

· 综 述 ·

橙色荧光蛋白的研究进展及其应用

彭稳¹, 何培民¹, 施定基^{1,2}, 贾睿¹

1 上海海洋大学 海洋生态与环境学院, 上海 201306

2 中国科学院植物研究所, 北京 100093

彭稳, 何培民, 施定基, 等. 橙色荧光蛋白的研究进展及其应用. 生物工程学报, 2020, 36(6): 1060–1068.

Peng W, He PM, Shi DJ, et al. Advances in the research and applications of orange fluorescent protein. Chin J Biotech, 2020, 36(6): 1060–1068.

摘要: 荧光蛋白 (Fluorescent protein, FPs) 可作为探针用以探究细胞内分子间相互作用, 追踪特定代谢物的代谢途径, 对活细胞内的各种代谢过程和细胞通路进行详细、准确的描述。目前已有的 FPs 几乎已经覆盖了从紫外光到远红外光的所有光谱波段, 这些 FPs 借助高分辨率显微技术应用于生命科学的诸多领域, 为生物学的发展作出巨大贡献。橙色 FPs 通常指光谱区间在 540–570 nm 的 FPs, 近几年来关于橙色 FPs 的研究进展较快, 并且其作为标记蛋白以及荧光共振能量转移技术 (Fluorescence resonance energy transfer, FRET) 中的荧光受体在生物学及医学领域得到较多的应用。文中综述了近 15 年橙色 FPs 领域的相关研究, 重点聚焦橙色 FPs 的发展和应用, 为今后橙色 FPs 的研究提供依据。

关键词: 橙色荧光蛋白, 标记蛋白, 荧光共振能量转移, 生物传感器

Advances in the research and applications of orange fluorescent protein

Wen Peng¹, Peimin He¹, Dingji Shi^{1,2}, and Rui Jia¹

1 College of Marine Ecology and Environment, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

2 Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China

Abstract: Fluorescent proteins can be used as probes to investigate intercellular molecular interactions and trace the pathway of specific metabolites, thus providing a detailed and accurate description of various metabolic processes and cellular pathways in living cells. Nowadays, the existing fluorescent proteins cover almost all spectral bands from ultraviolet to far-red. These fluorescent proteins have been applied in many fields of bioscience with the help of high-resolution microscopy, making great contributions to the development of biology. It is generally agreed that orange fluorescent proteins refer to the

Received: September 30, 2019; **Accepted:** December 4, 2019

Supported by: Shanghai Science and Technology Commission Innovation Project (No. 17391902200), Shanghai Agriculture Science and Technology Innovation Project (2017, No 1-13), National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2014AA093506).

Corresponding author: Rui Jia. Tel: +86-21-61900449; E-mail: rjia@shou.edu.cn

上海市科委创新项目 (No. 17391902200), 上海市农委科技兴农项目 (沪农科推字 (2017) 第 1-13 号), 国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2014AA093506) 资助。

fluorescent proteins at the spectral range of 540–570 nm. In recent years, researches on orange fluorescent proteins have made great progress, and they have been widely applied in the field of biology and medicine as reporter protein and fluorescence resonance energy transfer as fluorescent receptor. This paper reviews the studies in the field of orange fluorescent proteins over the last 15 years, with the special focus on the development and application of orange fluorescent proteins to provide the basis for the future studies.

Keywords: orange fluorescent protein, reporter protein, fluorescence resonance energy transfer, biosensor

细胞生物学的研究需要对活细胞内的各种代谢过程和细胞通路进行详细、准确的描述。各种荧光染料由于其毒性所以不能在活体细胞中很好地使用,而荧光蛋白 (Fluorescent protein, FPs) 可以在光谱成像中显示出明亮的荧光^[1],在活细胞、深层组织和全身的成像容易^[2],也就成为更好的替代品。随着荧光显微技术的进步,FPs可作为探针以跟踪细胞内分子间相互作用,追踪特定代谢产物的代谢途径,也可以结合到传感器中将细胞活动转化为生物信号^[3-4]。

1962年,下村修等在维多利亚管状水母 *Aequorea victoria* 体内首次分离得到绿色 FPs^[5]。此后绿色 FPs 在生物学领域得到了广泛运用,但是其发射光谱仅仅局限于 440–529 nm,细胞内成像背景较高,且不能解决皮下深层组织的成像问题^[6]。1999年,Matz等从印度洋-太平洋地区的珊瑚虫 (*Discosoma* sp.) 中分离并改进得到红色 FPs——DsRed^[7],但由于其四聚体的特性限制了其在生物技术领域中的应用^[8-9]。

