



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109553687 B

(45) 授权公告日 2021.07.06

(21) 申请号 201710892931.0

(22) 申请日 2017.09.27

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 109553687 A

(43) 申请公布日 2019.04.02

(73) 专利权人 北京大学

地址 100871 北京市海淀区颐和园路5号

(72) 发明人 李毓龙 井淼 冯杰思 万金霞
王欢(74) 专利代理机构 北京知元同创知识产权代理
事务所(普通合伙) 11535

代理人 刘元霞

(51) Int. Cl.

C07K 19/00 (2006.01)

C09K 11/06 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 101171337 A, 2008.04.30

CN 102892881 A, 2013.01.23

Baird GS等.Circular permutation and
receptor insertion within green
fluorescent proteins.《Proc Natl Acad
Sci》.1999,第96卷(第20期),摘要和第11246页
左栏第1段.Eddy等. β 2-Adrenergic Receptor
Conformational Response to Fusion Protein
in the Third Intracellular Loop.
《Structure》.2016,2190-2197.Jiesi Feng等.A Genetically Encoded
Fluorescent Sensor for Rapid and Specific
In Vivo Detection of Norepinephrine.
《Neuron》.2019,745-761.Villardaga, J.P.等.Measurement of the
millisecond activation switch of G
protein-coupled receptors in living
cells.《Nature Biotechnology》.2003,第21卷
(第7期),摘要、图6、第809页左栏第1段、第810页
右栏第2段和第811页右栏第3段、第810页左栏倒
数第1段和图4.

审查员 陈彦闯

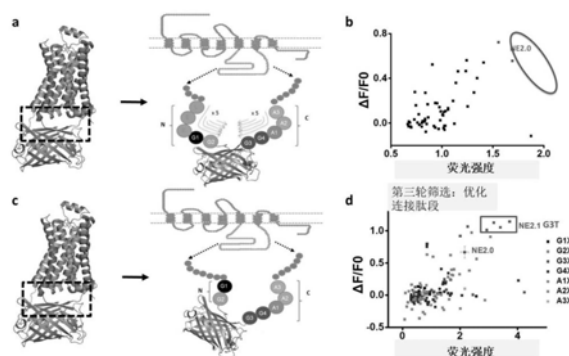
权利要求书11页 说明书58页 附图42页

(54) 发明名称

基于G蛋白偶联受体构建的荧光探针

(57) 摘要

本发明利用G蛋白偶联受体(GPCR)感受特定配体并发生构象改变的特点,在G蛋白偶联受体的第三胞内环中插入循环重排的荧光蛋白,将G蛋白偶联受体的构象改变转变为光学信号的变化,通过检测光学信号的变化来检测所述特定配体的浓度,以此为原理构建基于GPCR的激活的荧光探针(GRAB探针)。本发明还公开了利用GRAB探针检测特定配体的方法。



1. 基于G蛋白偶联受体构建的荧光探针,所述荧光探针是对G蛋白偶联受体进行改造获得的融合蛋白,所述改造包括:

(1) 在G蛋白偶联受体的第五跨膜区和第六跨膜区之间的第三胞内环中插入循环重排的荧光蛋白;

其中,所述基于G蛋白偶联受体构建的荧光探针能够在细胞膜上表达;并且

所述基于G蛋白偶联受体构建的荧光探针当与所述G蛋白偶联受体的特异性配体接触时可以与其结合,由此导致荧光探针的荧光强度具有可检测到的变化。

2. 权利要求1的荧光探针,其中所述(1)的改造为对G蛋白偶联受体的第五跨膜区和第六跨膜区之间的第三胞内环截短并在截短的位置插入循环重排的荧光蛋白。

3. 权利要求1或2的荧光探针,其中所述循环重排的荧光蛋白两端分别通过连接肽与G蛋白偶联受体的第三胞内环相连。

4. 权利要求3的荧光探针,其中所述连接肽包括柔性氨基酸。

5. 权利要求4的荧光探针,其中所述柔性氨基酸包括甘氨酸和/或丙氨酸。

6. 权利要求5的荧光探针,其中所述连接肽由甘氨酸和丙氨酸组成。

7. 权利要求6的荧光探针,其中所述循环重排的荧光蛋白N端的连接肽为GG,和/或循环重排的荧光蛋白C端的连接肽为GGAAA。

8. 权利要求1或2的荧光探针,其中所述循环重排的荧光蛋白选自循环重排的绿色荧光蛋白(cpGFP)、循环重排的黄色荧光蛋白(cpYFP)、循环重排的红色荧光蛋白(cpRFP)、循环重排的蓝色荧光蛋白(cpBFP)、循环重排的增强绿色荧光蛋白(cpEGFP)、循环重排的增强黄色荧光蛋白(cpEYFP)和循环重排的红外荧光蛋白(cp infrared fluorescent protein, cpiRFP)。

9. 权利要求8的荧光探针,其中所述循环重排的增强绿色荧光蛋白是来自GCaMP6s、GCaMP6m或G-GECO的cpEGFP;所述循环重排的红色荧光蛋白是cpmApple、cpmCherry、cpmRuby2、cpmKate2和cpFusionRed;所述循环重排的黄色荧光蛋白包括但不限于循环重排的Venus (cpVenus)、循环重排的Citrine (cpCitrine)。

10. 权利要求9的荧光探针,其中所述cpmApple是来自R-GECO1的cpmApple。

11. 权利要求1的荧光探针,其中所述改造还包括在G蛋白偶联受体的C端插入荧光素酶,以使得荧光素酶催化化学反应发出的光能够激发所述荧光探针中的循环重排的荧光蛋白。

12. 权利要求1的荧光探针,其中所述特异性配体是神经递质、激素、代谢分子、营养分子、或人工合成的激活特定受体的小分子或药物;所述G蛋白偶联受体是与神经递质、激素、代谢分子、营养分子、或人工合成的激活特定受体的小分子或药物特异性结合的G蛋白偶联受体。

13. 权利要求12的荧光探针,其中所述神经递质是肾上腺素、去甲肾上腺素、乙酰胆碱、五羟色胺和/或多巴胺;其中所述人工合成的激活特定受体的小分子或药物是异丙肾上腺素(ISO)。

14. 权利要求1或2的荧光探针,其中所述G蛋白偶联受体是人源的或动物源的。

15. 权利要求1的荧光探针,其中基于G蛋白偶联受体构建的荧光探针是用于检测肾上腺素的荧光探针,其中所述G蛋白偶联受体是特异性结合肾上腺素的GPCR。

16. 权利要求15的荧光探针,其中所述特异性结合肾上腺素的GPCR是人 $\beta 2$ 肾上腺素受体,所述基于G蛋白偶联受体构建的荧光探针是基于人 $\beta 2$ 肾上腺素受体构建的荧光探针。

17. 权利要求16的荧光探针,其中循环重排的荧光蛋白通过N端和C端的连接肽与人 $\beta 2$ 肾上腺素受体的第三胞内环相连。

18. 权利要求17的荧光探针,其中循环重排的荧光蛋白两端的连接肽的长度分别是氮端为1个或2个氨基酸,和/或碳端为1个、2个、3个、4个或5个氨基酸。

19. 权利要求18的荧光探针,其中循环重排的荧光蛋白两端的连接肽的长度分别是氮端为2个氨基酸,碳端为5个氨基酸。

20. 权利要求19的荧光探针,其中循环重排的荧光蛋白两端的连接肽分别是N端为GG,C端为GGAAA,或者循环重排的荧光蛋白两端的连接肽分别是N端为GG,C端为SPSVA,或者循环重排的荧光蛋白两端的连接肽分别是N端为GG,C端为APSV A。

21. 权利要求18的荧光探针,其中循环重排的荧光蛋白两端的连接肽的长度分别是氮端为1个氨基酸,碳端为1个氨基酸。

22. 权利要求21的荧光探针,其中循环重排的荧光蛋白两端的连接肽分别是N端为G,C端为G。

23. 权利要求16-22任一项的荧光探针,其中被插入到人 $\beta 2$ 肾上腺素受体中的循环重排的荧光蛋白是cpEGFP。

24. 权利要求23的荧光探针,其中所述cpEGFP是来自GCaMP6s、GCaMP6m或GEC01.2的cpEGFP。

25. 权利要求16-22任一项的荧光探针,其中所述人 $\beta 2$ 肾上腺素受体的氨基酸序列为:
MGQPGNGSAFL LAPNRSHAPDHDVTQQRDEVWVVG MGIVMSLIVLAIVFGNVLVITAI AKFERLQTVTNYFI
TSLACADLV MGLAVVPFGAAHILMKMWTFGNFWCEFWTSIDVLCVTAS IETLCVIAVD RYFAITSPFKYQSL LTKN
KARV IILMVWIVSGLTSFLPIQMHWYRATHQEAINCYANETCCDFFT NQAYAIASSIVSFYVPLVIMVFVYSRVFQ
EAKRQLQKIDKSEGRFHVQNLSQVEQDGR TGHLRRSSKFCLKEHKAL KTLGIIMGTFTLCWLPFFIVNIVHVIQD
NLIRKEVYILLNWIGYVNSGFNPLIYCRSPDFRIAFQELLCLRRSSLKAYGNGYSSNGNTGEQSGYHVEQEKENKL
LCEDLPGTEDFVGHQGTVP SDNIDSQGRNCSTNDSLL (SEQ ID NO: 1),

