监测细胞内氧化还原代谢状态的遗传编码荧光探针

赵玉政^{1,2,3*}, 张卓¹, 杨弋^{1,2,3*}

1. 华东理工大学, 光遗传学与合成生物学交叉学科研究中心, 合成生物学与生物技术实验室, 上海 200237;

2. 华东理工大学, 生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237;

3. 华东理工大学药学院上海市新药设计重点实验室, 上海 200237

* 联系人, E-mail: yuzhengzhao@ecust.edu.cn; yiyang@ecust.edu.cn

收稿日期: 2017-03-20; 接受日期: 2017-04-27; 网络版发表日期: 2017-05-13

国家重点基础研究发展计划(批准号: 2013CB531200)、国家自然科学基金(批准号: 91313301, 31225008, 31470833, 91649123, 31671484)、上海市科委项目(批准号: 14XD1401400, 16430723100, 15YF1402600)、111计划(批准号: B07023)、中国科协“青年人才托举工程”、上海市青年拔尖人才、高等学校博士学科点专项科研基金、生物反应器工程国家重点实验室和中央高校基本科研业务费资助

摘要 原位、高时空分辨地检测细胞内氧化还原代谢状态是生命科学研究的一个瓶颈问题和迫切需求。然而, 依赖细胞裂解、酶学、色谱、质谱等传统生化分析方法难以实时监测细胞内氧化还原代谢变化, 更难以应用于高通量药物筛选。基于荧光蛋白的探针成像是近年来生命科学和医学领域迅速发展的一种分析检测技术。由于这些荧光探针实现了在活细胞内实时、动态地监测生物学过程, 从而革命性地改变了生命科学研究。相对于化学小分子荧光探针, 遗传编码的荧光蛋白探针在精确定位亚细胞结构、消除人为干扰以及活体应用方面, 存在显著的优势。近年来, 科学家针对细胞内重要的氧化还原代谢物, 发明了多种多样的遗传编码荧光探针, 实现了在单细胞、亚细胞甚至活体内对氧化还原代谢状态的特异性检测和成像, 大大推动了相关研究领域的发展。本文将细胞内两对关键的氧化还原代谢分子NADH/NAD⁺和NADPH/NADP⁺为例, 重点介绍相关荧光探针的设计、性质、应用以及使用注意事项, 以方便研究者更好地了解和和使用相关技术。

关键词 氧化还原代谢, NADH/NAD⁺, NADPH/NADP⁺, 成像, 荧光蛋白, 遗传编码的荧光探针

氧化还原反应存在于所有生物体内, 这些反应不仅参与了生物体内众多的生命活动, 如生物大分子分解代谢和合成代谢、线粒体功能、钙稳态、氧化还原稳态、基因表达、离子通道、细胞周期、免疫反应、细胞增殖、分化、衰老和死亡等^[1-8], 也与癌症、糖尿病、肥胖症、心血管疾病、神经退行性疾病、

冠心病、老年痴呆、慢性损伤和炎症等多种疾病的发生和发展有密切关系^[6,8-12]。

根据氧化还原代谢物的性质, 可主要分为以下三类:

(1) 辅酶类, 主要包括烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide, NADH/NAD⁺) 和

引用格式: 赵玉政, 张卓, 杨弋. 监测细胞内氧化还原代谢状态的遗传编码荧光探针. 中国科学: 生命科学, 2017, 47: 508-521

Zhao Y Z, Zhang Z, Yang Y. Monitoring intracellular redox metabolism with genetically encoded fluorescent sensors. Sci Sin Vitae, 2017, 47: 508-521, doi: 10.1360/N052017-00086

烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH/NADP⁺). NADH/NAD⁺ 作为生物体内辅酶 I 和核心代谢物, 介导了糖酵解、三羧酸循环以及线粒体呼吸等能量代谢途径中的多数氧化还原反应^[13]. 因此, NADH/NAD⁺ 常被用作评价细胞内能量代谢状态的一个关键指标^[14]. NADPH 作为生物体内辅酶 II, 主要由磷酸戊糖途径产生. 此外, 苹果酸酶 ME1/3、异柠檬酸脱氢酶 IDH1/2、亚甲基四氢叶酸脱氢酶 MTHFD1/2 以及烟酰胺核苷酸转氢酶 NNT 催化的氧化还原反应也可产生 NADPH^[2,5,15]. NADPH 为细胞内谷胱甘肽 (glutathione, GSH/GSSG) 和硫氧还蛋白 (Trx/Trx-SS) 两大氧化还原体系以及生物大分子合成提供还原力^[2,16]. 因此, NADPH/NADP⁺ 常被用作评价细胞内氧化还原代谢状态的一个重要指标^[2,5].

长久以来, NADH/NAD⁺ 和 NADPH/NADP⁺ 的检测主要依赖细胞裂解的酶循环法、色谱法、电化学法、毛细管电泳法以及代谢物间接指示法. 然而, 这些方法不仅破坏了细胞或生物体的完整性, 也易在抽提过程中引入人为干扰. 为了在活细胞或活体水平评价细胞代谢活动, 研究者主要利用微弱的 NAD(P)H 自发荧光(激发: 340nm; 发射: 450nm)^[12,17]. 由于该信号绝大部分来自线粒体, 因此常被用来评价线粒体的功能^[12]. 细胞浆中 NAD(P)H 荧光信号通常只有线粒体的 1/5~1/4^[18,19], 且常混入线粒体信号部分, 使得更加难以测定. 此外, 由于 NADH 和 NADPH 具有相同的荧光光谱, 这种自发荧光分析方法更无法区分 NADH 和 NADPH 这两种生物学功能完全不同的代谢物^[12]. 最近 Blacker 等人^[20]报道, 利用荧光寿命成像技术 FLIM 可以区分结合形式的 NADH 和 NADPH, 但是该方式需要高端精密的仪器以及复杂的数学计算, 从技术上来讲不是简单的, 很难被大多数实验室采用, 这样开发原位、高时空分辨地检测 NADH/NAD⁺ 和 NADPH/NADP⁺ 代谢的方法显得尤为关键和迫切.

(2) 自由基类, 主要包括活性氧自由基(O₂⁻, ·OH 和 H₂O₂等)和活性氮自由基(NO和ONOO⁻等). 在静息状态下, 细胞内活性氧自由基主要由线粒体呼吸链电子泄漏产生^[21]. NO 主要由神经元细胞、血管内皮细胞和巨噬细胞产生^[22], 过氧亚硝基阴离子(ONOO⁻)是由 NO 和 O₂⁻ 进一步反应生成, 后者的生成可能是 NO 诱导病理损伤的重要环节.

为了实现在活细胞水平上自由基的检测, 科学家开发了多种多样的化学分子荧光探针, 如检测活性氧自由基的 H₂DCF-DA^[23] 以及检测 NO 的 DAF-2DA^[24] 等. 然而这些小分子探针存在易引入人为干扰、无法精确定位亚细胞结构以及活体应用受限等缺点.