近年来,蛋白质工程学已经成功地将天然荧光蛋白的激发光谱扩展到整个可见光波段甚至远红外波长,从而产生了一系列荧光蛋白^[10]。当使用 FPs 时,通常需要同时成像多个光谱通道的图像以分析多种生物活动,或在定量研究中使用一个荧光团作为参照^[11],所以丰富多样的荧光蛋白对生物学的推动作用显而易见。橙色荧光蛋白的出现使荧光蛋白家族的光谱范围进一步完善,它具有与常用的红色以及绿色荧光蛋白显著差异的发射波峰,使研究者在进行多荧光标记等实验时具有更多样的选择。同时它具有在显微镜下细胞自身荧光背景较暗、光散射较少、可用于

活体组织成像、发射波长较长等优势。因此,现在更多的研究集中在橙色 FPs 的开发中。

1 橙色荧光蛋白的种类及其特点

1.1 常规橙色荧光蛋白

目前报道的常规橙色 FPs 主要来源于两种亲本蛋白:Kusabira-Orange (KO)^[12]、DsRed^[13]。KO最初是从石质珊瑚 *Fungia concinna* 中分离出来的,通过在其 N 端引入 10 个氨基酸残基从而可为蛋白质提供明亮的橙色荧光^[12],KO 激发和发射峰分别为 548 nm 和 561 nm^[14]。但由于 KO 是四聚体结构,后来又通过引入另外 22 个氨基酸突变得到了一个单分子变体 mKO,其保持了原有的亮度和荧光特性,最大发射峰略有变化 (559 nm),分子量为 28.1 kDa^[14]。mKO 被进一步改进,产生两个亮度更高的变体 (mKO2^[15]和 mKOk^[16])。

DsRed 衍生物中橙色 FPs 最多,共有 8 种,Shaner 等在 DsRed 的单分子变体 mRFPI^[17]基础上改进得到了 mHoneydew、mBanana 和 mOrange^[18]。mOrange 的亮度比同为 DsRed 衍生物的 mCherry^[18]要高出 3 倍以上。虽然 mOrange 的亮度较高,但它对酸的敏感性也非常高,pKa 值为 6.5。mOrange 的高消光系数和高量子产率使其成为潜在的荧光共振能量转移技术 (Fluorescence resonance energy transfer, FRET) 受体。随后,Shaner 等又在 mOrange 的基础上,开发出 mOrange2^[19],其光稳定性是 mOrange 的 25 倍以上。此外,Strack 等通过改造 DsRed 获得一种低细胞毒性的四聚体红色 FPs——DsRed-Express 2^[9,20],并以此蛋白作为模板,在保留其低细胞毒性的基础上创造了橙色变体 E2-Orange。

1.2 具有特殊表型的荧光蛋白

此外, 还有一些具有独特表型的橙色 FPs, 具有大斯托克位移 (Large stoker shift, LSS) 的橙色 FPs 有两种: LSSmOrange^[21]以及亮度更高的 CyOFPI^[22], LSSmOrange 是在 mOrange 的基础上突变得到的变体, CyOFPI 是在 mNeptune2 的基础上定向突变得到, 具有激发光为绿色以及高亮度的特点。除此之外还有具有从橙色到远红色荧光态的光转化特性的 FPsPSmOrange 和 PSmOrange2^[23]。

另外, 在 FPs 发色团中还有一种被称为光敏剂的发色团, 这种发色团被光照射后能够产生活性氧 (ROS), 进而灭活目的蛋白, 即发色基团辅助光失活 (Chromophore-assisted light inactivation, CALI) 技术^[29-30], 对 DNA、蛋白质、脂肪等造成损伤, 影响细胞的代谢或增殖, 诱导细胞死亡^[31]。Sarkisyan 等报道了一种红色 FPsKillerRed 的橙色突变体 KillerOrange, 当其被蓝光或绿光照射时, 它会产生 ROS 从而杀伤细胞^[32], 所有荧光蛋白特性罗列在表 1 中。

表 1 橙色荧光蛋白及其特性

Table 1 Orange fluorescent protein and its characteristics

Fluorescent protein	Excitation maximum (nm)	Excitation maximum (nm)	Extinction coefficient per chain (L/(mol·cm))	Fluorescence quantum yield	Brightness of fully mature protein (% of EGFP)	Reference
EGFP*	489	5 300	5 300	0.60	1.00	[24]
KO	548	561	109 750	0.45	1.55	[12]
mKO	548	559	51 600	0.60	0.97	[12]
mKO2	551	565	63 800	0.57	1.14	[15]
mKOK	551	563	10 500	0.61	2.01	[16]
DsRed*	558	583	75 000	0.79	1.65	[13]
mHoneydew	504	562	17 000	0.12	0.06	[18]
mBanana	540	553	6 000	0.70	0.13	[18]
mOrange	548	562	71 000	0.70	1.54	[18]
mOrange2	549	565	58 000	0.60	1.09	[19]
LSSmOrange	437	572	52 000	0.45	0.74	[25]
CyOFPI	523	589	40 000	0.76	1.20	[23]
PSmOrange	548/636	565/662	113 300/32 700	0.51/0.28	1.82	[26]
PSmOrange2	546/619	561/651	51 000/18 900	0.61/0.38	0.98	[27]
DsRed-Express2*	554	591	35 600	0.42	0.47	[20]
E2-Orange	540	561	36 500	0.54	0.62	[28]

*EGFP, DsRed, DsRed-express2 are not orange FPs, only used as a control.

