

基于荧光蛋白的生物探针设计策略及其应用

张宁^{1,2}, 田烨^{1,2}

1. 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100101

2. 中国科学院大学, 北京 100093

摘要: 荧光蛋白的发现为细胞生物学研究带来了革命性进展。通过将荧光蛋白与目标蛋白融合, 构建荧光生物探针, 可以在活细胞和生物体内实时监测细胞事件的动态变化。荧光蛋白的独特理化特性, 如光谱范围、发色团成熟速度、pH 敏感性和稳定性等, 为探针的设计提供了多样化的选择。基于这些特性, 研究者开发了用于监测不同分子事件的多种荧光生物探针。本文系统总结了荧光蛋白探针设计的主要策略及其在生物学研究中的典型应用, 为开发更高效、更专用的新型荧光生物探针以应对复杂生物学问题提供了参考。

关键词: 荧光蛋白; 荧光生物探针; 荧光时钟; 循环重排荧光蛋白; 双分子荧光互补; 二聚化依赖荧光蛋白; 荧光共振能量转移; 光激活; 光转换; 光开关

Design strategies and applications of fluorescent protein-based probes

Ning Zhang^{1,2}, Ye Tian^{1,2}

1. Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China

Abstract: The discovery of fluorescent proteins has revolutionized cell biology research. By fusing fluorescent proteins with target proteins, fluorescent biosensors can be constructed to enable real-time monitoring of dynamic cellular events in live cells and organisms. The unique physicochemical properties of fluorescent proteins, such as spectral range, chromophore maturation speed, pH sensitivity, and stability, offer diverse options for probe design. Researchers have developed various fluorescent biosensors based on these properties to monitor distinct molecular events. This review systematically summarizes the main strategies for designing fluorescent protein probes and highlights their typical applications in biological research. It provides a reference for developing more efficient and specialized fluorescent probes to address complex biological questions.

Keywords: fluorescent protein; fluorescent biosensor; fluorescent timer; circularly permuted fluorescent protein; bimolecular fluorescence complementation; dimerization-dependent fluorescent protein; fluorescence resonance energy transfer; photoactivation; photoconversion; photoswitch

收稿日期: 2025-01-20; 修回日期: 2025-05-08; 网络发布日期: 2025-05-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 32225025, 32430025, 32321004)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 32225025, 32430025, 32321004)]

作者简介: 张宁, 博士, 研究方向: 细胞生物学。E-mail: zn19951211@163.com

通讯作者: 田烨, 博士, 研究员, 研究方向: 线粒体应激反应和衰老。E-mail: ytian@genetics.ac.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.25-022

细胞功能受复杂信号网络的精密调控,研究这些信号分子的定位、动态分布及相互作用,对于解析信号通路并深入理解细胞命运具有重要意义。荧光生物探针的出现,为研究人员提供了一种高时空分辨率的工具,能够在单细胞或整个生物体水平上可视化分子、大分子以及生化活动的动态过程。这些探针通常由传感器模块和荧光报告模块构成。常见的荧光报告模块包括以下几类:内源性荧光发色团的荧光蛋白,如绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP);需要外源性辅因子才能发光的分子,如细菌光敏色素光受体(bacterial phytochrome photoreceptors, BphPs),其与胆绿素(biliverdin, BV)结合后产生荧光;化学遗传标签系统,由小分子荧光团与自标记蛋白组成,例如 SNAP、FAST、TMP/eDHFIR 和 Halo 标签,通过与小分子荧光团的共价或非共价结合实现发光;生物发光工具,如萤光素酶催化萤光素发光^[1]。

以上不同类型的荧光报告模块各具优势及局限性。需要外源性辅因子的探针因其信号不受背景荧光干扰,且可通过调节辅因子添加量控制信号强度和持续性,非常适合动态实验。然而,辅因子的补充可能增加实验复杂性与成本,并在某些细胞类型或模型中因辅因子摄取或代谢受限而影响其普适性^[2]。化学遗传标签系统具有高特异性和灵活性,不依赖细胞代谢,因此适用于多种细胞和组织。然而,该方法的共标记过程不可逆,若需要重新标记目标分子,需要换荧光团或进行额外的标记步骤,从而降低了探针的可重用性^[2]。生物发光工具由于背景荧光干扰低且灵敏度高,非常适合体内研究。然而,其依赖底物进行反应,实验复杂性较高,且信号持续时间短,时空分辨率有限,因此不适合实时动态监测或长期跟踪实验^[3]。

相比之下,荧光蛋白因其具有非入侵性、对生理过程干扰最小、能够在细胞或细胞器中特异性表达、生物相容性高且易于遗传编码等优势,得到了广泛应用。不同荧光蛋白在理化性质方面存在差异,包括光谱范围、颜色、亮度、发色团成熟时间、pH 稳定性及聚集倾向等^[1]。基于荧光蛋白多样的理化性质,研究者能够设计出满足不同需求的荧光生物探针,用于研究蛋白质定位、信号通路动态监测等多种生物学问题。本文将重点探讨基于荧光蛋白理

化特性设计荧光生物探针的策略,并系统总结其在生物学研究中的典型应用,为进一步开发新型探针提供借鉴与参考。

1 利用单一荧光蛋白的空间信息构建荧光探针

单一荧光蛋白通过简单的遗传编码,被广泛应用于研究目标分子的表达、定位及动态变化。常见方法包括:利用荧光蛋白基因作为报告基因,反映目标基因的转录水平;或通过将荧光蛋白与目标蛋白串联构建融合蛋白,直接观察目标蛋白在细胞中的精确定位。

除了蛋白质分子的研究,荧光生物探针的应用还扩展到其他重要的细胞信号分子。例如,脂类信号分子(如磷酸肌醇(phosphatidylinositol, PI)及其衍生物磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸(PtdIns(4,5)P₂)和磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸(PtdIns(3,4,5)P₃))等,也能通过荧光生物探针进行研究。尽管这些分子含量极低,仅占细胞总磷脂的 1%^[4,5],它们在膜性细胞器的动态调控及细胞生长、增殖、凋亡和极性等过程中发挥着重要作用^[6]。由于 PI 本身无法直接与荧光蛋白结合,研究人员利用其特异性结合某些蛋白结构域的特点,将荧光蛋白与这些特异结构域融合,开发了用于监测 PI 的荧光探针。例如, PtdIns(4,5)P₂ 和 PtdIns(3,4,5)P₃ 分别与 PLC δ 1 和 BTK 的 PH 结构域结合,将荧光蛋白与这些结构域融合后,可用于实时监测 PI 的分布及动态变化(图 1A)^[7,8]。类似策略还被用于开发其他脂类分子的探针,例如磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)和磷脂酸(phosphatidic acid, PA)^[9,10]。

此外,该策略还可用于设计通过定位变化监测酶活性的探针。例如,研究人员将激酶底物识别序列与核定位信号(nuclear localization signal, NLS)和核输出信号(nuclear export signal, NES)融合,再进一步与荧光蛋白融合。当底物被磷酸化时, NLS 的活性被抑制而 NES 的活性增强,导致荧光探针从细胞核转移至细胞质。通过细胞质与细胞核中荧光信号的动态变化,可分析激酶的活性(图 1B)^[11]。另一种新颖方法是利用液-液相分离现象设计探针来检测

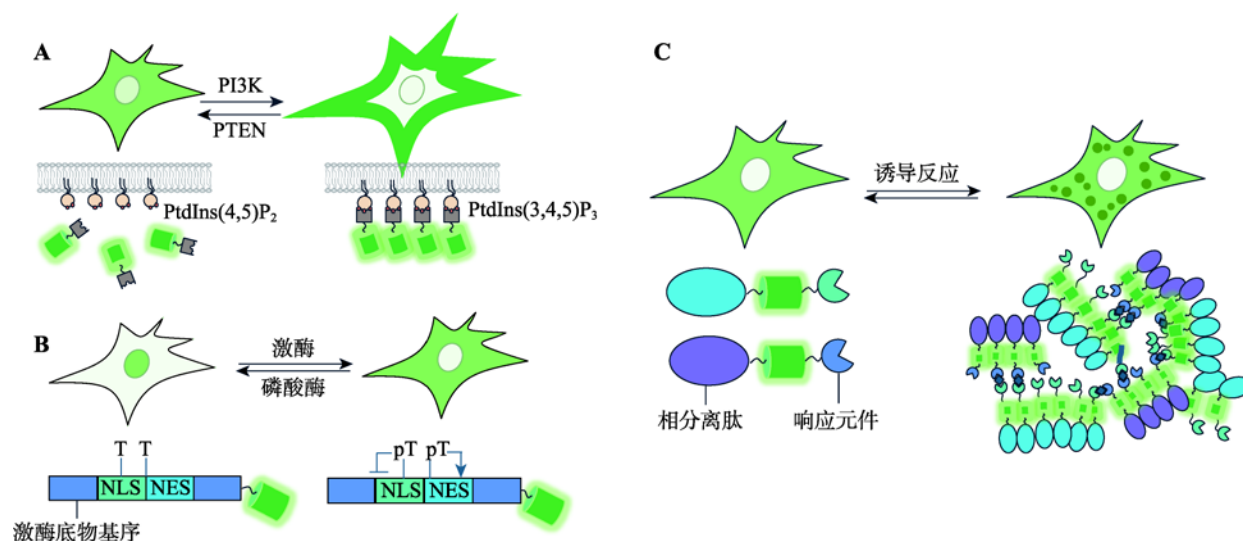


图1 利用单一荧光蛋白的空间信息构建的生物探针示例

Fig. 1 Examples of biosensors constructed using the spatial information of a single fluorescent protein

A: PtdIns(3,4,5)P₃ 荧光探针动态变化示意图。在细胞膜上, PI3K 催化 PtdIns(4,5)P₂ 生成 PtdIns(3,4,5)P₃, PTEN 可拮抗这一过程。通过设计能特异结合 PtdIns(3,4,5)P₃ 的荧光探针, 可以实时监测其动态变化。B: 指示激酶活性的荧光探针示意图。激酶底物序列由底物识别基序、NLS、NES 和荧光蛋白组成。NLS 和 NES 上带有激酶磷酸化位点(如 T 位点), 当激酶介导底物磷酸化时, 会抑制 NLS 的活性并激活 NES 的功能, 导致荧光探针从细胞核转移至细胞质。通过观察荧光信号的空间分布变化, 可评估激酶的活性。C: 基于液-液相分离的荧光探针响应分子事件的示意图。通过将荧光蛋白与响应分子事件的蛋白或多肽标记融合, 再与具有液-液相分离能力的分子融合构建探针。当目标分子事件发生时, 响应分子间相互作用会促成液-液相分离, 形成含有强荧光信号的液滴。通过观察液滴的出现及分布, 可实现对分子事件的灵敏检测。

酶活。例如, 研究人员将 EGFP 分别与激酶底物及其相互作用蛋白融合, 并连接到能形成液-液相分离的不同分子上。通过观察强荧光液滴的出现, 可判断酶活^[12]。类似策略还被用于检测小分子诱导的弱相互作用, 通过液-液相分离现象放大信号, 实现更灵敏的检测(图 1C)^[13]。

在使用单一荧光蛋白构建融合蛋白时, 需要注意不能影响目标蛋白的原始定位及功能^[14]。为准确监测目标分子的分布, 应优先选择单体形式的荧光蛋白。多聚体荧光蛋白(如二聚体的 StayGold)可能因聚集倾向导致目标蛋白错误定位或异常聚集^[15,16]。因此, 在设计探针时, 应谨慎选择荧光蛋白的类型及其融合方式, 以确保研究结果的可靠性。

2 利用荧光时钟设计探针

荧光蛋白的发色团在翻译后需经历一个自催化成熟过程, 通过内部化学反应从非荧光的初始状态转变为具有荧光的结构^[17]。一些经过基因编辑的荧

光蛋白在成熟过程中会呈现时间依赖性的颜色变化, 被称为荧光时钟(fluorescent timer, FT)(图 2A)。荧光时钟可用于追踪目标蛋白的动态变化、监测细胞老化程度以及解析其他时间相关的生物过程^[18]。