其中下划线部分为第三胞内环。

26. 权利要求25的荧光探针,其中循环重排的荧光蛋白被插入到所述人 $\beta 2$ 肾上腺素受体的第240位氨基酸和第241位氨基酸之间;或者循环重排的荧光蛋白被插入到所述人 $\beta 2$ 肾上腺素受体的第250位氨基酸和第251位氨基酸之间。

27. 权利要求1的荧光探针,其中基于G蛋白偶联受体构建的荧光探针是用于检测肾上腺素和/或去甲肾上腺素的荧光探针,其中所述G蛋白偶联受体是特异性结合肾上腺素和/或去甲肾上腺素的GPCR。

28. 权利要求27的荧光探针,其中所述特异性结合肾上腺素和/或去甲肾上腺素的GPCR是人ADRA2A受体,所述基于G蛋白偶联受体构建的荧光探针是基于人ADRA2A受体构建的荧光探针。

29. 权利要求28的荧光探针,其中人ADRA2A受体的第三个胞内环被截短并在截短的位置插入循环重排的荧光蛋白。

30. 权利要求28的荧光探针,其中循环重排的荧光蛋白通过N端和C端的连接肽与人

ADRA2A受体的第三胞内环相连,循环重排的荧光蛋白两端的连接肽的长度分别是氮端为2个氨基酸,碳端为5个氨基酸。

31. 权利要求30的荧光探针,其中循环重排的荧光蛋白两端的连接肽分别是N端为GG,C端为GGAAA,或者,循环重排的荧光蛋白两端的连接肽分别是N端为GG,C端为TGAAA。

32. 权利要求28-31任一项的荧光探针,其中被插入到人ADRA2A受体中的循环重排的荧光蛋白是cpEGFP。

33. 权利要求32的荧光探针,其中所述cpEGFP是来自GCaMP6s、GCaMP6m或GEC01.2的cpEGFP。

34. 权利要求28-31任一项的荧光探针,其中所述人ADRA2A受体的氨基酸序列为:

MFRQEQLAEGSFAPMGSLQPDAGNASWNGTEAPGGGARATPYSLQVTLTLVCLAGLLMLLTVFGNVLVIIA
VFTSRALKAPQNLFLVSLASADILVATLVIPFSLANEVMGYWYFGKAWCEIYLALDVLFCSTSSIVHLCAISLDYRW
SITQAIEYNLKRTPRRIKAIITVWVISAVISFPPLISIEKKGGGGGPQPAEPRCEINDQKWYVISSCIGSFFAPC
LIMILVYVRIYQIAKRRTVRVPPSRRGPDAAVAPPGGTERRPNGLGPERSAGPGGAEEPLPTQLNGAPGEPAPAGP
RDTDALDLESSSSDHAERPPGPRRPERGPRGKGKARASQVKPGDSLPRRPGATGIGTPAAGPGEERVGAASR
WRGRQNREKRFTFVLAVVIGVFVVCWFPPFFTYTLTAVGCSVPRTLKFFFFWFGYCNSSLNPVIYTI FNHDFRRAF
KKILCRGDRKRIV (SEQ ID NO: 2),

其中下划线部分为第三胞内环。

35. 权利要求34的荧光探针,其中所述人ADRA2A受体的第三胞内环的第71-130位氨基酸被截去,并在被截去的位置上插入循环重排的荧光蛋白;或者,所述人ADRA2A受体的第三胞内环的第71-135位氨基酸被截去,并在被截去的位置上插入循环重排的荧光蛋白。

36. 权利要求1的荧光探针,其中基于G蛋白偶联受体构建的荧光探针是用于检测乙酰胆碱的荧光探针,其中所述G蛋白偶联受体是特异性结合乙酰胆碱的GPCR。

37. 权利要求36的荧光探针,其中所述特异性结合肾上腺素的GPCR是人乙酰胆碱受体M3R亚型,所述基于G蛋白偶联受体构建的荧光探针是基于人乙酰胆碱受体M3R亚型构建的荧光探针。

38. 权利要求37的荧光探针,其中人乙酰胆碱受体M3R亚型的第三个胞内环被截短并在截短的位置插入循环重排的荧光蛋白。

39. 权利要求37的荧光探针,其中循环重排的荧光蛋白通过N端和C端的连接肽与人乙酰胆碱受体M3R亚型的第三胞内环相连,循环重排的荧光蛋白两端的连接肽的长度分别是氮端为2个氨基酸,碳端为5个氨基酸。

40. 权利要求39的荧光探针,其中循环重排的荧光蛋白两端的连接肽分别是N端为GG,C端为GGAAA,或者,循环重排的荧光蛋白两端的连接肽分别是N端为GG,C端为HGAAA,或者,循环重排的荧光蛋白两端的连接肽分别是N端为GG,C端为HNAAA,或者,循环重排的荧光蛋白两端的连接肽分别是N端为GG,C端为HNAK。

41. 权利要求37-40任一项的荧光探针,其中被插入到人乙酰胆碱受体M3R亚型中的循环重排的荧光蛋白是cpEGFP。

42. 权利要求41的荧光探针,其中所述cpEGFP是来自GCaMP6s、GCaMP6m或GEC01.2的cpEGFP。

43. 权利要求37-40任一项的荧光探针,其中,所述人乙酰胆碱受体M3R亚型的氨基酸序

列为：

MTLHNNSTTSPLFPNIISSWIHSPSDAGLPPGTVTHFGSYNVSRAAGNFSSPDGTTDDPLGGHTVWQVVFIA
FLTGILALVTIIGNILVIVSFKNKQLKTVNNYFLLSLACADLIIGVISMNLFTTYIIMNRWALGNLACDLWLAID
YVASNASVMNLLVISFDRYFSITRPLTYRAKRTTKRAGVMIGLAWVISFVLWAPAILFWQYFVGKRTVPPGECFIQ
FLSEPTITFGTAIAAFYMPVTIMTILYWRIYKETEKRTKELAGLQASGTEAETENFVHPTGSSRSCSSYELQQQSM
KRSNRRKYGRCHFWF^{TTKSWKPSSEQMDQDHSSSDSWNNNDAAASLENSASSDEEDIGSETRAIYSIVLKLPGHST}
ILNSTKLPSDDLQVPEEELGMVDLERKADKLQAQKSVDDGGSF^{PKSFSKLP}IQLES^{AVDTAKTSDVNSSVGKSTA}
TLPLSFKEATLAKRFALKTRSQITKRKRMSLVKEK^{KAAQ}TL^{SAILLAFIITWTPYNIMVLVNTFC}DSCIPKTFWNL
GYWLCYINSTVNPVCYALCNKTFRTTFKMLLLCQCDKKRRKQ^{QYQQRQSVIFHKRAPEQAL} (SEQ ID NO:
3),

其中下划线部分为第三胞内环。

44. 权利要求43的荧光探针,其中所述人乙酰胆碱受体M3R亚型的第260-490位氨基酸被截去,并在被截去的位置上插入循环重排的荧光蛋白;或者所述人乙酰胆碱受体M3R亚型的第260-491位氨基酸被截去,并在被截去的位置上插入循环重排的荧光蛋白。

45. 权利要求1的荧光探针,其中基于G蛋白偶联受体构建的荧光探针是用于检测5-羟色胺的荧光探针,其中所述G蛋白偶联受体是特异性结合5-羟色胺的GPCR。

46. 权利要求45的荧光探针,其中所述特异性结合5-羟色胺的GPCR是人HTR2C受体,所述基于G蛋白偶联受体构建的荧光探针是基于人HTR2C受体构建的荧光探针。