2 橙色荧光蛋白结构的研究

2.1 蛋白质结构

大部分橙色荧光蛋白具有相似的 β -桶状的结构。以 mKO 为例 (图 1), 11 个 β -折叠链组成 β -筒的外周结构, 筒两端分别被一些分子量较小的短 α -螺旋覆盖, 组成发色团的 3 个氨基酸残基与 α -螺旋共价相连, 位于圆筒中央螺旋中部。 β -圆筒与短 α -螺旋形成致密的结构域, 使配体不能扩散进入, 发色团被严格保护在筒内, 从而形成稳定的结构, 不易猝灭^[33]。

2.2 发色团的结构

通过研究, FPs 发色团自成熟和光诱导化学的基本原理已经相对清楚^[34]。FPs 的光谱特性是由其发色团的结构决定的, 橙色荧光蛋白的发色团由 3 个氨基酸残基组成, 后两个较为保守, 一般为酪氨酸和甘氨酸, 第一位的氨基酸变化最大, 也是此位氨基酸的侧链发生环化, 形成特殊的三环发色团结构, 从而扩展电子共轭体系为荧光蛋白提供橙色的荧光^[18]。



图1 mKO的三维结构^[33]

Fig. 1 Representation of the three-dimensional structure of mKO^[33].

mKO 和 KO 具有相同的发色团结构,发色团都由 C-Y-G 三肽组成(图 2A),Cys 发生环化形成第 3 个环,扩展了显色团共轭体系^[35]。DsRed 的发色团由 Q-Y-G 组成,连接发色团的咪唑啉酮环和前一位氨基酸残基的酰基亚胺基团扩展了共轭体系从而导致了红色的荧光,DsRed 中发色团的氨基酸残基的改变产生了 3 种橙色 FPs:mHoney-dew (M-W-G)、mBanana (C-Y-G) 和 mOrange (T-Y-G)。在 mOrange 中,位于 66 位的 Gln 被 Thr 取代,从而形成色团中第 3 个杂环(恶唑环),导致橙色的光谱特性(图 2B)^[7,34]。在 DsRed-Express2 的橙色衍生物 E2Orange 的设计中,将相同的 Q66T 突变体引入 DsRed-Express2 中,从而产生了橙色的激发和发射峰。值得一提的是 mHoneydew 的发色团的结构很特别,与其他 DsRed 衍生物不同,它的发色团中的 Tyr 被取代为 Trp(图 2C),但是这个特殊的结构并没有给它带来良好的荧光表现,它的荧光强度只有 DsRed 的 3%,包括同为衍生物的 mBanana,它们的特性都不是很良好,所以应用的实例也较少。

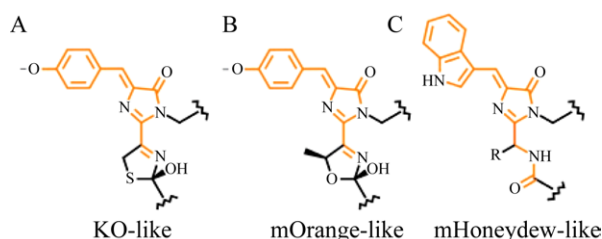


图2 橙色荧光蛋白的发色团结构^[36]

Fig. 2 The structure of the chromophore of the orange fluorescent protein^[36].

2.3 关键位点突变对二级结构的影响

LSSmOrange、PSmOrange 和 PSmOrange2 与亲本 mOrange 具有相同的显色团结构。它由对羟基苯基、咪唑啉酮和由 T66 侧链环化的 2-羟基二氢恶唑环组成。在 LSSmOrange 中,大斯托克位移的产生源于分子内部的激发态质子转移^[21],而包括 I161D、M163L 和 W143M 在内的关键突变对发色团周围环境造成显著影响从而为激发态质子转移的发生提供条件(图 3)。W143M 置换使 L165 侧链向蛋白的内部转移,W143M 和 M163L 均使发色团的结构趋向扁平,由这两个突变引起 S146 侧链构象的改变,从而使 S146 可以作为从发色团的对羟基苯环到 D161 的羧基之间激发态质子转移的中间传递体^[36]。与 LSSmOrange 不同,CyOFP1 的大斯托克位移源于 K160 与发色团的酚基团之间的氢键,激发态质子从发色团传递到 K160 的侧链从而完成激发态质子的转移^[22]。

在 PSmOrange 和 PSmOrange2 中,Q64L 突变对于其光转换特性至关重要。这种突变破坏了 64 位谷氨酰胺和 95 位精氨酸之间的氢键,Y99 侧链羧基与 I60 主链羰基形成新的水介导的氢键。这两种变化导致的蛋白质可以被氧化剂或光刺激,从而转化为远红外的发光状态(图 4)。光转换伴随着 65 位 Phe/Ile (PSmOrange/PSmOrange2) 上 Cα1-C 键的断裂,使畸变的显色团恢复,并将 2-羟基二氢恶唑氧 OH-基团转化为 C=O,使发色团共轭体系得到扩展。这是 PSmOrange 和 PSmOrange2 中大量(约 90 nm)荧光红移的主要原因。PSmOrange2