(3) 巯基类, 主要包括 GSH/GSSG 和 Trx/Trx-SS 两大氧化还原体系^[25], 涉及的是巯基(-SH)的氧化还原代谢. 巯基作为蛋白质感受氧化还原变化最活跃的基团, 在体内可被氧化为二硫键(-SS-)、次磺酸(-SOH)、亚磺酸(-SO₂H)和磺酸(-SO₃H), 也可发生谷胱甘肽化(-SSG)和亚硝基化(-SNO)等多种修饰^[25,26]. 在这些氧化修饰形式中, 巯基/二硫键氧化还原转换是最主要的, 它们不仅维持着两大巯基氧化还原体系的运转, 也与许多蛋白质(酶、分子伴侣和转录因子)的结构、稳定性以及活性密切相关. 此外, 细胞膜表面以及分泌途径中的蛋白质活性很大程度上也依赖二硫键的形成^[27,28]. 针对巯基氧化还原代谢的检测, 目前主要依赖细胞抽提、非还原/还原对角线电泳以及化学标记等方法, 导致无法在原位准确获取巯基代谢信息^[29-32].

为了解决传统检测技术上的问题, 近些年来, 研究者开发了多种多样的遗传编码荧光蛋白探针, 实现了在单细胞和亚细胞水平实时、动态地监测生物学过程.

1 遗传编码的荧光蛋白探针

1.1 绿色荧光蛋白

绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)及其衍生物已经成为当今生命医学研究领域重要的研究工具之一, 已成功在病毒、细菌、酵母、植物和动物等多种生物体中表达, 被广泛用作报告基因测定蛋白质表达水平, 作为融合标签研究蛋白质定位、转运及构象变化, 发展荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)和双分子荧光互补技术(bimolecular fluorescence complementation, BiFC)测定蛋白质相互作用以及开发为各种各样的功能荧光探针检测细胞内微环境的变化等. 2008年, 日本科学家下村修、美国科学家马丁·查尔菲和钱永健由于在绿色荧光蛋白研究领域的卓越贡献共同分享了诺贝尔化学奖.

GFP 是 1962 年下村修等人从维多利亚多管水母

(*Aequorea victoria*)中分离提取的一个副产物,由238个氨基酸组成,分子量约为26.9 kD。在紫外光或蓝光的照射下发出绿色荧光,荧光光谱显示GFP在395和475nm分别有主要的和次要的激发峰,在508nm处为发射峰^[33]。GFP是由1个 α -螺旋和11个 β -片层组成,形成一个“桶”状结构,又称 β 桶,其中11个 β -片层环绕这个“桶”的四周, α -螺旋成对角线分布,这个 β 桶直径大约为24Å,高度为42Å(图1)^[33]。GFP的生色团为三肽基团(Ser⁶⁵-Tyr⁶⁶-Gly⁶⁷),位于 β 桶的中心,与 α -螺旋结构相连接,被严密的桶状结构保护着,以防被外界环境变化干扰淬灭,这也可能正是GFP荧光十分稳定的原因^[34]。

1995年,钱永健对野生型GFP完成首个重大改变——S65T,这个突变不仅极大地提高了GFP的荧光强度和光稳定性,也使主激发峰从395nm迁移至488nm,而发射峰保持不变。F64L的进一步突变则改善了GFP的折叠能力,产生了常用的增强型GFP(EGFP)。目前

已经发展了各种颜色的GFP突变体,依据发射波长不同大体上可分为7类:蓝色荧光蛋白(blue fluorescent protein, BFP)、青色荧光蛋白(cyan fluorescent protein, CFP)、绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)、黄色荧光蛋白(yellow fluorescent protein, YFP)、橙色荧光蛋白(orange fluorescent protein, OFP)、红色荧光蛋白(red fluorescent protein, RFP)和远红外荧光蛋白(far-red fluorescent protein, FRFP)。

值得注意的是,在荧光蛋白的突变体中有一种环形排列的荧光蛋白(circularly permuted fluorescent protein, cpFP)。在cpFP中,荧光蛋白原始的N端和C端通过一段多肽(GGTGG)连接,在荧光生色团(Ser⁶⁵-Tyr⁶⁶-Gly⁶⁷)附近产生新的N端和C端(图2)^[35]。这一改造不影响荧光蛋白的三维结构,但使得cpFP荧光易于感受外界环境的变化^[35],通过插入到不同的响应蛋白中,已发展成多种重要的荧光探针。

图1 GFP的二级(A)^[33]和三级结构(B)
黄色: β -片层; 红色: α -螺旋

图2 cpGFP构建模型示意图^[35]

1.2 荧光蛋白探针分类

依据信号测定方式不同, 荧光蛋白探针大体上可分为: 荧光强度型探针和荧光比率型探针. 荧光强度型探针顾名思义就是通过测定荧光蛋白的单个荧光通道获取信号, 这类型的探针在细胞和生物体检测时一般不能直接定量检测底物浓度的变化, 易受探针浓度或表达水平等因素的影响. 荧光比率型探针通过计算两个荧光通道的荧光比值消除了探针浓度的差异, 因此具备了绝对定量底物浓度的能力. 根据荧光信号检测方式不同, 荧光比率型探针又可分为“双激发单发射”的单荧光蛋白探针以及“单激发双发射”的FRET型双荧光蛋白探针.

2 遗传编码的氧化还原代谢荧光探针

为了能在原位、高时空分辨地检测细胞内氧化还原代谢状态, 研究者发展了多种多样的荧光蛋白探针. 这类探针由于是基因编码的, 因此可加上不同的信号肽特异性定位在不同亚细胞结构内, 也可构建转基因模式生物, 从而实现了在单细胞、亚细胞甚至活体水平实时动态地监测氧化还原代谢状态. 本文重点介绍近几年相继报道的NADH/NAD⁺和NADPH/NADP⁺荧

光蛋白探针, 以便于更多的研究者了解和使用相关技术.

2.1 NADH荧光探针Frex系列

长期以来研究者主要依赖微弱的NAD(P)H自发荧光评价细胞代谢活动和线粒体功能, 然而, 该方法存在信号弱、易造成紫外照射损伤、特异性差、空间分辨率低、需要复杂仪器及数学计算等缺点.

为了解决这一问题, 2011年, Zhao等人^[39]利用合成生物学技术, 将来自枯草芽孢杆菌中结合NADH的转录因子B-Rex与环化的黄色荧光蛋白(circularly permuted yellow fluorescent protein, cpYFP)融合(图3), 开发了一系列特异检测NADH的遗传编码荧光探针Frex, 解决了细胞代谢研究中一个关键技术瓶颈问题, 在国际上首次实现了在活细胞及各种亚细胞结构中对NADH分子的实时动态、特异性的检测与成像^[39].

