所以可以进行长时间超分辨成像。但其缺点是快速开关的可逆光激活荧光蛋白每个开关周期中给出的光子数相对较少, 用其得到的每张超分辨图的信噪比较低。Chmyrov 研制出了慢速开关的可逆光激活荧光蛋白 rsEGFP(N205S), 这种变体开关相对较慢, 所以每个开关周期中可以给出比 rsEGFP 多 2 倍的光子数, 从而大大提高了每张超分辨图的信噪比。但遗憾的是慢速开关的可逆光激活荧光蛋白通常抗光漂白性能较差, 所以 rsEGFP(N205S) 并没有在长时间并行 RESOLFT 超高分辨成像中得到广泛应用。

### 3.5 结合超折叠绿色荧光蛋白 sfGFP 突变的可逆光激活荧光蛋白

在活细胞体内表达 rsEGFP 时, rsEGFP 的折叠成熟较慢, 限制了其在 RESOLFT 成像中的应用<sup>[18]</sup>。2015年, Duwé 等<sup>[18]</sup>选取了从 EGFP 到超折叠绿色荧光蛋白 sfGFP 里的突变, 将其应用到 rsEGFP 的优化上, 并结合定向筛选的方式研制出一系列折叠和成熟效率大大提高的可逆光激活 GFP, 即 rsGreen 系列。rsGreen 系列中的典型代表是开关速度较慢的 rsGreen0.7 以及开关速度较快的 rsGreenF。很有意思的是, Duwé 发现将 rsEGFP 中的第 145 位酪氨酸突变成苯丙氨酸后, rsGreen0.7 变体的开关速度较 rsEGFP 显著变慢, 而当其突变成亮氨酸后, rsGreenF 变体的开关速度较 rsEGFP 显著变快。这表明 145 位置的氨基酸可以调节可逆光激活荧光蛋白的开关速度。

### 3.6 在细菌细胞周质里可以进行超高分辨成像的可逆光激活荧光蛋白

细菌的内膜和外膜之间的周质空间是一个氧化环境, 在这种环境中, 荧光蛋白常会因为被氧化而不发光。2016年, Khatib 等<sup>[19]</sup>选取了从 EGFP 到超折叠绿色荧光蛋白 sfGFP 里的突变, 将其应用到 rsEGFP2 的优化上, 成功研制出可以在细菌细胞周质里正常工作的荧光蛋白 rsFolder。rsFolder 除了可以在氧化环境中正常折叠外, 还表现出超乎寻常的热稳定性, 其热稳定性是 rsEGFP2 的 15 倍, 也是迄今为止被报道的热稳定性最强的可逆光激活荧光蛋白。但 rsFolder 的亮暗态荧光对比度比 rsEGFP2 小, 限制了其在 RESOLFT 超分辨成像上的应用。Khatib 等随后又解析了 rsEGFP2 和 rsFolder 的晶体结构, 通过比较荧光蛋白在亮暗态的结构差异以及后续实验, 发现将 rsFolder 的 145 位苯丙氨酸突变成酪氨酸后, 变体 rsFolder2 获得了更大的亮暗态荧光对比度。rsFolder 虽因其相对较小的亮暗态荧光对比度不适合被用于 RESOLFT 超分辨成像, 但其被证明可以很好地用于 pcSOFI 成像中。而 rsFolder2 则特别适合细菌细胞周质等氧化环境下的超高分辨率 RESOLFT 成像。

### 3.7 特殊的激发光解偶联可逆光激活荧光蛋白 Dreiklang

2011年, Brakemann 等<sup>[20]</sup>发现通常的黄色荧光蛋白 Citrine 发出的黄色荧光(峰值 529 nm)可以在很小程度上被 365 nm 的紫外光(UV)和 405 nm 的紫光调制。Brakemann 通过对 Citrine 序列随机突变加定向筛选的方式从约 7 万个突变克隆中得到可被 UV 光和紫光高效调制的荧光蛋白 Dreiklang。通过对 Dreiklang 的晶体结构分析发现, Dreiklang 可逆光激活的原理并不是通常的荧光生色团的顺反异构, 而是生色团可逆的脱水和加水过程。这种特殊的可逆光激活机制的解析为后续研制更好性能的激发光解偶联可逆光激活荧光蛋白奠定了基础。