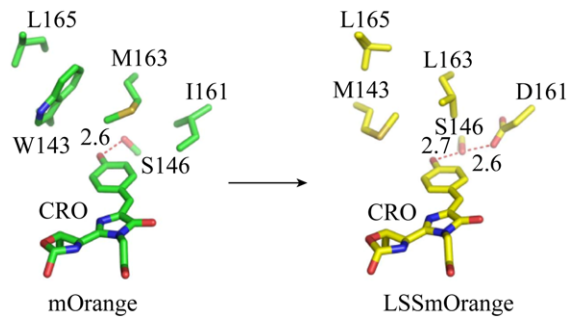


图3 mOrange 与 LSSmOrange 的结构差异^[36]

Fig. 3 The difference between mOrange and LSSmOrange^[36].

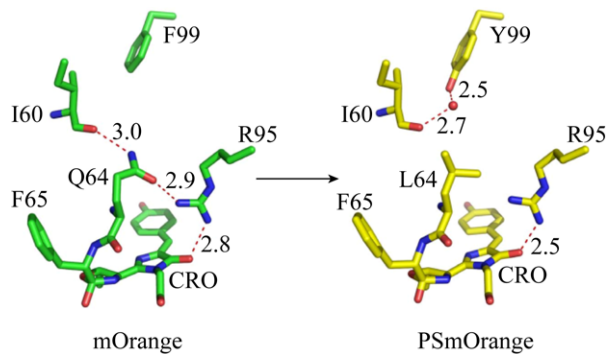


图4 mOrange 与 PSmOrange 的结构差异^[36]

Fig. 4 The difference between mOrange and PSmOrange^[36].

中 A217S 的取代使 215 位 Glu 向发色团靠近, 并使其与发色团形成氢键, 增加了发色团的极化和量子产率^[36]。

KillerOrange 以及 mKillerOrange 是 KillerRed 的突变体, 三肽结构为 Q-W-G, Trp 替换 KillerRed 发色团中的 Tyr, 在这两种 FPs 中, 发色团的第 66 位 Trp 与第 159 位 Gln 形成氢键, 以维持一种不寻常的反式-顺式结构。这种顺反式构象与沿着 β -桶轴从发色团延伸到筒体末端的充水通道是关键的结构特征, 这两者为两种光敏剂提供了明亮的橙色荧光和光毒性^[37]。

3 橙色荧光蛋白的应用

3.1 橙色荧光蛋白作为标记蛋白的应用

橙色荧光蛋白所在的发射光波段, 在某些特殊

细胞中可以有效避开细胞自身的背景荧光。除此之外, 橙色荧光在哺乳动物的深部组织成像优势巨大, 因为相关组织对橙光及红光的通透性较好。某些变体自身的优异特性也使其成为标记蛋白的良好选择, 比如大斯托克位移 FPs 在多荧光标记中的应用。

3.1.1 在微藻及植物中的应用

蓝藻作为可以用于生物燃料和化学合成应用的模式生物越来越受到关注^[38], 蓝藻自身携带大量的光合色素, 当对蓝藻进行荧光标记时, 这些光合色素会与 FPs 竞争吸收激发光源, 吸收 FPs 发射的荧光, 并且放出自身荧光信号干扰检测, 所以选择合适的标记蛋白对蓝藻的荧光标记至关重要。Ruffing 等选择 mOrange 作为标记蛋白, 探索其在 *Synechococcus* sp. PCC7002 中的标记性能, 结果显示可以在光谱图上区分转基因型和野生型蓝藻。这为使用 mOrange 作为蓝藻生物中的标记蛋白提供参考和依据^[39]。之前的研究也表明, 橙色和红色 FPs 适合莱茵衣藻 *Chlamydomonas reinhardtii*^[40] 的胞质表达。

除此之外, 橙色 FPs 也在植物中作为标记蛋白来使用。Mann 等将 mOrange 等 6 种 FPs 基因分别转入烟草和拟南芥中进行表达。结果显示橙色荧光蛋白可以用于植物转化^[41]。在豆科植物中, 过多的根瘤形成会抑制植物生长。植物激素脱落酸 (ABA) 可以抑制根瘤的形成, *ljglu1* 基因是一种 ABA 反应基因。Osuki 使用 mOrange 标记 LjGlu1 蛋白, 从而观察其在根组织和结节中的定位^[42], 表明 LjGlu1 的表达是植物自身对根瘤菌感染作出的应激反应, 并在根组织外发挥作用, 从而抑制感染。发动蛋白和网格蛋白参与植物包膜囊泡的形成, Fujimoto 等用 GFP 和 mKO 分别标记参与其中的发动蛋白以及网格蛋白, 根据它们的聚集状况从而观察它们在植物内吞过程中的分子机制^[43]。