Frex有高达800%的荧光动态范围, 在pH 7.4和pH 8.0条件下, 对NADH的解离常数(K_d)分别是~3.7和~11.0 $\mu\text{mol/L}$, 对NADH的检测范围是0.15~90 $\mu\text{mol/L}$ ^[13]. 值得注意的是, 生理NAD⁺的浓度也不干扰Frex对NADH的响应, 这说明Frex是一个真正

图3 遗传编码的NADH/NAD⁺荧光蛋白探针原理设计图^[36-38]

的NADH探针而非NADH/NAD⁺比率探针^[40]。此外, 一个具有更小K_d的NADH探针FrexH(K_d: ~40 μmol/L)以及更大K_d的NADH探针C3L194K(K_d: ~50 μmol/L, pH 8.0)也被报道(图3), 以分别辅助应用在NADH浓度极低的胞浆和细胞核以及NADH浓度高的线粒体中^[39]。

与其他基于cpYFP构建的荧光探针一样^[41~43], Frex也对生理pH环境十分敏感。cpYFP与Frex具有相似的pH敏感性, 在运用Frex时可以通过平行测定对照探针cpYFP, 消除pH的干扰^[13,38,39]。此外, 也可利用pH敏感的化学染料^[44]或红色的pH荧光蛋白探针^[45]进行pH校正。Frex系列探针的荧光比较弱, 这限制了它在高通量筛选或者比较难转染的细胞等条件下的应用。以上不足之处, 加上考虑到NAD⁺/NADH比率是一个比NADH更具有生理意义的氧化还原代谢指标, 这样开发性能更加优越的NAD⁺/NADH探针是必须的。

利用Frex系列的NADH探针, Zhao等人^[39,46,47]精确测定了哺乳动物细胞不同亚细胞结构内游离NADH的水平: 线粒体和胞浆中分别是~30和~0.13 μmol/L(图4A), 发现了NADH可以迅速跨膜进入细胞内(图4B), 实时动态地观测到了哺乳动物细胞内葡萄糖代谢、线粒体呼吸链功能、氧化还原调控条件下NADH代谢情况^[39]。基于大量实验数据, Zhao等人^[39]提出了胞浆中的NADH对细胞生理条件改变非常敏感, 而线粒体有很强的维持生理NADH稳态的观点。

2.2 NAD⁺/NADH比率荧光探针Peredox

在2011年10月*Cell Metabolism*报道Frex系列探针时, 也同期发表了Yellen研究组^[48]的一个检测NAD⁺/NADH氧化还原状态的荧光蛋白探针Peredox。

Peredox基于和Frex相似的原理, 将宝石蓝荧光蛋白突变体cpT-Sapphire插入到来自嗜热杆菌结合NADH的转录因子T-Rex两个亚单位之间构建而成(图3)。通过定点突变, 消除了探针的pH敏感性^[48], 利于在pH扰动比较大的环境下测定NAD⁺/NADH水平。

与Frex特异性测定NADH相比, Peredox测定的是NAD⁺/NADH比率的变化。然而在不同NAD⁺浓度下, 即使NAD⁺/NADH比率相同, Peredox的荧光响应也不同, 因此该探针不是一个严格意义上的NAD⁺/NADH比率探针。此外, Peredox对NADH亲和力太高(nmol/L量级), 在细胞内很容易饱和^[48]。不仅难以用在NADH浓度高的线粒体中, 也无法应用于其他NADH浓度高的生理或病理条件下, 如糖酵解旺盛的癌细胞。为了定量NAD⁺/NADH比率, 需要每次用丙酮酸(pyruvate)和乳酸(lactate)进行校准标定^[48]。与Frex相比, Peredox荧光动态范围仅有150%, 是一个强度依赖型的荧光探针^[48]。为了实现比率测定, 作者通过融合一个红色荧光蛋白mCherry实现(图3), 然而这不仅增加了探针自身的大小, 也易在细胞内表达时形成聚集体, 干扰探针荧光的测定^[48]。

利用Peredox-mCherry, Yellen研究组发现, 原代的星形胶质细胞(astrocyte)比神经元(neuron)有更低的NAD⁺/NADH比率, 暗示星形胶质细胞有更旺盛的糖酵解。通过高内涵成像, 该研究组^[48]也发现抑制PI3K途径导致了胞浆中NAD⁺/NADH比率上升。

2.3 NAD⁺/NADH比率荧光探针RexYFP

2013年, Belousov研究组^[49]通过将cpYFP插入到T-Rex的79位和80位残基之间构建了另外一个响应细

图4 哺乳动物细胞内NADH的亚细胞分布(A)及跨膜运输(B)^[39]

胞 NAD^+/NADH 比率的探针RexYFP(图3). RexYFP对 NADH 的 K_d 为 $\sim 0.18 \mu\text{mol/L}$, 适合胞浆和核内 NADH 代谢的检测. 与Frex相似, RexYFP也对pH非常敏感. 遗憾的是, RexYFP对 NADH 的荧光动态范围仅有50%, 远小于Frex的800%. 此外, RexYFP与Peredox一样, 也是一个强度依赖型的荧光探针^[49], 这样的荧光特性使得RexYFP在细胞应用时很难准确测定细胞内微弱的代谢变化. 利用RexYFP, 作者测定了糖酵解途径代谢物以及线粒体抑制剂对胞浆内和线粒体内 NAD^+/NADH 氧化还原状态的影响^[49].

2.4 NAD^+/NADH 比率荧光探针SoNar

先前报道的两个 NAD^+/NADH 比率探针Peredox和RexYFP存在诸多缺点, NADH 探针Frex在细胞内表达时荧光较弱, 这些问题都限制了它们的应用, 尤其是很难在细胞水平应用于高通量的药物或基因筛选. 为了解决以上问题, Zhao等人^[38]通过分子结构的理性设计和蛋白质工程方法, 将cpYFP插入到T-Rex单体, 并截去了T-Rex结合DNA的结构域(图3), 通过多轮筛选获得了一个可同时检测 NAD^+ , NADH 及其比率的第二代细胞代谢荧光探针SoNar.

与Peredox和Frex相比, SoNar蛋白不仅分子量更小^[40], 荧光强度更是大幅提高^[38]. 当 NAD^+/NADH 比率固定时, 不论 NAD^+ 或 NADH 的绝对浓度是多少, SoNar荧光变化完全取决于其比率, 因此它是目前报道的一个真正的 NAD^+/NADH 比率荧光探针. SoNar对 NAD^+ 的解离常数 K_d 为 $\sim 5.0 \mu\text{mol/L}$, 而已报道的Frex, Peredox和RexYFP均对 NAD^+ 不响应, 这样可以在蛋白质水平筛选依赖 NAD^+ 的相关代谢酶如SIRT, PARP或CD38的抑制剂或激活剂.