首个荧光时钟是通过在 DsRed 中引入 V105A 和 S197T 突变开发的变体 DsRed-E5。其中, S197T 突变类似于 GFP 中的 T203, 直接接触发色团, 使 DsRed-E5 在成熟前表现为绿色中间态^[18]。然而, DsRed-E5 的四聚体特性可能导致目标蛋白聚集, 从而干扰其正确定位和功能。为克服这一局限性, 后续研究开发了单体形式的荧光时钟。例如, 通过在 mCherry 中引入 K69R、L84W 和 M18V/L 突变, 得到可随着时间推移从蓝色转变为红色的突变体。此外, 通过进一步引入 A224S 或 A179V 突变, 可调控发色团成熟速率, 生成快速、中速和慢速的荧光时钟。在这些荧光时钟中, 蓝色荧光的峰值分别出现在 0.25 h、1.2 h 和 9.8 h, 而红色荧光的半峰值则分别为 7.1 h、3.9 h 和 28 h。除了上述改良版本, 还开发了其他荧光时钟变体, 如 mRubyFT、TagFT 和

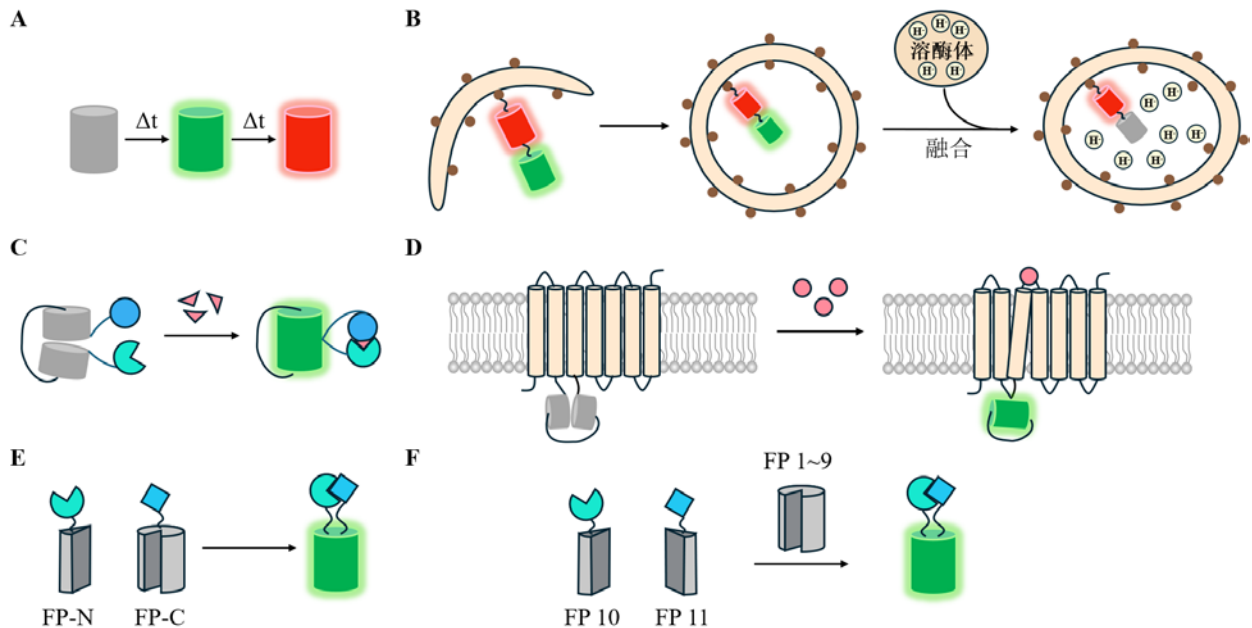


图 2 利用 FT、pH 敏感荧光蛋白、cpFP 和 BiFC 设计生物探针的示意图

Fig. 2 Schematic diagrams of designing biosensors using FT, pH-sensitive fluorescent protein, cpFP, and BiFC

A: 荧光时钟随时间变化的示意图。B: 基于 pH 敏感荧光蛋白设计的探针示意图。通过将 pH 敏感的 GFP 与 pH 不敏感的 mRFP 串联并融合 LC3 构建探针, 用于监测自噬过程。当自噬体成熟时, 其内部 pH 降低, 导致 GFP 荧光强度下降, 而 mRFP 的荧光强度保持不变, 从而反映自噬过程的动态变化。C: 基于 cpFP 设计探针的示意图。目标信号分子诱导探针构象发生变化, 从而增强 cpFP 的荧光强度, 实现对目标分子活动的灵敏监测。D: 基于 cpFP 设计的检测 GPCR 激活的探针示意图。GPCR 激活后发生构象改变, 驱动 cpFP 的荧光强度增加, 指示 GPCR 信号的激活状态。E: 基于 BiFC 设计探针的示意图。当目标蛋白发生寡聚化后, 分离的 BiFC 片段(如 VN 和 VC)通过复合重构, 生成可检测的荧光信号, 用于监测蛋白相互作用或寡聚化过程。F: 基于 TriFC 设计探针的示意图。FP 10 和 FP 11 单独时无法与 FP 1~9 重组。当 FP 10 和 FP 11 分别与目标蛋白融合后, 通过目标蛋白的相互作用使它们相邻, 随后与 FP 1~9 结合, 重构完整的荧光蛋白并产生荧光信号, 从而实现对目标蛋白相互作用的检测。

mTagFT。这些变体的发色团也表现出由蓝色向红色的转变, 但在亮度和成熟时间上存在差异^[19,20]。另一个荧光时钟 mK-GO, 则展示了在成熟过程中从绿色到橙色的颜色变化^[21]。这些多样化的荧光时钟为研究与时间相关的生物学过程提供了强有力的工具。

荧光时钟已被广泛应用于研究蛋白质、细胞器和细胞的老化及动力学。例如, 研究者将 FT 与多泡体内的泛素样蛋白 3 (ubiquitin-like 3, UBL3) 融合, 用于追踪 UBL3 在细胞内的动态变化^[22]; 利用 mK-GO 标记神经肽 Y 或组织型纤溶酶原激活剂, 探索囊泡外排过程与其老化程度的关联^[21]; 采用中速 FT 检测溶酶体相关膜蛋白 LAMP2A 的老化情况^[23]; 以及将 DsRed-E5 与胰岛素分泌颗粒膜蛋白 Syncollin 融合, 研究在葡萄糖刺激下胰岛 β 细胞优

先分泌新合成的胰岛素颗粒的机制^[24]。近年来, FT 被进一步应用于小鼠模型中, 通过区分不同细胞周期动力学的细胞研究其功能异质性^[25]; 并用于解析 T 细胞的转录时间动态以及抗原受体信号的调控过程^[25,26]。

除了单一的 FT, 通过串联具有不同成熟动力学和光谱特性的荧光蛋白, 还可以形成串联荧光蛋白时钟(tandem fluorescent protein timer, tFT)。例如, 将几分钟内即可快速成熟的 sfGFP 与成熟半衰期为 40 min 的 mCherry 串联, 通过红色/绿色荧光比值分析目标蛋白的老化程度^[27]。tFP 还被广泛应用于酵母模型中, 用于研究全基因组范围内蛋白质周转速率的调控因子^[28]。综上所述, 基于 FT 开发的荧光生物探针为研究蛋白质、细胞器和细胞的动力学及衰老提供了强有力的工具。通过结合不同类型和组

合的 FT, 研究者能够更精确地解析复杂生物过程的时间动态和功能机制。

3 利用 pH 敏感荧光蛋白设计探针

野生型 GFP 的激发光谱呈现 395 nm 和 475 nm 的双峰, 分别对应发色团中 Tyr66 的质子化和去质子化状态^[29]。尽管 GFP 的关键残基能够与环境进行质子交换, 但其激发光谱在 pH 5.5~10.0 范围内保持稳定, 表明质子化-去质子化反应受到限制。通过氨基酸突变改造其构象, 可赋予 GFP 对 pH 的敏感性。

研究者通过改变 GFP 中 Tyr66 质子中继网络的氨基酸(如 S202H、E132D 和 S147E 等)开发了 pHluorin, 这是一种对 pH 敏感的荧光蛋白。在 pH 5.5~7.0 范围内, pHluorin 在 475 nm 与 395 nm 处的激发峰比值随 pH 增加而减小。进一步突变得到了 ecliptic pHluorin, 其在 475 nm 的激发峰强度随 pH 值降低而逐渐减弱, 并在 pH 低于 6.0 时完全消失^[30]。通过在 ecliptic pHluorin 中引入 F64L 和 S65T 突变, 生成了亮度更高的 superecliptic pHluorin (SEP), 其在生理 pH 范围内的荧光强度变化可达 50 倍^[31]。此外, 还开发了多种颜色的 pH 敏感荧光蛋白, 例如红色荧光蛋白 pHTomato (来源于 mRFP 和 mStrawberry 的改造)^[32]、橙色荧光蛋白 pHoran4 (改造自 mOrange)^[33], 以及蓝色和青色荧光变体 SypHer 和 ECFP 等^[34]。

由于不同细胞器和亚细胞区室(如细胞质、线粒体、ER、高尔基体和溶酶体等)具有不同的 pH 值, pH 敏感荧光蛋白可用于指示这些区域的 pH 状态, 以评估细胞器健康并探究调控 pH 异常的分子机制^[34]。此外, pH 敏感荧光蛋白在研究突触传递、外泌体释放和自噬等动态过程中具有广泛应用。例如, 将 pH 敏感荧光蛋白与突触囊泡蛋白融合, 突触囊泡内的酸性环境会导致荧光猝灭。当囊泡释放并与质膜融合后, 荧光蛋白暴露于中性的细胞外环境中, 荧光随之恢复, 基于这一特性, 可实现胞吐、胞吞及融合过程的可视化^[35~38]。外泌体的生命周期(包括多泡体运输、与细胞膜融合释放外泌体, 外泌体摄取及内体酸化过程)同样可通过 pH 敏感探针研究。例如, 将外泌体标志蛋白 CD63 与 pHluorin 及其变体融合,

已被应用于 3D 细胞培养、原代神经元和体内系统研究中^[39,40]。

在自噬过程中, 自噬体与溶酶体的融合会导致内部 pH 值下降并激活货物蛋白的降解^[41]。将 pH 敏感荧光蛋白与自噬体标志蛋白微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3) 融合, 可以通过荧光变化推测自噬进程^[42~45]。例如, 串联的 pH 敏感 GFP 与 pH 稳定的 mRFP 标记 LC3, 通过检测红绿荧光的比值, 推测自噬囊泡内 pH 变化(图 2B)^[46]。类似的, mCherry-GFP 串联标记也被用于小鼠模型中量化线粒体自噬水平^[47]。

pH 敏感的荧光蛋白还可应用于药物筛选。例如, 将离子型谷氨酸受体 AMPAR 亚基 GluA1 与 SEP 或 SpHuji 融合, 表达在哺乳动物神经元细胞中, 用于监测不同药物处理后荧光信号的变化。这为精神疾病药物的筛选提供了工具^[48]。

综上所述, 通过特定突变和光谱特性优化的 pH 敏感荧光蛋白, 为研究细胞内 pH 动态变化及其调控机制提供了高分辨率工具。这些探针在细胞器功能、突触传递、自噬机制、外泌体生物学及药物筛选等研究领域具有广泛应用, 展现出重要的科研和医学价值。

4 利用循环重排荧光蛋白设计探针

荧光蛋白在成熟折叠后, 其 N 末端和 C 末端通常位于同一方向, 通过引入一段连接序列将两端连接, 并在靠近发色团的区域截断以生成新的末端, 这种改造后的荧光蛋白被称为循环重排荧光蛋白 (circularly permuted FP, cpFP)^[49]。由于 cpFP 在发色团附近的结构较为松散, 保护力有限, 其荧光强度通常较低。然而, 这一特性使 cpFP 对构象变化异常敏感, 适合用于检测蛋白质构象变化。当 cpFP 的两个新末端与传感结构域融合后, 传感结构域接收到特定信号时发生构象变化, 从而引发 cpFP 的构象重排, 导致荧光强度增强或减弱。通过监测荧光变化, 可以探测目标信号的动态变化(图 2C)。研究人员可以根据研究需求选择合适的截断位置, 以优化 cpFP 在构象重排后的荧光响应效果。