47. 权利要求46的荧光探针,其中人HTR2C受体的第三个胞内环被截短并在截短的位置插入循环重排的荧光蛋白。

48. 权利要求46的荧光探针,其中循环重排的荧光蛋白通过N端和C端的连接肽与人HTR2C受体的第三胞内环相连,循环重排的荧光蛋白两端的连接肽的长度分别是氮端为2个氨基酸,碳端为5个氨基酸。

49. 权利要求48的荧光探针,其中循环重排的荧光蛋白两端的连接肽分别是N端为GG,C端为GGAAA,或者,循环重排的荧光蛋白两端的连接肽分别是N端为NG,C端为GFAAA。

50. 权利要求46-49任一项的荧光探针,其中被插入到人HTR2C受体中的循环重排的荧光蛋白是cpEGFP。

51. 权利要求50的荧光探针,其中所述cpEGFP是来自GCaMP6s、GCaMP6m或GEC01.2的cpEGFP。

52. 权利要求46-49任一项的荧光探针,其中,所述人HTR2C受体的氨基酸序列为:

MVNLRNAVHSFLVHLIGLLVWQCDISVSPVAAIVTDIFNTSDGGRFKFPDGVQNPALSIVIIIMTIGGNI
LVIMAVSMEKKLHNATNYFLMSLAIADMLVGLLVMP^{LSLLAILYDYVWPLPRYLCPVWISLDVLFSTASIMHLCAI}
SLDRYVAIRNPIEHSR^{FNSRTKA}IMKIAIVWAISIGVS^{VIPVIGLRDEEKVFVNNTTCVLNDPNFVLIGSFVAFF}
IPLTIMVITYCLTIYV^{LRRQALMLLHGHTTEPPGLSLDFLKCKCRNTAE}EENSANPNQ^{DQNARRRKKKERRPRGTM}
QAINNERKASKVLGIVFFVFLIMWCPFFITN^{ILSVLCEKSCNQKLMEKLLNVFVWIGYVCSGINPLVYTLFNKIYR}
RAFSNYLRCNYKVEKKPPVRQIPRVAATALSGRELNVNIYRHTNEPVIEKASDNEPGIEMQVENLELPVNPSSVVS
ERISSV (SEQ ID NO: 4),

其中下划线部分为第三胞内环。

53. 权利要求52的荧光探针,其中所述人HTR2C受体的第三胞内环的第16-55位氨基酸

被截去,并在被截去的位置上插入循环重排的荧光蛋白;或者,所述人HTR2C受体的第三胞内环的第11-60位氨基酸被截去,并在被截去的位置上插入循环重排的荧光蛋白;或者,所述人HTR2C受体的第三胞内环的第16-70位氨基酸被截去,并在被截去的位置上插入循环重排的荧光蛋白;或者,所述人HTR2C受体的第三胞内环的第15-68位氨基酸被截去,并在被截去的位置上插入循环重排的荧光蛋白;或者,所述人HTR2C受体的第三胞内环的第15-68位氨基酸被截去,并在被截去的位置上插入循环重排的荧光蛋白,并且其第三胞内环的第13位的亮氨酸L被突变为苯丙氨酸F。

54. 权利要求46的荧光探针,其中循环重排的荧光蛋白通过N端和C端的连接肽与人HTR2C受体的第三胞内环相连;循环重排的荧光蛋白两端的连接肽的长度分别是氮端为5个氨基酸,碳端为3个氨基酸。

55. 权利要求54的荧光探针,其中循环重排的荧光蛋白两端的连接肽分别是N端为PVVSE,C端为ATR。

56. 权利要求46、47、54和55任一项的荧光探针,其中被插入到人HTR2C受体中的循环重排的荧光蛋白是cpmApple。

57. 权利要求46、47、54和55任一项的荧光探针,其中,所述人HTR2C受体的氨基酸序列为:

MVNLRNAVHSFLVHLIGLLVWQCDISVSPVAAIVTDIFNTSDGGRFKFPDGVQNWPAISIVIIIIMTIGGNI
LVIMAVSMEKKLHNATNYFLMSLAIADMLVGLLVMP LSLAILYDYVWPLPRYLCPVWISLDVLFSTASIMHLCAI
SLDRYVAIRNPIEHSRFSNRTKAIMKIAIVWAISIGVSVPIPVIGLRDEEKVFVNNTTCVLNDPNFVLIGSFVAFF
IPLTIMVITYCLTIYVLRQALMLLHGHTTEPPGLSLDFLKCKKRNTAEEENSANPNQDQNAARRRKKKERRPRGTM
QAINNERKASKVLGIVFFVFLIMWCPFFITNLSVLCEKSCNQKLMEKLLNVFVWIGYVCSGINPLVYTLFNKIYR
RAFSNYLRCNYKVEKKPPVRQIPRVAATALSGRELVNIYRHTNEPVIEKASDNEPGIEMQVENLELPVNPSSVVS
ERISSV (SEQ ID NO: 4),

其中下划线部分为第三胞内环。

58. 权利要求57的荧光探针,其中所述人HTR2C受体的第241-306位氨基酸被截去,并在被截去的位置上插入循环重排的荧光蛋白;或者,所述人HTR2C受体的第240-309位氨基酸被截去,并在被截去的位置上插入循环重排的荧光蛋白。

59. 权利要求1的荧光探针,其中基于G蛋白偶联受体构建的荧光探针是用于检测多巴胺的荧光探针,其中所述G蛋白偶联受体是特异性结合多巴胺的GPCR。

60. 权利要求59的荧光探针,其中所述特异性结合多巴胺的GPCR是人DRD2受体,所述基于G蛋白偶联受体构建的荧光探针是基于人DRD2受体构建的荧光探针。

61. 权利要求60的荧光探针,其中人DRD2受体的第三个胞内环被截短并在截短的位置插入循环重排的荧光蛋白。

62. 权利要求60的荧光探针,其中循环重排的荧光蛋白通过N端和C端的连接肽与人DRD2受体的第三胞内环相连,循环重排的荧光蛋白两端的连接肽的长度分别是氮端为2个氨基酸,碳端为5个氨基酸。

63. 权利要求62的荧光探针,其中循环重排的荧光蛋白两端的连接肽分别是N端为GG,C端为GGAAA。

64. 权利要求60-63任一项的荧光探针,其中被插入到人DRD2受体中的循环重排的荧光

蛋白是cpEGFP。

65. 权利要求64的荧光探针,其中所述cpEGFP是来自GCaMP6s、GCaMP6m或GEC01.2的cpEGFP。

66. 权利要求60-63任一项的荧光探针,其中,所述人DRD2受体的氨基酸序列为:

MDPLNLSWYDDDLERQNSRPFNGSDGKADRPYNYATLLTLLIAVIVFGNVLVCMASREKALQTTTNYL
IVSLAVADLLVATLVMPWVVYLEVVGWKFRIHCDIFVTLDVMMCTASILNLCAISIDRYTAVAMPMLYNTRYSS
KRRVTVMISIVWVLSFTISCPLLFGLNADQNECIIANPAFVVYSSIVSFYVPFIVTLLVYIKIYIVLRRRRKRNV
TKRSSRAFRAHLRAPLKGCTHPEDMKLCTVIMKSNGSFPVNRVRVEAARRAQELEMELSSSTSPPERTRYSPIPP
SHHQLTLPDPSHHGLHSTPDSPAKPEKNGHAKDHPKIAKIFEIQTMPNGKTRTSLKTMSRRKLSQQKEKKATQMLA
IVLGVFIICWLPFFITHILNIHCDNIPPVLYSAFTWLGYVNSAVNPPIIYTTFNIEFRKAFLKILHC (SEQ ID
NO: 5),

其中下划线部分为第三胞内环。

67. 权利要求66的荧光探针,其中所述人DRD2受体的第253-357位氨基酸被截去,并在被截去的位置上插入循环重排的荧光蛋白;或者,所述人DRD2受体的第254-360位氨基酸被截去,并在被截去的位置上插入循环重排的荧光蛋白。

68. 权利要求60的荧光探针,其中循环重排的荧光蛋白通过N端和C端的连接肽与人DRD2受体的第三胞内环相连,循环重排的荧光蛋白两端的连接肽的长度分别是氮端为5个氨基酸,碳端为3个氨基酸。

69. 权利要求68的荧光探针,其中循环重排的荧光蛋白两端的连接肽分别是N端为PVVSE,C端为ATR。

70. 权利要求60、61、68和69任一项的荧光探针,其中被插入到人DRD2受体中的循环重排的荧光蛋白是cpmApple。

71. 权利要求70的荧光探针,其中所述cpmApple是来自R-GEC01的cpmApple。

72. 权利要求60、61、68和69任一项的荧光探针,其中,所述人DRD2受体的氨基酸序列为:

MDPLNLSWYDDDLERQNSRPFNGSDGKADRPYNYATLLTLLIAVIVFGNVLVCMASREKALQTTTNYL
IVSLAVADLLVATLVMPWVVYLEVVGWKFRIHCDIFVTLDVMMCTASILNLCAISIDRYTAVAMPMLYNTRYSS
KRRVTVMISIVWVLSFTISCPLLFGLNADQNECIIANPAFVVYSSIVSFYVPFIVTLLVYIKIYIVLRRRRKRNV
TKRSSRAFRAHLRAPLKGCTHPEDMKLCTVIMKSNGSFPVNRVRVEAARRAQELEMELSSSTSPPERTRYSPIPP
SHHQLTLPDPSHHGLHSTPDSPAKPEKNGHAKDHPKIAKIFEIQTMPNGKTRTSLKTMSRRKLSQQKEKKATQMLA
IVLGVFIICWLPFFITHILNIHCDNIPPVLYSAFTWLGYVNSAVNPPIIYTTFNIEFRKAFLKILHC (SEQ ID
NO: 5),

其中下划线部分为第三胞内环。

73. 权利要求72的荧光探针,其中所述人DRD2受体的第223-349位氨基酸被截去,并在被截去的位置上插入循环重排的荧光蛋白;或者,所述人DRD2受体的第268-364位氨基酸被截去,并在被截去的位置上插入循环重排的荧光蛋白;或者,所述人DRD2受体的第224-365位氨基酸被截去,并在被截去的位置上插入循环重排的荧光蛋白。

74. 权利要求11的荧光探针,其中所述荧光素酶是Nanoluc、Fluc (萤火虫荧光素酶, firefly luciferase) 或Rluc (海肾荧光素酶, Renilla luciferase)。

75. 权利要求74的荧光探针,其中所述荧光探针是基于人HTR2C受体构建的荧光探针所述荧光素酶被插入到荧光探针的C端,荧光素酶通过其N端和C端的连接肽与所述荧光探针的C端连接,并且荧光素酶N端和C端的连接肽均为GSG。

76. 权利要求75的荧光探针,其中所述荧光素酶被插入到荧光探针GRAB-5-HT2.0的第582位和583位氨基酸之间,并且所述荧光素酶两端通过连接肽与荧光探针GRAB-5-HT2.0相连,其中荧光素酶N端和C端的连接肽均为GSG;

其中荧光探针GRAB-5-HT2.0是将人HTR2C受体的第三胞内环的第15-68位截去,并在截去的位置上插入cpEGFP获得的荧光探针,其中所述cpEGFP的N端通过N端连接肽NG与人HTR2C受体相连,C端通过C端连接肽GFAAA与人HTR2C受体相连;

所述人HTR2C受体的氨基酸序列是:

MVNLRNAVHSFLVHLIGLLVWQCDISVSPVAAIVTDIFNTSDGGRFKFPDGVQNWPAISIVIIIIMTIGGNI
LVIMAVSMEKKLHNATNYFLMSLAIDMLVGLLVMPSSLAILYDYVWPLPRYLCPVWISLDVLFSTASIMHLCAI
SLDRYVAIRNPIEHSRFSNRKAIMKIAIVWAISIGVSVPIPVIGLRDEEKVFNNTTCVLNDPNFVLIGSFVAFF
IPLTIMVITYCLTIYVLRRLQALMLLHGHTTEPPGLSLDFLKCKKRNTAEEENSANPNQDQNARRRKKKERRPRGTM
QAINNERKASKVLGIVFFVFLIMWCPFFITNLSVLCEKSCNQKLEKLLNVFVWIGYVCSGINPLVYTLFNKIYR
RAFSNYLRRCNYKVEKKPPVRQIPRVAATALSGRELNVNIYRHTNEPVIEKASDNEPGIEMQVENLELPVNPSSVVS
ERISSV (SEQ ID NO: 4),

其中下划线部分为第三胞内环;

其中所述cpEGFP是来自GCaMP6s的cpEGFP。

77. 构建GRAB荧光探针的方法,包括将基于第一G蛋白偶联受体构建的荧光探针的第三胞内环连同其中插入的循环重排的荧光蛋白完整截取出来,替换第二G蛋白偶联受体的第三胞内环,获得基于第二G蛋白偶联受体构建的荧光探针,即为所述GRAB荧光探针;

所述GRAB荧光探针能够在细胞膜上表达,当与所述第二G蛋白偶联受体的特异性配体接触时可以与其结合,由此导致荧光探针的荧光强度具有可检测到的变化。

78. 权利要求77的方法,其中所述第一G蛋白偶联受体和第二G蛋白偶联受体结合相同的特异性配体或结合不同的特异性配体。

79. 权利要求77的方法,其中所述基于第一G蛋白偶联受体构建的荧光探针是权利要求1-76任一项的荧光探针。

80. 权利要求77的方法,其中所述第二G蛋白偶联受体的特异性配体是神经递质、激素、代谢分子、营养分子或人工合成的激活特定受体的小分子或药物,所述第二G蛋白偶联受体是与神经递质、激素、代谢分子、营养分子或人工合成的激活特定受体的小分子或药物结合的G蛋白偶联受体。

81. 权利要求80的方法,其中所述神经递质是肾上腺素、去甲肾上腺素、乙酰胆碱、五羟色胺和/或多巴胺;其中所述人工合成的激活特定受体的小分子或药物是异丙肾上腺素(ISO)。

82. 权利要求77-81任一项的方法,其中第二G蛋白偶联受体是人源的或动物源的。

83. 权利要求77-81任一项的方法,其中所述第一G蛋白偶联受体是人β2肾上腺素受体,所述人β2肾上腺素受体的氨基酸序列为:

MGQPGNGSAFLAPNRSHAPDHDVTQQRDEVWVVGMIIVSLIVLAIVFGNVLVITAIKFERLQTVTNYFI

TSLACADLVMG LAVVPFGAAHILMKMWTFGNFWCEFWTSIDVLCVTASITLCVIAVDYFAITSPFKYQSLLTKN
KARVIIILMVWIVSGLTSFLPIQMHWYRATHQEAINCYANETCCDFFTQAYAIASSIVSFYVPLVIMVFVYSRVFQ
EAKRQLQKIDKSEGRFHVQNLSQVEQDGRTGHGLRRSSKFCLKEHKALKTLGIIMGFTTLCWLPFFIVNIVHVIQD
NLIRKEVYILLNWIGYVNSGFNPLIYCRSPDFRIAFQELLCLRRSSLKAYGNGYSSNGNTGEQSGYHVEQEKENKL
LCEDLPGTEDFVGHQGTVPSPDNIDSQGRNCSTNDSLL (SEQ ID NO: 1),

其中下划线部分为第三胞内环。

84. 权利要求83的方法, 其中循环重排的荧光蛋白被插入到所述人 $\beta 2$ 肾上腺素受体的第240位氨基酸和第241位氨基酸之间, 或者, 循环重排的荧光蛋白被插入到所述人 $\beta 2$ 肾上腺素受体的第250位氨基酸和第251位氨基酸之间。

85. 权利要求83的方法, 其中循环重排的荧光蛋白通过N端和C端的连接肽与所述人 $\beta 2$ 肾上腺素受体的第三胞内环相连, 其中, 循环重排的荧光蛋白两端的连接肽分别是N端为GG, C端为GGAAA; 或者, 循环重排的荧光蛋白两端的连接肽分别是N端为GG, C端为SPSVA; 或者, 循环重排的荧光蛋白两端的连接肽分别是N端为GG, C端为APSVA。

86. 权利要求83的方法, 其中被插入到人 $\beta 2$ 肾上腺素受体中的循环重排的荧光蛋白是cpEGFP。

87. 权利要求86的方法, 其中所述cpEGFP是来自GCaMP6s、GCaMP6m或GEC01.2的cpEGFP。

88. 权利要求77-81任一项的方法, 其中, 所述第二G蛋白偶联受体是人乙酰胆碱受体M3R亚型。

89. 权利要求88的方法, 其中所述人乙酰胆碱受体M3R亚型的具体序列是:

MTLHNNSTTSPLFPNIISSSWIHSPSDAGLPPGTVTHFGSYNVSRAAGNFSSPDGTTDDPLGGHTVWQVVFIA
FLTGILALVTIIGNILVIVSFKNQKLTVNNYFLLSLACADLIIGVISMNLFTTYIIMNRWALGNLACDLWLAI
YVASNASVMNLLVISFDRYFSITRPLTYRAKRTTKRAGVMIGLAWVISFVLWAPAILFWQYFVGKRTVPPGECFIQ
FLSEPTITFGTAIAAFYMPVTIMTILYWRIYKETEKRTKELAGLQASGTEAETENFVHPTGSSRSCSSYELQQQSM
KRSNRRKYGRCHF WFTTKSWKPSSEQMDQDHSSSDSWNNNDAAASLENSASSDEEDIGSETRAIYSIVLKLPGHST
ILNSTKLPSDNLQVPEEELGMVDLERKADKLQAQKSVDDGGSFPKSFSLPIQLESAVDTAKTSDVNSSVGKSTA
TLPLSFKEATLAKRFALKTRSQITKRKRMSLVKEKKAQTL SAILLAFIITWTPYNIMVLVNTFCDSCIPKTFWNL
GYWLCYINSTVNPVCYALCNKTFRTTFKMLLLCQCDKKRRKQQYQQRQSVIFHKRAPEQAL (SEQ ID NO:
3),

其中下划线部分的序列是其第三胞内环并被替换。

90. 权利要求77-81任一项的方法, 其中所述第一G蛋白偶联受体是人HTR2C受体, 所述人HTR2C受体的氨基酸序列为:

MVNLRNAVHSFLVHLIGLLVWQCDISVSPVAAIVTDIFNTSDGGRFKFPDGVQNWPAISIVIIIIMTIGGNI
LVIMAVSMEKKLHNATNYFLMSLAIADMLVGLLVMP LSLAILYDYVWPLPRYLCPVWISLDVLFSTASIMHLCAI
SLDRYVAIRNPIEHSRFSNRKAIMKIAIVWAISIGVSVPIVIGLRDEEKVFVNNTTCVLNDPNFVLIGSFVAFF
IPLTIMVITYCLTIYVLRRLQALMLLHGHTTEPPGLSLDFLKCKKRNTAE EENSANPNQDQNARRRKKKERRPRGTM
QAINNERKASKVLGIVFFVFLIMWCPFITNLSVLCEKSCNQKLMKLLNVFVWIGYVCSGINPLVYTLFNKIYR
RAFSNYLRCNYKVEKKPPVRQIPRVAATALSGRELNVNIYRHTNEPVIEKASDNEPGIEMQVENLELPVNPSSVVS
ERISSV (SEQ ID NO: 4),

其中下划线部分为第三个胞内环。

91. 权利要求90的方法,其中所述人HTR2C受体的第三胞内环的第16-55位氨基酸被截去,并在被截去的位置上插入循环重排的荧光蛋白;或者,所述人HTR2C受体的第三胞内环的第11-60位氨基酸被截去,并在被截去的位置上插入循环重排的荧光蛋白;或者,所述人HTR2C受体的第三胞内环的第16-70位氨基酸被截去,并在被截去的位置上插入循环重排的荧光蛋白;或者,所述人HTR2C受体的第三胞内环的第15-68位氨基酸被截去,并在被截去的位置上插入循环重排的荧光蛋白;或者,所述人HTR2C受体的第三胞内环的第15-68位氨基酸被截去,并在被截去的位置上插入循环重排的荧光蛋白,并且其第三胞内环的第13位的亮氨酸L被突变为苯丙氨酸F。

92. 权利要求90的方法,其中循环重排的荧光蛋白通过N端和C端的连接肽与人HTR2C受体的第三胞内环相连,其中,循环重排的荧光蛋白两端的连接肽分别是N端为GG,C端为GAAA;或者,循环重排的荧光蛋白两端的连接肽分别是N端为NG,C端为GFAAA。

93. 权利要求90的方法,其中被插入到人HTR2C受体中的循环重排的荧光蛋白是cpEGFP。

94. 权利要求93的方法,其中所述cpEGFP是来自GCaMP6s、GCaMP6m或GEC01.2的cpEGFP。

95. 权利要求90的方法,其中所述第二G蛋白偶联受体是人HTR2B受体或人HTR6受体。

96. 权利要求95的方法,其中所述人HTR2B受体的氨基酸序列是:

MALSYRVSELQSTIPEHILQSTFVHVISSNWSGLQTESIPEEMKQIVEEQGNKLHWAALLILMVIIPTIGGN
TLVILAVSLEKKLQYATNYFLMSLAVADLLVGLFVMPIALLTIMFEAMWPLPLVLCPAWLFLDVLFTASIMHLCA
ISVDYRIAIAKKPIQANQYNSRATAFIKITVWVLISIGIAIPVPIKGIETDVDNPNITCVLTKERFGDFMLFGSLA
AFFTPLAIMIVTYFLTIHALQKKAYLVKNKPPQRLTWLTVSTVFQRDETPCSSPEKVAMLDGSRKDKALPNSGDET
LMRRTSTIGKKSQTISNEQRASKVLGIVFFLFLMWCPFFITNITLVLCDSCNQTTLQMLLEIFVWIGYVSSGVN
PLVYTLFNKTFRDAFGRYITCNYRATKSVKTLRKRSSKIYFRNPMAENSKFFKKHGIRNGINPAMYQSPMRLRSST
IQSSSIILLDTLLLTENEGDKTEERVSYV (SEQ ID NO: 9),

其中下划线部分为第三胞内环。

97. 权利要求95的方法,所述人HTR6受体的氨基酸序列是:

MVPEPGPTANSTPAWGAGPPSAPGGSGWVAAALCVVIALTAANSLLIALICTQPALRNTSNFFLVSLFTSD
LMVGLVVMPPAMNLALYGRWVLARGLCLLWTAFDVMCCSASILNLCILSLDRYLLILSPLRYKLMTPLRALALVL
GAWSLAALASFLPLLLGWHELGHARPPVPGQCRLLASLPFVLVASGLTFFLPSGAICTFYCRILLAARKQAVQVAS
LTTGMASQASETLQVPRTPRPGVESADSRRLATKHSRKALKASLTLGILLGMFFVTWLPFFVANIVQAVCDCISPG
LFDVLTWLGVCNSTMNPIIYPLFMRDFKRALGRFLPCPRCPRERQASLASPSLRTSHSGPRPGLSLQQVLPLPLPP
DSDSDSDAGSGGSSGLRLTAQLLLPGEATQDPPLPTRAAAANFFNIDPAEPELRPHPLGIPTN (SEQ ID NO:
10),

其中下划线部分为第三胞内环。

98. 利用权利要求77-97任一项的方法构建获得的GRAB荧光探针。

99. 编码权利要求1-76、98任一项的荧光探针的多核苷酸。

100. 包含权利要求99的多核苷酸的表达载体。

101. 包含权利要求99的多核苷酸或权利要求100的表达载体的宿主细胞,其中所述宿主细胞不能发育成个体。

102. 权利要求101的宿主细胞,其中所述宿主细胞是神经元细胞。

103. 利用权利要求1-76、98任一项的荧光探针对待测样品或待测组织中G蛋白偶联受体的特异性配体的浓度变化进行定性检测的方法,其中所述荧光探针是基于所述G蛋白偶联受体构建的,所述方法包括:

使所述荧光探针在细胞膜上表达,并使表达的荧光探针与含有所述特异性配体的待测样品或待测组织接触,在第一个时间点测定所述荧光探针的荧光信号强度F1,所述第一个时间点是在所述荧光探针与所述待测样品或待测组织中接触之前或是在所述荧光探针与所述待测样品或待测组织中接触之后,在第一时间点之后的第二时间点测定所述荧光探针的荧光信号强度F2,根据F2相对于F1的荧光信号强度变化确定所述特异性配体浓度在第二时间点相对于第一时间点的变化。

104. 权利要求103的方法,其中所述荧光信号强度变化包括荧光信号强度增加、降低或不变,所述特异性配体的浓度变化包括其浓度增大、减小或不变。

105. 利用权利要求1-76、98任一项的荧光探针对待测样品或待测组织中G蛋白偶联受体的特异性配体的浓度变化进行定量检测的方法,其中所述荧光探针是基于所述G蛋白偶联受体构建的,所述方法包括:

(1) 使所述荧光探针与分别包含已知浓度的所述特异性配体的不同样品反应,测定所述特异性配体浓度与荧光信号强度的对应关系的标准曲线;

(2) 使所述荧光探针在细胞膜上表达,并使表达的荧光探针与含有所述特异性配体的待测样品或待测组织接触,测定荧光信号强度,根据测得的荧光信号强度和步骤(1)中获得的标准曲线获得所述待测样品或待测组织中的特异性配体的浓度。