3.1.2 在哺乳动物细胞中的应用

II 型糖尿病是一种非胰岛素依赖型糖尿病, 葡

葡萄糖转运体 4 (GLUT4) 是将葡萄糖转运入细胞的主要蛋白之一, 是治疗 II 型糖尿病的靶点, 其广泛分布于骨骼肌、心肌、脂肪组织、肾脏和大脑^[44]。Zhao 等通过构建融合表达 mOrange 和 GLUT4 的细胞株系, 从而观察细胞内 GLUT4 动态变化及其与质膜融合状况^[45]。在鸟类和哺乳动物的皮肤色素沉着过程中, 黑色素在黑素细胞中合成, 然后转移到邻近的角质形成细胞中, 使含有黑色素的细胞覆盖全身。Murai 等用 EGFP 和 mOrange 分别标记黑素细胞以及角质形成细胞, 探索两种细胞间的相互作用^[46], 以了解细胞间相互作用机制以及体内皮肤色素沉着规律。

值得一提的是, CyOFP1 的激发光为绿色, 发射光为橙色, 其开发者 Chu 等^[22]利用这一特性, 将其与绿色荧光蛋白分别标记到黑素瘤细胞的不同部位, 从而通过单一的激发光源同时观察两个光通路的蛋白标记状况, 这节省了布置双激光发射器的成本。

3.1.3 在病毒中的应用

Etienne 等将包括 mOrange 在内的多种 FPs 融合到单纯疱疹病毒 1 型 (HSV-1) 菌株的小衣壳蛋白 (VP26) 上, 并且进入人黑色素瘤细胞进行扩增, 从而探究病毒在体内的感染机制^[47]。Chen 等在竹花叶病毒 (BaMV) 感染宿主的过程中发现了一个上调的基因, 该基因编码的蛋白包括一个环状结构与一个跨膜结构域, 该蛋白可能具有泛素 E3 连接酶的功能, 并将其命名为泛素 E3 连接酶 (NbUbe3R1)。实验者将其与橙色 FPs 融合表达, 进一步研究 NbUbe3R1 在 BaMV 积累中的功能作用^[48]。

3.2 橙色荧光蛋白在 FRET 技术中的应用

基于荧光寿命成像显微镜 (FLIM) 的荧光共振能量转移 (FRET) 测量正越来越多地用于探索生命系统中的分子构象和分子间相互作用。在适当位置的受体存在的情况下, 可以根据供体荧光团的兴奋状态时间的缩短来判断其标记的蛋白

质之间的分子构象。传统的青色 FPs 由于其耐光性差、低量子产量等缺点在荧光共振成像中的应用还达不到理想的效果^[49], mOrange、mKO 等由于其较高的消光系数和量子产率使其具有成为 FRET 受体的潜力, 有望成为优秀的 FRET。近几年来使用 mOrange 作为荧光受体的研究越来越多, 为研究细胞内生物大分子相互作用以及探究生命过程提供有效工具。

Ke 等通过将 mOrange 连接到哈氏弧菌荧光酶素 α 亚基的 N 端, 从而使该融合蛋白获得了新的 560 nm 的发射峰。这为通过将荧光酶素与其他合适的 FPs 或发色团共价结合来改变细菌的生物发光颜色提供思路^[50]。De 等开发一种结合 mOrange 和荧光酶素的自发光融合蛋白 (BRET3), 新的融合蛋白在光强上提升了几倍, 且能解决体内荧光成像等相关问题^[51]。这两种应用都是将荧光酶素与 FPs 结合使用, 利用荧光酶素本身利用生物底物发光的性质以及橙色 FPs 的高消光系数和高量子产率的优势进行创新的荧光标记手段, 具有巨大的应用前景, 可以为后人的实验设计提供新的思路。

植物依靠肌动蛋白细胞骨架来驱动基本的细胞活动, 这对它们的正常生长和发育至关重要, 包括与细胞分裂、细胞膨胀和膜重构等相关的生命活动^[52]。Bayle 等报道了在完整植物细胞中使用绿色 FPs 突变体 TSapphire 作为 mOrange 的荧光供体的应用。嵌合连接的 TSapphire 和 mOrange 之间发生大量的能量转移, 导致 TSapphire 荧光寿命缩短。并且验证了该系统在不同的亚细胞中的通用性^[49]。

视网膜鸟苷酰基环化酶激活蛋白 (GCAPs) 可以调节人类的视觉光反应。Peshenko 等对整个 GCAP1 蛋白表面残基进行诱导突变, 并用 mOrange 标记, 在细胞基础上测试每个突变体与 GFP 标记的视网膜鸟苷酰基环化酶的体外结合以及激活能力, 从而探索 GCAPs 与其靶酶相互作用的关键位点^[53]。研究发现 Orai1 蛋白以及 STIM1