Ca²⁺探针 GCaMP 是首个基于 cpFP 原理设计的

探针,用于检测细胞内 Ca^{2+} 水平。它是通过将 cpGFP 的新末端分别与钙调蛋白(calmodulin, CaM)及其互作蛋白 M13 融合而来,当 Ca^{2+} 与 CaM 结合后, CaM 与 M13 发生互作,引发 cpGFP 的构象重排,从而显著增强荧光强度^[50,51]。除 Ca^{2+} 探针外,基于 cpFP 已开发出多种化学信号、代谢物和神经信号的探针,包括离子探针如钙离子、锌离子、汞离子等^[41]; 代谢物探针如氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide (oxidized form), NAD^+)^[52]、还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide (reduced form), NADH)^[53]、环状腺苷二磷酸(cyclic adenosine diphosphate, cAMP)^[54-56]、三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)^[57,58]、乙酰辅酶 A^[59]、乳酸探针^[60,61]等; 氧化还原信号探针如 H_2O_2 探针^[62,63]; 氨基酸探针如支链氨基酸(BCAA)包括亮氨酸-异亮氨酸-缬氨酸探针^[64]等; 神经肽探针如食欲素探针^[65]; 以及神经递质探针如谷氨酸、 γ -氨基丁酸(gamma-aminobutyric acid, GABA)和五羟色胺等^[66-68]。

cpFP 不仅适用于细胞内信号监测,还可锚定在细胞膜上,用于检测膜电位和机械力。例如,基于 cpFP 开发的加速动作电位探针(accelerated sensor of action potentials, ASAP)^[69,70], 可通过荧光信号实时可视化活体神经元及动物中的膜电位动态^[71]。此外,通过结合机械力敏感通道蛋白的设计, cpFP 探针还能用于研究细胞质膜张力的变化^[72]。

此外, cpFP 被广泛用于设计神经递质受体探针,如 G 蛋白偶联受体(G protein-coupled receptors, GPCR)^[73]。这一策略通过将 cpFP 插入 GPCR 的胞内环区域,当神经递质与受体结合后,受体发生构象变化,引发 cpFP 的荧光变化,从而实现实时信号检测。例如,多巴胺受体探针是首个基于 cpFP 开发的神经递质受体探针,通过将 cpGFP 插入多巴胺受体的胞内环 3 (intracellular loop 3, ICL3)中,当多巴胺与受体结合时 ICL3 发生构象变化,从而增强 cpGFP 的荧光亮度(图 2D)^[74,75]。类似方法已用于开发多种神经递质受体探针,包括乙酰胆碱受体^[76]、去甲肾上腺素受体^[77]、腺苷受体^[78]及五羟色胺受体^[79]等。此外,基于 cpFP 还开发了胰高血糖素样肽-1-受体探针 GLPLight1,用于研究司美格鲁肽激活受体的动力学过程,为肥胖药物的开发提供了新思路^[80]。

循环重排荧光蛋白通过灵活的结构改造和功能优化,为信号传递、生物化学反应和神经递质研究提供了强有力的工具。cpFP 探针的应用范围广泛,从小分子、离子检测到神经递质受体活性的实时监测,其在膜电位、机械力等动态信号检测中也展现了巨大潜力。随着技术的不断发展, cpFP 在基础研究中的价值将进一步扩大,为解决复杂的生物学问题提供新的思路 and 手段。

5 利用双分子荧光互补原理设计探针

荧光蛋白的发色团成熟过程具有相似的自催化机制。以 GFP 为例,天然 GFP 由 238 个氨基酸组成,其结构包括 4 个 α -螺旋和 11 个反向平行的 β -折叠片段,这些 β -折叠通过短环连接,形成圆柱状的桶状结构。发色团三肽 SYG (氨基酸 65~67)位于 β 折叠桶的中央,蛋白质折叠完成后,经过自催化成熟过程,发色团转变为功能性的荧光发色团,从而赋予蛋白质荧光特性。 β -折叠桶为发色团的成熟提供了保护环境^[81]。当 GFP 被分割为两个片段,例如 7 条和 4 条 β 链时,破坏了 β -折叠桶结构,这两个片段单独不发荧光,也无法自行重组。然而,当这两个片段足够接近时,它们能够完全重组并恢复荧光,这种现象被称为双分子荧光互补(bimolecular fluorescence complementation, BiFC)^[82]。基于这一原理,研究人员可以设计探针用于检测蛋白质间相互作用(图 2E)。

最早的 BiFC 探针系统基于黄色荧光蛋白 Venus,设计将其在第 154 位氨基酸处切割成 N 端片段(VN154)和 C 端片段(VC155)^[83]。随后,基于青色荧光蛋白 Cerulean^[84],以及红色荧光蛋白如 mRFP、mCherry 和 mKate 等的 BiFC 探针系统也相继被开发^[85-87]。这些探针广泛用于指示蛋白质-蛋白质相互作用。例如,将 VN154 和 VC155 分别与目标蛋白 Fos 的 bZIP 结构域和 Jun 融合后,可以在活细胞中观察到二者的相互作用^[83]。

BiFC 探针在研究蛋白质聚集相关疾病中得到了广泛应用。以帕金森病为例,帕金森病的病理特征之一是 α -突触核蛋白的异常聚集,形成路易小体^[88]。通过将 Venus 的 N 端和 C 端分别与 α -突触核蛋白融合,研究人员能够通过荧光信号追踪蛋白聚集的动

态过程,从而监测帕金森病的进程^[89,90]。在阿尔茨海默症的研究中,tau蛋白的聚集是该疾病的重要病理特征,BiFC探针已被用于细胞和小鼠模型中,用于观察tau蛋白聚集的过程,为阿尔茨海默症的机制研究提供了新工具^[91,92]。

有研究发现,将FP分割为1~10条 β 链和第11条 β 链时,二者会自发重组。自发重组的BiFC探针通常用于监测蛋白质的表达、溶解度、定位或细胞运输。为了减轻目标蛋白的负担,可以将FP 11而非整个FP连接到目标蛋白上,剩余的FP 1~10片段单独表达,这样它将与标记了FP 11的目标蛋白重组产生荧光,从而在活细胞中可视化目标蛋白^[93]。此外,也有研究将由E5和K5组成的异二聚体卷曲螺旋连在FP 1~10和FP 11上,并将蛋白酶切割序列加入其中,通过蛋白酶的作用释放FP 1~10和FP 11片段,从而发出荧光,来检测蛋白酶的活性^[94]。

随后,三部分荧光互补(TriFC)系统被开发出来,将GFP分割为 β 链1~9、10和11三个部分。虽然GFP 10和GFP 11本身不会自发与GFP 1~9重组,但当把这两条链分别与目标蛋白融合后,通过目标蛋白的相互作用,GFP 10和GFP 11会与GFP 1~9发生重组并产生荧光(图2F)。与传统的BiFC相比,TriFC显著提高了信噪比^[95],并被用于检测GPCR结合蛋白以及确定GPCR的互作区域^[96]。

除了检测两种蛋白质的互作外,BiFC系统也被扩展用于检测多个蛋白质相互作用。例如,在多色BiFC系统(mcBiFC)中,通过同时表达多个荧光蛋白变体,可以在同一细胞环境中监测多个蛋白质间的互作事件^[97]。结合核酸结合蛋白,BiFC还可以实现在活体内观察RNA与蛋白质的相互作用^[98,99];BiFC与CRISPR-Cas系统、转录激活因子样效应物(transcription activator-like effectors, TALEs)的融合,使得RNA和DNA分子的精确可视化和标记成为可能^[100,101]。

BiFC在疾病诊断和药物筛选领域展现出了巨大的应用前景。通过构建大规模的蛋白质-蛋白质互作网络,研究人员能够筛选与特定疾病相关的关键信号通路,并进一步研究这些通路中的潜在药物靶点^[102~105]。例如,在人类免疫缺陷病毒(HIV-1)研究中,病毒蛋白的二聚化是其与宿主细胞相互作用的关键步骤之一。利用基于BiFC开发的Venuc系统,

将其分别与HIV-1病毒蛋白R(Vpr)融合,利用高通量筛选小分子库,研究不同小分子对Vpr二聚化的影响,从而筛选潜在的抗病毒药物,并深入分析病毒与宿主细胞的互作机制^[103]。

基于BiFC原理设计的探针为研究分子相互作用、蛋白质聚集以及药物筛选提供了灵敏且多样化的工具。然而,BiFC探针涉及荧光蛋白片段的自组装以及随后的蛋白质折叠和发色团成熟过程,这一过程是不可逆的,因此,研究蛋白质动力学的时间信息有限。此外,为了准确检测连接在BiFC系统上的目标蛋白的相互作用,需要尽量减少荧光蛋白片段的非特异性自组装,以避免假阳性信号。因此,未来需要进一步优化BiFC探针设计,并结合其他技术以克服这些挑战。

6 利用二聚化依赖的荧光蛋白设计探针

某些荧光蛋白只有在二聚化后才能发出荧光,这类荧光蛋白被称为二聚化依赖的荧光蛋白(dimerization-dependent fluorescent protein, ddFP)。ddFP探针系统可用于检测蛋白质间的相互作用(图3A)。该系统由两部分组成,分别将两个荧光蛋白单体与目标蛋白融合,其中一个荧光蛋白单体包含发色团,称为copy-A,另一个则不包含,称为copy-B。在单独存在时,copy-A的荧光强度较弱;然而,当两个单体形成异源二聚体时,ddFP探针的荧光强度会显著增强^[106]。因此,通过分析荧光强度的变化,可以有效监测目标蛋白的相互作用。

第一个ddFP探针系统是基于红色荧光蛋白dTomato开发的^[106]。此后,研究人员又开发了绿色和黄色的ddFP探针系统^[107]。ddFP探针在研究膜接触位点的动态变化方面表现出色,如脂滴和线粒体。当ddFP浓度较高时,Contact-FP可驱动膜接触位点的形成;而在低浓度下,系统能够实现内源性脂滴-线粒体膜接触位点的可视化^[108]。此外,ddFP系统还被用于研究完整的突触结构。通过将ddFP与突触黏附分子结合,研究人员能够追踪突触结构的动态变化^[109]。值得注意的是,ddFP探针系统还被巧妙地应用于脂质代谢研究。研究者们通过将ddFP与脂质转移蛋白GRAMD1b结合开发了胆固醇探针,为研究胆固醇的分布及调控机制提供了新的创新工具^[110]。

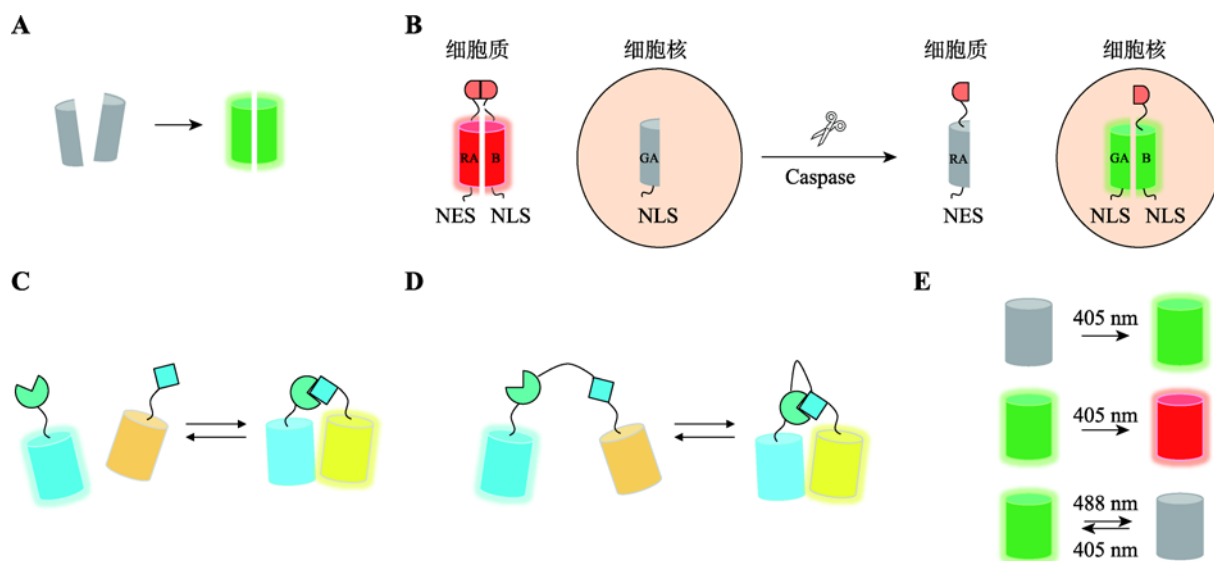


图 3 利用 ddFP、FRET、光激活、光转换、光开关荧光蛋白设计生物探针的示意图

Fig. 3 Schematic diagrams of designing biosensors using ddFP, FRET, photoactivatable, photoconvertible, and photoswitchable FPs