### 3.8 基于水母来源 GFP 改造的负向可逆光激活荧光蛋白结构和其光学特性的关系

虽然 Bizzarri 等将水母 GFP 的第 222 位的谷氨酸替换成谷氨酰胺使得其变体成为具有可逆光激活特性的荧光蛋白, 但真正较好地用于超高分辨 RESOLFT 成像的水母来源的可逆光激活荧光蛋白主要还是基于 rsEGFP 或 rsEGFP2 改造的荧光蛋白。人们对水母 GFP 来源的可逆光激活荧光蛋白结构的认识也同样源于对 rsGreen 0.7, rsEGFP2 和 rsFolder 结构的解析。研究发现可逆光激活荧光蛋白在亮态和暗态分别对应着生色团处于顺式构象去质子化状态和反式构象质子化状态<sup>[18]</sup>。对于绝大多数荧光蛋白而言, 当生色团处于顺式构象时, 荧光蛋白为亮态, 而当生色团处于反式构象时, 荧光蛋白为暗态, 并且生色团所处的内环境影响了其顺式反式构象转变的效率。例如在荧光蛋白筒状结构的内部, 与荧光蛋白生色团空间上接近的氨基

酸可以通过其侧链以非共价键的形式(如氢键)与生色团发生相互作用,或通过氨基酸侧链的空间位阻作用与生色团发生相互作用,进而影响了生色团的顺式反式构象转变的效率和光激活荧光蛋白的开关速度。

rsGreen0.7 的结构及涉及的氨基酸突变位点与 EGFP 对比图如图 3 所示。图 3 中,荧光蛋白  $\beta$ -筒状结构用绿色表示,其中心的生色团结构用球棍结构表示,紫色氨基酸位点的突变存在于 rsEGFP 蛋白中,青绿色氨基酸位点的突变存在于超折叠 sfGFP 中,其余突变的氨基酸位点用黄色表示。可以影响可逆光激活荧光蛋白开关性质的氨基酸突变位点用圆圈突出显示,这些氨基酸也都围绕在生色团附近。

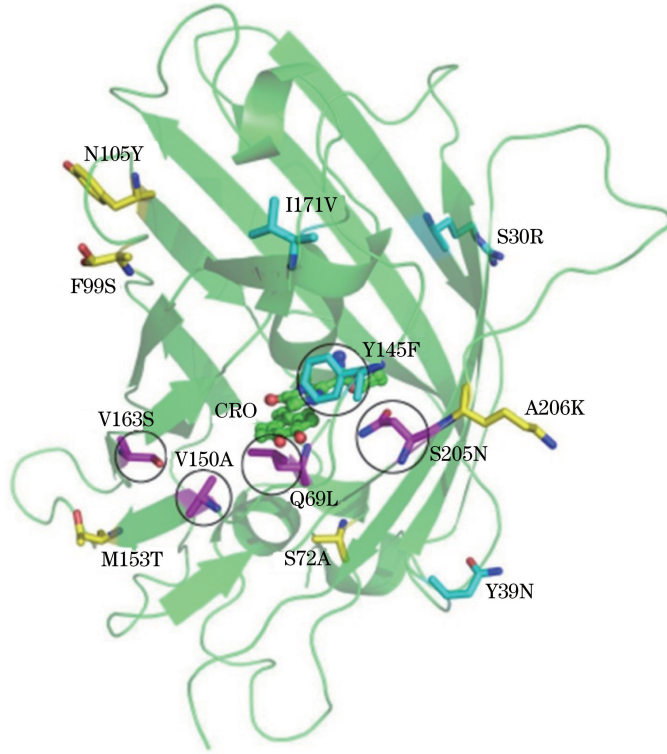


图 3 rsGreen0.7 的结构及涉及的氨基酸突变位点与 EGFP 对比图<sup>[18]</sup>

Fig. 3 Structure of rsGreen 0.7 and its relevant amino acid mutations compared with EGFP<sup>[18]</sup>