蛋白构建的 Ca^{2+} 储存通道在 Ca^{2+} 进入及信号传递中发挥重要作用^[54]。Huang 等用 EGFP 标记 Orai1 作为荧光供体, mOrange 标记 STIM1 作为荧光受体在大鼠神经细胞中表达, 探索两者之间的相互作用^[55]。肌动蛋白细胞骨架参与多种生物过程, 包括 T 细胞活化^[56]。Larbret 等将 EGFP 和 mOrange 分别融合到 T 细胞株的肌动蛋白上, 当游离的 G 肌动蛋白互相连接组成 F 肌动蛋白时, 靠近的 EGFP 和 mOrange 之间发生能量转移, 从而观测活细胞中 G 肌动蛋白和 F 肌动蛋白之间的动态平衡^[57]。Goedhart 等构建 mKO-mCherry FRET 受体供体对, 用于检测活细胞中 NF- κ B 转录因子复合物亚族 p65 的同源二聚化, 具有比 CFP-YFP 受体供体对更高的 FRET 效率^[1]。表明在单个活细胞中, 基于红色 FPs 的 FRET 方法更适合于检测蛋白质之间的相互作用。

4 总结与展望

本文主要介绍了橙色 FPs 的研究和发展, 以及其在蛋白标记、FRET、生物传感器等方面的运用。随着对 FPs 晶体结构研究的深入, 人们大大提高了对于荧光发色团的认识。通过对一些优秀突变体的结构分析, 我们了解了一些能够引起 FPs 性质改变的关键位点。结合目前现有的橙色 FPs 以及待发现的野生型橙色 FPs, 相信可以设计和研发出更多可应用的突变体。现有的常规橙色 FPs 如 mOrange、mKO 具有较高的消光性质和量子产率, 在 FRET 中有巨大的应用前景。除此之外还有很多创新的应用, 比如 FPs 与生物荧光酶素的融合表达也趋于流行, 以及大斯托克位移的 FPs 如 CyOFP1 在多荧光标记中的应用。有理由相信, 橙色 FPs 将会与众多 FPs 一起在未来的生物学研究中起到重要作用。

REFERENCES

- [1] Okumoto S. Imaging approach for monitoring cellular metabolites and ions using genetically encoded biosensors. *Curr Opin Biotechnol*, 2010, 21(1): 45–54.
- [2] Kremers GJ, Gilbert SG, Cranfill PJ, et al. Fluorescent proteins at a glance. *J Cell Sci*, 2011, 124(15): 2676.
- [3] Zhang J, Campbell RE, Ting AY, et al. Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3(12): 906–918.
- [4] van Roessel P, Brand AH. Imaging into the future: visualizing gene expression and protein interactions with fluorescent proteins. *Nat Cell Biol*, 2002, 4(1): E15–E20.
- [5] Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol*, 1962, 59(3): 223–239.
- [6] Wang F, Yang HT, Wang ZF. Research progress on red fluorescent protein. *Biotechnol Bull*, 2017, 33(9): 32–47 (in Chinese).
王飞, 杨海涛, 王泽方. 红色荧光蛋白的研究进展. *生物技术通报*, 2017, 33(9): 32–47.
- [7] Matz MV. Erratum: fluorescent proteins from nonbioluminescent *Anthozoa* species. *Nat Biotechnol*, 1999, 17(12): 1227.
- [8] Tao W, Evans BG, Yao J, et al. Enhanced green fluorescent protein is a nearly ideal long-term expression tracer for hematopoietic stem cells, whereas DsRed-Express fluorescent protein is not. *Stem Cells*, 2007, 25(3): 670–678.
- [9] Strack RL, Strongin DE, Bhattacharyya D, et al. A noncytotoxic DsRed variant for whole-cell labeling. *Nat Methods*, 2008, 5(11): 955–957.
- [10] Ng HL, Lin MZ. Structure-guided wavelength tuning in far-red fluorescent proteins. *Curr Opin Struct Biol*, 2016, 39: 124–133.
- [11] Depry C, Mehta S, Zhang J. Multiplexed visualization of dynamic signaling networks using genetically encoded fluorescent protein-based biosensors. *Pflugers Archiv-Eur J Physiol*, 2013, 465(3): 373–381.
- [12] Karasawa S, Araki T, Nagai T, et al. Cyan-emitting and orange-emitting fluorescent proteins as a donor/acceptor pair for fluorescence resonance energy transfer. *Biochem J*, 2004, 381(1): 307–312.
- [13] Yarbrough D, Wachter RM, Kallio K, et al. Remington SJ. Refined crystal structure of DsRed, a