A: ddFP 原理示意图。B: 基于 ddFP 与荧光蛋白交换策略设计的 Caspase-3 荧光探针示意图。Caspase 切割底物导致荧光探针由细胞质转移到细胞核, 以及荧光颜色由红色变为绿色。C: 分子间 FRET 原理示意图。D: 分子内 FRET 原理示意图。E: 光激活、光转换、光开关荧光蛋白示意图。

由于不同颜色的 ddFP 探针系统中的 copy-A 会竞争性地结合相同的 copy-B, 研究人员提出了荧光蛋白交换(fluorescent protein exchange, FPX)策略。FPX 策略使得 ddFP 探针能够通过探针颜色变化来显示蛋白质的活性。例如, 基于 FPX 策略设计的分子间 Caspase-3 探针由两部分组成: 第一部分包括具有出核信号肽的红色荧光蛋白单体 RA (red copy-A)-NES 和具有入核定位肽的 copy-B-NLS, 它们通过 Caspase-3 底物序列 DEVD 连接; 第二部分是含有入核信号的绿色荧光蛋白单体 GA (green copy-A)-NLS。在正常条件下, RA 和 copy-B 异源二聚体在细胞质中发出红色荧光。当 Caspase-3 激活后, Caspase-3 会切割 DEVD 序列, 导致 RA-NES 与 copy-B-NLS 分离。释放的 copy-B-NLS 进入细胞核, 并与 GA-NLS 结合, 发出绿色荧光(图 3B)。这种基于 FPX 策略实现的亚细胞荧光颜色变化可用于实时检测 Caspase-3 的活性。利用 FPX 策略, 研究人员还设计了分子内 Caspase-3 生物探针和分子内 Ca^{2+} 探针。值得注意的是, 由于不同颜色的 copy-A 对 copy-B 的亲和力不同, 在使用多色 ddFP 系统进行定量分析时, 需要特别注意避免颜色之间的干扰^[111]。

由于每个 ddFP 探针系统仅使用一种颜色的荧光蛋白, ddFP 系统可以与其他颜色的荧光探针系统结合使用, 进而在单个细胞中同时监测多个信号事件。这种多色 ddFP 系统为研究蛋白质-蛋白质相互作用、细胞内信号转导以及其他分子事件提供了强大的工具。

7 利用荧光共振能量转移原理设计荧光探针

不同荧光蛋白各自具有独特的激发光谱与发射光谱。当一种荧光蛋白的发射光谱与另一种荧光蛋白的激发光谱重叠且两者之间的距离小于 10 nm 时, 会发生一种非辐射能量转移现象, 称为荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)^[112]。由于许多细胞信号依赖分子间的近距离相互作用, 基于 FRET 原理设计的荧光探针广泛用于检测这些分子间相互作用和研究分子间距离的动态变化^[113,114]。

FRET 探针通常将供体荧光蛋白与一个目标蛋白融合表达, 受体荧光蛋白与另一个目标蛋白融合

表达。当两个目标蛋白相互作用时, 供体和受体之间的距离接近, 产生 FRET 信号(图 3C)。然而, 由于融合蛋白表达水平和亚细胞定位的差异, 以及与内源性蛋白的潜在相互作用, FRET 检测可能受到干扰。为了克服这些问题, 可将供体和受体荧光蛋白设计在同一分子内, 将分子间相互作用转化为分子内相互作用, 以消除表达和定位差异的影响(图 3D)^[115,116]。

分子内 FRET 探针可以通过在供体与受体荧光蛋白之间插入蛋白酶的底物序列, 构建酶活性探针。当目标蛋白酶切割底物时, 供体和受体荧光蛋白分离, 导致 FRET 信号减弱。基于这一策略开发的探针包括检测 Caspase-3/7 (DEVD)、Caspase-8 (IETD) 和 Caspase-9 (LEHD) 活性的 FRET 探针^[117~119]。由于底物切割过程是不可逆的, FRET 信号变化也具有不可逆性。

分子内 FRET 探针还可通过监测供体与受体之间的距离变化, 以探测配体结合、磷酸化修饰、GTP 水解等分子事件^[120]。例如, 通过在供体和受体荧光蛋白之间插入弹性连接肽, 可构建分子张力探针, 用于检测蛋白力学状态。当目标蛋白承受张力变化时, 供体和受体间的距离发生改变, FRET 信号随之变化^[121]。例如, 将供体和受体分别连接在黏着斑蛋白 Vinculin 的头部和尾部, 发现细胞迁移过程中 FRET 信号降低, 表明 Vinculin 承受的张力增加^[122]。FRET 探针还被用于监测分子和细胞器的拥挤程度。例如, 利用 FRET 信号变化指示细胞质或细胞器中分子的空间分布及动态行为, 为研究细胞内物质运输和细胞器健康状态提供了工具^[123,124]。

为了使供体和受体荧光蛋白之间有效发生 FRET, 需要注意以下几点: 供体的发射光谱应与受体的激发光谱高度重叠^[125]; 供体和受体之间的距离应小于 10 nm, 并且相对方向要适合能量转移; 选择高量子产率(quantum yield, QY)和高消光系数(extinction coefficient, EC)的荧光蛋白, 以提高 FRET 效率和光稳定性^[126]。

一些荧光蛋白具有较大的斯托克斯位移(stokes shift, LSS), 即激发光谱和发射光谱之间的间隔较大^[127]。结合这种 LSS 的荧光蛋白与传统 FRET 探针, 可以实现多色 FRET 检测, 用于同时监测多个分子事件。例如, 通过联合使用 LSSmOrange-mKate2 和 CFP-YFP 对, 可以在单个实验中同时监测细胞内

Caspase-3 活性和 Ca^{2+} 浓度。在该实验中, 两个供体 CFP 和 LSSmOrange 均在 440 nm 处被激发, 而两个受体 YFP 和 mKate2 的发射波长分别为 530 nm 和 630 nm。通过分别检测这两个波长的信号, 成功实现了对两种分子事件的同时检测^[128]。

8 光激活、光转换和光开关荧光蛋白

在光照射下, 一些荧光蛋白的发色团会发生重排或异构化, 从而表现出特殊的光学性质^[129]。这些性质包括从非荧光状态变为荧光状态(光激活)^[130]、改变荧光颜色(光转换)^[131], 或在特定波长光照下可逆地开启和关闭荧光(光开关)(图 3E)^[132]。这些具有特殊功能的荧光蛋白为细胞过程的精细研究提供了强大工具, 并能与现有探针技术结合, 拓宽其应用场景。

8.1 光激活荧光蛋白

光激活荧光蛋白可通过特定波长光照局部激活荧光信号, 在动态追踪实验中展现出显著优势。例如, 光激活 GFP (photoactivatable GFP, PA-GFP) 在蓝光照射下, 其绿色荧光强度可增强至原来的 100 倍^[130]。此外, 还开发了光激活的 BFP 以及近红外荧光蛋白 PAiRFP1 和 PAiRFP2^[133,134]。

光激活荧光蛋白的典型应用包括: 通过将 PA-GFP 与溶酶体相关膜蛋白 2 (LAMP2) 融合, 并在细胞核附近进行光激活, 研究溶酶体之间的膜交换率^[130]。此外, 光激活荧光蛋白也被用于动态追踪轴突内的运输过程^[135,136]; 结合 CRISPRi 系统, 通过光激活荧光蛋白标记已编辑细胞, 从而区分编辑与未编辑的细胞^[137]。光激活荧光蛋白最重要的应用是直接推动了基于单分子定位重构的超分辨显微镜技术(fluorescence photoactivation-localization microscopy, fPALM), 在超高分辨率下提供目标蛋白的精准分布信息^[138,139]。

8.2 光转换荧光蛋白

光转换荧光蛋白通过光照改变荧光颜色, 例如 mEos 家族蛋白可以通过光照由绿色转变为红色。mEos 家族包括 mEos2、mEos3.2、mEosBrite 和 mEos4b 等变体, 每种变体具有不同的特点。其中,

mEos2 能够在紫外光照射下迅速转换至红光荧光,具有较高的转换效率,但在长时间使用中容易发生光漂白,因此适用于对光转换效率要求较高的短时间成像实验;mEos3.2 相较于 mEos2 具有更高的光转换效率和光稳定性,尽管光转换速度稍慢,但适用于超分辨率成像^[140];mEosBrite 拥有极高的荧光亮度和较快的光转换速度,适用于单分子成像和超分辨率显微镜技术^[141];mEos4b 具有较好的光转换效率和亮度,光漂白较少,适用于长时间的成像实验,但光转换速度相对较慢^[142]。不同类型的 mEos 蛋白为研究者提供了多种选择,根据实验需要可以选择最合适的变体。除了 mEos 家族蛋白之外,还有其他颜色的光转换蛋白,例如由细菌光敏色素改造的 miRFP,能在光照射下由近红外光转换为远红光^[131,143]。通过将光转换荧光蛋白与目标蛋白融合,研究者可以利用局部光照改变目标蛋白的颜色,从而实现双重颜色标记,这种特性被广泛应用于研究蛋白质和细胞器动态行为、细胞迁移、胚胎发育等过程^[144~146]。

光转换荧光蛋白还可以与循环重排荧光蛋白(cpFP)技术结合使用。例如:Ca²⁺探针 CaMPARI 的设计,由 cp-mEos 与 Ca²⁺传感结构域(CaM 和 M13)组成。当 Ca²⁺与 Ca²⁺传感结构域结合时,cp-mEos 发出绿色荧光;在蓝光照射下,CaMPARI 的荧光从绿色转换为红色。将 CaMPARI 表达于活体动物的神经元中,通过分析蓝光照射下红色荧光的分布,可追踪不同刺激条件下 Ca²⁺水平升高的神经元^[147]。

8.3 光开关荧光蛋白

光开关荧光蛋白在特定波长光照下可逆地开启和关闭荧光。例如,Dronpa 在 405 nm 光照射下激发荧光,在 488 nm 的光照射下关闭荧光^[132]。这种特性使光开关荧光蛋白广泛应用于高分辨率成像和动态研究领域。

光开关荧光蛋白的典型应用包括:结合 BiFC 原理,研究蛋白质相互作用,通过光开关荧光蛋白构建的随机光学波动成像系统,可用于超分辨率成像^[148]。例如,将 Dronpa 两个组分分别与钙调节蛋白(stromal interaction molecule 1, STIM1)和钙通道蛋白(ORAI calcium release-activated calcium modulator 1, ORAI1)融合,当 STIM1 与 ORAI1 相互作用时,Dronpa 发

出绿色荧光,通过光开关实现高精度的空间信息解析。利用光开关荧光蛋白和 BiFC 技术,可以在超分辨率尺度上研究蛋白质互作及其时空动态变化。

9 结语与展望

本文系统总结了多种基于荧光蛋白的理化性质和分子生化方法的生物荧光探针设计策略。具体而言,这些策略包括:直接应用荧光蛋白空间定位分析;基于荧光蛋白发色团的成熟速度或 pH 敏感性进行设计;通过循环重排荧光蛋白、分裂荧光蛋白重构、ddFP 以及 FRET 等技术构建探针;以及利用光激活、光转换或光开关荧光蛋白设计动态探针。根据待监测的分子事件类型,可以选择最适合的设计策略,并结合不同的荧光蛋白与设计方案,以开发满足特定研究需求的生物探针。