从图 3 可以看出空间结构上离荧光生色团很近的 Q69L 和 V150A 突变加大了这两个位点离生色团的距离,从而解除了生色团顺反异构的空间位阻,使得生色团更利于顺反异构。同时 163 位的丝氨酸和 183 位的谷氨酰胺以及一分子水形成的氢键可以稳定处于反式构象的生色团,使得 rsGreen 0.7 具有较好的热稳定性。而 205 位的丝氨酸被天冬酰胺替代后,当荧光蛋白生色团处于顺式构象时,该区域的分子骨架会向外侧移动,从而生色团有更大的空间进行顺反异构;而当荧光蛋白生色团处于反式构象时,该区域的分子骨架回缩,天冬酰胺侧链较大的酰胺基团给荧光蛋白生色团提供了自发向顺式构象转变时的空间位阻,从而稳定了处于反式构象的荧光蛋白生色团。这就解释了为什么单个 N205S 的突变,就可使得 rsEGFP 变成开关速度更慢的变体 rsEGFP(N205S)。有意思的是,第 145 位的酪氨酸在空间结构上也接近荧光蛋白生色团。据推测,rsEGFP 中的 145 位酪氨酸突变为 rsGreen 0.7 中的苯丙氨酸后,Phe145 与 His148 和 Asn205 的极性相互作用减弱,但苯丙氨酸依然维持了足够的空间位阻,这使得相比于 rsEGFP 来说,rsGreen 0.7 开关速度变的更慢;而当其变为 rsGreenF 中的亮氨酸后,空间位阻作用减弱,这使得相比于 rsEGFP 来说,rsGreenF 开关速度变快。因此第 145 位氨基酸可以作为调控基于水母来源 GFP 改造的可逆光激活荧光蛋白开关速度的“旋钮”。在 rsEGFP2 中,当生色团处于顺式构象时,His148 可以通过强的氢键作用稳定生色团,而当生色团处于反式构象时,His148 则与 Tyr145 形成氢键降低了生色团处于反式构象的自由能,这种可逆光激活机制是与 rsGreen 0.7 类似的。而在 rsFolder 中,则是另一番情景:在生色团处于顺式构象时,苯环上的酚氧基团与 203 位的苏氨酸,148 位的组氨酸以及水分子形成稳定的氢键;当处于反式构象时,苯环上的酚氧基团与 148 位的组氨酸仍然形成氢键,但其余的两个氢键断开,这使得处于反式构象的生色团紧密地与荧光蛋

白骨架相连,因此极大地稳定了生色团的反式构象。这也解释了为什么 rsFolder 具有超乎寻常的热稳定性。

## 4 基于珊瑚来源荧光蛋白开发的可逆光激活荧光蛋白

基于珊瑚来源荧光蛋白开发的可逆光激活荧光蛋白主要有两类:1) 正向可逆光激活荧光蛋白,例如 Pardon 及 Kohinoor;2) 负向可逆光激活荧光蛋白,例如 Dronpa 及其变体、基于 mEos2 蛋白改造的 mGeos 系列、基于 mEos3.1 改造的 Skylan 系列(例如 Skylan-S, Skylan-NS),以及基于 mMaple3 改造的 GMars 系列(例如 GMars-Q)等。本文着重介绍负向可逆光激活荧光蛋白的研制及其结构特点。

