



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119978072 A

(43) 申请公布日 2025. 05. 13

(21) 申请号 202311508503.5

(22) 申请日 2023.11.13

(71) 申请人 华东理工大学

地址 200237 上海市徐汇区梅陇路130号

(72) 发明人 杨弋 赵玉政 李写 张秀泽

卢世洁 唐伟韬

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

专利代理师 陶启长

(51) Int. Cl.

C07K 14/00 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

C09K 11/06 (2006.01)

权利要求书2页 说明书24页

序列表(电子公布) 附图6页

(54) 发明名称

一种琥珀酸光学探针及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明涉及一种琥珀酸光学探针及其制备方法和应用。一方面,本发明涉及一种光学探针,包含琥珀酸敏感多肽或其功能变体和光学活性多肽或其功能变体,其中光学活性多肽或其功能变体位于琥珀酸敏感多肽或其功能变体的序列内。本发明也涉及上述探针的制备方法及其在检测琥珀酸中的应用。

1. 一种琥珀酸结合蛋白变体,其:

(1) 具有SEQ ID NO:1所示的序列并且在以下的1个、2个或3个、4个、5个或6个位点具有突变:S154,F155,Y160,N182,V183,S184,所述突变包括氨基酸的修饰、取代或缺失,

(2) 是(1)的具有第65-320位氨基酸的截短变体,或

(3) 是与(1)或(2)的序列具有至少70%序列相同性并具有(1)所述突变并保留对琥珀酸结合能力的序列,

优选地,所述突变的位点选自以下任一组中的1个、2个、3个、4个、5个或6个:S154,F155,Y160,N182,V183,S184;

更优选地,所述突变包括选自以下任一组的位点处的突变:(1)F155和Y160,(2)Y160和N182,(3)Y160、N182和V183,(4)Y160、N182和S184,(5)S154、Y160、N182和S184;

更优选地,所述S154突变为R;F155突变为T、P、Q或C;Y160突变为Y或W;N182突变为S;V183突变为Y或W;S184突变为L;

更优选地,所述突变包含选自以下任一组的突变:(1)F155T和Y160W,(2)F155P和Y160W,(3)F155Q和Y160W,(4)F155C和Y160W,(5)Y160W和N182S,(6)Y160W、N182S和V183Y,(7)Y160W、N182S和V183W,(8)Y160W、N182S和S184L,(9)S154R、Y160W、N182S和S184L。

2. 一种光学探针,包含琥珀酸敏感多肽和光学活性多肽,其中所述光学活性多肽位于琥珀酸敏感多肽的残基108-112、181-185、196-201或148-156之间,所述琥珀酸敏感多肽是琥珀酸结合蛋白或其功能变体,所述光学活性多肽是荧光蛋白或其功能变体,

优选地,所述琥珀酸敏感多肽具有:

(1) SEQ ID NO:1所示的序列或其具有第65-320位氨基酸的截短变体,或与他们有至少70%序列相同性并保留对琥珀酸结合活性的序列,

(2) 权利要求1所述的琥珀酸结合蛋白变体的序列,或

(3) 与(2)所述序列具有至少70%序列相同性并具有(2)所述突变并保留对琥珀酸敏感性的序列,

优选地,所述光学活性多肽具有:

(a) SEQ ID NO:2-9中任一所示的序列,

(b) SEQ ID NO:2所示的序列并且在选自以下的1个、2个或3个、4个、5个或6个位点具有突变:M9,S132,Y141,F201,N207,Y245,所述突变包括氨基酸的修饰、取代或缺失;优选地,所述突变选自以下任意一个或多个:M9T、S132R、Y141N、F201S、N207T和Y245F,或

(c) 与(a)或(b)有至少70%序列相同性并保留荧光蛋白功能的变体序列。

3. 如权利要求2所述的光学探针,其特征在于,所述光学探针包含(2)所述的琥珀酸结合蛋白变体和(b)所述的光学活性多肽,并且包含选自以下任一组的突变:(1)琥珀酸结合蛋白的F155T和Y160W,(2)琥珀酸结合蛋白的F155P和Y160W,(3)琥珀酸结合蛋白的F155Q和Y160W,(4)琥珀酸结合蛋白的F155C和Y160W,(5)琥珀酸结合蛋白的Y160W和N182S,(6)琥珀酸结合蛋白的Y160W、N182S和V183Y,(7)琥珀酸结合蛋白的Y160W、N182S和V183W,(8)琥珀酸结合蛋白的Y160W、N182S和S184L,(9)琥珀酸结合蛋白的S154R、Y160W、N182S和S184L,(10)琥珀酸结合蛋白的Y160W、N182S和S184L,和荧光蛋白的M9T、S132R、Y141N、F201S、N207T和Y245F,(11)琥珀酸结合蛋白的S154R、Y160W、N182S和S184L,和荧光蛋白的M9T、S132R、Y141N、F201S、N207T和Y245F。

4. 如权利要求2或3所述的光学探针,其特征在于,光学活性多肽位于琥珀酸敏感多肽的选自下述位点中的一个或多个:108/109,108/110,108/111,108/112,109/110,109/111,109/112,110/111,110/112,111/112,181/182,181/183,181/184,181/185,182/183,182/184,182/185,183/184,183/185,184/185,196/197,196/198,196/199,196/200,196/201,197/198,197/199,197/200,197/201,198/199,198/200,198/201,199/200,199/201,200/201,148/149,148/150,148/151,148/152,148/153,148/154,148/155,148/156,149/150,149/151,149/152,149/153,149/154,149/155,149/156,150/151,150/152,150/153,150/154,150/155,150/156,151/152,151/153,151/154,151/155,151/156,152/151,152/152,152/153,152/154,152/155,152/156,153/151,153/152,153/153,153/154,153/155,153/156,154/151,154/152,154/153,154/154,154/155,154/156,155/156。

5. 如权利要求4所述的光学探针,其特征在于,所述光学探针具有SEQ ID NO:10-31中任一所示的序列。

6. 一种核酸分子,其包含:(a) 权利要求2-5中任一项所述的光学探针的编码序列,或(b) (a)的互补序列。

7. 核酸构建物,包括权利要求6所述的核酸分子,  
优选地,所述核酸构建物是克隆载体、表达载体或重组载体。

8. 一种宿主细胞,所述宿主细胞:

- (1) 表达权利要求2-5中任一项所述的光学探针;
- (2) 包含权利要求6所述的核酸分子;和/或
- (3) 包含权利要求7所述的核酸构建物。

9. 一种检测试剂盒,其包含:

- (1) 权利要求2-5中任一项所述的光学探针,
- (2) 权利要求6所述的核酸分子,
- (3) 权利要求7所述的核酸构建物,
- (4) 权利要求8所述的宿主细胞,

所述检测试剂盒任选还包含利用光学探针检测琥珀酸所需的其他试剂,

优选地,所述检测试剂盒还包含选自以下的一种或多种试剂:缓冲液、培养基、琥珀酸标准品。

10. 制备权利要求2-5中任一项所述光学探针的方法,包括:培养权利要求8所述的宿主细胞,和由培养物分离所述光学探针。

11. 权利要求2-5中任一项所述的光学探针、权利要求6所述的核酸分子、权利要求7所述的核酸构建物和/或权利要求8所述的宿主细胞在检测样品中的琥珀酸、筛选化合物或琥珀酸细胞内和/或外定位中的应用。

## 一种琥珀酸光学探针及其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及光学探针技术领域,尤其涉及一种琥珀酸光学探针及其制备方法和应用。

### 背景技术

[0002] 琥珀酸是一种重要的天然有机酸,琥珀酸代谢异常与多种疾病息息相关,包括心血管疾病以及肿瘤等。Prag,H.A等人发现琥珀酸以及琥珀酸受体SUCNR1信号轴可作为代谢物感应机制通过生物钟相关的方式调控瘦素的动态,从而控制生物体的能量平衡。

[0003] 现有的对琥珀酸的检测方法包括比色法、液相色谱-质谱联用法、高效液相色谱等。这些检测分析方法或需要专业分析仪器设备,或步骤繁琐,无法区分琥珀酸和黄嘌呤,易出现人为误差,且仅适用于体外检测,无法实时监控活细胞内的琥珀酸浓度变化。因此,亟待开发新的检测方法,实现在细胞内、外,简便、快捷、特异性高的实时定位、定量、高通量检测琥珀酸。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供在细胞内、外实时定位、高通量、定量检测琥珀酸的探针和方法。为了实现上述发明目的,本发明提供以下技术方案:

[0005] 本发明第一方面提供一种琥珀酸结合蛋白变体,其:

[0006] (1) 具有SEQ ID NO:1所示的序列并且在以下的1个、2个或3个、4个、5个或6个位点具有突变:S154,F155,Y160,N182,V183,S184,所述突变包括氨基酸的修饰、取代或缺失,

[0007] (2) 是(1)的具有第65-320位氨基酸的截短变体,或

[0008] (3) 是与(1)或(2)的序列具有至少70%序列相同性并具有(1)所述突变并保留对琥珀酸结合能力的序列。

[0009] 在一个或多个实施方案中,所述突变包括选自以下任意位点处的突变:S154,F155,Y160,N182,V183,S184。

[0010] 在一个或多个实施方案中,所述突变包括选自以下任一组的位点处的突变:(1) F155和Y160,(2) Y160和N182,(3) Y160、N182和V183,(4) Y160、N182和S184,(5) S154、Y160、N182和S184;

[0011] 在一个或多个实施方案中,S154突变为R。在一个或多个实施方案中,F155突变为T、P、Q或C。在一个或多个实施方案中,Y160突变为Y或W。在一个或多个实施方案中,N182突变为S。在一个或多个实施方案中,V183突变为Y或W。在一个或多个实施方案中,S184突变为L。

[0012] 在一个或多个实施方案中,所述突变包含选自以下任一组的突变:(1) F155T和Y160W,(2) F155P和Y160W,(3) F155Q和Y160W,(4) F155C和Y160W,(5) Y160W和N182S,(6) Y160W、N182S和V183Y,(7) Y160W、N182S和V183W,(8) Y160W、N182S和S184L,(9) S154R、Y160W、N182S和S184L。

[0013] 本发明另一方面提供一种琥珀酸光学探针,包含琥珀酸敏感多肽和光学活性多肽,其中光学活性多肽位于琥珀酸敏感多肽的序列内。

[0014] 在一个或多个实施方案中,琥珀酸敏感多肽包括琥珀酸结合蛋白或其功能变体。在一个或多个实施方案中,琥珀酸敏感多肽源自根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*)。

[0015] 在一个或多个实施方案中,琥珀酸敏感多肽具有:

[0016] (1) SEQ ID NO:1所示的序列或其具有第65-320位氨基酸的截短变体,或与他们有至少70%序列相同性并保留对琥珀酸结合活性的序列,

[0017] (2) 本文第一方面任一实施方案所述的琥珀酸结合蛋白变体的序列,或

[0018] (3) 与(2)所述序列具有至少70%序列相同性并具有(2)所述突变并保留对琥珀酸敏感性的序列。

[0019] 在一个或多个实施方案中,光学活性多肽是荧光蛋白或其功能变体。在一个或多个实施方案中,荧光蛋白选自黄色荧光蛋白(如SEQ ID NO:2所示的cpYFP)、橘黄色荧光蛋白(如SEQ ID NO:3所示的cpmOrange)、红色荧光蛋白(如SEQ ID NO:4或8所示的mKate,如SEQ ID NO:5所示的mcherry)、绿色荧光蛋白(如SEQ ID NO:6所示的cpGFP)、蓝色荧光蛋白(如SEQ ID NO:7所示的cpBFP)、苹果红荧光蛋白(如SEQ ID NO:9所示的cpmApple)。优选地,光学活性多肽是cpYFP。在一个或多个实施方案中,荧光蛋白具有SEQ ID NO:2-9中任一所示的序列。

[0020] 在一个或多个实施方案中,荧光蛋白功能变体具有:(1) SEQ ID NO:2所示的序列并且在以下的1个、2个、3个、4个、5个或6个位点具有突变:M9,S132,Y141,F201,N207,Y245,所述突变包括氨基酸的修饰、取代或缺失,氨基酸的编号对应于荧光蛋白的序列,或(2)与(1)的序列具有至少70%序列相同性的序列。在一个或多个实施方案中,荧光蛋白的突变选自以下任意一个或多个:M9T、S132R、Y141N、F201S、N207T和Y245F。在一个或多个实施方案中,荧光蛋白的突变是M9T、S132R、Y141N、F201S、N207T和Y245F。

[0021] 在一个或多个实施方案中,所述光学探针包含本文第一方面任一实施方案所述的琥珀酸结合蛋白变体和上述荧光蛋白功能变体,并且包含选自以下任一组的突变:(1) 琥珀酸结合蛋白的F155T和Y160W,(2) 琥珀酸结合蛋白的F155P和Y160W,(3) 琥珀酸结合蛋白的F155Q和Y160W,(4) 琥珀酸结合蛋白的F155C和Y160W,(5) 琥珀酸结合蛋白的Y160W和N182S,(6) 琥珀酸结合蛋白的Y160W、N182S和V183Y,(7) 琥珀酸结合蛋白的Y160W、N182S和V183W,(8) 琥珀酸结合蛋白的Y160W、N182S和S184L,(9) 琥珀酸结合蛋白的S154R、Y160W、N182S和S184L,(10) 琥珀酸结合蛋白的Y160W、N182S和S184L,和荧光蛋白的M9T、S132R、Y141N、F201S、N207T和Y245F,(11) 琥珀酸结合蛋白的S154R、Y160W、N182S和S184L,和荧光蛋白的M9T、S132R、Y141N、F201S、N207T和Y245F。

[0022] 在一个或多个实施方案中,光学活性多肽位于琥珀酸敏感多肽的残基108-112、181-185、196-201以及148-156之间,编号对应于琥珀酸敏感多肽的全长。优选地,光学活性多肽位于琥珀酸敏感多肽的选自下述位点中的一个或多个:108/109,108/110,108/111,108/112,109/110,109/111,109/112,110/111,110/112,111/112,181/182,181/183,181/184,181/185,182/183,182/184,182/185,183/184,183/185,184/185,196/197,196/198,196/199,196/200,196/201,197/198,197/199,197/200,197/201,198/199,198/200,198/