- red fluorescent protein from coral, at 2.0-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(2): 462–467.
- [14] Merzlyak EM, Goedhart J, Shcherbo D, et al. Bright monomeric red fluorescent protein with an extended fluorescence lifetime. *Nat Methods*, 2007, 4(7): 555–557.
- [15] Sakaue-Sawano A, Kurokawa H, Morimura T, et al. Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression. *Cell*, 2008, 132(3): 487–498.
- [16] Tsutsui H, Karasawa S, Okamura Y, et al. Improving membrane voltage measurements using FRET with new fluorescent proteins. *Nat Methods*, 2008, 5(8): 683–685.
- [17] Campbell RE, Tour O, Palmer AE, et al. A monomeric red fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(12): 7877–7882.
- [18] Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, et al. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol*, 2004, 22(12): 1567–1572.
- [19] Shaner NC, Lin MZ, McKeown MR, et al. Improving the photostability of bright monomeric orange and red fluorescent proteins. *Nat Methods*, 2008, 5(6): 545–551.
- [20] Strack RL, Hein B, Bhattacharyya D, et al. A rapidly maturing far-red derivative of dsred-express2 for whole-cell labeling. *Biochemistry*, 2009, 48(35): 8279–8281.
- [21] Shcherbakova DM, Hink MA, Joosen L, et al. An orange fluorescent protein with a large stokes shift for single-excitation multicolor FCCS and FRET imaging. *J Am Chem Soc*, 2012, 134(18): 7913–7923.
- [22] Chu J, Oh YH, Sens A, et al. A bright cyan-excitable orange fluorescent protein facilitates dual-emission microscopy and enhances bioluminescence imaging *in vivo*. *Nat Biotechnol*, 2016, 34(7): 760–767.
- [23] Subach OM, Patterson GH, Ting LM, et al. A photoswitchable orange-to-far-red fluorescent protein, PSmOrange. *Nat Methods*, 2011, 8(9): 771–777.
- [24] Patterson GH, Knobel SM, Sharif WD, et al. Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy. *Biophys J*, 1997, 73(5): 2782–2790.
- [25] Kennis JTM, van Stokkum IHM, Peterson DS, et al. Ultrafast proton shuttling in psammocora cyan fluorescent protein. *J Phys Chem B*, 2013, 117(38): 11134–11143.
- [26] Griswold SL, Sajja KC, Jang CW, et al. Generation and characterization of *iUBC-KikGR* photoconvertible transgenic mice for live time lapse imaging during development. *Genesis*, 2011, 49(7): 591–598.
- [27] Tsuboi T, Kitaguchi T, Karasawa S, et al. Age-dependent preferential dense-core vesicle exocytosis in neuroendocrine cells revealed by newly developed monomeric fluorescent timer protein. *Mol Biol Cell*, 2010, 21(1): 87–94.
- [28] Strack RL, Bhattacharyya D, Glick BS, et al. Noncytotoxic orange and red/green derivatives of DsRed-Express2 for whole-cell labeling. *BMC Biotechnol*, 2009, 9: 32.
- [29] Bulina ME, Chudakov DM, Britanova OV, et al. A genetically encoded photosensitizer. *Nat Biotechnol*, 2006, 24(1): 95–99.
- [30] Bulina ME, Lukyanov KA, Britanova OV, et al. Chromophore-assisted light inactivation (CALI) using the phototoxic fluorescent protein KillerRed. *Nat Protocols*, 2006, 1(2): 947–953.
- [31] Rao PP, Wang X. The research progress of KillerRed in optogenetics. *Chin J Cardiac Pac Electrophysiol*, 2017, 31(4): 283–286 (in Chinese).
饶盼盼, 王晞. KillerRed 在光遗传学中的研究进展. *中国心脏起搏与心电生理杂志*, 2017, 31(4): 283–286.
- [32] Sarkisyan KS, Zlobovskaya OA, Gorbachev DA, et al. KillerOrange, a genetically encoded photosensitizer activated by blue and green light. *PLoS ONE*, 2015, 10(12): e0145287.
- [33] Ausili A, Staiano M, Marabotti A, et al. Correlation between fluorescence and structure in the orange-emitting GFP-like protein, monomeric Kusabira Orange. *J Photochem Photobiol B Biol*, 2014, 138: 223–229.
- [34] Subach OM, Malashkevich VN, Zencheck WD, et al. Structural characterization of acylimine-containing blue and red chromophores in mTagBFP and TagRFP fluorescent proteins. *Chem Biol*, 2010, 17(4): 333–341.
- [35] Kikuchi A, Fukumura E, Karasawa S, et al. Structural characterization of a thiazoline-containing chromophore in an orange fluorescent protein, monomeric kusabira orange. *Biochemistry*, 2008, 47(44): 11573–11580.