### 4.1 第 157,159,173 位置的氨基酸的突变可将珊瑚来源的光转化荧光蛋白转变成可逆光激活荧光蛋白

可逆光激活荧光蛋白 Dronpa 已经被成功地用于多种显微成像实验中,这主要是因为 Dronpa 蛋白亮度大,单体性好。人们对 Dronpa 蛋白结构以及可逆光激活特性的光物理、光化学的研究表明 Dronpa 的可逆光激活过程同样涉及其生色团的顺反式构象转变及质子化和去质子化变化。当 Dronpa 的生色团处于顺式构象时,生色团共平面性较好,发出强烈绿色荧光,而当生色团处于反式构象时,生色团的共面性被破坏,失去荧光<sup>[21]</sup>。2007 年,Stile 等<sup>[22]</sup>解析了 Dronpa 的结构发现其第 157 位拥有较大侧链的缬氨酸会对生色团的顺反异构造成空间位阻,而如果将缬氨酸变成侧链较小的甘氨酸后,变体 rsFastline 开关的效率比 Dronpa 提高了 50 倍。同样地,将第 159 位较大侧链的甲硫氨酸突变成侧链较小的丙氨酸后,变体 Dronpa(M159T) 的开关效率更是提高了 1000 倍。这种提高可逆光激活荧光蛋白开关效率的突变同样适用于来源于类似物种的荧光蛋白如 EosFP, Dendra2 等。除以上两个关键位点外,Adam 等<sup>[23]</sup>发现如果将 mEosFP 的第 173 位苯丙氨酸突变成丝氨酸,也可以间接改变第 159 位甲硫氨酸的构象,从而使 mEosFP 在绿色和红色状态都产生明显的可逆光激活特性。Adam 也将 Dendra2 的第 173 位苯丙氨酸突变为丝氨酸,变体 NijiFP 在绿色和红色状态也都能产生明显的可逆光激活特性。

### 4.2 mEos2 荧光蛋白生色团组氨酸的改变也可以诱导光转化蛋白产生可逆光激活的特性

珊瑚来源的具有绿色和红色状态的光转化荧光蛋白在序列和结构上具有高度的保守性。例如 mEosFP, Dendra2, mMaple 等荧光蛋白的生色团都是由 HYG 三个氨基酸构成,其中第一位的组氨酸在荧光蛋白从绿色状态转化到红色状态时起关键作用。2012 年,Chang 等<sup>[24]</sup>将 mEos2 荧光蛋白生色团第一位的组氨酸改变成其他氨基酸后发现这类蛋白不能从绿色状态转变为红色状态,却在绿色状态具有不同效率的可逆光激活特性,他们把这类蛋白命名为 mGeos。除此以外,Chang 又将 mGeos 蛋白第 173 位的苯丙氨酸替换成丝氨酸,得到开关速度更快的可逆光激活荧光蛋白例如 mGeos-FS, mGeos-MS 等。基于同样的原理,2015 年,Zhang 等<sup>[25]</sup>将光转化荧光蛋白 mEos3.1 生色团第一位的组氨酸改变成丝氨酸后,变体 Skylan-S 不但具有可逆光激活特性,还具有光闪烁的特性,非常适合基于荧光涨落图像分析的超高分辨率成像<sup>[26]</sup>。2016 年,Zhang 等<sup>[10]</sup>又报道了另一种特别适用于 NL-SIM 超分辨率成像的可逆光激活荧光蛋白 Skylan-NS,这种变体也是将 mEos3.1 蛋白生色团第一位的组氨酸突变成了亮氨酸。这种变体相对 Dronpa 或 rsEGFP 来说,具有更大的亮暗态荧光对比度以及很好的抗漂白特性,采用 NL-SIM 技术在较低的激发光强度下就可以实现 60 nm 的长时间超高分辨率活细胞成像。