201,199/200,199/201,200/201,148/149,148/150,148/151,148/152,148/153,148/154,148/155,148/156,149/150,149/151,149/152,149/153,149/154,149/155,149/156,150/151,150/152,150/153,150/154,150/155,150/156,151/152,151/153,151/154,151/155,151/156,152/151,152/152,152/153,152/154,152/155,152/156,153/151,153/152,153/153,153/154,153/155,153/156,154/151,154/152,154/153,154/154,154/155,154/156,155/156。更优选地,光学活性多肽位于琥珀酸敏感多肽的选自下述位点中的任一个或多个:150/152,150/153,150/155,150/156,151/153,152/152,152/153,152/154,153/152,153/153,153/154,154/151,154/152,154/154,181/182。

[0023] 在一个或多个实施方案中,光学探针还包含侧接所述光学活性多肽的一个或多个接头。本发明所述接头可以是任何长度的任何氨基酸序列。在一个或多个实施方案中,光学活性多肽侧翼包含不超过5个氨基酸的接头,例如0、1、2、3、4个氨基酸的接头。在一个或多个实施方案中,光学活性多肽侧翼的接头包含氨基酸Y。在一个或多个实施方案中,接头Y位于光学活性多肽的N端和/或C端。在一个或多个实施方案中,光学探针如下所示:琥珀酸敏感多肽的第一部分B1-Y-光学活性多肽A-琥珀酸敏感多肽的第二部分B2。在一个或多个实施方案中,本发明光学探针不包含接头。

[0024] 在一个或多个实施方案中,本发明光学探针还包含定位序列,用于将探针定位到例如细胞的特定细胞器。

[0025] 在一个或多个实施方案中,光学活性多肽是cpYFP或其变体,其位于琥珀酸敏感多肽的选自下述位点中的任一个或多个:108/110,108/111,108/112,181/182,181/185,182/183,182/185,183/184,148/150,148/153,148/155,149/150,149/151,149/152,149/154,150/152,150/153,150/154,150/155,150/156,151/152,151/153,151/154,151/156,152/151,152/152,152/153,152/154,152/156,153/152,153/153,153/154,153/156,154/151,154/152,154/153,154/154,154/155,155/156,(优选150/152,150/153,150/155,150/156,151/153,152/152,152/153,152/154,153/152,153/153,153/154,154/151,154/152,154/154,181/182),所述琥珀酸敏感多肽(1)如SEQ ID NO:1所示或是其具有第65-320位氨基酸的截短变体,或(2)是本文第一方面任一实施方案所述的琥珀酸结合蛋白变体。优选地,所述琥珀酸结合蛋白变体具有选自以下任一组的突变:(1)F155T和Y160W,(2)F155P和Y160W,(3)F155Q和Y160W,(4)F155C和Y160W,(5)Y160W和N182S,(6)Y160W、N182S和V183Y,(7)Y160W、N182S和V183W,(8)Y160W、N182S和S184L,(9)S154R、Y160W、N182S和S184L。

[0026] 在一个或多个实施方案中,所述cpYFP变体具有SEQ ID NO:2所示的序列并且在以下的1个、2个或3个、4个、5个或6个位点具有突变:M9,S132,Y141,F201,N207,Y245,所述突变包括氨基酸的修饰、取代或缺失。

[0027] 在一个或多个实施方案中,所述cpYFP变体的突变是M9T、S132R、Y141N、F201S、N207T、Y245F。

[0028] 在一个或多个实施方案中,光学活性多肽是cpGFP,其位于琥珀酸敏感多肽的选自下述位点中的任一个或多个:181/182,183/185,184/185,197/198,198/200,198/201,199/200,199/201,200/201,148/152,148/154,148/156,149/150,149/151,149/156,150/151,150/152,150/153,150/155,150/156,151/152,151/153,151/154,151/155,151/156,152/152,152/153,152/154,152/155,152/156,153/151,153/153,153/155,153/156,154/151、

154/154、154/155、154/156、155/156, (优选150/153, 151/152, 152/153, 152/154), 所述琥珀酸敏感多肽(1)如SEQ ID NO:1所示或是其具有第65-320位氨基酸的截短变体, 或(2)是本文第一方面任一实施方案所述的琥珀酸结合蛋白变体。优选地, 所述琥珀酸结合蛋白变体具有选自以下任一组的突变: (1) F155T和Y160W, (2) F155P和Y160W, (3) F155Q和Y160W, (4) F155C和Y160W, (5) Y160W和N182S, (6) Y160W、N182S和V183Y, (7) Y160W、N182S和V183W, (8) Y160W、N182S和S184L, (9) S154R、Y160W、N182S和S184L。

[0029] 在一个或多个实施方案中, 光学活性多肽是cpBFP, 其位于琥珀酸敏感多肽的选自下述位点中的任一个或多个: 108/109、108/110、110/111、110/112、181/185、183/184、183/185、197/201、200/201、148/150、148/151、148/152、148/153、149/151、149/153、149/155、150/151、150/152、150/155、151/152、151/153、151/154、151/156、152/151、152/152、152/154、152/155、152/156、153/151、153/152、153/153、153/156、154/151、154/152、155/156, (优选148/152、148/153、151/153、151/154、152/155、152/156、153/151、154/152), 所述琥珀酸敏感多肽(1)如SEQ ID NO:1所示或是其具有第65-320位氨基酸的截短变体, 或(2)是本文第一方面任一实施方案所述的琥珀酸结合蛋白变体。优选地, 所述琥珀酸结合蛋白变体具有选自以下任一组的突变: (1) F155T和Y160W, (2) F155P和Y160W, (3) F155Q和Y160W, (4) F155C和Y160W, (5) Y160W和N182S, (6) Y160W、N182S和V183Y, (7) Y160W、N182S和V183W, (8) Y160W、N182S和S184L, (9) S154R、Y160W、N182S和S184L。

[0030] 在一个或多个实施方案中, 光学活性多肽是cpmApple, 其位于琥珀酸敏感多肽的选自下述位点中的任一个或多个: 108/109、108/110、110/111、196/201、197/201、199/200、200/201、148/149、148/151、148/155、149/152、149/156、150/155、150/156、151/156、152/154、152/155、152/156、153/151、153/152、153/153、154/152、154/153、154/156, (优选152/154、153/153), 所述琥珀酸敏感多肽(1)如SEQ ID NO:1所示或是其具有第65-320位氨基酸的截短变体, 或(2)是本文第一方面任一实施方案所述的琥珀酸结合蛋白变体。优选地, 所述琥珀酸结合蛋白变体具有选自以下任一组的突变: (1) F155T和Y160W, (2) F155P和Y160W, (3) F155Q和Y160W, (4) F155C和Y160W, (5) Y160W和N182S, (6) Y160W、N182S和V183Y, (7) Y160W、N182S和V183W, (8) Y160W、N182S和S184L, (9) S154R、Y160W、N182S和S184L。

[0031] 在一个或多个实施方案中, 所述光学探针包含氨基酸序列SEQ ID NO:10-31中任一或其变体。在一个或多个实施方案中, 本发明提供的光学探针包含与氨基酸序列SEQ ID NO:10-31中任一有35%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、99%序列相同性的序列。优选地, 本发明提供的光学探针包含与氨基酸序列SEQ ID NO:10-31中任一实质上相似或相同的序列。

[0032] 本发明另一方面还提供融合多肽, 包含本文所述光学探针和其它多肽。在一些实施方式中, 本文所述光学探针还包含与之融合的其它多肽。本文所述其他多肽不影响光学探针的性质。在一些实施方式中, 其他多肽位于所述光学探针的N端和/或C端。在一些实施方式中, 其他多肽包括将光学探针定位到不同细胞器或亚细胞器的多肽、用于纯化的标签或者用于免疫印迹的标签。本文所述融合多肽中的光学探针和其它多肽之间可具有接头。

[0033] 本发明另一方面还提供核酸分子, 其包含: (a) 本文任一实施方案所述的多肽或探针的编码序列, 或(b) (a)的互补序列, 或(c) (a)或(b)的片段。所述片段是引物。

[0034] 在一个或多个实施方案中, 所述核酸序列包含编码SEQ ID NO:25-31中任一所示

氨基酸序列。优选地,所述核酸序列包含核苷酸序列SEQ ID NO:30-31中任一或其变体。更优选地,所述核酸序列包含与核苷酸序列SEQ ID NO:30-31中任一具有99%、95%、90%、80%、70%或50%相同性的序列;或包含与核苷酸序列SEQ ID NO:30-31中任一实质上相似或相同的核苷酸序列。

[0035] 本发明还涉及上述核酸序列的互补序列或其变体,其可包含编码本发明光学探针或融合蛋白的片段、类似物、衍生物、可溶性片段和变体的核酸序列或其互补序列。

[0036] 本发明还提供包含本文所述核酸分子的核酸构建物。该核酸序列编码本发明所述光学探针或融合多肽。

[0037] 在一个或多个实施方案中,所述核酸构建物是克隆载体、表达载体或重组载体。

[0038] 在一个或多个实施方案中,所述核酸分子与表达控制序列操作性连接。

[0039] 在一些实施方案中,表达载体选自原核表达载体、真核表达载体和病毒载体。

[0040] 本发明还提供包含一种宿主细胞,所述宿主细胞:(1)表达本发明任一实施方案所述的光学探针或融合多肽;(2)包含本发明任一实施方案所述的核酸分子;或(3)包含本发明任一实施方案所述的核酸构建物。所述宿主细胞优选大肠杆菌。

[0041] 本发明另一方面还提供琥珀酸检测试剂盒,包括本文所述光学探针或融合多肽或多核苷酸或如本文所述方法制备的光学探针。

[0042] 在一个或多个实施方案中,所述试剂盒还包含选自以下的一种或多种试剂:缓冲液、培养基、琥珀酸标准品。

[0043] 本发明提供制备本文所述光学探针的方法,包括:提供表达本文所述光学探针或融合多肽的宿主细胞,在所述光学探针或融合多肽表达的条件下培养所述宿主细胞,和分离光学探针或融合多肽。

[0044] 在一个或多个实施方案中,制备本文所述琥珀酸光学探针或融合多肽的方法包括以下步骤:1)将编码本文所述琥珀酸光学探针的表达载体转移到宿主细胞中;2)在适合所述表达载体表达的条件下培养所述宿主细胞,3)分离琥珀酸光学探针。

[0045] 本发明还提供检测样品中琥珀酸的方法,包括:使本文所述光学探针或融合多肽或如本文所述方法制备的光学探针或融合多肽与样品接触,和检测光学活性多肽的变化。所述检测可以在体内、体外、亚细胞或原位进行。所述样品例如血液。

[0046] 本文还提供定量样品中琥珀酸的方法,包括:使本文所述光学探针或融合多肽或如本文所述方法制备的光学探针或融合多肽与样品接触,检测光学活性多肽的变化,和根据光学活性多肽的变化定量样品中的琥珀酸。

[0047] 本发明还提供筛选化合物(例如药物)的方法,包括:在含琥珀酸的体系中使本文所述光学探针或融合多肽或如本文所述方法制备的光学探针或融合多肽与候选化合物接触,检测光学活性多肽的变化,和根据光学活性多肽的变化筛选化合物。所述方法可以高通量地筛选化合物。

[0048] 在一个或多个实施方案中,在含琥珀酸的体系中使本文所述宿主细胞与候选化合物接触,并且光学活性多肽的光学变化指示所述候选化合物是否能调节细胞对琥珀酸的摄取。

[0049] 本发明另一方面还提供对所述琥珀酸进行细胞内和/或外定位的方法,包括:将含琥珀酸的体系与所述光学探针或所述宿主细胞接触,和检测光学活性多肽的光学变化。

[0050] 在一个或多个实施方案中,所述体系是溶液体系、细胞体系、亚细胞体系。

[0051] 本发明另一方面还提供本文所述琥珀酸光学探针或融合多肽或宿主细胞在检测样品中的琥珀酸、筛选化合物或琥珀酸细胞内/外定位中的应用。在一个或多个实施方案中,所述定位是实时定位。

[0052] 本发明的有益效果:本发明提供的琥珀酸光学探针易于成熟,荧光动态变化大,特异性好,并且能够通过基因操作的方法在细胞中表达,可在细胞内外实时定位、高通量、定量检测琥珀酸,省去了耗时的处理样品步骤。实验效果表明本申请所提供的琥珀酸光学探针针对琥珀酸的最高响应达到对照的4倍左右,并且可以在细胞浆、线粒体、细胞核和核排阻等亚细胞结构中对细胞进行定位、定性、定量检测,并且可以进行高通量的化合物筛选以及血液中琥珀酸定量检测。

## 附图说明

[0053] 下面结合附图和实施例对本发明作进一步说明。

[0054] 图1为实施例1所述的示例性琥珀酸光学探针的SDS-PAGE图;

[0055] 图2为实施例6所述的示例性琥珀酸光学探针对不同浓度琥珀酸的响应的滴定曲线图;

[0056] 图3为实施例8所述的示例性琥珀酸光学探针对琥珀酸的亲和力;

[0057] 图4为实施例8所述的示例性琥珀酸光学探针对4种琥珀酸类似物的特异性检测的柱状图;

[0058] 图5为实施例9所述的示例性琥珀酸光学探针在哺乳动物细胞中的亚细胞器定位照片;

[0059] 图6为实施例9所述的对示例性琥珀酸光学探针在哺乳动物细胞中对胞浆中的琥珀酸浓度进行动态监测的示意图;

[0060] 图7为实施例10所述的示例性琥珀酸光学探针在活细胞水平进行高通量化合物筛选的点图;

[0061] 图8为实施例11所述的示例性琥珀酸光学探针对小鼠和人血液中的琥珀酸进行定量的柱状图;

## 具体实施方式

[0062] 在给出数值或范围时,本文所用术语“约”指该数值或范围在给定数值或范围的20%以内、10%以内和5%以内。

[0063] 本文所用术语“包含”、“包括”和其等同形式包括“含有”以及“由……组成”的含义,例如“包含”X的组合物可仅由X组成或可含有其它物质,例如X+Y。

[0064] 本文所用术语“琥珀酸敏感多肽”或“琥珀酸响应多肽”指对琥珀酸产生响应的多肽,所述响应包括与敏感多肽的相互作用相关的多肽的化学,生物学,电学或生理学参数的任何响应。响应包括小的变化,例如,多肽的氨基酸或肽片段的方向的变化以及例如多肽的一级,二级或三级结构的变化,包括例如质子化,电化学势和/或构象的变化。“构象”是分子中包含侧基的分子的一级,二级和三级结构的三维排列;当分子的三维结构发生变化时,构象发生变化。构象变化的实例包括从 $\alpha$ -螺旋转变为 $\beta$ -折叠或从 $\beta$ -折叠转变为 $\alpha$ -螺旋。可以