106. 药物筛选方法,包括使权利要求1-76、98任一项的荧光探针在细胞膜上表达,将药物候选者加入到细胞中,测定药物候选者加入前后的荧光信号强度,根据药物候选者加入后的荧光信号强度相对于加入前的荧光信号强度的变化确定所述药物候选者是否是G蛋白偶联受体的激动剂,其中所述荧光探针是基于所述G蛋白偶联受体构建的。

107. 药物筛选方法,包括:

(1) 使权利要求1-76、98任一项的荧光探针在细胞膜上表达,向细胞中加入可激活G蛋白偶联受体的分子,测定荧光信号强度变化,其中所述荧光探针是基于所述G蛋白偶联受体构建的;

(2) 向细胞中加入药物候选者,筛选能够逆转步骤(1)中的荧光信号强度变化的药物候选者,作为能阻断所述G蛋白偶联受体的拮抗剂;

其中,如果步骤(1)中加入可激活所述G蛋白偶联受体的分子后荧光信号强度增大,步骤(2)中的逆转是指加入药物候选者后荧光信号强度减小;如果步骤(1)中加入可激活所述G蛋白偶联受体的分子后荧光信号强度减小,步骤(2)中的逆转是指加入药物候选者后荧光信号强度增大。

108. 检测G蛋白偶联受体的特异性配体在动物体内分布的方法,包括使权利要求1-76、98任一项的荧光探针在动物体内表达,实时测定动物体内的荧光信号强度,根据动物体内不同区域的荧光信号强度有无、强弱和变化情况确定所述特异性配体在动物体内不同区域是否存在、不同区域之间的浓度是否有差别、以及同一区域的浓度是否随时间发生变化,其中所述荧光探针是基于所述G蛋白偶联受体构建的。

109. 权利要求108的方法,包括在测定荧光信号强度之前,诱导动物体产生所述特异性

配体的步骤。

110. 权利要求109的方法,通过气味刺激或视觉刺激诱导动物体产生所述特异性配体。

111. 权利要求103-110任一项的方法,其中在测定荧光信号强度时,通过外界光源的激发使得循环重排的荧光蛋白产生荧光信号。

112. 权利要求103-110任一项的方法,其中当荧光探针的C末端具有插入的荧光素酶时,在测定荧光信号强度之前,使所述荧光探针与所述荧光素酶的底物接触,然后通过BRET(生物发光共振能量转移)检测荧光信号强度。

基于G蛋白偶联受体构建的荧光探针

发明领域

[0001] 本发明涉及基因编码的基于G蛋白偶联受体构建的荧光探针。

背景技术

[0002] 由于神经递质在神经系统中的重要作用,从第一个神经递质乙酰胆碱被鉴定到现在为止近100年的时间,很多科学家都进行了关于神经递质的性质、合成、储存、释放和作用等多方面的研究 (Valenstein, E. S. The discovery of chemical neurotransmitters. Brain and cognition 49, 73-95 (2002))。然而,与现如今飞速发展的认知神经生物学领域相比,检测神经递质的技术仍然受限于低时空分辨率和细胞特异性,这使得我们对于递质的释放和作用的精细刻画变得困难。

[0003] 通过微透析方法偶联生化分析检测为经典的研究神经递质释放的方法之一。该方法最早由Bito L 于1966年开发,用于检测大脑中多种氨基酸的含量及动态变化 (Justice, J. B. Quantitative microdialysis of neurotransmitters. Journal of Neuroscience Methods 48, 263-276 (1993))。Understedt和Pycock作为该领域的先驱,改进并发展了微透析技术并应用该技术进行了多种重要神经递质如多巴胺在大脑神经环路中的检测 (Watson, C. J., Venton, B. J. & Kennedy, R. T. In vivo measurements of neurotransmitters by microdialysis sampling. Analytical chemistry 78, 1391-1399 (2006))。该方法虽然可以达到检测神经递质的目的,但由于其需要通过透析膜获得神经递质并借助生化方法分离鉴定特定分子,其极大地缺乏递质释放的时空信息,并且由于其复杂的操作,难以保证对于生理状态的完整的体现。现如今发展的精细微透析 nano-LC-microdialysis通过进一步增加生化检测过程的分辨率使得我们可以对组织中的极少量神经递质进行细致的分离和刻画,所需样品体积最小可以达到4nL,时间分辨率上升到数秒,然而其还是难以较差的空间分辨率导致的缺乏细胞特异性检测的缺陷 (Olive, M. F., Mehmert, K. K. & Hodge, C. W. Microdialysis in the mouse nucleus accumbens: A method for detection of monoamine and amino acid neurotransmitters with simultaneous assessment of locomotor activity. Brain Research Protocols 5, 16-24 (2000); Lee, G. J., Park, J. H. & Park, H. K. Microdialysis applications in neuroscience. Neurological research 30, 661-668 (2008))。

[0004] 除了生化方法外,利用化学氧化还原方法发展的电化学技术来检测单胺类神经递质如多巴胺、五羟色胺等是目前应用较多的检测神经递质释放的方法之一。该方法由于可以与电信号相偶联,其具有较好的灵敏度和时间分辨率,因此在了解多巴胺、五羟色胺等单胺类神经递质的释放及其调节机理的研究中起到了重要的作用 (Zhou, Z. & Misler, S. Amperometric detection of stimulus-induced quantal release of catecholamines from cultured superior cervical ganglion neurons. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92, 6938-6942 (1995); Bruns, D. Detection of transmitter release with carbon fiber

electrodes.Methods (San Diego, Calif.) 33,312-321 (2004))。然而,由于其插入的电极难以精确地靶定到特定突触位置,其实际上难以达到精确的细胞和亚细胞特异性,并且由于电极的插入等处理本身的因素,其对于组织和细胞具有一定的损伤性,不适合并行检测多处区域;另一方面,该方法为基于化学氧化还原原理开发,其只适用于单胺类神经递质,对于如乙酰胆碱等其他重要的神经递质的检测无能为力。虽然该方法在研究神经递质的功能和释放领域内起到了关键作用,其在现如今要求细胞特异和时空特异的神经生物学研究中作用越来越局限。

[0005] 应用光学成像的方法检测神经递质由于具有高灵敏性、实时观测的特点在近年来得到了快速发展。其中,美国旧金山大学圣地亚哥分校的David Kleinfeld实验室开发的基于检测细胞系构建的神经递质检测方法CNiFERs,通过将改造过的人源HEK293细胞植入特定脑区实现对该脑区神经递质释放的检测(Muller,A.,Joseph,V.,Slesinger,P.A.& Kleinfeld,D.Cell-based reporters reveal in vivo dynamics of dopamine and norepinephrine release in murine cortex.Nature methods 11,1245-1252 (2014); Nguyen,Q.T.et al. An in vivo biosensor for neurotransmitter release and in situ receptor activity.Nature neuroscience 13,127-132 (2010))。该细胞系中具有特定神经递质所对应的G蛋白偶联受体,并在该受体下游偶联荧光钙指示剂,从而将神经递质的结合转变为细胞内钙信号的检测。该方法具有特异性的神经递质检测,在肾上腺素、多巴胺、乙酰胆碱的检测中起到了重要贡献。同时,其检测信号并非神经递质结合本身,而是下游经过级联方法的次级钙信号,使得该方法具有较高的灵敏性和秒级的时间分辨率。然而,由于其原理为移植外源细胞系进入大脑特定位置,其对内源神经细胞,对亚细胞轴突、树突甚至单个突触的水平神经递质作用的检测仍然难以进行。另一方面,其复杂的操作过程和可能的免疫排斥反应也限制了其在神经生物学领域的广泛应用。

[0006] 除去基于细胞的探针,分子层面上的神经递质探针也有所发展。瑞士洛桑理工大学的Kai Johnsson 实验室开发了基于FRET原理的、用于检测乙酰胆碱的荧光探针ACh-SNIFIT(Alberto Schena,et al, Sensing Acetylcholine and anticholinesterase compounds,Angewandte Chemie,Vol 53,Issue 5,1302-1305, Dec 13,2013)。相比于CNiFERs虽然体积很小便于操作,但ACh-SNIFIT的构建需要蛋白的表达和收集以及化学荧光基团的额外修饰,使用时需将其注射到相应脑区,不适合于神经递质在体的、无创伤的检测。