近年来,人工智能(artificial intelligence, AI)技术的快速发展为荧光蛋白的优化和创新提供了前所未有的机遇。深度学习工具如 DeepSeek 和 AlphaFold3 在荧光蛋白的结构预测和功能优化方面展现出巨大潜力。DeepSeek 能够基于已有荧光蛋白的结构数据,预测其荧光性能,从而在设计阶段筛选出高效荧光蛋白,并实现定制化优化。目前已有研究者利用 DeepSeek 预测和筛选激发态质子转移(excited-state intramolecular proton transfer, ESIPT)荧光分子,推动新型荧光探针的开发^[149]。AlphaFold3 则能够准确预测蛋白质、DNA、RNA 及配体等生物分子的结构及其相互作用,助力开发更高灵敏度和特异性的荧光蛋白探针。结合扩散模型和生成对抗网络(generative adversarial networks, GAN),研究者甚至可以从头设计全新的荧光蛋白结构,进一步提升其光学性能和稳定性^[150]。AI 技术的引入为荧光探针的智能优化和个性化设计提供了新思路。除了基于荧光蛋白的探针设计,荧光小分子和新型荧光探针近年来也在生物成像、分子诊断及药物研究等领域受到广泛关注^[151~153]。荧光小分子探针包括荧光染料(如罗丹明、BODIPY),可用于蛋白质和核酸标记^[154];荧光小分子与 RNA 适配体结合用于标记 RNA^[155];金属配合物,能与特定的金属离子结合并发出荧光,适用于金属离子检测和电化学发光分析^[156];半导体量子点,具备优异的光稳定性和窄带宽发射特性,适用于多

色成像和长期监测^[157]。它们在灵活性、靶向性和检测精度等方面具有独特优势。新型荧光探针例如基于寡核苷酸适配体 (aptamers) 设计的荧光探针 Aptamer^[158,159], 其结合了 aptamers 的高特异性和荧光分子的显著信号增强作用, 在检测小分子、蛋白质、病毒、细胞表面受体等生物标志物的识别中展现出独特优势, 在生物标志物检测、病毒识别及临床诊断中展现出广阔应用前景。

未来的研究可以将荧光蛋白探针与新型探针以及化学遗传标签系统等技术联合使用, 进一步拓宽荧光生物探针的应用范围^[160,161]。这些探针的设计与优化, 不仅为解析细胞过程中的动态机制提供了新工具, 也为生命科学的深入探索提供了有力支持。随着技术的不断进步, 未来的荧光探针将具备更高的灵敏度、更广泛的适用性及更精细的时空分辨能力, 进一步推动细胞生物学、分子生物学及精准医学等领域的发展。

致谢:

感谢中国科学院遗传与发育生物学研究所何康敏研究员在文章内容上的建议和帮助。

参考文献(References):

- [1] Gest AMM, Sahan AZ, Zhong YH, Lin W, Mehta S, Zhang J. Molecular spies in action: genetically encoded fluorescent biosensors light up cellular signals. *Chem Rev*, 2024, 124(22): 12573–12660. [DOI]
- [2] Reja SI, Minoshima M, Hori Y, Kikuchi K. Recent advancements of fluorescent biosensors using semisynthetic probes. *Biosens Bioelectron*, 2024, 247: 115862. [DOI]
- [3] Syed AJ, Anderson JC. Applications of bioluminescence in biotechnology and beyond. *Chem Soc Rev*, 2021, 50(9): 5668–5705. [DOI]
- [4] Wu ZS, Du YT, Kirchhausen T, He KM. Probing and imaging phospholipid dynamics in live cells. *Life Metab*, 2024, 3(4): lae014. [DOI]
- [5] Rosen SAJ, Gaffney PRJ, Spiess B, Gould IR. Understanding the relative affinity and specificity of the pleckstrin homology domain of protein kinase B for inositol phosphates. *Phys Chem Chem Phys*, 2012, 14(2): 929–936. [DOI]
- [6] Dickson EJ, Hille B. Understanding phosphoinositides: rare, dynamic, and essential membrane phospholipids. *Biochem J*, 2019, 476(1): 1–23. [DOI]
- [7] Thallmair V, Schultz L, Zhao WC, Marrink SJ, Oliver D, Thallmair S. Two cooperative binding sites sensitize PI(4,5)P₂ recognition by the tubby domain. *Sci Adv*, 2022, 8(36): eabp9471. [DOI]
- [8] Wang J, An ZY, Wu ZS, Zhou W, Sun PY, Wu PY, Dang S, Xue R, Bai X, Du YT, Chen RM, Wang WX, Huang P, Lam SM, Ai YW, Liu SL, Shui GH, Zhang Z, Liu Z, Huang JY, Fang XH, He KM. Spatial organization of PI3K-PI(3,4,5)P₃-AKT signaling by focal adhesions. *Mol Cell*, 2024, 84(22): 4401–4418.e9. [DOI]
- [9] Zhang F, Wang ZQ, Lu M, Yonekubo Y, Liang X, Zhang YQ, Wu P, Zhou Y, Grinstein S, Hancock JF, Du GW. Temporal production of the signaling lipid phosphatidic acid by phospholipase D2 determines the output of extracellular signal-regulated kinase signaling in cancer cells. *Mol Cell Biol*, 2014, 34(1): 84–95. [DOI]
- [10] Chung J, Torta F, Masai K, Lucast L, Czaplá H, Tanner LB, Narayanaswamy P, Wenk MR, Nakatsu F, De Camilli P. Intracellular transport. PI4P/phosphatidylserine counter-transport at ORP5- and ORP8-mediated ER-plasma membrane contacts. *Science*, 2015, 349(6246): 428–432. [DOI]
- [11] Kudo T, Jeknić S, Macklin DN, Akhter S, Hughey JJ, Regot S, Covert MW. Live-cell measurements of kinase activity in single cells using translocation reporters. *Nat Protoc*, 2017, 13(1): 155–169. [DOI]
- [12] Zhang Q, Huang H, Zhang LQ, Wu R, Chung CI, Zhang SQ, Torra J, Schepis A, Coughlin SR, Kornberg TB, Shu XK. Visualizing dynamics of cell signaling *in vivo* with a phase separation-based kinase reporter. *Mol Cell*, 2018, 69(2): 347. [DOI]
- [13] Chung CI, Zhang Q, Shu XK. Dynamic imaging of small molecule induced protein-protein interactions in living cells with a fluorophore phase transition based approach. *Anal Chem*, 2018, 90(24): 14287–14293. [DOI]
- [14] Brown MC, Turner CE. Paxillin: adapting to change. *Physiol Rev*, 2004, 84(4): 1315–1339. [DOI]
- [15] Hirano M, Ando R, Shimozono S, Sugiyama M, Takeda N, Kurokawa H, Deguchi R, Endo K, Haga K, Takai-Todaka R, Inaura S, Matsumura Y, Hama H, Okada Y, Fujiwara T, Morimoto T, Katayama K, Miyawaki A. A highly photostable and bright green fluorescent protein. *Nat Biotechnol*, 2022, 40(7): 1132–1142. [DOI]
- [16] Ando R, Shimozono S, Ago H, Takagi M, Sugiyama M, Kurokawa H, Hirano M, Niino Y, Ueno G, Ishidate F,

- Fujiwara T, Okada Y, Yamamoto M, Miyawaki A. StayGold variants for molecular fusion and membrane-targeting applications. *Nat Methods*, 2024, 21(4): 648–656. [DOI]
- [17] Matz MV, Fradkov AF, Labas YA, Savitsky AP, Zeraisky AG, Markelov ML, Lukyanov SA. Fluorescent proteins from nonbioluminescent *Anthozoa* species. *Nat Biotechnol*, 1999, 17(10): 969–973. [DOI]
- [18] Terskikh A, Fradkov A, Ermakova G, Zeraisky A, Tan P, Kajava AV, Zhao X, Lukyanov S, Matz M, Kim S, Weissman I, Siebert P. "Fluorescent timer": protein that changes color with time. *Science*, 2000, 290(5496): 1585–1588. [DOI]
- [19] Subach OM, Tashkeev A, Vlaskina AV, Petrenko DE, Gaivoronskii FA, Nikolaeva AY, Ivashkina OI, Anokhin KV, Popov VO, Boyko KM, Subach FV. The mRubyFT protein, genetically encoded blue-to-red fluorescent timer. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(6): 3208. [DOI]
- [20] Subach OM, Vlaskina AV, Agapova YK, Nikolaeva AY, Anokhin KV, Piatkevich KD, Patrushev MV, Boyko KM, Subach FV. Blue-to-red TagFT, mTagFT, mTsFT, and green-to-farred mNeptusFT2 proteins, genetically encoded true and tandem fluorescent timers. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(4): 3279. [DOI]
- [21] Tsuboi T, Kitaguchi T, Karasawa S, Fukuda M, Miyawaki A. Age-dependent preferential dense-core vesicle exocytosis in neuroendocrine cells revealed by newly developed monomeric fluorescent timer protein. *Mol Biol Cell*, 2009, 21(1): 87–94. [DOI]
- [22] Terada Y, Obara K, Yoshioka Y, Ochiya T, Bito H, Tsuchida K, Ageta H, Ageta-Ishihara N. Intracellular dynamics of ubiquitin-like 3 visualized using an inducible fluorescent timer expression system. *Biol Open*, 2024, 13(11): bio060345. [DOI]
- [23] Subach FV, Subach OM, Gundorov IS, Morozova KS, Piatkevich KD, Cuervo AM, Verkhusa VV. Monomeric fluorescent timers that change color from blue to red report on cellular trafficking. *Nat Chem Biol*, 2009, 5(2): 118–126. [DOI]
- [24] Yau B, Hays L, Liang C, Laybutt DR, Thomas HE, Gunton JE, Williams L, Hawthorne WJ, Thorn P, Rhodes CJ, Kebede MA. A fluorescent timer reporter enables sorting of insulin secretory granules by age. *J Biol Chem*, 2020, 295(27): 8901–8911. [DOI]
- [25] Ono M. Unraveling T-cell dynamics using fluorescent timer: insights from the Tocky system. *Biophys Physicobiol*, 2024, 21(Supplemental): e211010. [DOI]
- [26] Elliot TAE, Jennings EK, Lecky DAJ, Rouvray S, Mackie GM, Scarfe L, Sheriff L, Ono M, Maslowski KM, Bending D. Nur77-Tempo mice reveal T cell steady state antigen recognition. *Discov Immunol*, 2022, 1(1): kyac009. [DOI]
- [27] Khmelinskii A, Keller PJ, Bartosik A, Meurer M, Barry JD, Mardin BR, Kaufmann A, Trautmann S, Wachsmuth M, Pereira G, Huber W, Schiebel E, Knop M. Tandem fluorescent protein timers for *in vivo* analysis of protein dynamics. *Nat Biotechnol*, 2012, 30(7): 708–714. [DOI]
- [28] Fung JJ, Blöcher-Juárez K, Khmelinskii A. High-throughput analysis of protein turnover with tandem fluorescent protein timers. *Methods Mol Biol*, 2022, 2378: 85–100. [DOI]
- [29] Chattoraj M, King BA, Bublit GU, Boxer SG. Ultra-fast excited state dynamics in green fluorescent protein: multiple states and proton transfer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(16): 8362–8367. [DOI]
- [30] Miesenböck G, De Angelis DA, Rothman JE. Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature*, 1998, 394(6689): 192–195. [DOI]
- [31] Sankaranarayanan S, De Angelis D, Rothman JE, Ryan TA. The use of pHluorins for optical measurements of presynaptic activity. *Biophys J*, 2000, 79(4): 2199–2208. [DOI]
- [32] Li YL, Tsien RW. pHTomato, a red, genetically encoded indicator that enables multiplex interrogation of synaptic activity. *Nat Neurosci*, 2012, 15(7): 1047–1053. [DOI]
- [33] Shen Y, Rosendale M, Campbell RE, Perrais D. pHuji, a pH-sensitive red fluorescent protein for imaging of exo- and endocytosis. *J Cell Biol*, 2014, 207(3): 419–432. [DOI]
- [34] Li SA, Meng XY, Zhang YJ, Chen CL, Jiao YX, Zhu YQ, Liu PP, Sun W. Progress in pH-sensitive sensors: essential tools for organelle pH detection, spotlighting mitochondrion and diverse applications. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1339518. [DOI]
- [35] Liu AY, Huang XS, He WT, Xue FD, Yang YR, Liu JJ, Chen LY, Yuan L, Xu PY. pHmScarlet is a pH-sensitive red fluorescent protein to monitor exocytosis docking and fusion steps. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 1413. [DOI]
- [36] Seidenthal M, János B, Rosenkranz N, Schuh N, Elvers N, Willoughby M, Zhao XD, Gottschalk A. pOpsicle: an all-optical reporter system for synaptic vesicle recycling combining pH-sensitive fluorescent proteins with optogenetic manipulation of neuronal activity. *Front Cell Neurosci*, 2023, 17: 1120651. [DOI]
- [37] Tanaka H, Funahashi J, Hirano T. Live-cell imaging of endocytosed synaptophysin around individual hippocampal presynaptic active zones. *Front Cell Neurosci*,