### 4.3 通过联合改变生色团组氨酸和第 159 位氨基酸研制可逆光激活荧光蛋白

2014 年,哈佛大学的庄小威教授实验室研制出了一种特别适合进行 PALM 超高分辨成像的光转化荧光蛋白 mMaple3<sup>[27]</sup>。本实验组将第 159 位(mMaple3 中的 168 位)的甲硫氨酸替换成丙氨酸后,发现变体除了具有光转化特性外,还在绿色和红色状态都具有可逆光激活特性。把这种变体叫做“火星荧光蛋白”(Mars)。后续采用对生色团组氨酸饱和突变的方法又得到了一系列只有绿色荧光的可逆光激活荧光蛋白 GMars。随后又从 GMars 系列荧光蛋白中成功筛选出具有较高亮暗态荧光对比度和强抗光漂白特性的可逆光激活荧光蛋白 GMars-Q<sup>[11]</sup>。与已成功用于并行 RESOLFT 显微成像的慢速开关可逆光激活荧光蛋白 rsEGFP(N205S)相比,GMars-Q 与 rsEGFP(N205S)在群体水平具有相似的亮度和开关速度,可以保证每个开关循环里给出足够的光子数以获取高信噪比的超分辨图像。然而,GMars-Q 的亮暗态荧光对比度是 rsEGFP(N205S)的 10 倍,其连续成像时间也是 rsEGFP(N205S)的 10 倍。同时,GMars-Q 展现出在其他可



逆光激活荧光蛋白中少见的双态光漂白现象,这也是 GMars-Q 可以进行长时间超高分辨的基础(图 4)。图 4(a)的标尺为  $5\ \mu\text{m}$ ,图 4(b)的数据来自 10 组细胞的平均数值,图 4(c)左图伪彩色显示 3 s(红色),30 s(绿色)和 60 s(蓝色)内质网的动态变化,右图为在总长 50 张超分辨活细胞电影中截取的 6 张图片,箭头处标明了内质网管化的动态过程,电影拍摄的总时长为 300 s,标尺为  $1\ \mu\text{m}$ 。在同一期杂志上,荧光蛋白权威专家 Nienhaus 等<sup>[28]</sup>也对这种蛋白的研制过程和可能的光漂白机理进行了分析报道。GMars-Q 的研制很好地促进了并行 RESOLFT 活细胞超高分辨率显微技术的应用。