理解的是,只要荧光蛋白部分的荧光被改变,可检测到的改变不需要是构象改变。本文所述琥珀酸敏感多肽还可包括其功能变体。琥珀酸敏感多肽的功能变体包括但不限于可以与琥珀酸相互作用从而发生与亲本琥珀酸敏感多肽相同或相似变化的变体。

[0065] 本文所用术语“光学探针”是指与光学活性多肽融合的琥珀酸敏感多肽,光学活性多肽(例如荧光蛋白)可操作地插入琥珀酸敏感多肽中。发明人发现,当将光学活性多肽融合到琥珀酸敏感多肽例如琥珀酸结合蛋白中时,琥珀酸敏感多肽专一性地对生理浓度的琥珀酸结合后所产生的构象变化会引起光学活性多肽(例如荧光蛋白)的构象变化,进而导致光学活性多肽的光学性质发生改变。借助不同琥珀酸浓度下测定的荧光蛋白的荧光绘制标准曲线,可以检测并分析琥珀酸的存在和/或水平。本发明所述琥珀酸敏感多肽包括但不限于琥珀酸结合蛋白DctBp或与其有90%以上同源性的变体。本发明所述示例性琥珀酸结合蛋白DctBp来源于根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)。示例性DctBp蛋白如SEQ ID NO:1所示,示例性的DctBp蛋白截短变体是SEQ ID NO:1的包含第65-320位氨基酸的片段。当描述本发明光学探针、琥珀酸敏感多肽或琥珀酸结合蛋白时(例如描述插入位点或突变位点时),提及氨基酸残基编号均参考SEQ ID NO:1。

[0066] 基于蛋白质的“光学活性多肽”是具有发射荧光能力的多肽。荧光是光学活性多肽的一种光学性质,其可用作检测本发明的光学探针的响应性的手段。如本文所用,术语“荧光性质”是指适当激发波长下的摩尔消光系数,荧光量子效率,激发光谱或发射光谱的形状,激发波长最大值和发射波长最大值,两个不同波长激发的振幅,两个不同波长的发射振幅比,激发态寿命或荧光各向异性。活性和无活性状态之间的这些性质中的任何一个的可测量的差异足以用于本发明的荧光蛋白底物在活性测定中的效用。可测量的差异可通过确定任何定量荧光性质的量来确定,例如,特定波长处的荧光量或荧光在发射光谱上的积分。优选地,选择蛋白质底物以具有在未激活和活化的构象状态下容易区分的荧光特性。本文所述光学活性多肽还可包括其功能变体。光学活性多肽的功能变体包括但不限于可以发生与亲本光学活性多肽相同或相似荧光性质变化的变体。

[0067] 本文中,“响应倍数”是标准化后的荧光比值。探针的响应倍数越偏离1(不管是变大或者变小),探针对底物响应能力相对对照的变化倍数或者响应能力越大。例如,本实施例通过检测420nm激发528nm发射处荧光强度和485nm激发528nm发射处荧光强度比值的变化(Normalized Ratio<sub>485/420</sub>)来计算响应倍数,具体如下:

[0068] 通过扣除未表达探针蛋白细胞的检测信号值来进行荧光信号值的校正。将平行实验组中的探针检测信号与对照检测信号进行相除来消除pH敏感干扰获得校正数据。

$$[0069] \quad F = F_{\text{sample}} = F_{\text{BLK}}$$

$$[0070] \quad \text{Corrected } F = \frac{F_{\text{sensor}}}{F_{\text{cpYFP}}}$$

$$[0071] \quad \text{Ratio} = \frac{F_{485}}{F_{420}}$$

$$[0072] \quad \text{Corrected ratio} = \frac{\text{Ratio}_{\text{sensor}}}{\text{Ratio}_{\text{cpYFP}}}$$

$$[0073] \quad \text{Normalized Ratio} = \frac{\text{Corrected Ratio (Succinate)}}{\text{Corrected Ratio (Buffer)}}$$

[0074] F表示荧光强度(Fluorescence intensity), $F_{\text{sample}}$ 表示表达荧光探针样品的总的

荧光强度,  $F_{\text{BLK}}$  表示未表达荧光探针样品的背景荧光强度,  $F_{\text{cpYFP}}$  表示作为pH对照的样品的荧光强度。 $F_{485}$  表示荧光蛋白样品的在485nm处激发528nm处发射的荧光强度,  $F_{420}$  表示荧光蛋白样品的在420nm处激发528nm处发射的荧光强度。 $\text{Ratio}_{\text{sensor}}$  表示探针的荧光强度比值,  $\text{Ratio}_{\text{cpYFP}}$  表示对应探针的pH对照荧光蛋白的荧光强度比值。 $\text{Normalized Ratio}_{485/420}$  是探针的变化倍数或者响应的倍。 $\text{Normalized Ratio}_{485/420}$  越偏离1 (不管是变大或者变小) 表示探针的变化倍数或者响应倍数越大。

[0075] “接头”或“连接区”指在本发明多肽、蛋白质或核酸中连接两个部分的氨基酸或核苷酸序列。示例性地, 本发明中琥珀酸敏感多肽与光学活性多肽的连接区氨基端的氨基酸数目选择的是0-3个, 羧基端的氨基酸数目选择的是0-2个; 当重组光学探针作为基本单元与功能蛋白连接时, 可以融合在重组光学探针的氨基酸或羧基端。接头序列可为一个或多个柔性氨基酸组成的短肽链, 如Y。

[0076] 本文所用术语“生色团”、“荧光团”与“荧光蛋白”同义, 指在激发光照射下发出荧光的蛋白质。荧光蛋白作为生物学领域的基础检测手段, 例如生物技术领域常用的绿色荧光蛋白GFP及由该蛋白突变衍生出的环状重排的蓝色荧光蛋白(cpBFP)、环状重排的绿色荧光蛋白(cpGFP)、环状重排的黄色荧光蛋白(cpYFP)等; 还有本技术领域常用的红色荧光蛋白RFP, 及由该蛋白衍生出来的环状重排的蛋白, 如cpmApple, cpmOrange, cpmKate等。示例性荧光蛋白的序列如SEQ ID NO:2-9中任一所示。

[0077] 本发明所述的琥珀酸光学探针包括琥珀酸敏感多肽B, 例如琥珀酸结合蛋白或其变体, 和光学活性多肽A, 例如荧光蛋白。光学活性多肽A插入到琥珀酸敏感多肽B中, 将B分为第一部分B1和第二部分B2, 形成B1-A-B2式的探针结构; 琥珀酸敏感多肽B和琥珀酸相互作用导致光学活性多肽A的光学信号变强。

[0078] 在本发明的光学探针中, 光学活性多肽可以位于琥珀酸敏感多肽的任何位置。在一个或多个实施方案中, 光学活性多肽以N-C方向位于N-C方向的琥珀酸敏感多肽的以下区域: 氨基酸残基108-112, 181-185, 196-201以及148-156区域。示例性地, 光学活性多肽位于琥珀酸结合蛋白的氨基酸序列的108/109, 108/110, 108/111, 108/112, 109/110, 109/111, 109/112, 110/111, 110/112, 111/112, 181/182, 181/183, 181/184, 181/185, 182/183, 182/184, 182/185, 183/184, 183/185, 184/185, 196/197, 196/198, 196/199, 196/200, 196/201, 197/198, 197/199, 197/200, 197/201, 198/199, 198/200, 198/201, 199/200, 199/201, 200/201, 148/149, 148/150, 148/151, 148/152, 148/153, 148/154, 148/155, 148/156, 149/150, 149/151, 149/152, 149/153, 149/154, 149/155, 149/156, 150/151, 150/152, 150/153, 150/154, 150/155, 150/156, 151/152, 151/153, 151/154, 151/155, 151/156, 152/151, 152/152, 152/153, 152/154, 152/155, 152/156, 153/151, 153/152, 153/153, 153/154, 153/155, 153/156, 154/151, 154/152, 154/153, 154/154, 154/155, 154/156, 155/156。处。

[0079] 本文中, 在“X/Y”形式表示的位点中, 光学活性多肽的两端分别具有部分琥珀酸敏感多肽, 其中光学活性多肽的N端为琥珀酸敏感多肽序列的N端起始氨基酸(例如第1位至第65位的任一氨基酸)至第X位氨基酸, 光学活性多肽的C端为琥珀酸敏感多肽序列的第Y位氨基酸至其C端末尾氨基酸(例如第Y位任一氨基酸至第320位氨基酸)。其中, 如果以“X/Y”形式表示的位点中的两个数字是连续的整数, 则表示光学活性多肽位于该数字所述的氨基酸之间, 例如插入位点152/153表示光学活性多肽位于琥珀酸敏感多肽的氨基酸152与153之

间;如果以“X/Y”形式表示的位点中的两个数字不是连续的整数且X小于Y,则表示光学活性多肽置换该数字所示氨基酸之间的氨基酸,例如插入位点150/153表示光学活性多肽置换琥珀酸敏感多肽的氨基酸151-152;如果以“X/Y”形式表示的位点中的X大于或等于Y,则表示位于光学活性多肽的N端的琥珀酸敏感多肽部分至琥珀酸敏感多肽序列的第X位氨基酸终止,而位于光学活性多肽的C端的琥珀酸敏感多肽部分从琥珀酸敏感多肽序列的第Y位氨基酸开始;例如插入位点131/126表示光学活性多肽的N端融合有琥珀酸敏感多肽序列的N端起始氨基酸(例如第1位至第654位的任一氨基酸)至第131位氨基酸,并且光学活性多肽的C端融合有琥珀酸敏感多肽序列的第126位氨基酸至C端末尾氨基酸(例如第320位氨基酸),其示例性的结构为:(琥珀酸敏感多肽序列的第65至131位氨基酸)-(光学活性多肽)-(琥珀酸敏感多肽序列的第126至320位氨基酸)。

[0080] 在一个或多个实施方案中,光学探针从N端至C端依次包含,SEQ ID NO:1的第65-X位残基、SEQ ID NO:2-9中任一项所示的光学活性多肽或其变体、和SEQ ID NO:1的第Y-320位残基,其中,X和Y选自以下任一组:

- [0081] (1) X是108, Y是109,
- [0082] (2) X是108, Y是110,
- [0083] (3) X是108, Y是111,
- [0084] (4) X是108, Y是112,
- [0085] (5) X是109, Y是110,
- [0086] (6) X是109, Y是111,
- [0087] (7) X是109, Y是112,
- [0088] (8) X是110, Y是111,
- [0089] (9) X是110, Y是112,
- [0090] (10) X是111, Y是112,
- [0091] (11) X是181, Y是182,
- [0092] (12) X是181, Y是183,
- [0093] (13) X是181, Y是184,
- [0094] (14) X是181, Y是185,
- [0095] (15) X是182, Y是183,
- [0096] (16) X是182, Y是184,
- [0097] (17) X是182, Y是185,
- [0098] (18) X是183, Y是184,
- [0099] (19) X是183, Y是185,
- [0100] (20) X是184, Y是185,
- [0101] (21) X是196, Y是197,
- [0102] (22) X是196, Y是198,
- [0103] (23) X是196, Y是199,
- [0104] (24) X是196, Y是200,
- [0105] (25) X是196, Y是201,
- [0106] (26) X是197, Y是198,

[0107] (27) X是197, Y是199,  
[0108] (28) X是197, Y是200,  
[0109] (29) X是197, Y是201,  
[0110] (30) X是198, Y是199,  
[0111] (31) X是198, Y是200,  
[0112] (32) X是198, Y是201,  
[0113] (33) X是199, Y是200,  
[0114] (34) X是199, Y是201,  
[0115] (35) X是200, Y是201,  
[0116] (36) X是148, Y是149,  
[0117] (37) X是148, Y是150,  
[0118] (38) X是148, Y是151,  
[0119] (39) X是148, Y是152,  
[0120] (40) X是148, Y是153,  
[0121] (41) X是148, Y是154,  
[0122] (42) X是148, Y是155,  
[0123] (43) X是148, Y是156,  
[0124] (44) X是149, Y是150,  
[0125] (45) X是149, Y是151,  
[0126] (46) X是149, Y是152,  
[0127] (47) X是149, Y是153,  
[0128] (48) X是149, Y是154,  
[0129] (49) X是149, Y是155,  
[0130] (50) X是149, Y是156,  
[0131] (51) X是150, Y是151,  
[0132] (52) X是150, Y是152,  
[0133] (53) X是150, Y是153,  
[0134] (54) X是150, Y是154,  
[0135] (55) X是150, Y是155,  
[0136] (56) X是150, Y是156,  
[0137] (57) X是151, Y是152,  
[0138] (58) X是151, Y是153,  
[0139] (59) X是151, Y是154,  
[0140] (60) X是151, Y是155,  
[0141] (61) X是151, Y是156,  
[0142] (62) X是152, Y是151,  
[0143] (63) X是152, Y是152,  
[0144] (64) X是152, Y是153,  
[0145] (65) X是152, Y是154,

- [0146] (66) X是152, Y是155,  
[0147] (67) X是152, Y是156,  
[0148] (68) X是153, Y是151,  
[0149] (69) X是153, Y是152,  
[0150] (70) X是153, Y是153,  
[0151] (71) X是153, Y是154,  
[0152] (72) X是153, Y是155,  
[0153] (73) X是153, Y是156,  
[0154] (74) X是154, Y是151,  
[0155] (75) X是154, Y是152,  
[0156] (76) X是154, Y是153,  
[0157] (77) X是154, Y是154,  
[0158] (78) X是154, Y是155,  
[0159] (79) X是154, Y是156,  
[0160] (80) X是155, Y是156。

[0161] 优选地, 光学活性多肽位于琥珀酸结合蛋白的氨基酸序列的150/152, 150/153, 150/155, 150/156, 151/153, 152/152, 152/153, 152/154, 153/152, 153/153, 153/154, 154/151, 154/152, 154/154, 181/182处, 如SEQ ID NO:10-24所示。