- 2023, 17: 1277729. [DOI]
- [38] Blaustein M, Wirth S, Saldaña G, Piantanida AP, Bogetti ME, Martin ME, Colman-Lerner A, Uchitel OD. A new tool to sense pH changes at the neuromuscular junction synaptic cleft. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 20480. [DOI]
- [39] Pescosolido MF, Ouyang Q, Liu JS, Morrow EM. Live-imaging detection of multivesicular body-plasma membrane fusion and exosome release in cultured primary neurons. *Methods Mol Biol*, 2023, 2683: 213–220. [DOI]
- [40] Sung BH, von Lersner A, Guerrero J, Krystofiak ES, Inman D, Pelletier R, Zijlstra A, Ponik SM, Weaver AM. A live cell reporter of exosome secretion and uptake reveals pathfinding behavior of migrating cells. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 2092. [DOI]
- [41] Parzych KR, Klionsky DJ. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal*, 2013, 20(3): 460–473. [DOI]
- [42] Maulucci G, Chiarpotto M, Papi M, Samengo D, Pani G, De Spirito M. Quantitative analysis of autophagic flux by confocal pH-imaging of autophagic intermediates. *Autophagy*, 2015, 11(10): 1905–1916. [DOI]
- [43] Tanida I, Ueno T, Uchiyama Y. A super-ecliptic, pHluorin-mKate2, tandem fluorescent protein-tagged human LC3 for the monitoring of mammalian autophagy. *PLoS One*, 2014, 9(10): e110600. [DOI]
- [44] Zhou CH, Zhong W, Zhou J, Sheng FG, Fang ZY, Wei Y, Chen YY, Deng XY, Xia B, Lin J. Monitoring autophagic flux by an improved tandem fluorescent-tagged LC3 (mTagRFP-mWasabi-LC3) reveals that high-dose rapamycin impairs autophagic flux in cancer cells. *Autophagy*, 2012, 8(8): 1215–1226. [DOI]
- [45] Kimura S, Noda T, Yoshimori T. Dissection of the autophagosome maturation process by a novel reporter protein, tandem fluorescent-tagged LC3. *Autophagy*, 2007, 3(5): 452–460. [DOI]
- [46] Kim H, Kim H, Choi J, Inn KS, Seong J. Visualization of autophagy progression by a red–green–blue autophagy sensor. *ACS Sens*, 2020, 5(12): 3850–3861. [DOI]
- [47] Montava-Garriga L, Singh F, Ball G, Ganley IG. Semi-automated quantitation of mitophagy in cells and tissues. *Mech Ageing Dev*, 2020, 185: 111196. [DOI]
- [48] Calleja-Felipe M, Wojtas MN, Diaz-González M, Ciceri D, Escribano R, Ouro A, Morales M, Knafo S. FORTIS: a live-cell assay to monitor AMPA receptors using pH-sensitive fluorescence tags. *Transl Psychiatry*, 2021, 11(1): 324. [DOI]
- [49] Baird GS, Zacharias DA, Tsien RY. Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(20): 11241–11246. [DOI]
- [50] Nakai J, Ohkura M, Imoto K. A high signal-to-noise Ca^{2+} probe composed of a single green fluorescent protein. *Nat Biotechnol*, 2001, 19(2): 137–141. [DOI]
- [51] Miyawaki A, Llopis J, Heim R, McCaffery JM, Adams JA, Ikura M, Tsien RY. Fluorescent indicators for Ca^{2+} based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature*, 1997, 388(6645): 882–887. [DOI]
- [52] Zou YJ, Wang AX, Huang L, Zhu XD, Hu QX, Zhang YN, Chen XJ, Li FW, Wang QH, Wang H, Liu RM, Zuo FT, Li T, Yao J, Qian YJ, Shi M, Yue X, Chen WC, Zhang Z, Wang CR, Zhou Y, Zhu LY, Ju ZY, Loscalzo J, Yang Y, Zhao YZ. Illuminating NAD^+ metabolism in live cells and *in vivo* using a genetically encoded fluorescent sensor. *Dev Cell*, 2020, 53(2): 240–252.e7. [DOI]
- [53] Zhao YZ, Jin J, Hu QX, Zhou HM, Yi J, Yu ZH, Xu L, Wang X, Yang Y, Loscalzo J. Genetically encoded fluorescent sensors for intracellular NADH detection. *Cell Metab*, 2011, 14(4): 555–566. [DOI]
- [54] Harada K, Ito M, Wang XW, Tanaka M, Wongso D, Konno A, Hirai H, Hirase H, Tsuboi T, Kitaguchi T. Red fluorescent protein-based cAMP indicator applicable to optogenetics and *in vivo* imaging. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 7351. [DOI]
- [55] Liu WF, Liu C, Ren PG, Chu J, Wang L. An improved genetically encoded fluorescent cAMP indicator for sensitive cAMP imaging and fast drug screening. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 902290. [DOI]
- [56] Wang L, Wu CL, Peng WL, Zhou ZL, Zeng JZ, Li XL, Yang YN, Yu SG, Zou Y, Huang M, Liu C, Chen YF, Li Y, Ti PP, Liu WF, Gao YF, Zheng W, Zhong HN, Gao SB, Lu ZH, Ren PG, Ng HL, He J, Chen SD, Xu M, Li YL, Chu J. A high-performance genetically encoded fluorescent indicator for *in vivo* cAMP imaging. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 5363. [DOI]
- [57] Lobas MA, Tao RK, Nagai J, Kronschräger MT, Borden PM, Marvin JS, Looger LL, Khakh BS. A genetically encoded single-wavelength sensor for imaging cytosolic and cell surface ATP. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 711. [DOI]
- [58] Marvin JS, Kokotos AC, Kumar M, Pulido C, Tkachuk AN, Yao JS, Brown TA, Ryan TA. iATPSnFR2: a high-dynamic-range fluorescent sensor for monitoring intracellular ATP. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2024, 121(21): e2314604121. [DOI]
- [59] Smith JJ, Valentino TR, Ablicki AH, Banerjee R, Colligan AR, Eckert DM, Desjardins GA, Diehl KL. A

- genetically-encoded fluorescent biosensor for visualization of acetyl-CoA in live cells. *Cell Chem Biol*, 2025, 32(2): 325–337.e10. [DOI]
- [60] Li X, Zhang YN, Xu LY, Wang AX, Zou YJ, Li T, Huang L, Chen WC, Liu SN, Jiang K, Zhang XZ, Wang DM, Zhang LJ, Zhang Z, Zhang ZY, Chen XJ, Jia W, Zhao AH, Yan XF, Zhou HM, Zhu LY, Ma XR, Ju ZY, Jia WP, Wang CR, Loscalzo J, Yang Y, Zhao YZ. Ultrasensitive sensors reveal the spatiotemporal landscape of lactate metabolism in physiology and disease. *Cell Metab*, 2023, 35(1): 200–211.e9. [DOI]
- [61] Nasu Y, Aggarwal A, Le GNT, Vo CT, Kambe Y, Wang XX, Beinlich FRM, Lee AB, Ram TR, Wang FY, Gorzo KA, Kamijo Y, Boisvert M, Nishinami S, Kawamura G, Ozawa T, Toda H, Gordon GR, Ge SY, Hirase H, Nedergaard M, Paquet ME, Drobizhev M, Podgorski K, Campbell RE. Lactate biosensors for spectrally and spatially multiplexed fluorescence imaging. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 6598. [DOI]
- [62] Lara-Rojas F, Juárez-Verdayes MA, Wu HM, Cheung AY, Montiel J, Pascual-Morales E, Ryken SE, Bezanilla M, Cardenas L. Using Hyper as a molecular probe to visualize hydrogen peroxide in living plant cells: an updated method. *Methods Enzymol*, 2023, 683: 265–289. [DOI]
- [63] Berndt A, Lee J, Won W, Kimball K, Neiswanger C, Schattauer S, Wang YH, Yeboah F, Ruiz M, Evitts K, Rappleye M, Bremner S, Chun C, Smith N, Mack D, Young J, Lee CJ, Chavkin C. Ultra-fast genetically encoded sensor for precise real-time monitoring of physiological and pathophysiological peroxide dynamics. *Res Sq*, 2024, rs.3.rs-4048855. [DOI]
- [64] Asanova AN, Subach OM, Myachina SA, Evteeva MA, Gunitseva NM, Borisova AA, Patrushev MV, Vlaskina AV, Nikolaeva AY, Yang LN, Gabdulkhakov A, Dronova E, Samygina VR, Xiao X, Zhao H, Piatkevich KD, Subach FV. Nelle, a genetically encoded indicator for branched-chain amino acids based on mNeonGreen fluorescent protein and LIVBP protein. *ACS Sens*, 2024, 9(10): 5135–5147. [DOI]
- [65] Lee HM, Choi DW, Kim S, Lee A, Kim M, Roh YJ, Jo YH, Cho HY, Lee HJ, Lee SR, Tarrago L, Gladyshev VN, Kim JH, Lee BC. Biosensor-linked immunosorbent assay for the quantification of methionine oxidation in target proteins. *ACS Sens*, 2022, 7(1): 131–141. [DOI]
- [66] Marvin JS, Scholl B, Wilson DE, Podgorski K, Kazempour A, Müller JA, Schoch S, Quiroz FJU, Rebola N, Bao H, Little JP, Tkachuk AN, Cai E, Hantman AW, Wang SSH, DePiero VJ, Borghuis BG, Chapman ER, Dietrich D, DiGregorio DA, Fitzpatrick D, Looger LL. Stability, affinity, and chromatic variants of the glutamate sensor iGluSnFR. *Nat Methods*, 2018, 15(11): 936–939. [DOI]
- [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. A genetically encoded fluorescent sensor for *in vivo* imaging of GABA. *Nat Methods*, 2019, 16(8): 763–770. [DOI]
- [68] Kubitschke M, Müller M, Wallhorn L, Pulin M, Mittag M, Pollok S, Ziebarth T, Bremshey S, Gerdey J, Claussen KC, Renken K, Groß J, Gneiß P, Meyer N, Wiegert JS, Reiner A, Fuhrmann M, Massek OA. Next generation genetically encoded fluorescent sensors for serotonin. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 7525. [DOI]
- [69] Chamberland S, Yang HH, Pan MM, Evans SW, Guan SH, Chavarha M, Yang Y, Salesse C, Wu HD, Wu JC, Clandinin TR, Toth K, Lin MZ, St-Pierre F. Fast two-photon imaging of subcellular voltage dynamics in neuronal tissue with genetically encoded indicators. *eLife*, 2017, 6: e25690. [DOI]
- [70] St-Pierre F, Marshall JD, Yang Y, Gong YY, Schnitzer MJ, Lin MZ. High-fidelity optical reporting of neuronal electrical activity with an ultrafast fluorescent voltage sensor. *Nat Neurosci*, 2014, 17(6): 884–889. [DOI]
- [71] Villette V, Chavarha M, Dimov IK, Bradley J, Pradhan L, Mathieu B, Evans SW, Chamberland S, Shi DQ, Yang RZ, Kim BB, Ayon A, Jalil A, St-Pierre F, Schnitzer MJ, Bi GQ, Toth K, Ding J, Dieudonné S, Lin MZ. Ultrafast two-photon imaging of a high-gain voltage indicator in awake behaving mice. *Cell*, 2019, 179(7): 1590–1608.e23. [DOI]
- [72] Hsu YY, Resto Irizarry AM, Fu JP, Liu AP. Mechano-sensitive channel-based optical membrane tension reporter. *ACS Sens*, 2023, 8(1): 12–18. [DOI]
- [73] Weis WI, Kobilka BK. The molecular basis of G protein-coupled receptor activation. *Annu Rev Biochem*, 2018, 87: 897–919. [DOI]
- [74] Sun FM, Zeng JZ, Jing M, Zhou JH, Feng JS, Owen SF, Luo YC, Li FN, Wang H, Yamaguchi T, Yong ZH, Gao YJ, Peng WL, Wang LZ, Zhang SY, Du JL, Lin DY, Xu M, Kreitzer AC, Cui GH, Li YL. A genetically encoded fluorescent sensor enables rapid and specific detection of dopamine in flies, fish, and mice. *Cell*, 2018, 174(2): 481–496.e19. [DOI]
- [75] Patriarchi T, Cho JR, Merten K, Howe MW, Marley A, Xiong WH, Folk RW, Broussard GJ, Liang RQ, Jang MJ, Zhong HN, Dombeck D, Von Zastrow M, Nimmerjahn A,