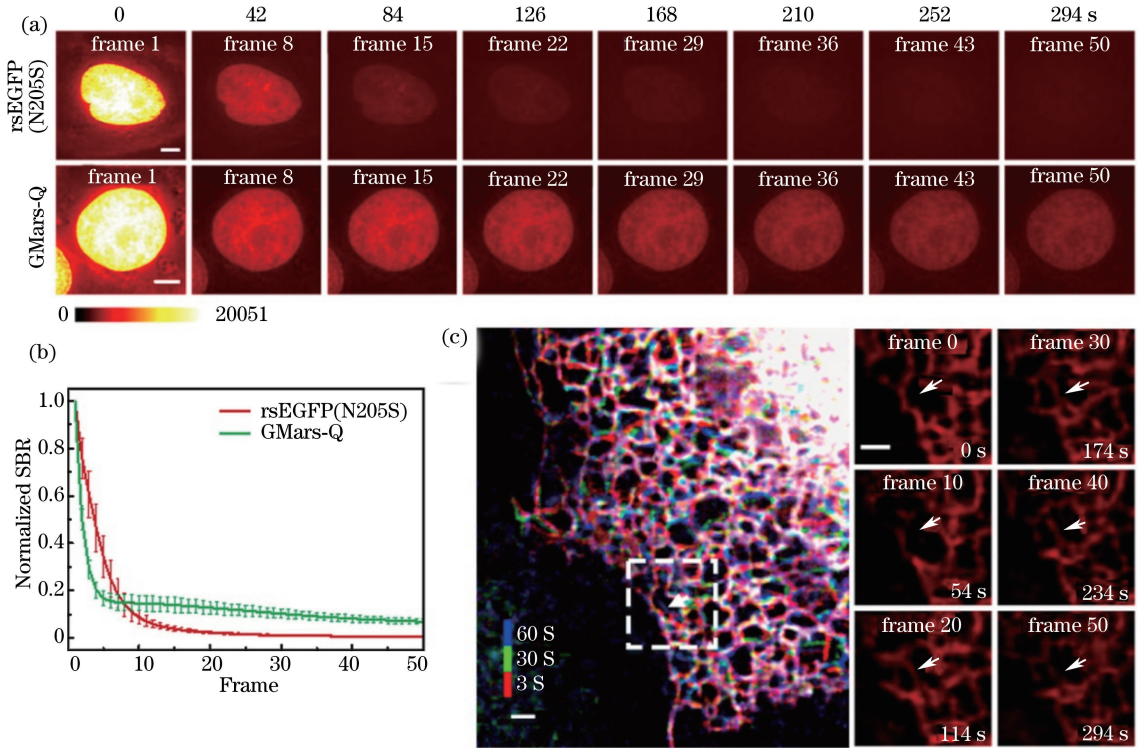


图 4 GMars-Q 用于并行 RESOLFT 显微镜成像效果图<sup>[11]</sup>。(a)在相同成像条件下比较 H2B 标记的 rsEGFP(N205S) 和 GMars-Q 用于长时间活细胞并行 RESOLFT 成像; (b)归一化的信背比随着成像帧数的变化; (c)将 GMars-Q 用 KDEL 序列定位于内质网,进行长时间活细胞并行 RESOLFT 成像

Fig. 4 Performance of GMars-Q in parallelized RESOLFT microscope<sup>[11]</sup>. (a) Comparison of the long-term parallelized RESOLFT imaging performance between live cells expressing H2B-rsEGFP (N205S) and H2B-GMars-Q; (b) normalized signal-to-background ratio changes with the frame numbers; (c) long-term live cell parallelized RESOLFT imaging of GMars-Q targeting to the endoplasmic reticulum with KDEL sequence

#### 4.4 正向可逆光激活荧光蛋白 Pardon 和 Kohinoor

虽然 Pardon 是正向可逆光激活荧光蛋白,与 Dronpa 展现出完全相反的光激活模式,但 Pardon 却是从 Dronpa 改造而来<sup>[29]</sup>。关键的突变位点是 Dronpa 第 159 位的甲硫氨酸。当甲硫氨酸被替换成酪氨酸后,则 Dronpa 变体 Pardon 展现出完全相反的光激活模式。2015 年, Tiwari 对 Pardon 进行了进一步优化,研制出可以在极低功率下进行 RESOLFT 超分辨显微成像的荧光蛋白 Kohinoor<sup>[30]</sup>,开辟了正向可逆光激活荧光蛋白用于 RESOLFT 超分辨成像的先河。但 Kohinoor 在生理 pH 条件下荧光强度较低,这也限制了其进一步的应用。

## 5 结 论

可逆光激活荧光蛋白的研制,极大地促进了超高分辨活细胞成像技术的发展及应用。从研制这类 GFP 所涉及的关键氨基酸位点出发,本文综述了近几年可逆光激活 GFP 的研制进展。荧光蛋白光学特性由其生色团本身以及生色团所处的周围环境共同决定。从以上的研究分析可以看出生色团周围临近的某些氨基酸的突变,可以显著改变生色团与其周围氨基酸残基非共价的相互作用,进而影响荧光蛋白一系列光物理化学



特性。对荧光蛋白结构的进一步认识,使得人们可以根据已有知识来设计开发和筛选满足某些光物理化学特性的荧光蛋白。对更多可逆光激活荧光蛋白晶体结构的解析也能为理解荧光蛋白光物理化学的机制提供理论基础。