[0007] 可基因编码的、基于荧光蛋白构建的神经递质探针不仅可以具有细胞特异性的表达和检测,还可以通过优化荧光蛋白探针本身来达到高信噪比的检测。该方法实现神经递质无创伤的、在体的检测,实时的记录在大脑认知神经环路中神经递质的释放及其作用。美国Janelia研究中心一直致力于开发新一代的荧光探针,其中Loren Looger实验室于2013年构建了重要兴奋性神经递质谷氨酸的荧光探针iGluSnFR(Marvin,J.S.et al.An optimized fluorescent probe for visualizing glutamate neurotransmission. Nature methods 10,162-170 (2013))。该探针通过将荧光蛋白与细菌周质空间内结合谷氨酸的蛋白相融合,将结合蛋白的构象改变转化为荧光蛋白亮度的变化。该方法不仅通过基因编码达到了细胞特异性的检测谷氨酸的浓度和释放,其基于构象改变的原理本身也使得探针具有高灵敏性和快速的时间分辨率。将该种基因编码的谷氨酸受体探针优化并特意表

达在特定神经元的突触后膜后,其可以精确地记录该神经元合适受到突触前的谷氨酸释放,在突触水平通过成像方法检测到了神经递质的作用,为神经元之间的联系和神经网络的建成提供了重要的信息。虽然该方法为应用基因编码的荧光探针来检测神经递质提供了先例,但iGluSnFR应用了细菌中的代谢型的谷氨酸结合蛋白,使得该探针构建方法难以简单的应用于其他神经递质的检测,对于不同的神经递质则需要重新寻找或设计其结合蛋白,而对于有些关键的高等生物特有的大分子神经递质如肽类神经递质来说,在原核生物中很难找到对应的结合蛋白;此外,针对不同的小分子结合蛋白,将其有效的定位于细胞膜上检测神经递质的动态可能需要不同的定位序列优化或辅助蛋白的帮助,这些都限制了该方法的应用。总而言之,由于神经系统的复杂性和神经递质的动态多样性,现如今缺乏有效的手段能够时空特异性的检测神经递质的动态变化,这大大制约了神经生物学的发展。

发明内容

[0008] 本发明利用G蛋白偶联受体 (GPCR) 感受特定配体并发生构象改变的特点,利用与G蛋白偶联受体相偶联的循环重排的荧光蛋白将G蛋白偶联受体的构象改变转变为光学信号的变化,通过检测光学信号的变化来检测所述特定配体的浓度,以此为原理构建基于GPCR的激活的荧光探针 (GRAB探针, GPCR Activation Based Sensor,也可被称为基于G蛋白偶联受体构建的荧光探针) 和利用GRAB探针检测所述特定配体的方法。

[0009] 由于大多数经典神经递质的受体为配体介导的离子通道或G蛋白偶联受体 (GPCR)。因此,本发明的GRAB探针和检测方法特别适用于检测神经递质,通过制备与神经递质结合的特定G蛋白偶联受体,把它们由配体激活的构象变化,直接偶联到光信号的输出,从而反映神经递质浓度的动态变化。

[0010] 本发明的一方面涉及基于G蛋白偶联受体构建的荧光探针 (GRAB探针),所述荧光探针是对G蛋白偶联受体进行改造获得的融合蛋白,所述改造包括在G蛋白偶联受体的第五跨膜区和第六跨膜区之间的第三胞内环中插入循环重排的荧光蛋白。

[0011] 所述基于G蛋白偶联受体构建的荧光探针 (即GRAB探针) 能够在细胞膜上表达。所述基于G蛋白偶联受体构建的荧光探针当与所述G蛋白偶联受体的特异性配体接触时可以与其结合,由此导致荧光探针的荧光强度具有可检测到的变化。所述基于G蛋白偶联受体构建的荧光探针可用于定性地检测所述 G蛋白偶联受体的特异性配体的结合或其浓度改变,或者定量地分析所述G蛋白偶联受体的特异性配体的浓度。

[0012] 在一些实施方案中,所述改造包括对G蛋白偶联受体的第五跨膜区和第六跨膜区之间的第三胞内环截短并在截短的位置插入循环重排的荧光蛋白。

[0013] 在一些实施方案中,所述循环重排的荧光蛋白两端分别通过连接肽与G蛋白偶联受体的第三胞内环相连。

[0014] 在一些实施方案中,所述连接肽包括柔性氨基酸。优选地,所述柔性氨基酸包括甘氨酸和/或丙氨酸。更优选地,所述连接肽由甘氨酸和丙氨酸组成。

[0015] 在一些实施方案中,循环重排的荧光蛋白N端的连接肽为GG,和/或循环重排的荧光蛋白C端的连接肽为GGAAA。

[0016] 在一些实施方案中,所述循环重排的荧光蛋白选自循环重排的绿色荧光蛋白 (cpGFP)、循环重排的黄色荧光蛋白 (cpYFP)、循环重排的红色荧光蛋白 (cpRFP)、循环重排

的蓝色荧光蛋白(cpBFP)、循环重排的增强绿色荧光蛋白(cpEGFP),和循环重排的增强黄色荧光蛋白(cpEYFP)。

[0017] 在一些实施方案中,所述循环重排的荧光蛋白是循环重排的增强绿色荧光蛋白(cpEGFP)。循环重排的增强绿色荧光蛋白优选是来自GCaMP6s、GCaMP6m或G-GECO的cpEGFP。

[0018] 在一些实施方案中,所述循环重排的荧光蛋白是循环重排的红色荧光蛋白(cpRFP)。循环重排的红色荧光蛋白包括但不限于cpmApple、cpmCherry、cpmRuby2、cpmKate2和cpFusionRed,优选是cpmApple。cpmApple优选是来自R-GECO1的cpmApple。

[0019] 在一些实施方案中,所述循环重排的荧光蛋白是循环重排的黄色荧光蛋白(cpYFP)。循环重排的黄色荧光蛋白包括但不限于循环重排的Venus(cpVenus)、循环重排的Citrine(cpCitrine)。

[0020] 在一些实施方案中,所述循环重排的荧光蛋白是循环重排的红外荧光蛋白(cp infrared fluorescent protein, cpiRFP)。

[0021] 在一些实施方案中,可以用循环重排的荧光素酶(cp luciferase)替代荧光蛋白,构建本发明的荧光探针。

[0022] 在一些实施方案中,所述G蛋白偶联受体是与特异性配体特异性结合的G蛋白偶联受体。

[0023] 在一些实施方案中,所述特异性配体是神经递质,包括但不限于肾上腺素、去甲肾上腺素、乙酰胆碱、五羟色胺和/或多巴胺。所述G蛋白偶联受体是与神经递质特异性结合的G蛋白偶联受体,例如但不限于与肾上腺素、去甲肾上腺素、乙酰胆碱、五羟色胺和/或多巴胺特异性结合的G蛋白偶联受体。

[0024] 在另一些实施方案中,所述特异性配体是激素、代谢分子或营养分子,所述G蛋白偶联受体是与激素、代谢分子或营养分子特异性结合的G蛋白偶联受体。

[0025] 在一些实施方案中,所述特异性配体为人工合成的激活特定受体的小分子或药物,所述G蛋白偶联受体是与所述人工合成的激活特定受体的小分子或药物特异性结合的G蛋白偶联受体。所述人工合成的激活特定受体的小分子或药物包括但不限于异丙肾上腺素(ISO)。

[0026] 在一些实施方案中,所述G蛋白偶联受体是人源的。

[0027] 在一些实施方案中,所述G蛋白偶联受体是动物源的。

[0028] 在一些实施方案中,基于G蛋白偶联受体构建的荧光探针是用于检测肾上腺素的荧光探针,其中所述G蛋白偶联受体是特异性结合肾上腺素的GPCR。

[0029] 在一些实施方案中,所述特异性结合肾上腺素的GPCR是人 $\beta 2$ 肾上腺素受体,所述基于G蛋白偶联受体构建的荧光探针是基于人 $\beta 2$ 肾上腺素受体构建的荧光探针。

[0030] 在一些实施方案中,在基于人 $\beta 2$ 肾上腺素受体构建的荧光探针中,循环重排的荧光蛋白通过N端和C端的连接肽与人 $\beta 2$ 肾上腺素受体的第三胞内环相连。在一些优选的实施方案中,循环重排的荧光蛋白两端的连接肽的长度分别是氮端为1个或2个氨基酸,和/或碳端为1个、2个、3个、4个或5个氨基酸。在一些更优选的实施方案中,循环重排的荧光蛋白两端的连接肽的长度分别是氮端为2个氨基酸,碳端为5个氨基酸。在另一些优选的实施方案中,循环重排的荧光蛋白两端的连接肽的长度分别是氮端为1个氨基酸,碳端为1个氨基酸。在一些优选的实施方案中,循环重排的荧光蛋白两端的连接肽分别是N端为GG,C端为