- Gradinaru V, Williams JT, Tian L. Ultrafast neuronal imaging of dopamine dynamics with designed genetically encoded sensors. *Science*, 2018, 360(6396): eaat4422. [DOI]
- [76] Jing M, Zhang P, Wang GF, Feng JS, Mesik L, Zeng JZ, Jiang HQ, Wang SH, Looby JC, Guagliardo NA, Langma LW, Lu J, Zuo Y, Talmage DA, Role LW, Barrett PQ, Zhang LI, Luo MM, Song Y, Zhu JJ, Li YL. A genetically encoded fluorescent acetylcholine indicator for *in vitro* and *in vivo* studies. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(8): 726–737. [DOI]
- [77] Feng JS, Zhang CM, Lischinsky JE, Jing M, Zhou JH, Wang H, Zhang YJ, Dong A, Wu ZF, Wu H, Chen WY, Zhang P, Zou J, Hires SA, Zhu JJ, Cui GH, Lin DY, Du JL, Li YL. A genetically encoded fluorescent sensor for rapid and specific *in vivo* detection of norepinephrine. *Neuron*, 2019, 102(4): 745–761.e8. [DOI]
- [78] Wu ZF, Cui YT, Wang H, Wu H, Wan Y, Li BH, Wang L, Pan SL, Peng WL, Dong A, Yuan ZW, Jing M, Xu M, Luo MM, Li YL. Neuronal activity-induced, equilibrative nucleoside transporter-dependent, somatodendritic adenosine release revealed by a GRAB sensor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2023, 120(14): e2212387120. [DOI]
- [79] Wan JX, Peng WL, Li XL, Qian TR, Song K, Zeng JZ, Deng F, Hao SY, Feng JS, Zhang P, Zhang YJ, Zou J, Pan SL, Shin MM, Venton BJ, Zhu JJ, Jing M, Xu M, Li YL. A genetically encoded sensor for measuring serotonin dynamics. *Nat Neurosci*, 2021, 24(5): 746–752. [DOI]
- [80] Duffet L, Williams ET, Gresch A, Chen SM, Bhat MA, Benke D, Hartrampf N, Patriarchi T. Optical tools for visualizing and controlling human GLP-1 receptor activation with high spatiotemporal resolution. *eLife*, 2023, 12: RP86628. [DOI]
- [81] Yang F, Moss LG, Phillips Jr GN. The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat Biotechnol*, 1996, 14(10): 1246–1251. [DOI]
- [82] Ghosh I, Hamilton AD, Regan L. Antiparallel leucine zipper-directed protein reassembly: application to the green fluorescent protein. *J Am Chem Soc*, 2000, 122(23): 5658–5659. [DOI]
- [83] Hu CD, Chinenov Y, Kerppola TK. Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol Cell*, 2002, 9(4): 789–798. [DOI]
- [84] Shyu YJ, Liu H, Deng XH, Hu CD. Identification of new fluorescent protein fragments for bimolecular fluorescence complementation analysis under physiological conditions. *Biotechniques*, 2006, 40(1): 61–66. [DOI]
- [85] Chu J, Zhang ZH, Zheng Y, Yang J, Qin LS, Lu JL, Huang ZL, Zeng SQ, Luo QM. A novel far-red bimolecular fluorescence complementation system that allows for efficient visualization of protein interactions under physiological conditions. *Biosens Bioelectron*, 2009, 25(1): 234–239. [DOI]
- [86] Fan JY, Cui ZQ, Wei HP, Zhang ZP, Zhou YF, Wang YP, Zhang XE. Split mCherry as a new red bimolecular fluorescence complementation system for visualizing protein-protein interactions in living cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 367(1): 47–53. [DOI]
- [87] Jach G, Pesch M, Richter K, Frings S, Uhrig JF. An improved mRFP1 adds red to bimolecular fluorescence complementation. *Nat Methods*, 2006, 3(8): 597–600. [DOI]
- [88] Henderson MX, Trojanowski JQ, Lee VMY. α -Synuclein pathology in Parkinson's disease and related α -synucleinopathies. *Neurosci Lett*, 2019, 709: 134316. [DOI]
- [89] Bae EJ, Lee HJ, Lee SJ. Cell models to study cell-to-cell transmission of α -synuclein. *Methods Mol Biol*, 2016, 1345: 291–298. [DOI]
- [90] Frey B, AlOkda A, Jackson MP, Riguet N, Duce JA, Lashuel HA. Monitoring alpha-synuclein oligomerization and aggregation using bimolecular fluorescence complementation assays: what you see is not always what you get. *J Neurochem*, 2021, 157(4): 872–888. [DOI]
- [91] Tak H, Haque MM, Kim MJ, Lee JH, Baik JH, Kim Y, Kim DJ, Grailhe R, Kim YK. Bimolecular fluorescence complementation; lighting-up tau-tau interaction in living cells. *PLoS One*, 2013, 8(12): e81682. [DOI]
- [92] Shin S, Kim D, Song JY, Jeong H, Hyeon SJ, Kowall NW, Ryu H, Pae AN, Lim S, Kim YK. Visualization of soluble tau oligomers in TauP301L-BiFC transgenic mice demonstrates the progression of tauopathy. *Prog Neurobiol*, 2020, 101782. [DOI]
- [93] Feng SY, Sekine S, Pessino V, Li H, Leonetti MD, Huang B. Improved split fluorescent proteins for endogenous protein labeling. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 370. [DOI]
- [94] To TL, Schepis A, Ruiz-González R, Zhang Q, Yu D, Dong ZQ, Coughlin SR, Shu XK. Rational design of a GFP-based fluorogenic caspase reporter for imaging apoptosis *in vivo*. *Cell Chem Biol*, 2016, 23(7): 875–882. [DOI]
- [95] Cabantous S, Nguyen HB, Pedelacq JD, Koraichi F, Chaudhary A, Ganguly K, Lockard MA, Favre G, Terwilliger TC, Waldo GS. A new protein-protein interaction sensor based on tripartite split-GFP association. *Sci Rep*, 2013, 3: 2854. [DOI]
- [96] Zhang Q, Zheng YW, Coughlin SR, Shu XK. A rapid

- fluorogenic GPCR- β -arrestin interaction assay. *Protein Sci*, 2018, 27(4): 874–879. [DOI]
- [97] Hu CD, Kerppola TK. Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(5): 539–545. [DOI]
- [98] Yin J, Zhu DH, Zhang ZP, Wang W, Fan JY, Men D, Deng JY, Wei HP, Zhang XE, Cui ZQ. Imaging of mRNA-protein interactions in live cells using novel mCherry trimolecular fluorescence complementation systems. *PLoS One*, 2013, 8(11): e80851. [DOI]
- [99] Han Y, Wang SF, Zhang ZP, Ma XH, Li W, Zhang XW, Deng JY, Wei HP, Li ZY, Zhang XE, Cui ZQ. *In vivo* imaging of protein-protein and RNA-protein interactions using novel far-red fluorescence complementation systems. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(13): e103. [DOI]
- [100] Chen M, Sui TT, Yang L, Qian YQ, Liu ZQ, Liu YS, Wang GR, Lai LX, Li ZJ. Live imaging of RNA and RNA splicing in mammalian cells via the dcas13a-SunTag-BiFC system. *Biosens Bioelectron*, 2022, 204: 114074. [DOI]
- [101] Hu H, Yang XJ, Tang C. Visualization of genomic loci in living cells with BiFC-TALE. *Curr Protoc Cell Biol*, 2019, 82(1): e78. [DOI]
- [102] Zhu JQ, He X, Bernard D, Shen JN, Su Y, Wolek A, Issacs B, Mishra N, Tian XC, Garmendia A, Tang Y. Identification of new compounds against PRRSV infection by directly targeting CD163. *J Virol*, 2023, 97(5): e0005423. [DOI]
- [103] Zych C, Domling A, Ayyavoo V. Development of a robust cell-based high-throughput screening assay to identify targets of HIV-1 viral protein R dimerization. *Drug Des Devel Ther*, 2013, 7: 403–412. [DOI]
- [104] Poe JA, Vollmer L, Vogt A, Smithgall TE. Development and validation of a high-content bimolecular fluorescence complementation assay for small-molecule inhibitors of HIV-1 Nef dimerization. *J Biomol Screen*, 2014, 19(4): 556–565. [DOI]
- [105] Xu Y, Liu R, Leu NA, Zhang L, Ibragimova I, Schultz DC, Wang PJ. A cell-based high-content screen identifies isocotoin as a small molecule inhibitor of the meiosis-specific MEIOB-SPATA22 complex†. *Biol Reprod*, 2020, 103(2): 333–342. [DOI]
- [106] Alford SC, Abdelfattah AS, Ding YD, Campbell RE. A fluorogenic red fluorescent protein heterodimer. *Chem Biol*, 2012, 19(3): 353–360. [DOI]
- [107] Alford SC, Ding YD, Simmen T, Campbell RE. Dimerization-dependent green and yellow fluorescent proteins. *ACS Synth Biol*, 2012, 1(12): 569–575. [DOI]
- [108] Miner GE, Smith SY, Showalter WK, So CM, Ragusa JV, Powers AE, Zanellati MC, Hsu CH, Marchan MF, Cohen S. Contact-FP: a dimerization-dependent fluorescent protein toolkit for visualizing membrane contact site dynamics. *Contact (Thousand Oaks)*, 2024, 7: 25152564241228911. [DOI]
- [109] Son S, Nagahama K, Lee J, Jung K, Kwak C, Kim J, Noh YW, Kim E, Lee S, Kwon HB, Heo WD. Real-time visualization of structural dynamics of synapses in live cells *in vivo*. *Nat Methods*, 2024, 21(2): 353–360. [DOI]
- [110] Koh DHZ, Naito T, Na M, Yeap YJ, Rozario P, Zhong FL, Lim KL, Saheki Y. Visualization of accessible cholesterol using a GRAM domain-based biosensor. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 6773. [DOI]
- [111] Ding YD, Li J, Enterina JR, Shen Y, Zhang I, Tewson PH, Mo GCH, Zhang J, Quinn AM, Hughes TE, Maysinger D, Alford SC, Zhang Y, Campbell RE. Ratiometric biosensors based on dimerization-dependent fluorescent protein exchange. *Nat Methods*, 2015, 12(3): 195–198. [DOI]
- [112] Kowski A. Zwischenmolekulare energiewanderung und konzentrationsdepolarisation der fluoreszenz. *Annalen der Physik*, 1961, 463(1–2): 116–119. [DOI]
- [113] Bajar BT, Wang ES, Zhang S, Lin MZ, Chu J. A guide to fluorescent protein FRET pairs. *Sensors (Basel)*, 2016, 16(9): 1488. [DOI]
- [114] Terai K, Imanishi A, Li CJ, Matsuda M. Two decades of genetically encoded biosensors based on förster resonance energy transfer. *Cell Struct Funct*, 2019, 44(2): 153–169. [DOI]
- [115] Miyawaki A. Development of probes for cellular functions using fluorescent proteins and fluorescence resonance energy transfer. *Annu Rev Biochem*, 2011, 80: 357–373. [DOI]
- [116] Kim H, Ju J, Lee HN, Chun H, Seong J. Genetically encoded biosensors based on fluorescent proteins. *Sensors (Basel)*, 2021, 21(3): 795. [DOI]
- [117] O'Connor CL, Anguissola S, Huber HJ, Dussmann H, Prehn JHM, Rehm M. Intracellular signaling dynamics during apoptosis execution in the presence or absence of X-linked-inhibitor-of-apoptosis-protein. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1783(10): 1903–1913. [DOI]
- [118] Hellwig CT, Kohler BF, Lehtivarjo AK, Dussmann H, Courtney MJ, Prehn JHM, Rehm M. Real time analysis of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/cycloheximide-induced Caspase activities during apoptosis initiation. *J Biol Chem*, 2008, 283(31): 21676–21685. [DOI]