近年来,可逆光激活 GFP 的研制取得了较大的进展,但性能优越的可逆光激活红色荧光蛋白的研制一直是个难点。红色荧光蛋白生色团结构更为复杂,涉及的各种非共价相互作用更多,这给研制性能优越的红色荧光蛋白带来了巨大的挑战<sup>[31]</sup>。比起 GFP,红色荧光蛋白整体亮度相对较低,成熟时间相对较慢,单体性相对较差。近几年虽然也有可逆光激活红色荧光蛋白的报道<sup>[32-34]</sup>,但相对 GFP 而言,其亮度、明暗态荧光对比度、开关效率、抗光漂白性等都不令人满意,期待未来的研究可以更好地揭示可逆光激活红色荧光蛋白的晶体结构以及其内在的光物理化学机制,从而为结构导向的可逆光激活红色荧光蛋白的研制提供理论基础。

## 参 考 文 献

- [1] Heim R, Prasher D C, Tsien R Y. Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein [C]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91(26): 12501-12504.
- [2] Shaner N C, Campbell R E, Steinbach P A, *et al.* Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein[J]. *Nat Biotechnol*, 2004, 22(12): 1567-1572.
- [3] Shcherbo D, Merzlyak E M, Chepurnykh T V, *et al.* Bright far-red fluorescent protein for whole-body imaging[J]. *Nat Methods*, 2007, 4(9): 741-746.
- [4] Adam V, Berardozi R, Byrdin M, *et al.* Phototransformable fluorescent proteins: future challenges [J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2014, 20: 92-102.
- [5] Adam V. Phototransformable fluorescent proteins: which one for which application [J]. *Histochemistry and Cell Biology*, 2014, 142(1): 19-41.
- [6] Post J N, Lidke K A, Rieger B, *et al.* One- and two-photon photoactivation of a paGFP-fusion protein in live *Drosophila* embryos[J]. *FEBS Lett*, 2005, 579(2): 325-330.
- [7] Mutoh T, Miyata T, Kashiwagi S, *et al.* Dynamic behavior of individual cells in developing organotypic brain slices revealed by the photoconvertible protein Kaede[J]. *Exp Neurol*, 2006, 200(2): 430-437.
- [8] Habuchi S, Ando R, Dedecker P, *et al.* Reversible single-molecule photoswitching in the GFP-like fluorescent protein Dronpa[C]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(27): 9511-9516.
- [9] Jensen N A, Danzl J G, Willig K I, *et al.* Coordinate-targeted and coordinate-stochastic super-resolution microscopy with the reversibly switchable fluorescent protein Dreiklang[J]. *Chemphyschem*, 2014, 15(4): 756-762.
- [10] Zhang X, Zhang M, Li D, *et al.* Highly photostable, reversibly photoswitchable fluorescent protein with high contrast ratio for live-cell superresolution microscopy[C]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(37): 10364-10369.
- [11] Wang S, Chen X Z, Chang L, *et al.* GMars-Q enables long-term live-cell parallelized reversible saturable optical fluorescence transitions nanoscopy[J]. *ACS Nano*, 2016, 10(10): 9136-9144.
- [12] Bourgeois D, Adam V. Reversible photoswitching in fluorescent proteins: a mechanistic view[J]. *IUBMB Life*, 2012, 64(6): 482-491.
- [13] Creemers T M, Lock A J, Subramaniam V V, *et al.* Three photoconvertible forms of green fluorescent protein identified by spectral hole-burning[J]. *Nature Structural Biology*, 1999, 6(7): 557-560.
- [14] Bizzarri R, Serresi M, Cardarelli F, *et al.* Single amino acid replacement makes *Aequorea victoria* fluorescent proteins reversibly photoswitchable[J]. *J Am Chem Soc*, 2010, 132(1): 85-95.
- [15] Grotjohann T, Testa I, Leutenegger M, *et al.* Diffraction-unlimited all-optical imaging and writing with a photochromic GFP[J]. *Nature*, 2011, 478(7368): 204-208.
- [16] Grotjohann T, Testa I, Reuss M, *et al.* rsEGFP2 enables fast RESOLFT nanoscopy of living cells[J]. *eLife*, 2012, 1: e00248.
- [17] Chmyrov A, Keller J, Grotjohann T, *et al.* Nanoscopy with more than 100,000' doughnuts'[J]. *Nat Methods*, 2013, 10(8): 737-740.
- [18] Duwé S, de Zitter E, Gielen V, *et al.* Expression-enhanced fluorescent proteins based on enhanced green fluorescent protein for super-resolution microscopy[J]. *ACS Nano*, 2015, 9(10): 9528-9541.
- [19] Khatib M E, Martins A, Bourgeois D, *et al.* Rational design of ultrastable and reversibly photoswitchable fluorescent proteins for super-resolution imaging of the bacterial periplasm[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 18459.