- [36] Pletnev S, Shcherbakova DM, Subach OM, et al. Orange fluorescent proteins: structural studies of LSSmOrange, PSmOrange and PSmOrange2. *PLoS ONE*, 2014, 9(6): e99136.
- [37] Pletneva NV, Pletnev VZ, Sarkisyan KS, et al. Crystal structure of phototoxic orange fluorescent proteins with a tryptophan-based chromophore. *PLoS ONE*, 2015, 10(12): e0145740.
- [38] Angermayr SA, Paszota M, Hellingwerf KJ. Engineering a cyanobacterial cell factory for production of lactic acid. *Appl Environ Microbiol*, 2012, 78(19): 7098–7106.
- [39] Ruffing AM, Jensen TJ, Strickland LM. Genetic tools for advancement of *Synechococcus* sp. PCC 7002 as a cyanobacterial chassis. *Microb Cell Factor*, 2016, 15: 190.
- [40] Rasala BA, Barrera DJ, Ng J, et al. Expanding the spectral palette of fluorescent proteins for the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J*, 2013, 74(4): 545–556.
- [41] Mann DGJ, Abercrombie LL, Rudis MR, et al. Very bright orange fluorescent plants: endoplasmic reticulum targeting of orange fluorescent proteins as visual reporters in transgenic plants. *BMC Biotechnol*, 2012, 12: 17.
- [42] Osuki KI, Hashimoto S, Suzuki A, et al. Gene expression and localization of a β -1,3-glucanase of *Lotus japonicus*. *J Plant Res*, 2016, 129(4): 749–758.
- [43] Fujimoto M, Arimura SI, Ueda T, et al. *Arabidopsis* dynamin-related proteins DRP2B and DRP1A participate together in clathrin-coated vesicle formation during endocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(13): 6094–6099.
- [44] Kotani K, Peroni OD, Minokoshi Y, et al. GLUT4 glucose transporter deficiency increases hepatic lipid production and peripheral lipid utilization. *J Clin Invest*, 2004, 114(11): 1666–1675.
- [45] Zhao P, Ming Q, Xiong MR, et al. Dandelion chloroform extract promotes glucose uptake via the AMPK/GLUT4 pathway in L6 cells. *Evid-Based Complement Alternat Med*, 2018, 2018: 1709587.
- [46] Murai H, Tadokoro R, Sakai KI, et al. *In ovor* gene manipulation of melanocytes and their adjacent keratinocytes during skin pigmentation of chicken embryos. *Dev Growth Differ*, 2015, 57(3): 232–241.
- [47] Etienne L, Joshi P, Dingle L, et al. Visualization of herpes simplex virus type 1 virions using fluorescent colors. *J Virol Methods*, 2017, 241: 46–51.
- [48] Chen IH, Chang JE, Wu CY, et al. An E3 ubiquitin ligase from *Nicotiana benthamiana* targets the replicase of Bamboo mosaic virus and restricts its replication. *Mol Plant Pathol*, 2019, 20(5): 673–684.
- [49] Bayle V, Nussaume L, Bhat RA. Combination of novel green fluorescent protein mutant TSapphire and DsRed variant mOrange to set up a versatile in planta FRET-FLIM assay. *Plant Physiol*, 2008, 148(1): 51–60.
- [50] Ke DC, Tu SC. Activities, kinetics and emission spectra of bacterial luciferase-fluorescent protein fusion enzymes. *Photochem Photobiol*, 2011, 87(6): 1346–1353.
- [51] De A, Ray P, Loening AM, et al. BRET3: a red-shifted bioluminescence resonance energy transfer (BRET)-based integrated platform for imaging protein-protein interactions from single live cells and living animals. *FASEB J*, 2009, 23(8): 2702–2709.
- [52] Hussey PJ, Ketelaar T, Deeks MJ. Control of the actin cytoskeleton in plant cell growth. *Ann Rev Plant Biol*, 2006, 57: 109–125.
- [53] Peshenko IV, Olshevskaya EV, Lim S, et al. Identification of target binding site in photoreceptor Guanylyl Cyclase-Activating Protein 1 (GCAP1). *J Biol Chem*, 2014, 289(14): 10140–10154.
- [54] Liou J, Kim ML, Heo WD, et al. STIM is a Ca^{2+} sensor essential for Ca^{2+} -store-depletion-triggered Ca^{2+} influx. *Curr Biol*, 2005, 15(13): 1235–1241.
- [55] Huang PC, Chiu TY, Wang LC, et al. Visualization of the orai1 homodimer and the functional coupling of orai1-STIM1 by live-cell fluorescence lifetime imaging. *Microsc Microanal*, 2010, 16(3): 313–326.
- [56] Samstag Y, Eibert SM, Klemke M, et al. Actin cytoskeletal dynamics in T lymphocyte activation and migration. *J Leukocyte Biol*, 2003, 73(1): 30–48.
- [57] Larbret F, Dubois N, Brau F, et al. Technical advance: Actin CytoFRET, a novel FRET flow cytometry method for detection of actin dynamics in resting and activated T cell. *J Leukoc Biol*, 2013, 94(3): 531–539.
- [58] Goedhart J, Vermeer JEM, Adjobo-Hermans MJW, et al. Sensitive detection of p65 homodimers using red-shifted and fluorescent protein-based FRET couples. *PLoS ONE*, 2007, 2(10): e1011.

(本文责编 陈宏宇)