- [119] Takemoto K, Nagai T, Miyawaki A, Miura M. Spatio-temporal activation of caspase revealed by indicator that is insensitive to environmental effects. *J Cell Biol*, 2003, 160(2): 235–243. [DOI]
- [120] VanEngelenburg SB, Palmer AE. Fluorescent biosensors of protein function. *Curr Opin Chem Biol*, 2008, 12(1): 60–65. [DOI]
- [121] Grashoff C, Hoffman BD, Brenner MD, Zhou RB, Parsons M, Yang MT, McLean MA, Sligar SG, Chen CS, Ha T, Schwartz MA. Measuring mechanical tension across vinculin reveals regulation of focal adhesion dynamics. *Nature*, 2010, 466(7303): 263–266. [DOI]
- [122] Rothenberg KE, Scott DW, Christoforou N, Hoffman BD. Vinculin force-sensitive dynamics at focal adhesions enable effective directed cell migration. *Biophys J*, 2018, 114(7): 1680–1694. [DOI]
- [123] Boersma AJ, Zuhorn IS, Poolman B. A sensor for quantification of macromolecular crowding in living cells. *Nat Methods*, 2015, 12(3): 227–229, 1 p following 229. [DOI]
- [124] Miyagi T, Yamanaka Y, Harada Y, Narumi S, Hayamizu Y, Kuroda M, Kanekura K. An improved macromolecular crowding sensor CRONOS for detection of crowding changes in membrane-less organelles under stressed conditions. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 583: 29–34. [DOI]
- [125] Zadrán S, Standley S, Wong K, Otiniano E, Amighi A, Baudry M. Fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based biosensors: visualizing cellular dynamics and bioenergetics. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 96(4): 895–902. [DOI]
- [126] Shrestha D, Jenei A, Nagy P, Vereb G, Szöllösi J. Understanding FRET as a research tool for cellular studies. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(4): 6718–6756. [DOI]
- [127] Kogure T, Karasawa S, Araki T, Saito K, Kinjo M, Miyawaki A. A fluorescent variant of a protein from the stony coral *Montipora* facilitates dual-color single-laser fluorescence cross-correlation spectroscopy. *Nat Biotechnol*, 2006, 24(5): 577–581. [DOI]
- [128] Shcherbakova DM, Hink MA, Joosen L, Gadella TWJ, Verkhusha VV. 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. [DOI]
- [129] Shcherbakova DM, Verkhusha VV. Chromophore chemistry of fluorescent proteins controlled by light. *Curr Opin Chem Biol*, 2014, 20: 60–68. [DOI]
- [130] Patterson GH, Lippincott-Schwartz J. A photoactivatable GFP for selective photolabeling of proteins and cells. *Science*, 2002, 297(5588): 1873–1877. [DOI]
- [131] Wiedenmann J, Ivanchenko S, Oswald F, Schmitt F, Röcker C, Salih A, Spindler KD, Nienhaus GU. EosFP, a fluorescent marker protein with UV-inducible green-to-red fluorescence conversion. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(45): 15905–15910. [DOI]
- [132] Ando R, Mizuno H, Miyawaki A. Regulated fast nucleocytoplasmic shuttling observed by reversible protein highlighting. *Science*, 2004, 306(5700): 1370–1373. [DOI]
- [133] Gaytán P, Roldán-Salgado A. Photoactivatable blue fluorescent protein. *ACS Omega*, 2024, 9(26): 28577–28582. [DOI]
- [134] Khan FI, Hassan F, Anwer R, Juan F, Lai D. Comparative analysis of bacteriophytochrome Agp2 and its engineered photoactivatable NIR fluorescent proteins PAiRFP1 and PAiRFP2. *Biomolecules*, 2020, 10(9): 1286. [DOI]
- [135] Ganguly A, Roy S. Imaging diversity in slow axonal transport. *Methods Mol Biol*, 2022, 2431: 163–179. [DOI]
- [136] Boyer NP, Julien JP, Jung P, Brown A. Neurofilament transport is bidirectional *in vivo*. *eNeuro*, 2022, 9(4): ENEURO.0138-22.2022. [DOI]
- [137] Yan XW, Stuurman N, Ribeiro SA, Tanenbaum ME, Horlbeck MA, Liem CR, Jost M, Weissman JS, Vale RD. High-content imaging-based pooled CRISPR screens in mammalian cells. *J Cell Biol*, 2021, 220(2): e202008158. [DOI]
- [138] Betzig E, Patterson GH, Sougrat R, Lindwasser OW, Olenych S, Bonifacino JS, Davidson MW, Lippincott-Schwartz J, Hess HF. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science*, 2006, 313(5793): 1642–1645. [DOI]
- [139] Hess ST, Girirajan TPK, Mason MD. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy. *Biophys J*, 2006, 91(11): 4258–4272. [DOI]
- [140] Zhang MS, Chang H, Zhang YD, Yu JW, Wu LJ, Ji W, Chen JJ, Liu B, Lu JZ, Liu YF, Zhang JL, Xu PY, Xu T. Rational design of true monomeric and bright photoactivatable fluorescent proteins. *Nat Methods*, 2012, 9(7): 727–729. [DOI]
- [141] Marathe P, H S MS, Nair D, Bhattacharyya D. mEosBrite are bright variants of mEos3.2 developed by semirational protein engineering. *J Fluoresc*, 2020, 30(3): 703–715. [DOI]
- [142] Osuga M, Nishimura T, Suetsugu S. Development of a green reversibly photoswitchable variant of Eos fluorescent protein with fixation resistance. *Mol Biol Cell*,

- 2021, 32(21): br7. [DOI]
- [143] Pennacchietti F, Alvelid J, Morales RA, Damenti M, Ollech D, Oliinyk OS, Shcherbakova DM, Villablanca EJ, Verkhusha VV, Testa I. Blue-shift photoconversion of near-infrared fluorescent proteins for labeling and tracking in living cells and organisms. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 8402. [DOI]
- [144] McKinney SA, Murphy CS, Hazelwood KL, Davidson MW, Looger LL. A bright and photostable photoconvertible fluorescent protein. *Nat Methods*, 2009, 6(2): 131–133. [DOI]
- [145] Tomura M. In vivo tracking of dendritic cell migration. *Methods Mol Biol*, 2023, 2618: 39–53. [DOI]
- [146] Tanaka Y, Morozumi A, Hirokawa N. Nodal flow transfers polycystin to determine mouse left-right asymmetry. *Dev Cell*, 2023, 58(16): 1447–1461.e6. [DOI]
- [147] Fosque BF, Sun Y, Dana H, Yang CT, Ohshima T, Tadross MR, Patel R, Zlatić M, Kim DS, Ahrens MB, Jayaraman V, Looger LL, Schreier ER. Neural circuits. labeling of active neural circuits *in vivo* with designed calcium integrators. *Science*, 2015, 347(6223): 755–760. [DOI]
- [148] Hertel F, Mo GCH, Duwé S, Dedekerckx P, Zhang J. RefSOFI for mapping nanoscale organization of protein-protein interactions in living cells. *Cell Rep*, 2016, 14(2): 390–400. [DOI]
- [149] Huang WZ, Huang S, Fang YP, Zhu TY, Chu FY, Liu QH, Yu KQ, Chen F, Dong J, Zeng WB. AI-powered mining of highly customized and superior ESIP-based fluorescent probes. *Adv Sci (Weinh)*, 2024, 11(35): e2405596. [DOI]
- [150] Abramson J, Adler J, Dunger J, Evans R, Green T, Pritzel A, Ronneberger O, Willmore L, Ballard AJ, Bambrick J, Bodenstein SW, Evans DA, Hung CC, O'Neill M, Reiman D, Tunyasuvunakool K, Wu Z, Žemgulytė A, Arvaniti E, Beattie C, Bertolli O, Bridgland A, Cherepanov A, Congreve M, Cowen-Rivers AI, Cowie A, Figurnov M, Fuchs FB, Gladman H, Jain R, Khan YA, Low CMR, Perlin K, Potapenko A, Savy P, Singh S, Stecula A, Thillaisundaram A, Tong C, Yakneen S, Zhong ED, Zielinski M, Židek A, Bapst V, Kohli P, Jaderberg M, Hassabis D, Jumper JM. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature*, 2024, 630(8016): 493–500. [DOI]
- [151] Chan J, Dodani SC, Chang CJ. Reaction-based small-molecule fluorescent probes for chemoselective bioimaging. *Nat Chem*, 2012, 4(12): 973–984. [DOI]
- [152] Jun JV, Chenoweth DM, Petersson EJ. Rational design of small molecule fluorescent probes for biological applications. *Org Biomol Chem*, 2020, 18(30): 5747–5763. [DOI]
- [153] Leake MC, Quinn SD. A guide to small fluorescent probes for single-molecule biophysics. *Chem Phys Rev*, 2023, 4(1): 011302. [DOI]
- [154] Wang X, Ding Q, Groleau RR, Wu LL, Mao YT, Che FD, Kotova O, Scanlan EM, Lewis SE, Li P, Tang B, James TD, Gunnlaugsson T. Fluorescent probes for disease diagnosis. *Chem Rev*, 2024, 124(11): 7106–7164. [DOI]
- [155] Zuo FT, Zhang YQ, Yang HM, Yang Y, Chen XJ. Progress on fluorescent RNA and fluorescent RNA-based biosensing technology. *Hereditas(Beijing)*, 2024, 46(2): 92–108.
左方婷, 张雅强, 杨慧敏, 杨弋, 陈显军. 荧光 RNA 及其生物传感技术研究进展. *遗传*, 2024, 46(2): 92–108. [DOI]
- [156] Berrones Reyes J, Kuimova MK, Vilar R. Metal complexes as optical probes for DNA sensing and imaging. *Curr Opin Chem Biol*, 2021, 61: 179–190. [DOI]
- [157] García de Arquer FP, Talapin DV, Klimov VI, Arakawa Y, Bayer M, Sargent EH. Semiconductor quantum dots: technological progress and future challenges. *Science*, 2021, 373(6555): eaaz8541. [DOI]
- [158] Keefe AD, Pai S, Ellington A. Aptamers as therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, 2010, 9(7): 537–550. [DOI]
- [159] Dunn MR, Jimenez RM, Chaput JC. Analysis of aptamer discovery and technology. *Nat Rev Chem*, 2017, 1: 0076. [DOI]
- [160] Tsao KK, Imai S, Chang M, Hario S, Terai T, Campbell RE. The best of both worlds: chemigenetic fluorescent sensors for biological imaging. *Cell Chem Biol*, 2024, 31(9): 1652–1664. [DOI]
- [161] Saimi D, Chen ZX. Chemical tags and beyond: live-cell protein labeling technologies for modern optical imaging. *Smart Mol*, 2023, 1(2): e20230002. [DOI]

(责任编辑: 李海涛)