SoNar具有两个最大激发波长, 分别是418和500nm, 发射峰都位于518nm. 因此, SoNar是一个内源荧光比率型探针, 这不仅实现了荧光比率测定, 也避免了像Peredox融合其他荧光蛋白出现聚集体的问题. 当结合底物时, SoNar在两个荧光通道的变化相反, 呈现1500%的巨大动态变化, 这几乎是Peredox(150%)的10倍, Frex(800%)的2倍, 让它成为目前已报道的荧光变化最大的遗传编码探针之一. SoNar在活细胞中也有高达8倍的动态变化, 使得它就像火眼金睛一样, 可灵敏地测定非常细微的细胞代谢变化, 远远优于Frex, Peredox和RexYFP.

与Peredox相比, SoNar对底物兼具快速的结合和解离速率, 非常利于活细胞或活体内代谢状态的实时监测. 作为基于cpYFP发展的探针, SoNar在485nm通道对pH也是非常敏感的, 然而SoNar在420nm通道、最大动态范围以及对 NAD^+/NADH 比率的解离常数都是pH不敏感的^[13,38,40]. 这样当pH扰动发生时, 可以只用420nm一个通道测定^[13,38,40], 也可以像Peredox一样融合一个红色荧光蛋白实现不依赖pH变化的比率型测定^[48].

在活细胞水平, SoNar可以监测众多代谢途径扰动产生的 NAD^+/NADH 变化, 例如, 添加外源营养物 NADH , glucose, pyruvate和lactate, 以及抑制关键能量代谢途径如糖酵解、线粒体呼吸、三羧酸循环和 NADH 穿梭系统等^[13,38,40]. SoNar对 NAD^+/NADH 的解离常数 $K_{\text{NAD}^+/\text{NADH}}$ 约为40^[38], 远低于Peredox的330^[48], 使得它可以测定更高 NADH 水平的代谢状态. 利用SoNar, 研究发现癌细胞比正常细胞有更低的 NAD^+/NADH 比率, 暗示可能通过寻找增加 NAD^+/NADH 比率的化合物来杀伤癌细胞. 通过筛选5500多种小分子化合物, 发现了几百种调节细胞内代谢状态的活性化合物, 其中一个化合物KP372-1能够在低至100nmol/L的水平广谱地杀灭人体不同组织来源的癌细胞. 通过代谢组、化学遗传学功能筛选等技术, Zhao等人^[38]最终鉴定了一种结构新颖的NQO1底物KP372-1, 在癌细胞中特异高表达NQO1酶的催化下产生极度氧化应激, 进而杀灭癌细胞. 该化合物比目前已进入临床II期依赖NQO1的经典抗癌化合物 β -拉帕醌(β -lapachone)具有更高的口服利用度、更长的药物作用半衰期和更低的药效浓度.

相比Frex, Peredox和RexYFP, SoNar真正实现了在活细胞和活体动物水平对细胞代谢状态的高时空分辨检测和成像^[13]. 为了拓展SoNar在生命医学领域的应用, Zhao等人^[40]利用多维荧光显微镜系统, 建立了基于SoNar探针的单细胞动态检测和成像技术(图5A), 定量分析了不同组织来源的哺乳动物细胞中 NAD^+/NADH 比率; 利用多光谱活体荧光、发光、X-光成像系统, 建立了基于SoNar探针的活体动物成像技术(图5B). 针对悬浮和贴壁两种细胞类型, 建立并改进了先前药物筛选的方法, 大大提高了筛选效率, 60min之内即可评价380种化合物对细胞代谢的影响^[40].

为了研究体内微环境或代谢物等, 研究者报道了

图5 基于SoNar的单细胞(A)和活体动物(B)成像^[38]

多种多样的遗传编码荧光探针,然而真正能够在活体动物水平直接应用的寥寥无几, SoNar具有强烈的荧光,使得研究者能够利用荷瘤鼠模型,在活体水平直接观测到丙酮酸以及抗癌化合物KP372-1对体内肿瘤代谢的影响。

2.5 NAD⁺荧光探针ligA-cpVenus

NAD⁺作为NADH的氧化形式,一方面作为重要的电子载体参与了广泛的氧化还原反应,另一方面作为限制性底物调控包括SIRT家族、PARP和CD38等几类重要的酶活性^[3],这些酶与基因组完整性、表观遗传修饰以及多种重要信号转导途径相关,从而把细胞代谢与重要的生理活动如应激、进食、生物节律和衰老关联起来。此外,最近发现NAD⁺参与信使RNA的5'端修饰和稳定性调控^[50,51]。细胞内NAD⁺水平保持稳态^[52],但是也响应外部刺激,如运动^[53]、营养压力^[54-56]、昼夜节律^[55,57]。特别是NAD⁺的水平与机体衰老密切相关,在衰老过程中,NAD⁺水平在多种器官组织中显著下降^[54,58-61]。这样,发展一个遗传编码的NAD⁺探针对于研究生理和病理条件下的NAD⁺代谢有十分重要的意义。

2016年,Cambronne等人^[36]在*Science*报道了一个遗传编码的NAD⁺探针,该探针通过将环化的黄色荧光蛋白cpVenus插入到一种结合NAD⁺的细菌DNA连接酶构建而成(图3)。在蛋白质水平,NAD⁺探针的K_d大

约为65 μmol/L。然而,该探针动态范围非常小仅有50%左右,且易受pH等因素的影响^[36],使得很难解析细微的NAD⁺代谢差异,更难以应用于NAD⁺代谢失常引起的相关疾病的药物或基因筛选。

利用这个NAD⁺探针,该研究组定量了HEK293T细胞浆、细胞核和线粒体中游离的NAD⁺浓度,分别约为106, 109和230 μmol/L。考虑到胞浆和细胞核内消耗NAD⁺的代谢酶如SIRT1, SIRT2, PARP1和PARP2的K_m约为100 μmol/L^[3],以及线粒体中消耗NAD⁺的代谢酶如SIRT3的K_m约为250 μmol/L,这说明这些酶的活性可能被区室化的NAD⁺水平直接调节^[36]。值得注意的是,该研究组发现无论下调胞浆定位的NAD⁺合成途径中关键酶NMNAT2还是线粒体定位的NMNAT3表达水平,线粒体中NAD⁺均显著降低,这说明线粒体中NAD⁺来源多个代谢途径:(i) NMNAT3介导的NAD⁺合成途径;(ii) 胞浆中NAD⁺的直接跨膜运输到线粒体^[36]。目前NAD⁺的跨膜转运蛋白已经在细菌、酵母和植物中发现,但是在哺乳动物细胞中至今尚未报道^[36]。

2.6 NADP⁺荧光探针NADPsor

NADPH/NADP⁺作为生物体内另外一对重要的辅酶,直接参与调控胞内氧化还原状态以及脂类、氨基酸和核酸等生物大分子合成^[2,16]。碳同位素标记被广泛用于测定代谢流,2014年,两个研究组^[2,5]创新性地利用了氢标记的方法研究胞内NADPH代谢,然而该