[0162] 提到某多肽或蛋白时, 本发明所用术语“变体”或“突变体”包括具有所述多肽或蛋白相同功能、但序列不同的变体。多肽或蛋白的变体可包括: 同源序列、保守性变体、等位变体、天然突变体、诱导突变体。这些变体包括但并不限于: 在所述多肽或蛋白的序列中缺失、插入和/或取代一个或多个(通常为1-30个, 较佳地1-20个, 更佳地1-10个, 最佳地1-5个) 氨基酸, 以及在其羧基末端和/或氨基末端添加一个或数个(通常为20个以内, 较佳地为10个以内, 更佳地为5个以内) 氨基酸获得的序列。不希望受理论限制, 氨基酸残基发生改变而不改变多肽或蛋白质的总体构型和功能, 即功能保守突变。例如, 在本领域中, 用性能相近或相似的氨基酸进行取代时, 通常不会改变多肽或蛋白的功能。在本领域中, 性能相似的氨基酸往往指具有相似侧链的氨基酸家族, 在本领域已有明确定义。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、具有酸性侧链的氨基酸(例如天冬氨酸、谷氨酸)、具有不带电荷的极性侧链的氨基酸(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、具有非极性侧链的氨基酸(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、琥珀酸)、具有 $\beta$ -分支侧链的氨基酸(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸) 和具有芳香侧链的氨基酸(例如酪氨酸、苯丙氨酸、琥珀酸、组氨酸)。又比如, 在氨基末端和/或羧基末端添加一个或数个氨基酸通常也不会改变多肽或蛋白的功能。对于许多常见已知非遗传性编码氨基酸的保守氨基酸取代本领域已知。其他非编码氨基酸的保守取代可基于其物理性质与遗传上编码的氨基酸的性质的比较来确定。本领域技术人员公知, 在基因克隆操作中, 常常需要设计合适的酶切位点, 这势必在所表达的多肽或蛋白末端引入了一个或多个不相干的残基, 而这并不影响目的多肽或蛋白的活性。又如为了构建融合蛋白、促进重组蛋白的表达、获得自动分泌到宿主细胞外的重组蛋白、或利于重组蛋白的纯化, 常常需要将一些氨基酸添加至重组蛋白的N-末端、C-末端或该蛋白内的其它合适区

域内,例如,包括但不限于,适合的接头肽、信号肽、前导肽、末端延伸、谷胱甘肽S-转移酶(GST)、麦芽糖E结合蛋白、蛋白A、如6His或Flag的标签,或Xa因子或凝血酶或肠激酶的蛋白水解酶位点。多肽或蛋白的变体可包括:同源序列、保守性变体、等位变体、天然突变体、诱导突变体。这些变体还可包含与所述多肽或蛋白的序列相同性为至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或100%的多肽或蛋白。示例性的DctBp蛋白截短变体是SEQ ID NO:1的包含第65-320位氨基酸的片段,这些片段保留DctBp蛋白与琥珀酸的结合功能,并且不影响其中插入的光学活性多肽响应琥珀酸结合后所产生的光学性质变化。

[0163] 本发明光学探针可包含具有突变的琥珀酸敏感多肽。在SEQ ID NO:1或其截短变体的选自以下的位点具有突变的琥珀酸结合蛋白变体表现出与琥珀酸不同的结合活性:S154,F155,Y160,N182,V183,S184。所述氨基酸突变包括氨基酸的修饰、取代或缺失。在较佳的实施方案中,琥珀酸结合蛋白变体的突变包括选自以下任一组的位点处的突变:(1) F155和Y160,(2) Y160和N182,(3) Y160、N182和V183,(4) Y160、N182和S184,(5) S154、Y160、N182和S184。

[0164] 其中,作为实施例中的示例,在SEQ ID NO:1或其截短变体中,S154突变为R。在一个或多个实施方案中,F155突变为T、P、Q或C。在一个或多个实施方案中,Y160突变为Y或W。在一个或多个实施方案中,N182突变为S。在一个或多个实施方案中,V183突变为Y或W。在一个或多个实施方案中,S184突变为L。

[0165] 在一个或多个实施方案中,所述突变包含选自以下任一组的突变:(1) F155T和Y160W,(2) F155P和Y160W,(3) F155Q和Y160W,(4) F155C和Y160W,(5) Y160W和N182S,(6) Y160W、N182S和V183Y,(7) Y160W、N182S和V183W,(8) Y160W、N182S和S184L,(9) S154R、Y160W、N182S和S184L。本发明提供具有这些突变的琥珀酸结合蛋白变体以及包含此类琥珀酸结合蛋白变体作为琥珀酸敏感多肽的光学探针。

[0166] 本发明光学探针可包含具有突变的光学活性多肽。在一些实施方案中,突变的光学活性多肽具有SEQ ID NO:2所示的序列并且在以下的1个、2个或3个、4个、5个或6个位点具有突变:M9,S132,Y141,F201,N207,Y245,所述突变包括氨基酸的修饰、取代或缺失,在一个或多个实施方案中,所述突变包括选自以下任意位点处的突变:M9,S132,Y141,F201,N207,Y245。具体地,所述突变是M9T、S132R、Y141N、F201S、N207T和Y245F;

[0167] 在一个或多个实施方案中,光学探针包含氨基酸序列SEQ ID NO:10-31中任一或其变体。在一个或多个实施方案中,本发明提供的光学探针包含与氨基酸序列SEQ ID NO:10-31中任一有35%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、99%序列相同性的序列。在优选实施方式中,本发明提供的光学探针包含与氨基酸序列SEQ ID NO:10-31中任一实质上相似或相同的序列。优选地,所述光学探针具有SEQ ID NO:25-31所示的序列;更优选地,所述光学探针具有SEQ ID NO:29-31所示的序列。

[0168] 在一些具体实施方案中,光学探针中的琥珀酸敏感多肽如SEQ ID NO:1的第65-320位氨基酸所示,光学活性多肽如SEQ ID NO:2所示,光学活性多肽位于琥珀酸敏感多肽的150/153位点处,并且琥珀酸敏感多肽具有选自以下中的任一项所示的突变:(1) F155T和Y160W,(2) F155P和Y160W,(3) F155Q和Y160W,(4) F155C和Y160W,(5) Y160W和N182S,(6) Y160W、N182S和V183Y,(7) Y160W、N182S和V183W,(8) Y160W、N182S和S184L,(9) S154R、

Y160W、N182S和S184L;或光学探针具有选自以下中的任一项所示的突变:(10)琥珀酸敏感多肽的Y160W、N182S和S184L,和光学活性多肽的M9T、S132R、Y141N、F201S、N207T和Y245F;(11)琥珀酸敏感多肽的S154R、Y160W、N182S和S184L,和光学活性多肽的M9T、S132R、Y141N、F201S、N207T和Y245F。

[0169] 示例性地,第(1)-(4)项所示的光学探针的氨基酸序列如SEQ ID NO:25所示;第(5)项所示的光学探针的氨基酸序列如SEQ ID NO:26所示;第(6)-(7)项所示的光学探针的氨基酸序列如SEQ ID NO:27所示;第(8)项所示的光学探针的氨基酸序列如SEQ ID NO:28所示;第(9)项所示的光学探针的氨基酸序列如SEQ ID NO:29所示;第(10)项所示的光学探针的氨基酸序列如SEQ ID NO:30所示;第(11)项所示的光学探针的氨基酸序列如SEQ ID NO:31所示。

[0170] 在两种或多种多肽或核酸分子序列中,术语“相同性”或“相同性百分数”指在比较窗口或指定区域上,采用本领域已知方法如序列比较算法,通过手工比对和目测检查来比较和比对最大对应性时,两个或多个序列或子序列相同或其中在指定区域有一定百分数的氨基酸残基或核苷酸相同(例如,60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同)。例如,适合测定序列相同性百分数和序列相似性百分数的优选算法是BLAST和BLAST 2.0算法,分别可参见Altschul等(1977) *Nucleic Acids Res.*25:3389和Altschul等(1990) *J.Mol.Biol.*215:403。

[0171] 本领域技术人员公知,在基因克隆操作中,常常需要设计合适的酶切位点,这势必在所表达的多肽或蛋白末端引入了一个或多个不相干的残基,而这并不影响目的多肽或蛋白的活性。又如为了构建融合蛋白、促进重组蛋白的表达、获得自动分泌到宿主细胞外的重组蛋白、或利于重组蛋白的纯化,常常需要将一些氨基酸添加至重组蛋白的N-末端、C-末端或该蛋白内的其它合适区域内,例如,包括但不限于,适合的接头肽、信号肽、前导肽、末端延伸、谷胱甘肽S-转移酶(GST)、麦芽糖E结合蛋白、蛋白A、如6His或Flag的标签,或Xa因子或凝血酶或胰凝乳蛋白酶的蛋白水解酶位点。

[0172] 本文所用术语“功能变体”、“衍生物”和“类似物”是指基本上保持与原始多肽或蛋白(例如DctBp蛋白或荧光蛋白)相同的生物学功能或活性的蛋白。本发明的多肽或蛋白(例如DctBp蛋白或荧光蛋白)的功能变体、衍生物或类似物可以是(i)有一个或多个保守或非保守性氨基酸残基(优选保守性氨基酸残基)被取代的蛋白,而这样的取代的氨基酸残基可以是也可以不是由遗传密码编码的,或(ii)在一个或多个氨基酸残基中具有取代基团的蛋白,或(iii)成熟蛋白与另一个化合物(比如延长蛋白半衰期的化合物,例如聚乙二醇)融合所形成的蛋白,或(iv)附加的氨基酸序列融合到此蛋白序列而形成的蛋白(如分泌序列或用来纯化此蛋白的序列或蛋白原序列,或与抗原IgG片段的形成的融合蛋白)。根据本文的教导,这些功能变体、衍生物和类似物属于本领域熟练技术人员公知的范围。

[0173] 所述类似物与原始多肽或蛋白的差别可以是氨基酸序列上的差异,也可以是不影响序列的修饰形式上的差异,或者兼而有之。这些蛋白包括天然或诱导的遗传变体。诱导变体可以通过各种技术得到,如通过辐射或暴露于诱变剂而产生随机诱变,还可通过定点诱变法或其他已知分子生物学的技术得到。

[0174] 所述类似物还包括具有不同于天然L-氨基酸的残基(如D-氨基酸)的类似物,以及具有非天然存在的或合成的氨基酸(如 $\beta$ 、 $\gamma$ -氨基酸)的类似物。应理解,本发明的琥珀酸敏

感多肽并不限于上述列举的代表性蛋白、变体、衍生物和类似物。修饰(通常不改变一级结构)形式包括:体内或体外的蛋白的化学衍生形式如乙酰化或羧基化。修饰还包括糖基化,如那些在蛋白的合成和加工中或进一步加工步骤中进行糖基化修饰而产生的蛋白。这种修饰可以通过将蛋白暴露于进行糖基化的酶(如哺乳动物的糖基化酶或去糖基化酶)而完成。修饰形式还包括具有磷酸化氨基酸残基(如磷酸酪氨酸,磷酸丝氨酸,磷酸苏氨酸)的序列。还包括被修饰从而提高了其抗蛋白水解性能或优化了溶解性能的蛋白。

[0175] 本发明融合多肽包含本文所述光学探针和其它多肽。在一些实施方案中,本文所述光学探针还包含与之融合的其他多肽。本文所述其他多肽不影响光学探针的性质。其他多肽可位于所述光学探针的N端和/或C端。在一些实施方案中,其他多肽包括将光学探针定位到不同细胞器或亚细胞器的多肽、用于纯化的标签或者用于免疫印迹的标签。本文所述融合多肽中的光学探针和其它多肽之间可具有接头。

[0176] 本文所述亚细胞器包括细胞浆、线粒体、细胞核、内质网、细胞膜、高尔基体、溶酶体和过氧化物酶体等。在一些实施方案中,用于纯化的标签或者用于免疫印迹的标签包括6组氨酸(6\*His)、谷胱甘肽硫转移酶(GST)、Flag。

[0177] 本发明还提供了上述琥珀酸光学探针的制备方法,包括以下步骤:1)将编码本文所述琥珀酸光学探针的核酸序列纳入表达载体;2)将表达载体转移到宿主细胞中;2)在适合所述表达载体表达的条件下培养所述宿主细胞,3)分离琥珀酸光学探针。

[0178] 本发明所用术语“核酸”或“核苷酸”可以是DNA形式或RNA形式。DNA形式包括cDNA、基因组DNA或人工合成的DNA。DNA可以是单链的或是双链的。DNA可以是编码链或非编码链。提到核酸时,本文所用术语“变体”可以是天然发生的等位变体或非天然发生的变体。这些核苷酸变体包括简并变体、取代变体、缺失变体和插入变体。如本领域所知的,等位变体是一个核酸的替换形式,它可能是一个或多个核苷酸的取代、缺失或插入,但不会从实质上改变其编码的蛋白的功能。本发明核酸可包含与所述核酸序列的序列相同性为至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或100%的核苷酸序列。本发明还涉及与上述的序列杂交的核酸片段。如本文所用,“核酸片段”的长度至少含15个核苷酸,较好是至少30个核苷酸,更好是至少50个核苷酸,最好是至少100个核苷酸以上。核酸片段可用于核酸的扩增技术(如PCR)。

[0179] 本发明光学探针或融合蛋白的全长序列或其片段通常可以用PCR扩增法、人工合成法或重组法获得。对于PCR扩增法,可根据本发明所公开的核苷酸序列设计引物,并用市售的cDNA库或按本领域技术人员已知的常规方法所制备的cDNA库作为模板,扩增而得有关序列。当核苷酸序列大于2500bp时,优选的进行2~6次PCR扩增,然后将各次扩增的片段按正确次序拼接在一起。本发明对所述的PCR扩增的程序和体系没有特殊限定,采用本领域常规的PCR扩增程序和体系即可。还可以用重组法来大批量地获得有关序列。这通常是将其克隆入载体,再转入细胞,然后通过常规方法从增殖后的宿主细胞中分离和纯化得到有关多肽或蛋白。此外,还可用人工合成的方法来合成有关序列,尤其是片段长度较短时。在本发明中,在光学探针的核苷酸序列小于2500bp时,可采用人工合成方法来合成。所述人工合成方法为本领域常规的DNA的人工合成方法,无其他特殊要求。通常,通过先合成多个小片段,然后再进行连接可获得序列很长的片段。目前,已经可以完全通过化学合成来得到编码本发明蛋白(或其功能变体、衍生物或类似物)的DNA序列。然后可将该DNA序列引入本领域中