- [20] Brakemann T, Stiel A C, Weber G, *et al.* A reversibly photoswitchable GFP-like protein with fluorescence excitation decoupled from switching[J]. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(10): 942-947.
- [21] Andresen M, Stiel A C, Trowitzsch S, *et al.* Structural basis for reversible photoswitching in Dronpa[C]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(32): 13005-13009.
- [22] Stiel A C, Trowitzsch S, Weber G, *et al.* 1.8 Å bright-state structure of the reversibly switchable fluorescent protein Dronpa guides the generation of fast switching variants[J]. *Biochem J*, 2007, 402(1): 35-42.
- [23] Adam V, Moeyaert B, David C C, *et al.* Rational design of photoconvertible and biphotochromic fluorescent proteins for advanced microscopy applications[J]. *Chem Biol*, 2011, 18(10): 1241-1251.
- [24] Chang H, Zhang M, Ji W, *et al.* A unique series of reversibly switchable fluorescent proteins with beneficial properties for various applications[C]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(12): 4455-4460.
- [25] Zhang X, Chen X, Zeng Z, *et al.* Development of a reversibly switchable fluorescent protein for super-resolution optical fluctuation imaging (SOFI)[J]. *ACS Nano*, 2015, 9(3): 2659-2667.
- [26] Dertinger T, Colyer R, Vogel R, *et al.* Superresolution optical fluctuation imaging (SOFI)[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2011, 733: 17-21.
- [27] Wang S, Moffitt J R, Dempsey G T, *et al.* Characterization and development of photoactivatable fluorescent proteins for single-molecule-based superresolution imaging[C]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(23): 8452-8457.
- [28] Nienhaus K, Nienhaus G U. Photoswitchable fluorescent proteins: do not always look on the bright side[J]. *ACS Nano*, 2016, 10(10): 9104-9108.
- [29] Andresen M, Stiel A C, Folling J, *et al.* Photoswitchable fluorescent proteins enable monochromatic multilabel imaging and dual color fluorescence nanoscopy[J]. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(9): 1035-1040.
- [30] Tiwari D K, Arai Y, Yamanaka M, *et al.* A fast-and positively photoswitchable fluorescent protein for ultralow-laser-power RESOLFT nanoscopy[J]. *Nat Methods*, 2015, 12(6): 515-518.
- [31] Shcherbakova D M, Sengupta P, Lippincott-Schwartz J, *et al.* Photocontrollable fluorescent proteins for superresolution imaging[J]. *Annual Review of Biophysics*, 2014, 43: 303-329.
- [32] Stiel A C, Andresen M, Bock H, *et al.* Generation of monomeric reversibly switchable red fluorescent proteins for far-field fluorescence nanoscopy[J]. *Biophys J*, 2008, 95(6): 2989-2997.
- [33] Lavoie-Cardinal F, Jensen N A, Westphal V, *et al.* Two-color RESOLFT nanoscopy with green and red fluorescent photochromic proteins[J]. *Chemphyschem*, 2014, 15(4): 655-663.
- [34] Pakhomov A A, Martynov V I. GFP family: structural insights into spectral tuning[J]. *Chemistry Biology*, 2008, 15(8): 755-764.