方法还是基于液相色谱-质谱联用, 因此破坏了样本的完整性。

基于FRET原理, 2016年, Zhao等人^[62]报道了一种遗传编码的NADP⁺探针NADPsor。NADPsor通过将结合NADP⁺的KPR蛋白插入到FRET荧光蛋白对CFP/YFP之前构建而成^[62]。NADPsor对NADP⁺的亲合力太低(K_d : 2~4 mmol/L), 且仅有30%的动态范围^[62]。真核细胞内NADPH/NADP⁺比率约为20~100^[63-65], 而先前研究预测NADPH/NADH的比率约为4:1^[66], 考虑到胞浆中游离的NADH水平在100~700 nmol/L^[39] (基于NADH探针Frex的结果), 这样胞浆内NADP⁺的水平大约在0.14 μ mol/L以下, 这样也使得NADPsor很难在哺乳动物细胞中使用。

2.7 NADP⁺荧光探针Apollo-NADP⁺

2016年, Rocheleau研究组^[67]报道了一种新的NADP⁺遗传编码荧光探针Apollo-NADP⁺。Apollo-NADP⁺是葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(glucose 6-phosphatedehydrogenase, G6PD)和荧光蛋白的嵌合体, 基本原理是利用G6PD的同源二聚化, 诱导荧光蛋白在水平(parallel)和垂直方向(perpendicular)上的光学各向异性(anisotropy)比值变化, 从而实现NADP⁺测定^[67]。Apollo-NADP⁺的优势是可以选择融合不同颜色的荧光蛋白, 便于实现在单个细胞或其他生物学样本的多色成像^[67], 同时测定不同生物学指标。

需要注意的是, Apollo-NADP⁺的劣势也非常明显, 动态范围仅15%~20%。在细胞内表达时Apollo-NADP⁺也易受内源G6PD诱导的异源二聚化影响, 使得Apollo-NADP⁺的动态范围可能变得更小, 实际上当应用在细胞上观测到的最大变化也仅不足5%^[67]。由于该探针采用的是哺乳动物细胞内部已有的G6PD蛋白, 这样为了避免探针表达时对细胞内部功能的影响, 不得不做系统的突变来消除探针自身的G6PD酶催化活性。Apollo-NADP⁺的 K_d 与野生型的G6PD(K_d : 0.1~20 μ mol/L)相似, 作者已经测试了Apollo-NADP⁺在哺乳动物细胞胞浆中可以正常工作, 然而在另外两个非常重要的NADPH库: 线粒体和内质网中尚未得到验证^[67]。此外, Apollo-NADP⁺也并非严格测定NADP⁺, 例如, G6PD的乙酰化也被报道显著影响G6PD的同源二聚化^[68]。G6PD除了形成单体和二聚体外, 也可以形成四聚体和六聚体^[68], 这些因素都可能会干扰Apollo-NADP⁺探针的测定。考

虑到anisotropy测定需要高端精密的光学仪器以及复杂的数学计算^[67], 这使得它很难在实验室中普遍使用。

2.8 其他氧化还原探针

针对第二类代谢物, 即自由基类, 研究者相继报道了H₂O₂荧光蛋白探针HyPer^[41], HyPer2^[69], HyPer3^[70], HyPerRed^[71]以及Orp1-roGFP2^[72], 超氧阴离子(O₂⁻)荧光蛋白探针cpYFP^[21], 有机过氧化物荧光蛋白探针OHSer^[73], 一氧化氮(nitrogen monoxide, NO)荧光蛋白探针^[74]、过氧亚硝酸根(OONO⁻)荧光蛋白探针pnGFP^[75]等, 实现了在单细胞和亚细胞尺度对胞内活性氧和活性氮自由基的原位、实时动态的监测。

针对第三类的巯基类代谢物, 研究者也发展了多种多样的荧光蛋白探针, 包括rxYFP^[76], roGFP家族^[77-79], rxRFP^[80]以及特异性检测GSSG/GSH氧化还原状态的荧光蛋白探针Grx1-roGFP2^[81], 它们可以原位、实时地监测单细胞和亚细胞水平的巯基氧化还原状态。

3 使用中注意事项

在真核细胞内, NADH/NAD⁺和NADPH/NADP⁺的分布呈严格的区室化。本文以NADH/NAD⁺探针为例, 推荐亲合力高的SoNar, Peredox, RexYFP, FrexH以及LigA-cpVenus探针主要应用在胞浆和细胞核中, 而亲合力低的Frex和CL194K探针主要应用在线粒体中。目前两个NADP⁺探针仍存在诸多不足, 很难被广大实验室采用。

通常来讲, 相较于线粒体, 胞浆中pH受外界环境的影响较小, 一般不需要校正pH对探针的影响。当必须校正pH的影响时, 推荐做相应的pH对照平行实验, 如cpYFP。以SoNar为例, 计算pH校正的荧光比率($R_{pH校正}$)时, 可以采用如下公式: $R_{pH校正} = R_{SoNar} / R_{cpYFP}$, 其中 R_{SoNar} 和 R_{cpYFP} 分别代表表达SoNar和cpYFP样品的420/485 nm荧光比率($R_{420/485}$)^[40]。

当定量NADH/NAD⁺浓度变化时, 可以通过米氏方程进行计算, 利用荧光检测仪器, 在蛋白质水平标定探针的最大(R_{max})和最小(R_{min})荧光比率变化, 以SoNar为例, 代入以下方程: $[NAD^+]/[NADH] = K_d(R_{max} - R)/(R - R_{min})$, 其中 K_d 为探针的解离常数, R 为样品的420/485 nm荧光比率^[40]。

对于这些探针的测定, 需要使用配有特定激发和发射波长的仪器, 如多功能酶标仪、流式细胞仪、单光子或双光子荧光显微镜以及高内涵成像仪等. 如果进行高通量的化合物或基因筛选, 可以采用兼容96孔或384孔板的多功能酶标仪或高内涵成像仪. 对于荧光的测定, 可以采用贴壁和悬浮两种细胞状态测定. 对于成像介质的选择, 推荐荧光成像专用的玻璃底细胞培养皿或培养板, 厚度通常为0.13~0.17mm. 对于酶标板的选择, 推荐全黑的平底96孔板或384孔板. 对于化合物的高通量筛选, 可以利用自动化液体处理工作站先在384孔板上加入25 μL 化合物溶液, 然后再利用8通道电动排枪或自动化分液仪加入50 μL 细胞悬液, 在线震荡混匀后, 立即读取60 min内的时间动力学(图6). 注意在384孔板上设置不加化合物的对照、最大上调和下调NADH/NAD⁺变化的对照, 以便数据处理时, 均一化不同批次获得的数据.

受篇幅所限, 若想进一步了解探针在活细胞、活体动物以及高通量筛选实验方面的使用材料、使用仪器、实验流程以及注意细节等信息, 请参考Zhao等

人^[40]最近发表在*Nature Protocols*的文章.