已知的各种现有的DNA分子(如载体)和细胞中。可通过突变PCR或化学合成等方法将突变引入本发明蛋白序列中。

[0180] 本发明在获得编码光学探针的核苷酸序列后,将编码所述光学探针的核苷酸序列纳入表达载体,得到重组表达载体。本文所用的术语“表达载体”和“重组载体”可互换使用,指本领域熟知的原核或真核载体,例如细菌质粒、噬菌体、酵母质粒、植物细胞病毒、哺乳动物细胞病毒如腺病毒、逆转录病毒或其他载体,这些载体能够在宿主体内复制和稳定表达,这些重组载体的一个重要特征是通常含有表达控制序列。本文所用术语“表达控制序列”指调控目的基因的转录、翻译和表达的可以与目的基因操作性连接的元件,可以是复制起点、启动子、标记基因或翻译控制元件,包括增强子、操纵子、终止子、核糖体结合位点等,表达控制序列的选择取决于所用的宿主细胞。在本发明中适用的重组载体包括但不限于细菌质粒。在重组表达载体中,“操作性连接”是指目的的核苷酸序列与调节序列以允许核苷酸序列表达的方式连接。本领域的技术人员熟知能用于构建含本发明融合蛋白编码序列和合适的转录/翻译控制信号的表达载体的方法。这些方法包括体外重组DNA技术、DNA合成技术、体内重组技术等。所述的DNA序列可有效连接到表达载体中的适当启动子上,以指导mRNA合成。这些启动子的代表性例子有:大肠杆菌的lac或trp启动子; $\lambda$ 噬菌体PL启动子;真核启动子包括CMV立即早期启动子、HSV胸苷激酶启动子、早期和晚期SV40启动子、反转录病毒的LTR和其他一些已知的可控制基因在原核或真核细胞或其病毒中表达的启动子。表达载体还包括翻译起始用的核糖体结合位点和转录终止子。在一个或多个实施方案中,表达载体可采用市售的pCDF载体,无其他特殊要求。示例性地,采用HindIII和XhoI分别对编码所述光学探针的核苷酸序列和表达载体进行双酶切,然后将二者的酶切产物连接得到重组表达载体。本发明对酶切和连接的具体步骤和参数没有特殊限定,采用本领域常规的步骤和参数即可。

[0181] 在获得重组表达载体后,将该载体转化到宿主细胞中,以产生包括融合蛋白的蛋白或肽。此种转移过程可用转化或转染等本领域技术人员熟知的常规技术进行。本发明所述的宿主细胞是指能够接收和容纳重组DNA分子的细胞,是重组基因扩增的场所,理想的受体细胞应该满足易于获取和增殖两个条件。本发明的“宿主细胞”可包括原核细胞和真核细胞,具体包括细菌细胞、酵母细胞、昆虫细胞和哺乳动物细胞。具体的可为大肠杆菌,链霉菌属,鼠伤寒沙门氏菌的细菌细胞,真菌细胞如酵母,植物细胞,果蝇S2或Sf9的昆虫细胞,CHO、COS、HEK293、HEK293细胞、或Bowes黑素瘤细胞的动物细胞等,其中包括但不限于上述的那些宿主细胞。所述宿主细胞优选各种利于基因产物表达或发酵生产的细胞,此类细胞已为本领域熟知并常用。在本发明实施例中所用的示例性宿主细胞为大肠杆菌BL21-DE3菌株。本领域一般技术人员都清楚如何选择适当的载体、启动子、增强子和宿主细胞。

[0182] 本发明所述的转移到宿主细胞的方法为本领域常规的方法,包括磷酸钙或氯化钙共沉淀、DEAE-甘露聚糖-介导的转染、脂转染、天然感受态、化学介导的转移或电穿孔。当宿主为原核生物如大肠杆菌时,所述方法优选的为 $\text{CaCl}_2$ 法或 $\text{MgCl}_2$ 法处理,所用的步骤为本领域公知。当宿主细胞是真核细胞时,可选用如下的DNA转染方法:磷酸钙共沉淀法,常规机械方法如显微注射、电穿孔、脂质体包装等。

[0183] 本发明在将表达载体转入宿主细胞后,对转入表达载体的宿主细胞进行扩增表达培养,分离得到琥珀酸光学探针。所述宿主细胞扩增表达培养采用常规的方法即可。根据所

用的宿主细胞种类,培养中所用的培养基可以是各种常规培养基。在适于宿主细胞生长的条件下进行培养。

[0184] 在本发明中,光学探针在细胞内、细胞膜上表达、或分泌到细胞外。如果需要,可利用其物理的、化学的和其它特性通过各种分离方法分离或纯化重组的蛋白。本发明对分离所述琥珀酸荧光蛋白的方法没有特殊限定,采用本领域常规的融合蛋白的分离方法即可。这些方法是本领域技术人员所熟知的,包括但不限于:常规的复性处理、盐析方法、离心、渗透破菌、超声处理、超离心、分子筛层析、吸附层析、离子交换层析、高效液相层析(HPLC)和其它各种液相层析技术及这些方法的结合。在一个或多个实施方案中,利用His标签的亲层析法进行光学探针的分离。

[0185] 本发明还提供了所述琥珀酸光学探针在琥珀酸实时定位、定量检测以及高通量化合物筛选中的应用。在一个方面,所述的琥珀酸光学探针优选与细胞不同部位的信号肽连接,转入到细胞中,通过检测细胞中荧光信号的强弱,进行琥珀酸的实时定位;通过琥珀酸标准滴加曲线进行相应琥珀酸的定量检测。本发明所述的琥珀酸标准滴加曲线是根据琥珀酸光学探针在不同浓度琥珀酸的情况下的荧光信号绘制而成。本发明所述琥珀酸光学探针直接转入细胞中,在琥珀酸实时定位和定量检测过程中,不需要耗时的样品处理过程,更加准确。本发明琥珀酸光学探针在进行高通量化合物筛选时,将不同的化合物添加到细胞培养液中,测定琥珀酸含量的变化,从而筛选出对琥珀酸含量变化有影响的化合物。在本发明中所述的琥珀酸光学探针在琥珀酸实时定位、定量检测以及高通量化合物筛选中的应用,均是非诊断和治疗目的,不涉及疾病的诊断和治疗。

[0186] 在本文中,浓度、含量、百分数和其它数值均可用范围的形式表示。也应理解,使用这种范围形式只是为了方便和简洁,应该被弹性地解读为包括范围上下限所明确提及的数值,还应包括该范围内包括的所有单个数值或子范围。

[0187] 实施例

[0188] 下面结合实施例对本发明提供的琥珀酸光学探针进行详细的说明,但是不能把它们理解为对本发明保护范围的限定。

[0189] I. 实验材料和试剂

[0190] 实施例中主要采用常规的基因工程分子生物学克隆方法和细胞培养以及成像方法等,这些方法是本领域普通技术人员所熟知的,例如:简·罗斯凯姆斯等的《分子生物学实验参考手册》,J. 萨姆布鲁克,D.W. 拉塞尔著,黄培堂等译:《分子克隆实验指南》(第三版,2002年8月,科学出版社出版,北京);费雷谢尼等的《动物细胞培养:基本技术指南》(第五版),章静波,徐存拴等译;J.S. 博尼费斯农,M. 达索等的《精编细胞生物学实验指南》,章静波等译。

[0191] 实施例中所用的基于pCDF-cpYFP, pCDF-琥珀酸结合蛋白质粒由华东理工大学蛋白质实验室构建, pCDF质粒载体购自Invitrogen公司。所有用于PCR的引物均由上海捷瑞生物工程有限公司和华大基因合成、纯化和经质谱法鉴定正确。实施例中构建的表达质粒都经过序列测定,序列测定由华大基因公司和杰李测序公司完成。各实施例所用的Taq DNA聚合酶购自东盛生物, pfu DNA聚合酶购自天根生化科技(北京)有限公司, primeSTAR DNA聚合酶购自TaKaRa公司, 三种聚合酶购买时都附带赠送对应聚合酶缓冲液和dNTPs。 BamHI、BglIII、HindIII、NdeI、XhoI、EcoRI、SpeI等限制性内切酶、T4连接酶、T4磷酸化酶(T4

PNK) 购自Fermentas公司, 购买时附带有相对应的缓冲液等。转染试剂Lip2000 Kit购于Invitrogen公司。琥珀酸等化合物均购自Sigma公司。除非特别声明, 无机盐类等化学试剂均购自Sigma-Aldrich公司。HEPES盐, 氨苄青霉素 (Amp) 和嘌呤霉素购自Ameresco公司。96孔检测黑板、384孔荧光检测黑板购自Grenier公司。

[0192] 实施例中所用的DNA纯化试剂盒购自BBI公司(加拿大), 普通质粒小抽试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。克隆菌株Mach1购自Invitrogen公司。镍柱亲和层析柱和脱盐柱填料均来自GE healthcare公司。

[0193] 实施例中所用的主要仪器包括: Biotek Synergy 2多功能酶标仪(美国Bio-Tek公司), X-15R高速冷冻离心机(美国Beckman公司), Microfuge22R台式高速冷冻离心机(美国Beckman公司), PCR扩增仪(德国Biometra公司), 超声破碎仪(宁波新芝公司), 核酸电泳仪(申能博彩公司), 荧光分光光度计(美国Varian公司), CO<sub>2</sub>恒温细胞培养箱(SANYO), 倒置荧光显微镜(日本尼康公司)。

[0194] II. 分子生物学方法和细胞实验方法

[0195] II.1 聚合酶链式反应(PCR):

[0196] 1. 目的片段扩增PCR:

[0197] 该方法主要用于基因片段扩增和菌落PCR鉴定阳性克隆。所述PCR扩增的反应体系如下: 模板序列0.5-1 $\mu$ L, 正向引物(25 $\mu$ M) 0.5 $\mu$ L, 反向引物(25 $\mu$ M) 0.5 $\mu$ L, 10 $\times$  pfu缓冲液5 $\mu$ L, pfu DNA聚合酶0.5 $\mu$ L, dNTP(10mM) 1 $\mu$ L, 灭菌超纯水(ddH<sub>2</sub>O) 41.5-42 $\mu$ L, 总体积50 $\mu$ L。PCR扩增程序如下: 95 $^{\circ}$ C变性2-10分钟, 30轮循环(94-96 $^{\circ}$ C持续30-45秒, 50-65 $^{\circ}$ C持续30-45秒, 72 $^{\circ}$ C持续一定时间(600bp/min)), 72 $^{\circ}$ C延伸10分钟。

[0198] 2. 长片段(>2500bp) 扩增PCR:

[0199] 本发明中使用的长片段扩增, 主要是反向PCR扩增载体, 在下述实施例中用于获得定点突变的一种技术。在变异部位设计反向PCR引物, 其中一条引物的5'端包含变异的核苷酸序列。扩增后的产物就含有相应的突变位点。长片段扩增PCR反应体系如下: 模板序列(10pg-1ng) 1 $\mu$ L, 正向引物(25 $\mu$ M) 0.5 $\mu$ L, 反向引物(25 $\mu$ M) 0.5 $\mu$ L, 5 $\times$ PrimerSTAR缓冲液10 $\mu$ L, PrimerSTAR DNA聚合酶0.5 $\mu$ L, dNTP(2.5mM) 4 $\mu$ L, 灭菌超纯水(ddH<sub>2</sub>O) 33.5 $\mu$ L, 总体积50 $\mu$ L。PCR扩增程序如下: 95 $^{\circ}$ C变性5分钟, 30轮循环(98 $^{\circ}$ C持续10秒, 50-68 $^{\circ}$ C持续5-15秒, 72 $^{\circ}$ C持续一定时间(1000bp/min)), 72 $^{\circ}$ C延伸10分钟; 或者95 $^{\circ}$ C变性5分钟, 30轮循环(98 $^{\circ}$ C持续10秒, 68 $^{\circ}$ C持续一定时间(1000bp/min)), 72 $^{\circ}$ C延伸10分钟。

[0200] II.2 核酸内切酶酶切反应:

[0201] 对质粒载体进行双酶切的体系如下: 质粒载体20 $\mu$ L(约1.5 $\mu$ g), 10 $\times$ 缓冲液5 $\mu$ L, 限制性内切酶1为1-2 $\mu$ L, 限制性内切酶2为1-2 $\mu$ L, 用灭菌超纯水补至总体积50 $\mu$ L。反应条件37 $^{\circ}$ C, 1-7小时。

[0202] II.3 DNA片段5'端磷酸化反应

[0203] 从微生物中抽提出的质粒或者基因组末端都含有磷酸基团, 而PCR产物没有, 故需对PCR产物的5'端碱基进行磷酸基团加成反应, 只有末端含有磷酸基团DNA分子才能发生连接反应。磷酸化反应体系如下: PCR产物片段DNA序列5-8 $\mu$ L, 10 $\times$ T4连接酶缓冲液1 $\mu$ L, T4多聚核苷酸激酶(T4 PNK) 1 $\mu$ L, 灭菌超纯水0-3 $\mu$ L, 总体积10 $\mu$ L。反应条件37 $^{\circ}$ C, 30分钟-2小时后72 $^{\circ}$ C灭活20分钟。

[0204] II.4目的片段和载体的连接反应

[0205] 不同的片段和载体之间的连接方法有所差异,本发明中使用了三种连接方法

[0206] 1.平末端短片段和线性化载体的平末端连接

[0207] 该方法的原理是PCR获得的平末端产物在T4 PNK作用下对DNA片段的5'末端进行磷酸化反应后,与线性化的载体在PEG4000和T4 DNA连接酶的作用下连接获得重组质粒。同源重组连接体系如下:T4 PNK处理的DNA片段4 $\mu$ L,线性化载体片段4 $\mu$ L,PEG4000 1 $\mu$ L,10 $\times$ T4连接酶缓冲液1 $\mu$ L,T4 DNA连接酶1 $\mu$ L,总计10 $\mu$ L。反应条件22 $^{\circ}$ C,30分钟。

[0208] 2.含有粘性末端的DNA片段和含有粘性末端载体片段的连接

[0209] 通过限制性内切酶切割的DNA片段通常会产生突出的粘性末端,因此可以和含有序列互补的粘性末端载体片段连接,形成重组质粒。连接反应体系如下:酶切后的PCR产物片段DNA 1-7 $\mu$ L,酶切后的质粒0.5-7 $\mu$ L,10 $\times$ T4连接酶缓冲液1 $\mu$ L,T4DNA连接酶1 $\mu$ L,灭菌超纯水补至总体积10 $\mu$ L。反应条件16 $^{\circ}$ C,4-8小时。

[0210] 3.反向PCR引入定点突变后5'端磷酸化的DNA片段产物自身环化的连接反应

[0211] 将5'端磷酸化的DNA片段通过自身环化连接反应将线性化载体的3'端和5'端连接反应得到重组质粒。自身环化连接反应体系如下:磷酸化反应体系10 $\mu$ L,T4连接酶(5U/ $\mu$ L)0.5 $\mu$ L,总体积10.5 $\mu$ L。反应条件16 $^{\circ}$ C,4-16小时。

[0212] II.5感受态细胞的制备与转化

[0213] 感受态细胞的制备:

[0214] 1.挑取单菌落(如Mach1)接种于5mL LB培养基中,37 $^{\circ}$ C摇床过夜。

[0215] 2.取0.5-1mL过夜培养的菌液转种到50mL LB培养基中,37 $^{\circ}$ C,220rpm培养3至5小时,直到OD<sub>600</sub>达到0.5。

[0216] 3.冰浴预冷细胞2小时。

[0217] 4.4 $^{\circ}$ C,4000rpm离心10分钟。

[0218] 5.弃上清,用5mL预冷的缓冲液重悬细胞,待均匀后再加入重悬缓冲液至终体积为50mL。

[0219] 6.冰浴45分钟。

[0220] 7.4 $^{\circ}$ C 4000rpm离心10分钟,用5mL冰预冷的储存缓冲液重悬细菌。

[0221] 8.每个EP管中放100 $\mu$ L菌液,-80 $^{\circ}$ C或液氮冻存。

[0222] 重悬缓冲液:CaCl<sub>2</sub>(100mM)、MgCl<sub>2</sub>(70mM)、NaAc(40mM)

[0223] 储存缓冲液:0.5mL DMSO、1.9mL 80%甘油、1mL 10 $\times$ CaCl<sub>2</sub>(1M)、1mL10 $\times$ MgCl<sub>2</sub>(700mM)、1mL 10 $\times$ NaAc(400mM)、4.6mL ddH<sub>2</sub>O

[0224] 感受态细胞的转化:

[0225] 1.取100 $\mu$ L感受态细胞于冰浴上融化。

[0226] 2.加入适当体积的连接产物,轻轻吹打混匀,冰浴30分钟。通常加入的连接产物的体积少于感受态细胞体积的1/10。

[0227] 3.将菌液放入42 $^{\circ}$ C水浴中热激90秒,迅速转移至冰浴中放置5分钟。

[0228] 4.加入500 $\mu$ L LB,于37 $^{\circ}$ C恒温摇床上200rpm培养1小时。

[0229] 5.将菌液4000rpm离心3分钟,留200 $\mu$ L上清将菌体吹匀,均匀涂布于含适当抗生素的琼脂平板表面,平板于37 $^{\circ}$ C恒温培养箱内倒置过夜。

[0230] II.6蛋白质的表达,纯化和荧光检测

[0231] 1.将表达载体(例如以pCDF为基础的琥珀酸光学探针表达载体)转化到BL21(DE3)细胞中,倒置培养过夜,从平板上挑取克隆到250ml锥形瓶中,置于37℃摇床,220rpm培养至OD=0.4-0.8,加入1/1000(v/v)的IPTG(1M),18℃诱导表达24-36小时。

[0232] 2.诱导表达完成后,4000rpm,30分钟离心收菌,加入50mM的磷酸盐缓冲液重悬菌体沉淀,超声破碎至菌体澄清。9600rpm,4℃离心20分钟。

[0233] 3.离心上清通过自装的镍柱亲和层析柱纯化获得蛋白,镍柱亲和层析后的蛋白再通过自装的脱盐柱获得溶解在100mM HEPES缓冲液(pH 7.4)中的蛋白。

[0234] 4.纯化的蛋白经过SDS-PAGE鉴定后,使用测定缓冲液(100mM HEPES,100mM NaCl,pH 7.4)稀释探针成终浓度为0.2-5μM的蛋白溶液。用测定缓冲液(100mM HEPES,100mM NaCl,pH 7.4)将琥珀酸配制成终浓度为50mM的储液。

[0235] 5.取100μl 1μM的蛋白溶液,37℃温育10分钟,加入琥珀酸滴定,测定蛋白的420nm光激发后528nm发射和485nm光激发后528nm发射的荧光强度。对样品的荧光激发、发射测定利用多功能荧光酶标仪完成。

[0236] 6.取100μl 1μM的蛋白溶液,37℃温育10分钟,加入琥珀酸,测定蛋白的吸收光谱和荧光光谱。对样品的吸收光谱和荧光光谱的测定通过分光光度计和荧光分光光度计完成。

[0237] II.7哺乳动物细胞的转染和荧光检测

[0238] 1.将pCDNA3.1+为基础的琥珀酸光学探针质粒通过转染试剂Lipofectamine2000(Invitrogen)转染到HEK293中,置于37℃,5% CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中培养。待外源基因充分表达24~36h后进行荧光检测。

[0239] 2.诱导表达完成后,将贴壁的HEK293细胞,用PBS冲洗三次,置于HBSS溶液中分别进行荧光显微镜和酶标仪检测。

[0240] 实施例1:琥珀酸结合蛋白质粒

[0241] 通过PCR扩增大肠杆菌基因中的DctBp(65-320)基因,PCR产物凝胶电泳后回收后用BamHI和XhoI酶切,同时对pCDF载体进行相应的双酶切。用T4 DNA连接酶连接后,用产物转化DH5α,转化的DH5α涂布于LB平板(链霉素100μg/mL),置于37℃培养过夜。将生长DH5α转化子进行质粒抽提后,进行PCR鉴定。阳性质粒经过测序正确后进行后续的质粒构建。

[0242] 实施例2:不同插入位点的cpYFP光学探针的表达和检测

[0243] 本实施例中,以pCDF-DctBp为基础选择下述位点插入cpYFP,得到相应pCDF-DctBp-cpYFP质粒:108/109,108/110,108/111,108/112,109/110,109/111,109/112,110/111,110/112,111/112,181/182,181/183,181/184,181/185,182/183,182/184,182/185,183/184,183/185,184/185,196/197,196/198,196/199,196/200,196/201,197/198,197/199,197/200,197/201,198/199,198/200,198/201,199/200,199/201,200/201,148/149,148/150,148/151,148/152,148/153,148/154,148/155,148/156,149/150,149/151,149/152,149/153,149/154,149/155,149/156,150/151,150/152,150/153,150/154,150/155,150/156,151/152,151/153,151/154,151/155,151/156,152/151,152/152,152/153,152/154,152/155,152/156,153/151,153/152,153/153,153/154,153/155,153/156,154/151,154/152,154/153,154/154,154/155,154/156,155/156。

[0244] 利用PCR技术扩增获得cpYFP的DNA片段,和pCDF-DctBp线性化载体,其5'和3'最末端分别带有和cpYFP两末端对应的完全一致的序列(15bp~20bp)。将线性化的pCDF-DctBp和cpYFP片段在Hieff Clone Enzyme的作用下发生同源重组。产物转化DH5 $\alpha$ ,转化的DH5 $\alpha$ 涂布于LB平板(链霉素100ug/mL),置于37℃培养过夜。PCR鉴定的阳性克隆抽质粒后测序。由杰李测序公司完成测序。

[0245] 经过测序正确后,将重组质粒转化到BL21(DE3)中诱导表达,并纯化蛋白质,通过SDS-PAGE电泳大小在57Kda附近。该大小符合pCDF-DctBp-cpYFP表达出的含His-tag纯化标签的DctBp-cpYFP融合蛋白质的大小。结果如图1所示。

[0246] 用表达DctBp-cpYFP融合蛋白质的大肠杆菌的破碎上清进行琥珀酸响应筛选,将含有琥珀酸的融合荧光蛋白质的检测信号除以无琥珀酸的融合荧光蛋白质的检测信号。结果如表1所示,检测结果显示:

[0247] 对琥珀酸响应超过1.1倍或低于0.9倍的光学探针有:108/110、108/111、108/112、181/182、181/185、182/183、182/185、183/184、148/150、148/153、148/155、149/150、149/151、149/152、149/154、150/152、150/153、150/154、150/155、150/156、151/152、151/153、151/154、151/156、152/151、152/152、152/153、152/154、152/156、153/152、153/153、153/154、153/156、154/151、154/152、154/153、154/154、154/155、155/156;

[0248] 对琥珀酸响应超过2倍的光学探针有15个,在150/152,150/153,150/155,150/156,151/153,152/152,152/153,152/154,153/152,153/153,153/154,154/151,154/152,154/154,181/182位点。

[0249] 表1

[0250]

| 插入位点    | 变化倍数 | 插入位点    | 变化倍数 | 插入位点    | 变化倍数 | 插入位点    | 变化倍数 | 插入位点    | 变化倍数 |
|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|
| 108/109 | 1.09 | 182/185 | 1.80 | 199/200 | 1.02 | 149/155 | 0.95 | 152/154 | 3.98 |
| 108/110 | 1.10 | 183/184 | 1.40 | 199/201 | 1.01 | 149/156 | 0.95 | 152/155 | 1.08 |
| 108/111 | 1.18 | 183/185 | 0.99 | 200/201 | 1.05 | 150/151 | 1.03 | 152/156 | 1.10 |
| 108/112 | 1.19 | 184/185 | 0.98 | 148/149 | 0.95 | 150/152 | 2.59 | 153/151 | 1.01 |
| 109/110 | 1.03 | 196/197 | 1.01 | 148/150 | 1.15 | 150/153 | 3.32 | 153/152 | 5.92 |
| 109/111 | 1.01 | 196/198 | 0.99 | 148/151 | 0.87 | 150/154 | 1.59 | 153/153 | 3.65 |
| 109/112 | 1.03 | 196/199 | 0.97 | 148/152 | 0.96 | 150/155 | 0.34 | 153/154 | 3.19 |
| 110/111 | 1.05 | 196/200 | 0.96 | 148/153 | 1.30 | 150/156 | 0.20 | 153/155 | 1.03 |
| 110/112 | 1.05 | 196/201 | 1.09 | 148/154 | 0.97 | 151/152 | 1.28 | 153/156 | 1.18 |
| 111/112 | 1.01 | 197/198 | 0.97 | 148/155 | 0.88 | 151/153 | 4.50 | 154/151 | 6.49 |
| 181/182 | 0.45 | 197/199 | 1.03 | 148/156 | 1.08 | 151/154 | 0.74 | 154/152 | 6.03 |
| 181/183 | 0.97 | 197/200 | 1.02 | 149/150 | 0.81 | 151/155 | 0.93 | 154/153 | 0.70 |
| 181/184 | 0.94 | 197/201 | 0.99 | 149/151 | 0.56 | 151/156 | 0.84 | 154/154 | 6.63 |
| 181/185 | 0.81 | 198/199 | 1.03 | 149/152 | 0.82 | 152/151 | 1.28 | 154/155 | 1.26 |
| 182/183 | 0.71 | 198/200 | 1.05 | 149/153 | 0.97 | 152/152 | 2.89 | 154/156 | 0.91 |
| 182/184 | 0.98 | 198/201 | 1.05 | 149/154 | 1.14 | 152/153 | 8.89 | 155/156 | 1.32 |
|         |      |         |      |         |      |         |      | cpYFP   | 1.00 |

[0251] 实施例3:不同插入位点的cpGFP光学探针的表达和检测

[0252] 按照实施例2中的方法将cpYFP替换为cpGFP,构建琥珀酸绿色荧光蛋白荧光探针。如表3所示,检测结果显示:

[0253] 对琥珀酸响应超过1.1倍或低于0.9倍的光学探针有:181/182、183/185、184/185、

197/198、198/200、198/201、199/200、199/201、200/201、148/152、148/154、148/156、149/150、149/151、149/156、150/151、150/152、150/153、150/155、150/156、151/152、151/153、151/154、151/155、151/156、152/152、152/153、152/154、152/155、152/156、153/151、153/153、153/155、153/156、154/151、154/154、154/155、154/156、155/156；

[0254] 对琥珀酸响应超过1.5倍的光学探针有在150/153,151/152,152/153,152/154位点。

[0255] 表2

[0256]

| 插入位点    | 变化倍数 | 插入位点    | 变化倍数 | 插入位点    | 变化倍数 | 插入位点    | 变化倍数 | 插入位点    | 变化倍数 |
|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|
| 108/109 | 0.97 | 182/185 | 0.97 | 199/200 | 1.42 | 149/155 | 0.97 | 152/154 | 2.21 |
| 108/110 | 0.99 | 183/184 | 0.94 | 199/201 | 1.29 | 149/156 | 1.20 | 152/155 | 1.45 |
| 108/111 | 1.00 | 183/185 | 1.18 | 200/201 | 1.10 | 150/151 | 1.24 | 152/156 | 1.26 |
| 108/112 | 1.01 | 184/185 | 1.14 | 148/149 | 0.89 | 150/152 | 1.41 | 153/151 | 1.39 |
| 109/110 | 1.03 | 196/197 | 1.00 | 148/150 | 1.04 | 150/153 | 1.89 | 153/152 | 1.00 |
| 109/111 | 1.01 | 196/198 | 1.02 | 148/151 | 1.07 | 150/154 | 1.09 | 153/153 | 1.41 |
| 109/112 | 1.00 | 196/199 | 1.00 | 148/152 | 1.28 | 150/155 | 1.39 | 153/154 | 1.04 |
| 110/111 | 0.97 | 196/200 | 0.97 | 148/153 | 1.04 | 150/156 | 1.25 | 153/155 | 1.44 |
| 110/112 | 0.99 | 196/201 | 0.99 | 148/154 | 1.20 | 151/152 | 2.01 | 153/156 | 1.37 |
| 111/112 | 1.00 | 197/198 | 0.89 | 148/155 | 1.07 | 151/153 | 1.30 | 154/151 | 1.29 |
| 181/182 | 1.25 | 197/199 | 0.98 | 148/156 | 1.25 | 151/154 | 1.32 | 154/152 | 1.04 |
| 181/183 | 1.09 | 197/200 | 1.00 | 149/150 | 0.89 | 151/155 | 1.39 | 154/153 | 0.99 |
| 181/184 | 1.00 | 197/201 | 1.04 | 149/151 | 1.19 | 151/156 | 1.41 | 154/154 | 1.89 |
| 181/185 | 0.96 | 198/199 | 1.02 | 149/152 | 1.08 | 152/151 | 1.07 | 154/155 | 0.85 |
| 182/183 | 1.08 | 198/200 | 1.20 | 149/153 | 1.05 | 152/152 | 1.24 | 154/156 | 1.49 |
| 182/184 | 0.93 | 198/201 | 1.31 | 149/154 | 0.98 | 152/153 | 2.08 | 155/156 | 1.28 |
|         |      |         |      |         |      |         |      | cpGFP   | 1.00 |

[0257] 实施例4:不同插入位点的cpBFP光学探针的表达和检测

[0258] 按照实施例2中的方法将cpYFP替换为cpBFP,构建琥珀酸蓝色荧光蛋白荧光探针。如表3所示,检测结果显示:

[0259] 对琥珀酸响应超过1.1倍或低于0.9倍的光学探针有:108/109、108/110、110/111、110/112、181/185、183/184、183/185、197/201、200/201、148/150、148/151、148/152、148/153、149/151、149/153、149/155、150/151、150/152、150/155、151/152、151/153、151/154、151/156、152/151、152/152、152/154、152/155、152/156、153/151、153/152、153/153、153/156、154/151、154/152、155/156；

[0260] 对琥珀酸响应超过1.3倍的光学探针有在148/152、148/153、151/153、151/154、152/155、152/156、153/151、154/152位点。

[0261] 表3

[0262]

| 插入位点    | 变化倍数 | 插入位点    | 变化倍数 | 插入位点    | 变化倍数 | 插入位点    | 变化倍数 | 插入位点    | 变化倍数 |
|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|
| 108/109 | 1.30 | 182/185 | 1.02 | 199/200 | 1.07 | 149/155 | 1.29 | 152/154 | 1.20 |
| 108/110 | 1.23 | 183/184 | 1.14 | 199/201 | 0.93 | 149/156 | 1.02 | 152/155 | 1.39 |
| 108/111 | 1.01 | 183/185 | 1.29 | 200/201 | 0.85 | 150/151 | 1.30 | 152/156 | 1.44 |
| 108/112 | 1.04 | 184/185 | 1.03 | 148/149 | 1.03 | 150/152 | 1.29 | 153/151 | 2.04 |
| 109/110 | 0.98 | 196/197 | 1.05 | 148/150 | 1.20 | 150/153 | 0.96 | 153/152 | 1.49 |
| 109/111 | 0.99 | 196/198 | 0.99 | 148/151 | 1.19 | 150/154 | 0.96 | 153/153 | 1.24 |

|         |      |         |      |         |      |         |      |         |      |
|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|
| 109/112 | 0.97 | 196/199 | 0.96 | 148/152 | 1.50 | 150/155 | 0.81 | 153/154 | 1.00 |
| 110/111 | 1.21 | 196/200 | 1.04 | 148/153 | 1.42 | 150/156 | 1.02 | 153/155 | 1.04 |
| 110/112 | 1.19 | 196/201 | 1.07 | 148/154 | 1.02 | 151/152 | 1.30 | 153/156 | 1.18 |
| 111/112 | 1.03 | 197/198 | 0.96 | 148/155 | 0.98 | 151/153 | 1.59 | 154/151 | 1.30 |
| 181/182 | 1.00 | 197/199 | 1.04 | 148/156 | 1.05 | 151/154 | 1.83 | 154/152 | 1.50 |
| 181/183 | 1.05 | 197/200 | 1.08 | 149/150 | 1.06 | 151/155 | 0.92 | 154/153 | 0.92 |
| 181/184 | 1.08 | 197/201 | 1.10 | 149/151 | 0.89 | 151/156 | 0.83 | 154/154 | 1.00 |
| 181/185 | 0.89 | 198/199 | 1.04 | 149/152 | 0.92 | 152/151 | 0.81 | 154/155 | 0.93 |
| 182/183 | 0.94 | 198/200 | 1.06 | 149/153 | 0.81 | 152/152 | 0.82 | 154/156 | 1.03 |
| 182/184 | 1.02 | 198/201 | 0.97 | 149/154 | 1.04 | 152/153 | 0.93 | 155/156 | 1.19 |
|         |      |         |      |         |      |         |      | cpBFP   | 1.00 |

[0263] 实施例5:不同插入位点的cpmApple光学探针的表达和检测

[0264] 按照实施例2中的方法将cpYFP替换为cpmApple,构建琥珀酸红色荧光蛋白荧光探针。如表4所示,检测结果显示:

[0265] 对琥珀酸响应超过1.1倍或低于0.9倍的光学探针有:108/109、108/110、110/111、196/201、197/201、199/200、200/201、148/149、148/151、148/155、149/152、149/156、150/155、150/156、151/156、152/154、152/155、152/156、153/151、153/152、153/153、154/152、154/153、154/156;

[0266] 对琥珀酸响应超过1.2倍的光学探针有在152/154、153/153位点。

[0267] 表4

[0268]

| 插入位点    | 变化倍数 | 插入位点    | 变化倍数 | 插入位点    | 变化倍数 | 插入位点    | 变化倍数 | 插入位点     | 变化倍数 |
|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|----------|------|
| 108/109 | 0.89 | 182/185 | 0.95 | 199/200 | 1.19 | 149/155 | 0.93 | 152/154  | 1.21 |
| 108/110 | 0.83 | 183/184 | 1.03 | 199/201 | 1.01 | 149/156 | 0.82 | 152/155  | 1.17 |
| 108/111 | 0.98 | 183/185 | 1.08 | 200/201 | 1.17 | 150/151 | 1.04 | 152/156  | 1.16 |
| 108/112 | 0.93 | 184/185 | 1.02 | 148/149 | 1.11 | 150/152 | 1.02 | 153/151  | 1.20 |
| 109/110 | 1.02 | 196/197 | 0.97 | 148/150 | 1.02 | 150/153 | 1.00 | 153/152  | 1.10 |
| 109/111 | 1.06 | 196/198 | 0.93 | 148/151 | 0.86 | 150/154 | 0.92 | 153/153  | 1.29 |
| 109/112 | 1.08 | 196/199 | 1.01 | 148/152 | 0.92 | 150/155 | 0.85 | 153/154  | 0.92 |
| 110/111 | 1.10 | 196/200 | 1.04 | 148/153 | 0.94 | 150/156 | 0.82 | 153/155  | 0.95 |
| 110/112 | 0.92 | 196/201 | 1.13 | 148/154 | 0.97 | 151/152 | 1.04 | 153/156  | 1.02 |
| 111/112 | 1.02 | 197/198 | 1.02 | 148/155 | 0.89 | 151/153 | 1.01 | 154/151  | 1.04 |
| 181/182 | 1.04 | 197/199 | 1.07 | 148/156 | 1.03 | 151/154 | 1.02 | 154/152  | 0.85 |
| 181/183 | 1.08 | 197/200 | 1.04 | 149/150 | 1.02 | 151/155 | 1.00 | 154/153  | 0.82 |
| 181/184 | 1.00 | 197/201 | 0.82 | 149/151 | 1.07 | 151/156 | 1.12 | 154/154  | 0.94 |
| 181/185 | 0.97 | 198/199 | 0.92 | 149/152 | 0.89 | 152/151 | 1.04 | 154/155  | 0.97 |
| 182/183 | 0.93 | 198/200 | 0.95 | 149/153 | 0.92 | 152/152 | 1.03 | 154/156  | 1.11 |
| 182/184 | 0.91 | 198/201 | 1.02 | 149/154 | 1.04 | 152/153 | 0.98 | 155/156  | 1.03 |
|         |      |         |      |         |      |         |      | cpmApple | 1.00 |

[0269] 实施例6:光学探针的性能

[0270] 对于实施例2中所得的对琥珀酸响应超过2倍的光学探针,即在:150/152,150/153,150/155,150/156,151/153,152/152,152/153、152/154,153/152,153/153,153/154,154/151,154/152,154/154,181/182位点实施插入的15种光学探针,进行进浓度梯度(0~100mM)的琥珀酸检测,检测420nm激发528nm发射处荧光强度和485nm激发528nm发射处荧光强度比值的变化。其中插入位点为150/152、153/152、153/153、153/154、154/151、154/152、

154/154、181/182的8种琥珀酸光学探针的 $K_d$  (结合常数) 过大,无法拟合,不适合检测。除此之外,插入位点为150/153,150/155,150/156,151/153,152/152,152/153、152/154的7种琥珀酸光学探针的 $K_d$  (结合常数) 分别为0.7mM,1.9mM,3.1mM,0.8mM,9.3mM,1.9mM,1.5mM。结果如图2所示。

[0271] 实施例7:突变的cpYFP光学探针的表达和检测

[0272] 在DctBp-150/153-cpYFP的基础上构建光学探针突变体。通过PCR线性化质粒pCDF-DctBp-150/153-cpYFP,引物中含有所要突变位点的碱基序列,对得到的PCR产物进行同源重组得到琥珀酸敏感多肽的S154,F155,Y160,N182,V183,S184以及光学活性多肽的M9,S132,Y141,F201,N207,Y245这12个位点的突变质粒,并由杰李测序公司完成测序。

[0273] 将构建成功的突变质粒转化到BL21 (DE3) 中诱导表达,用表达探针蛋白的大肠杆菌的破碎上清进行琥珀酸以及其他非特异性底物的响应筛选,将含有琥珀酸或其他非特异性底物的融合荧光蛋白质的检测信号除以无琥珀酸的融合荧光蛋白质的检测信号。结果表6所示,检测结果显示对琥珀酸响应超过2倍且特异性较好的光学探针如下所示。

[0274] 表6

| 序列           | 插入位点    | 突变                                                                    | 变化倍数 |
|--------------|---------|-----------------------------------------------------------------------|------|
| SEQ ID NO:25 | 150/153 | DctBp-F155T/Y160W                                                     | 2.57 |
| SEQ ID NO:25 | 150/153 | DctBp-F155P/Y160W                                                     | 2.13 |
| SEQ ID NO:25 | 150/153 | DctBp-F155Q/Y160W                                                     | 2.11 |
| SEQ ID NO:25 | 150/153 | DctBp-F155C/Y160W                                                     | 2.22 |
| SEQ ID NO:26 | 150/153 | DctBp-Y160W/N182S                                                     | 4.16 |
| SEQ ID NO:27 | 150/153 | DctBp-Y160W/N182S/V183Y                                               | 6.63 |
| SEQ ID NO:27 | 150/153 | DctBp-Y160W/N182S/V183W                                               | 5.90 |
| SEQ ID NO:28 | 150/153 | DctBp-Y160W/N182S/S184L                                               | 3.40 |
| SEQ ID NO:29 | 150/153 | DctBp-S154R/Y160W/N182S/S184L                                         | 5.32 |
| SEQ ID NO:30 | 150/153 | DctBp-Y160W/N182S/S184L-cpYFP-M9T/S132R/Y141N/F201S/N207T/Y245F       | 6.32 |
| SEQ ID NO:31 | 150/153 | DctBp-S154R/Y160W/N182S/S184L-cpYFP-M9T/S132R/Y141N/F201S/N207T/Y245F | 8.77 |

[0276] 实施例8:光学探针突变体的性能

[0277] 将实施例7所述的表6中的琥珀酸光学探针分别进行浓度梯度 (0 ~ 100mM) 的琥珀酸检测。对探针处理10分钟后,检测420nm激发528nm发射处荧光强度和485nm激发528nm发射处荧光强度比值的变化。探针滴定结果如图3所示,结果表明不同突变体对琥珀酸亲和力不同。

[0278] 对表6中的琥珀酸探针进行特异性检测,分别与琥珀酸结构类似物,富马酸,苹果酸, $\alpha$ -酮戊二酸,柠檬酸,天冬氨酸,丙酮酸,草酰乙酸,丙二酸进行反应性检测,结果表明具有良好的特异性,如图4所示。

[0279] 实施例9:光学探针的亚细胞器定位和光学探针在亚细胞器内的性能

[0280] 本实施例中,使用不同的定位信号肽与光学探针DctBp-S154R/Y160W/N182S/S184L-cpYFP-M9T/S132R/Y141N/F201S/N207T/Y245F融合,将光学探针定位到不同的细胞器中。用融合不同定位信号肽的光学探针质粒转染HEK293细胞36小时后,使用PBS冲洗,置于HBSS溶液中使用倒置荧光显微镜进行FITC通道下进行荧光检测。结果如图5所示。琥珀酸光学探针通过与不同的特异定位信号肽融合能够定位到包括细胞浆、线粒体、细胞核、核排

阻、细胞外膜、内质网中。不同的亚细胞结构中都显示有荧光,并且荧光的分布和强度各不相同。

[0281] 用胞浆表达的光学探针质粒转染HEK293细胞36小时后,使用PBS冲洗,置于HBSS溶液中,检测30min时间段内420nm激发528nm发射处荧光强度和485nm激发528nm发射处荧光强度比值的变化。结果如图6所示。添加10mM琥珀酸,继续检测30分钟。添加琥珀酸的样品的485/420逐渐增加,最高可以达到初始值的4倍,而不添加琥珀酸的对照组的485/420基本保持不变。

[0282] 实施例10:在活细胞中基于光学探针进行高通量化合物筛选

[0283] 本实施例中,我们使用胞浆表达DctBp-S154R/Y160W/N182S/S184L-cpYFP-M9T/S132R/Y141N/F201S/N207/Y245F的HEK293细胞进行高通量化合物筛选。

[0284] 经转染的HEK293细胞使用PBS冲洗,置于HBSS溶液中(无琥珀酸)处理1小时,然后使用10 $\mu$ M的化合物处理1小时。各样品中分别滴加琥珀酸。使用酶标仪记录420nm激发528nm发射处荧光强度和485nm激发528nm发射处荧光强度比值变化。以未用任何化合物处理的样品作为对照进行标准化。结果如图7所示。在使用的2000种化合物中,绝大部分的化合物对琥珀酸进入细胞影响极小。有7种化合物能够提高细胞对琥珀酸的摄取能力,另外有4种化合物能够明显降低细胞对琥珀酸的摄取。

[0285] 实施例11:光学探针定量检测血液中的琥珀酸

[0286] 在本实施中,使用纯化的DctBp-S154R/Y160W/N182S/S184L-cpYFP-M9T/S132R/Y141N/F201S/N207/Y245F小鼠和人的血液上清中的琥珀酸进行分析。

[0287] 将DctBp-S154R/Y160W/N182S/S184L-cpYFP-M9T/S132R/Y141N/F201S/N207/Y245F与稀释的血液上清混合处理10分钟后,使用酶标仪检测420nm激发528nm发射处荧光强度和485nm激发528nm发射处荧光强度比值。结果如图8所示,小鼠血液中的琥珀酸含量在32 $\mu$ M左右,人血液中的琥珀酸含量在16 $\mu$ M左右。

[0288] 由以上实施例可知,本发明提供的琥珀酸光学探针,蛋白分子量相对较小且易于成熟,荧光动态变化大,特异性好,并且能够通过基因操作的方法在细胞中表达,可在细胞内外实时定位、定量检测琥珀酸;并且能够进行高通量的化合物筛选。