4 总结与展望

为了检测细胞内的代谢物及其微环境, 过去的20年研究者相继报道了各种各样的荧光蛋白探针^[37,82-84], 然而真正能够应用于生命科学研究的不多, 一个重要的原因就是这些探针总是存在某些缺点, 如动态范围小、检测范围窄、荧光弱、响应慢等. 正如Tsien等人^[85]在*Nature*报道首个钙离子荧光蛋白探针, 近十几年以来, 科学家在*Science*和*Nature Methods*等国际顶级杂志不断报道更大动态范围^[86]、更高亮度^[87]、更快响应^[88]、更多颜色^[89]、适合活体内应用^[90]的钙离子探针, 以便更好地解析复杂的生物学问题. 因此, 开发一个快速响应、高特异性、高灵敏性、高亮度以及大动态范围的荧光蛋白探针一直是科学家们孜孜不倦的追求.

遗传编码的荧光探针实现了在单细胞水平、原位、实时、动态甚至定量分析细胞内氧化还原代谢状态. 针对NADH/NAD⁺的检测, SoNar探针的出现是对

图6 基于SoNar的高通量化合物筛选^[13]

本领域的实质性贡献,但仍需一个性能更加优越的NAD⁺荧光蛋白探针,结合现有的NADH探针Frex以及NADH/NAD⁺比率探针SoNar,可以实现NAD⁺, NADH及其比率3个关键代谢指标的高精度解析. 针对NADPH/NADP⁺的检测,目前仅有两个存在严重缺陷的NADP⁺探针, NADPH和NADPH/NADP⁺荧光蛋白探针更是技术空白,需要进一步的技术创新,拟从根本上解决此类问题.

代谢是生命的基本特征. 精确认识细胞内部代谢规律,对发现生命中的化学本质、发展生物工程技术、解析疾病分子机制、促进新药发现均具有重要意义. 在细胞内复杂的代谢网络中,有成千种代谢物,

而起核心作用的能量代谢如糖酵解、脂肪酸氧化、氨基酸代谢、三羧酸循环以及线粒体呼吸等,涉及上百种代谢物. 其中,几十个关键分子,分属磷酸类、羧酸类及电子载体等,它们不仅参与了广泛的代谢反应,是限速酶的底物或产物,还起到了调控代谢的作用,是可以表征细胞内代谢状态的信号分子. 在将来的研究中,需要逐步建立细胞关键代谢途径中的高性能代谢物荧光探针库,与色谱、质谱以及核磁等组学方法结合,可使细胞代谢监测实时、在线可视化、系统化,不仅对生命科学基础研究具有重要的科学价值,也对疾病医学诊疗以及相关药物的设计、筛选和发现具有指导意义.

参考文献

- 1 Titov D V, Cracan V, Goodman R P, et al. Complementation of mitochondrial electron transport chain by manipulation of the NAD⁺/NADH ratio. *Science*, 2016, 352: 231–235
- 2 Fan J, Ye J, Kamphorst J J, et al. Quantitative flux analysis reveals folate-dependent NADPH production. *Nature*, 2014, 510: 298–302
- 3 Cantó C, Menzies K J, Auwerx J. NAD⁺ metabolism and the control of energy homeostasis: a balancing act between mitochondria and the nucleus. *Cell Metab*, 2015, 22: 31–53
- 4 Zhang H, Ryu D, Wu Y, et al. NAD⁺ repletion improves mitochondrial and stem cell function and enhances life span in mice. *Science*, 2016, 352: 1436–1443
- 5 Lewis C A, Parker S J, Fiske B P, et al. Tracing compartmentalized NADPH metabolism in the cytosol and mitochondria of mammalian cells. *Mol Cell*, 2014, 55: 253–263
- 6 Ying W. NAD⁺/NADH and NADP⁺/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences. *Antioxid Redox Signal*, 2008, 10: 179–206
- 7 Ray P D, Huang B W, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal*, 2012, 24: 981–990
- 8 Trachootham D, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov*, 2009, 8: 579–591
- 9 Weinberg S E, Chandel N S. Targeting mitochondria metabolism for cancer therapy. *Nat Chem Biol*, 2014, 11: 9–15
- 10 Spitaler M M, Graier W F. Vascular targets of redox signalling in diabetes mellitus. *Diabetologia*, 2002, 45: 476–494
- 11 Zhang S, Liu X, Bawa-Khalife T, et al. Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nat Med*, 2012, 18: 1639–1642
- 12 Mayevsky A, Rogatsky G G. Mitochondrial function *in vivo* evaluated by NADH fluorescence: from animal models to human studies. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006, 292: C615–C640
- 13 Zhao Y, Yang Y. Real-time and high-throughput analysis of mitochondrial metabolic states in living cells using genetically encoded NAD⁺/NADH sensors. *Free Radical Biol Med*, 2016, 100: 43–52
- 14 Lin S J, Guarente L. Nicotinamide adenine dinucleotide, a metabolic regulator of transcription, longevity and disease. *Curr Opin Cell Biol*, 2003, 15: 241–246
- 15 Maddocks O D K, Labuschagne C F, Vousden K H. Localization of NADPH production: a wheel within a wheel. *Mol Cell*, 2014, 55: 158–160
- 16 Cairns R A, Harris I S, Mak T W. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11: 85–95
- 17 Kasischke K A, Vishwasrao H D, Fisher P J, et al. Neural activity triggers neuronal oxidative metabolism followed by astrocytic glycolysis. *Science*, 2004, 305: 99–103
- 18 Gao Q, Wolin M S. Effects of hypoxia on relationships between cytosolic and mitochondrial NAD(P)H redox and superoxide generation in coronary arterial smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008, 295: H978–H989
- 19 Patterson G H, Knobel S M, Arkhammar P, et al. Separation of the glucose-stimulated cytoplasmic and mitochondrial NAD(P)H responses in

- pancreatic islet beta cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 5203–5207
- 20 Blacker T S, Mann Z F, Gale J E, et al. Separating NADH and NADPH fluorescence in live cells and tissues using FLIM. *Nat Commun*, 2014, 5: 3936
- 21 Wang W, Fang H, Groom L, et al. Superoxide flashes in single mitochondria. *Cell*, 2008, 134: 279–290
- 22 Lim M H, Xu D, Lippard S J. Visualization of nitric oxide in living cells by a copper-based fluorescent probe. *Nat Chem Biol*, 2006, 2: 375–380
- 23 Nijmeh J, Moldobaeva A, Wagner E M. Role of ROS in ischemia-induced lung angiogenesis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2010, 299: L535–L541
- 24 Lepiller S, Laurens V, Bouchot A, et al. Imaging of nitric oxide in a living vertebrate using a diaminofluorescein probe. *Free Radical Biol Med*, 2007, 43: 619–627
- 25 Jones D P. Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2008, 295: C849–C868
- 26 Paulsen C E, Carroll K S. Orchestrating redox signaling networks through regulatory cysteine switches. *ACS Chem Biol*, 2010, 5: 47–62
- 27 Hansen R E, Roth D, Winther J R. Quantifying the global cellular thiol-disulfide status. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 422–427
- 28 Molteni S N, Fassio A, Ciriolo M R, et al. Glutathione limits Ero1-dependent oxidation in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 2004, 279: 32667–32673
- 29 Rahman I, Kode A, Biswas S K. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat Protoc*, 2007, 1: 3159–3165
- 30 Sommer A, Traut R R. Diagonal polyacrylamide-dodecyl sulfate gel electrophoresis for the identification of ribosomal proteins crosslinked with methyl-4-mercaptobutyrimide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1974, 71: 3946–3950
- 31 Yang Y, Song Y, Loscalzo J. Regulation of the protein disulfide proteome by mitochondria in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 10813–10817
- 32 Yang Y, Loscalzo J. S-nitrosoprotein formation and localization in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 117–122
- 33 Yang F, Moss L G, Phillips G N. The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat Biotechnol*, 1996, 14: 1246–1251
- 34 Zimmer M. Green fluorescent protein (GFP): applications, structure, and related photophysical behavior. *Chem Rev*, 2002, 102: 759–782
- 35 Baird G S, Zacharias D A, Tsien R Y. Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 11241–11246
- 36 Cambronne X A, Stewart M L, Kim D H, et al. Biosensor reveals multiple sources for mitochondrial NAD⁺. *Science*, 2016, 352: 1474–1477
- 37 Zhao Y, Yang Y. Profiling metabolic states with genetically encoded fluorescent biosensors for NADH. *Curr Opin Biotech*, 2015, 31: 86–92
- 38 Zhao Y, Hu Q, Cheng F, et al. SoNar, a highly responsive NAD⁺/NADH sensor, allows high-throughput metabolic screening of anti-tumor agents. *Cell Metab*, 2015, 21: 777–789
- 39 Zhao Y, Jin J, Hu Q, et al. Genetically encoded fluorescent sensors for intracellular NADH detection. *Cell Metab*, 2011, 14: 555–566
- 40 Zhao Y, Wang A, Zou Y, et al. *In vivo* monitoring of cellular energy metabolism using SoNar, a highly responsive sensor for NAD⁺/NADH redox state. *Nat Protoc*, 2016, 11: 1345–1359
- 41 Belousov V V, Fradkov A F, Lukyanov K A, et al. Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide. *Nat Meth*, 2006, 3: 281–286
- 42 Nagai T, Yamada S, Tominaga T, et al. Expanded dynamic range of fluorescent indicators for Ca²⁺ by circularly permuted yellow fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 10554–10559
- 43 Tarrago L, Péterfi Z, Lee B C, et al. Monitoring methionine sulfoxide with stereospecific mechanism-based fluorescent sensors. *Nat Chem Biol*, 2015, 11: 332–338
- 44 Berg J, Hung Y P, Yellen G. A genetically encoded fluorescent reporter of ATP:ADP ratio. *Nat Meth*, 2009, 6: 161–166
- 45 Tantama M, Hung Y P, Yellen G. Imaging intracellular pH in live cells with a genetically encoded red fluorescent protein sensor. *J Am Chem Soc*, 2011, 133: 10034–10037
- 46 Zhao Y, Yang Y, Loscalzo J. Real-time assessment of the metabolic profile of living cells with genetically encoded NADH sensors. *Methods Enzymol*, 2014, 542: 349–367
- 47 Zhao Y, Yang Y. Frex and FrexH: indicators of metabolic states in living cells. *Bioeng Bugs*, 2012, 3: 183–190
- 48 Hung Y P, Albeck J G, Tantama M, et al. Imaging cytosolic NADH-NAD⁺ redox state with a genetically encoded fluorescent biosensor. *Cell Metab*, 2011, 14: 545–554
- 49 Bilan D S, Matlashov M E, Gorokhovatsky A Y, et al. Genetically encoded fluorescent indicator for imaging NAD⁺/NADH ratio changes in different cellular compartments. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1840: 951–957
- 50 Chen Y G, Kowtoniuk W E, Agarwal I, et al. LC/MS analysis of cellular RNA reveals NAD-linked RNA. *Nat Chem Biol*, 2009, 5: 879–881

- 51 Cahová H, Winz M L, Höfer K, et al. NAD captureSeq indicates NAD as a bacterial cap for a subset of regulatory RNAs. *Nature*, 2014, 519: 374–377
- 52 Kaelin W G Jr, McKnight S L. Influence of metabolism on epigenetics and disease. *Cell*, 2013, 153: 56–69
- 53 Cantó C, Gerhart-Hines Z, Feige J N, et al. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature*, 2009, 458: 1056–1060
- 54 Yoshino J, Mills K F, Yoon M J, et al. Nicotinamide mononucleotide, a key NAD⁺ intermediate, treats the pathophysiology of diet- and age-induced diabetes in mice. *Cell Metab*, 2011, 14: 528–536
- 55 Nakahata Y, Sahar S, Astarita G, et al. Circadian control of the NAD⁺ salvage pathway by CLOCK-SIRT1. *Science*, 2009, 324: 654–657
- 56 Fulco M, Cen Y, Zhao P, et al. Glucose restriction inhibits skeletal myoblast differentiation by activating SIRT1 through AMPK-mediated regulation of Nampt. *Dev Cell*, 2008, 14: 661–673
- 57 Ramsey K M, Yoshino J, Brace C S, et al. Circadian clock feedback cycle through NAMPT-mediated NAD⁺ biosynthesis. *Science*, 2009, 324: 651–654
- 58 Mouchiroud L, Houtkooper R H, Moullan N, et al. The NAD⁺/Sirtuin pathway modulates longevity through activation of mitochondrial UPR and FOXO signaling. *Cell*, 2013, 154: 430–441
- 59 Gomes A P, Price N L, Ling A J Y, et al. Declining NAD⁺ induces a pseudohypoxic state disrupting nuclear-mitochondrial communication during aging. *Cell*, 2013, 155: 1624–1638
- 60 Khan N A, Auranen M, Paetau I, et al. Effective treatment of mitochondrial myopathy by nicotinamide riboside, a vitamin B3. *EMBO Mol Med*, 2014, 19: 721–731
- 61 Braidy N, Guillemin G J, Mansour H, et al. Age related changes in NAD⁺ metabolism oxidative stress and Sirt1 activity in wistar rats. *PLoS ONE*, 2011, 6: e19194
- 62 Zhao F L, Zhang C, Zhang C, et al. A genetically encoded biosensor for *in vitro* and *in vivo* detection of NADP⁺. *Biosens Bioelectron*, 2016, 77: 901–906
- 63 Zhang J, ten Pierick A, van Rossum H M, et al. Determination of the cytosolic NADPH/NADP ratio in *saccharomyces cerevisiae* using shikimate dehydrogenase as sensor reaction. *Sci Rep*, 2015, 5: 12846
- 64 Hedeskov C J, Capito K, Thams P. Cytosolic ratios of free [NADPH]/[NADP⁺] and [NADH]/[NAD⁺] in mouse pancreatic islets, and nutrient-induced insulin secretion. *Biochem J*, 1987, 241: 161–167
- 65 Veech R L, Eggleston L V, Krebs H A. The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate in the cytoplasm of rat liver. *Biochem J*, 1969, 115: 609–619
- 66 Zhang Q, Piston D W, Goodman R H. Regulation of corepressor function by nuclear NADH. *Science*, 2002, 295: 1895–1897
- 67 Cameron W D, Bui C V, Hutchinson A, et al. Apollo-NADP⁺: a spectrally tunable family of genetically encoded sensors for NADP⁺. *Nat Meth*, 2016, 13: 352–358
- 68 Wang Y P, Zhou L S, Zhao Y Z, et al. Regulation of G6PD acetylation by KAT9/SIRT2 modulates NADPH homeostasis and cell survival during oxidative stress. *EMBO J*, 2014, 33: 1304–1320
- 69 Markvicheva K N, Bilan D S, Mishina N M, et al. A genetically encoded sensor for H₂O₂ with expanded dynamic range. *Bioorg Med Chem*, 2011, 19: 1079–1084
- 70 Bilan D S, Pase L, Joosen L, et al. HyPer-3: a genetically encoded H₂O₂ probe with improved performance for ratiometric and fluorescence lifetime imaging. *ACS Chem Biol*, 2013, 8: 535–542
- 71 Ermakova Y G, Bilan D S, Matlashov M E, et al. Red fluorescent genetically encoded indicator for intracellular hydrogen peroxide. *Nat Commun*, 2014, 5: 5222
- 72 Albrecht S C, Barata A G, Grosshans J, et al. *In vivo* mapping of hydrogen peroxide and oxidized glutathione reveals chemical and regional specificity of redox homeostasis. *Cell Metab*, 2011, 14: 819–829
- 73 Zhao B S, Liang Y, Song Y, et al. A highly selective fluorescent probe for visualization of organic hydroperoxides in living cells. *J Am Chem Soc*, 2010, 132: 17065–17067
- 74 Eroglu E, Gottschalk B, Charoensin S, et al. Development of novel FP-based probes for live-cell imaging of nitric oxide dynamics. *Nat Commun*, 2016, 7: 10623
- 75 Chen Z, Ren W, Wright Q E, et al. Genetically encoded fluorescent probe for the selective detection of peroxynitrite. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 14940–14943
- 76 Ostergaard H, Henriksen A, Hansen F G, et al. Shedding light on disulfide bond formation: engineering a redox switch in green fluorescent protein. *EMBO J*, 2001, 20: 5853–5862