[0289] 其它实施方式

[0290] 本说明书描述了许多实施方式。然而应理解,本领域技术人员通过阅读本说明书获知的不背离本发明的构思和范围的各种改进,也应包括在所附权利要求书的范围内。

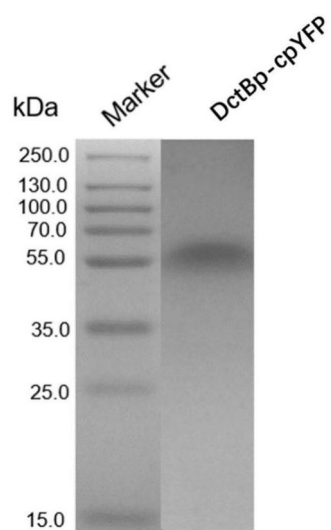


图1

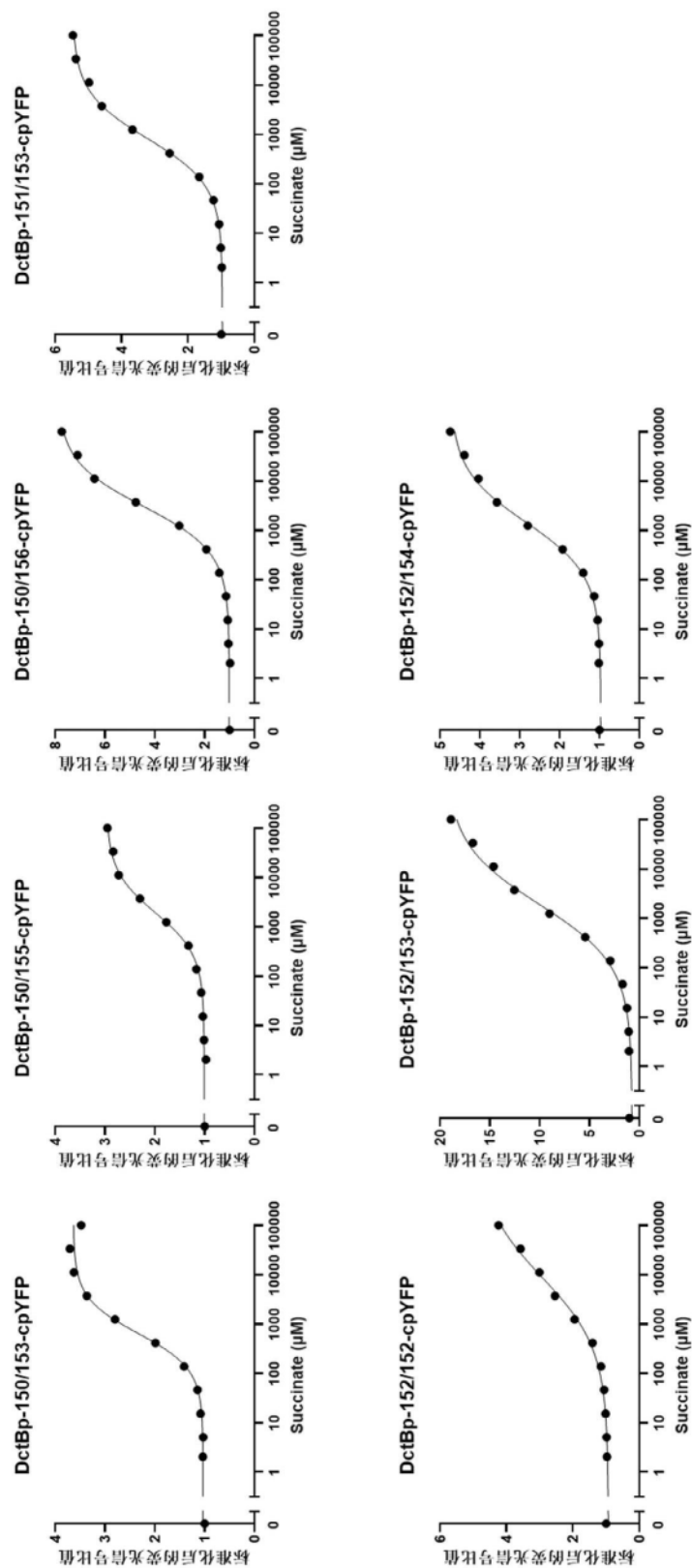


图2

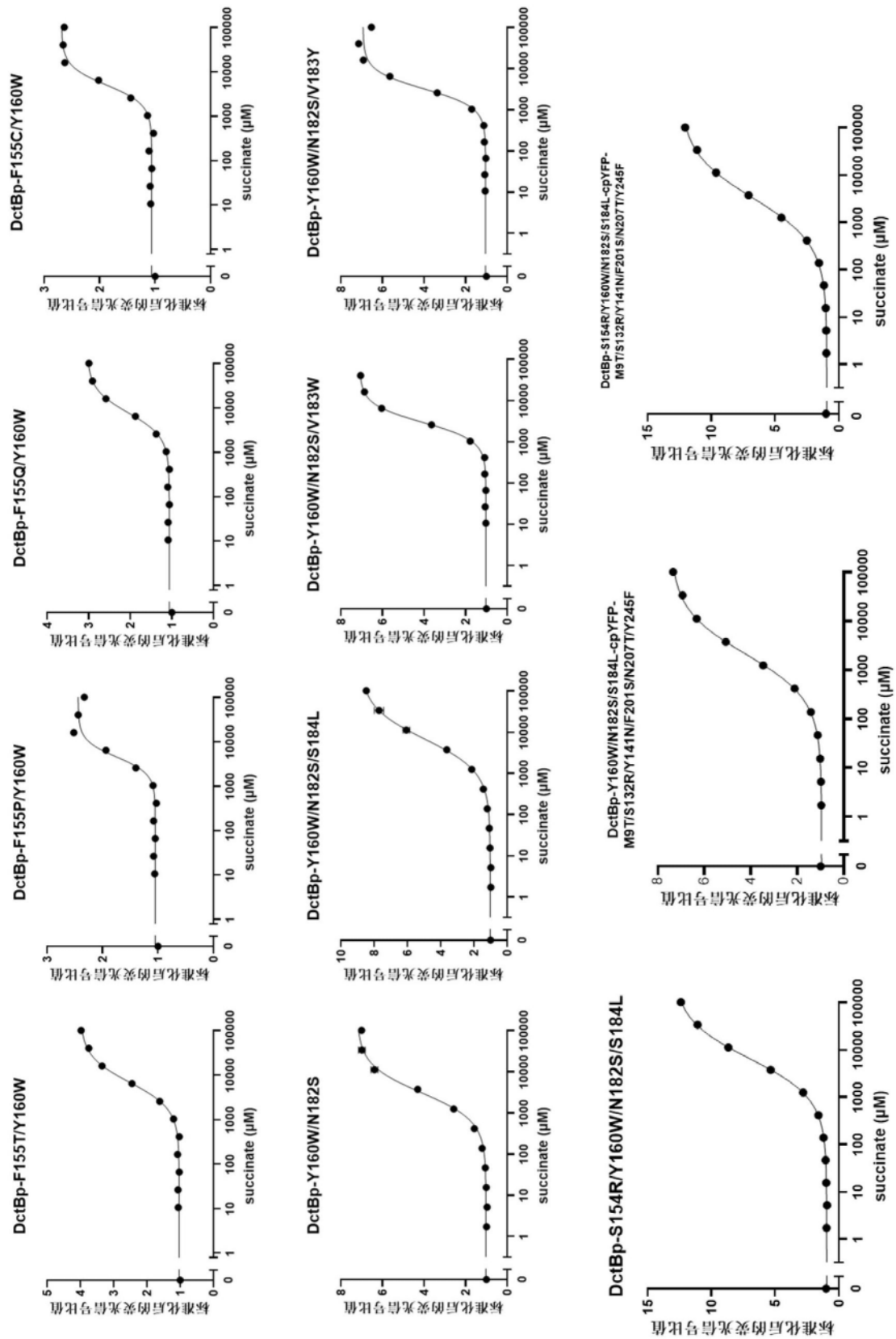


图3

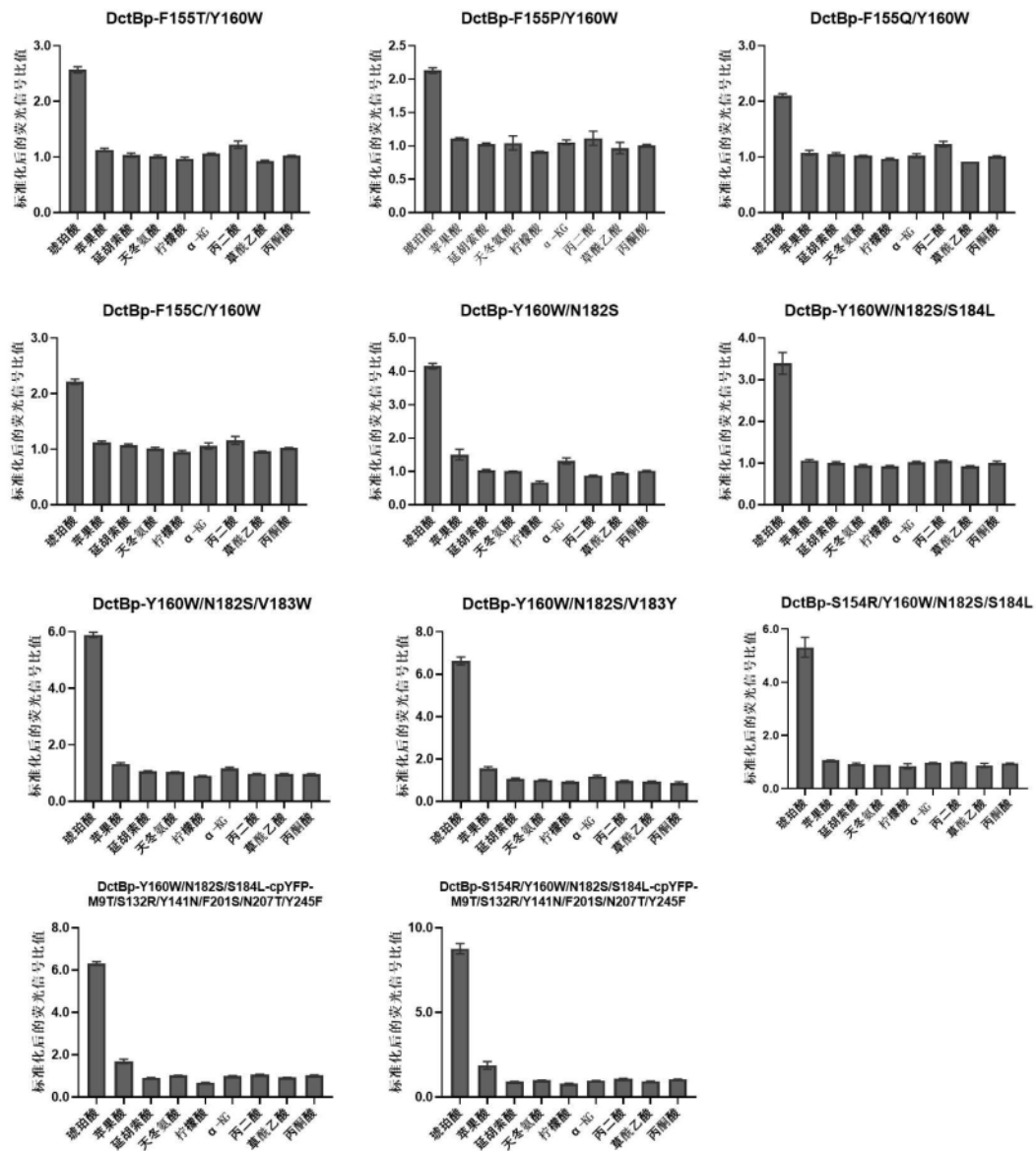


图4

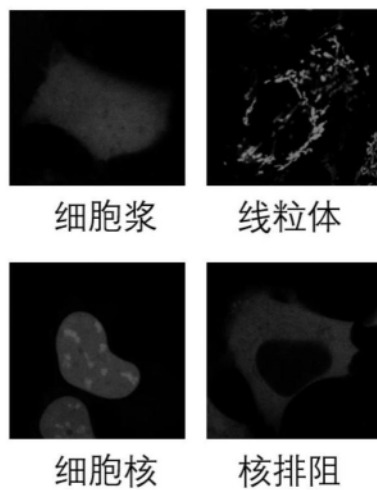


图5

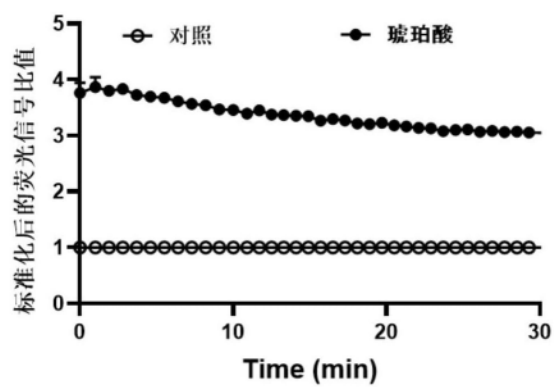


图6

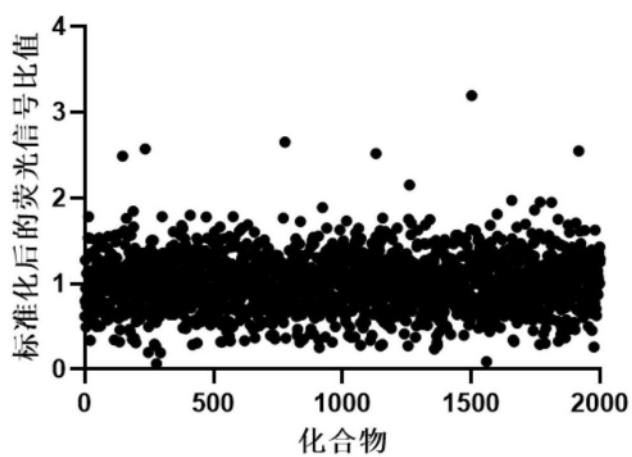


图7

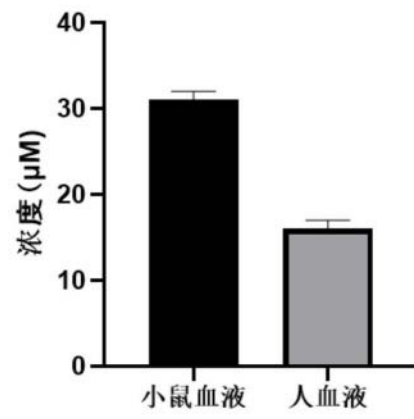


图8