- 77 Hanson G T, Aggeler R, Oglesbee D, et al. Investigating mitochondrial redox potential with redox-sensitive green fluorescent protein indicators. *J Biol Chem*, 2004, 279: 13044–13053
- 78 Dooley C T, Dore T M, Hanson G T, et al. Imaging dynamic redox changes in mammalian cells with green fluorescent protein indicators. *J Biol Chem*, 2004, 279: 22284–22293
- 79 Lohman J R, Remington S J. Development of a family of redox-sensitive green fluorescent protein indicators for use in relatively oxidizing subcellular environments. *Biochemistry*, 2008, 47: 8678–8688
- 80 Fan Y, Chen Z, Ai H. Monitoring redox dynamics in living cells with a redox-sensitive red fluorescent protein. *Anal Chem*, 2015, 87: 2802–2810
- 81 Gutscher M, Pauleau A L, Marty L, et al. Real-time imaging of the intracellular glutathione redox potential. *Nat Meth*, 2008, 5: 553–559
- 82 Newman R H, Fosbrink M D, Zhang J. Genetically encodable fluorescent biosensors for tracking signaling dynamics in living cells. *Chem Rev*, 2011, 111: 3614–3666
- 83 Zhang C, Wei Z H, Ye B C. Imaging and tracing of intracellular metabolites utilizing genetically encoded fluorescent biosensors. *Biotech J*, 2013, 8: 1280–1291
- 84 Lukyanov K A, Belousov V V. Genetically encoded fluorescent redox sensors. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1840: 745–756
- 85 Tsien R Y, Miyawaki A, Llopis J, et al. Fluorescent indicators for Ca^{2+} based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature*, 1997, 388: 882–887
- 86 Su S, Phua S C, DeRose R, et al. Genetically encoded calcium indicator illuminates calcium dynamics in primary cilia. *Nat Meth*, 2013, 10: 1105–1107
- 87 Tian L, Hires S A, Mao T, et al. Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators. *Nat Meth*, 2009, 6: 875–881
- 88 Inoue M, Takeuchi A, Horigane S, et al. Rational design of a high-affinity, fast, red calcium indicator R-CaMP2. *Nat Meth*, 2014, 12: 64–70
- 89 Zhao Y, Araki S, Wu J, et al. An expanded palette of genetically encoded Ca^{2+} indicators. *Science*, 2011, 333: 1888–1891
- 90 Thestrup T, Litzlbauer J, Bartholomäus I, et al. Optimized ratiometric calcium sensors for functional *in vivo* imaging of neurons and T lymphocytes. *Nat Meth*, 2014, 11: 175–182

Monitoring intracellular redox metabolism with genetically encoded fluorescent sensors

ZHAO YuZheng^{1,2,3*}, ZHANG Zhuo¹ & YANG Yi^{1,2,3*}

¹ Synthetic Biology and Biotechnology Laboratory, Optogenetics & Molecular Imaging Interdisciplinary Research Center, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China;

² State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China;

³ Shanghai Key Laboratory of New Drug Design, School of Pharmacy, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

In-situ measurement of intracellular redox metabolism with high spatiotemporal resolution remains to be an obstacle in life science research. However, traditional methods including enzymatic assays, chromatography and mass spectrometry require cell lysis, therefore suffer from some defects in real-time detection of redox metabolism in living cells and are not suitable for high-throughput screen. Recently fluorescent imaging has become a powerful tool for biomedical research with the development of various genetically encoded fluorescent sensors as well as chemical probes. These approaches allow us to dynamically monitor biological processes in living cells, and have made revolutionary changes in life science research. Comparing with chemical probes, genetically encoded fluorescent sensors possess many advantages, including precise subcellular localization, minor artificial disturbance and high suitability for *in vivo* study. In the past decade, different types of genetically encoded fluorescent sensors have been developed to monitor redox metabolites, enabling imaging redox states at single-cell or sub-cellular resolution as well as *in vivo* and achieving exciting progresses in the research field of redox biology. In this review, taking NADH/NAD⁺ and NADPH/NADP⁺ biosensors for example, we will give a detailed description on the design, property, application and practical concerns of genetically encoded fluorescent sensors to better understand and apply these tools.

redox metabolism, NADH/NAD⁺, NADPH/NADP⁺, imaging, fluorescent protein, genetically encoded fluorescent sensors

doi: [10.1360/N052017-00086](https://doi.org/10.1360/N052017-00086)