GGAAA。在另一些优选的实施方案中,循环重排的荧光蛋白两端的连接肽分别是N端为GG,C端为SPSVA。在另一些优选的实施方案中,循环重排的荧光蛋白两端的连接肽分别是N端为GG,C端为APSVA。在另一些优选的实施方案中,循环重排的荧光蛋白两端的连接肽分别是N端为G,C端为G。

[0031] 在一些实施方案中,被插入到人 β 2肾上腺素受体中的循环重排的荧光蛋白是cpEGFP。在一些实施方案中,所述cpEGFP是来自GCaMP6s的cpEGFP。在另一些实施方案中,所述cpEGFP是来自GCaMP6m或GEC01.2的cpEGFP。

[0032] 在优选的实施方案中,所述人 β 2肾上腺素受体的氨基酸序列为:

[0033] MGQPGNGSAFL LAPNRSHAPDHDVTQQRDEVWVVGMGIVMSLIVLAIVFGNVLVITAIKFER LQTV
TNYFITSLACADLVMGLAVVPFGAAHILMKMWTFGNFWCEFWTSIDVLCVTASIETLCVIAV DRYFAITSPFKYQ
SLLTKNKARV IILMVWIVSGLTSFLPIQMHWRATHQEAINCYANETCCDFFTN QAYAIASSIVSFYVPLVIMVF
VYSRVFQEAKRQLQKIDKSEGRFHVQNLSQVEQDGRGTGHGLRRSSKFCLKEHKALKTLGIIMGTFTLCWLPFFIVN
IVHVIQDNLIRKEYVYILLNWIGYVNSGFNPLIYCRSPDF RIAFQELLCLRRSSLKAYGNGYSSNGTGEQSGYHV
EQEKENKLLCEDLPGTEDFVGHQGTVPDNI DSQGRNCSTNDSLL (SEQ ID NO:1);

[0034] 其中下划线部分为第三胞内环。

[0035] 在一些实施方案中,循环重排的荧光蛋白被插入到所述人 β 2肾上腺素受体的第240位氨基酸和第241位氨基酸之间。在一些实施方案中,循环重排的荧光蛋白被插入到所述人 β 2肾上腺素受体的第250位氨基酸和第251位氨基酸之间。

[0036] 在一些实施方案中,基于G蛋白偶联受体构建的荧光探针是用于检测肾上腺素和/或去甲肾上腺素的荧光探针,其中所述G蛋白偶联受体是特异性结合肾上腺素和/或去甲肾上腺素的GPCR。

[0037] 在一些实施方案中,所述特异性结合肾上腺素和/或去甲肾上腺素的GPCR是人ADRA2A受体,所述基于G蛋白偶联受体构建的荧光探针是基于人ADRA2A受体构建的荧光探针。

[0038] 在一些实施方案中,在所述基于人ADRA2A受体构建的荧光探针中,人ADRA2A受体的第三个胞内环被截短并在截短的位置插入循环重排的荧光蛋白。

[0039] 在一些优选的实施方案中,在基于人ADRA2A受体构建的荧光探针中,循环重排的荧光蛋白通过N端和C端的连接肽与人ADRA2A受体的第三胞内环相连。在一些优选的实施方案中,循环重排的荧光蛋白两端的连接肽的长度分别是氮端为2个氨基酸,碳端为5个氨基酸。在一些优选的实施方案中,循环重排的荧光蛋白两端的连接肽分别是N端为GG,C端为GGAAA。在一些优选的实施方案中,循环重排的荧光蛋白两端的连接肽分别是N端为GG,C端为TGAAA。

[0040] 在一些实施方案中,被插入到人ADRA2A受体中的循环重排的荧光蛋白是cpEGFP。在一些实施方案中,所述cpEGFP是来自GCaMP6s的cpEGFP。在另一些实施方案中,所述cpEGFP是来自GCaMP6m或GEC01.2的cpEGFP。

[0041] 在一些优选的实施方案中,所述人ADRA2A受体的氨基酸序列为:

[0042] MFRQEQLAEGSFAPMGSLQPDAGNASWNGTEAPGGGARATPYSLQVTLTLVCLAGLLMLLT VFGNV
LVIIAVFTSRALKAPQNLFLVSLASADILVATLVIPFSLANEVMGYWYFGKAWCEIYLALDV LFCTSSIVHLCAI
SLDRYWSITQAIEYNLKRTPRRIKAI IITVWVISAVISFPPLISIEKKGGGGGPQPAEP RCEINDQKWYVISSCI

GSFFAPCLIMILVYVRIYQIAKRRTVRPPSRRGPDAAVAPPGGTERRPNGLGPERSAGPGGAEEPLPTQLNGAPG
EPAPAGPRDTDALDLEESSSDHAERPPGPRRPERGPRGKGKARASQVKPGDSLPRRPGATGIGTPAAGPGEERV
GAAKASRWRGRQNREKRFTFVLAVVIGVFVVCW FPFFFTYTLTAVGCSVPRTLKFFFWFGYCNSSLNPVIYITIF
NHDFRAAFKKILCRGDRKRIV (SEQ ID NO:2);

[0043] 其中下划线部分为第三胞内环。

[0044] 在一些优选的实施方案中,上述人ADRA2A受体的第三胞内环的第79-138位氨基酸被截去,并在被截去的位置上插入循环重排的荧光蛋白。在另一些优选的实施方案中,上述人ADRA2A受体的第三胞内环的第79-143位氨基酸被截去,并在被截去的位置上插入循环重排的荧光蛋白。

[0045] 在一些实施方案中,基于G蛋白偶联受体构建的荧光探针是用于检测乙酰胆碱的荧光探针,其中所述G蛋白偶联受体是特异性结合乙酰胆碱的GPCR。

[0046] 在一些实施方案中,所述特异性结合肾上腺素的GPCR是人乙酰胆碱受体M3R亚型,所述基于G蛋白偶联受体构建的荧光探针是基于人乙酰胆碱受体M3R亚型构建的荧光探针。

[0047] 在一些实施方案中,在所述基于人乙酰胆碱受体M3R亚型构建的荧光探针中,人乙酰胆碱受体M3R亚型的第三个胞内环被截短并在截短的位置插入循环重排的荧光蛋白。

[0048] 在一些实施方案中,在基于人乙酰胆碱受体M3R亚型构建的荧光探针中,循环重排的荧光蛋白通过N端和C端的连接肽与人乙酰胆碱受体M3R亚型的第三胞内环相连。在一些实施方案中,循环重排的荧光蛋白两端的连接肽的长度分别是氮端为2个氨基酸,碳端为5个氨基酸。在一些优选的实施方案中,循环重排的荧光蛋白两端的连接肽分别是N端为GG,C端为GGAAA。在另一些优选的实施方案中,循环重排的荧光蛋白两端的连接肽分别是N端为GG,C端为HGAAA。在另一些优选的实施方案中,循环重排的荧光蛋白两端的连接肽分别是N端为GG,C端为HNAAA。在另一些优选的实施方案中,循环重排的荧光蛋白两端的连接肽分别是N端为GG,C端为HNAK。

[0049] 在一些实施方案中,被插入到人乙酰胆碱受体M3R亚型中的循环重排的荧光蛋白是cpEGFP。在一些实施方案中,所述cpEGFP是来自GCaMP6s的cpEGFP。在另一些实施方案中,所述cpEGFP是来自GCaMP6m或GEC01.2的cpEGFP。

[0050] 在优选的实施方案中,所述人乙酰胆碱受体M3R亚型的氨基酸序列为:

[0051] MTLHNNSTTSPLFPNISSSWIHSPSDAGLPPGTVTHFGSYNVSRAAGNFSSPDGTTDDPLGGHT VWQ
VVFIAFLTGLALVTIIGNILVIVSFKNKQLKTVNNYFLLSLACADLIIGVISMNLFITYIIMNR WALGNLACD
LWLAIIDYVASNASVMNLLVISFDRYFSITRPLTYRAKRTTKRAGVMIGLAWVISFVL WAPAILFWQYFVGKRTVP
PGECFIQFLSEPTITFGTAIAAFYMPVTIMTILYWRYYKETEKRTKELAGLQASGTEAETENFVHPTGSSRSCSSY
ELQQQSMKRSNRRKYGRCHFWFTTKSWKPSSEQMDQDHSSSDSWNNNDAAASLENSASSDEEDIGSETRAIYSIVL
KLPGHSTILNSTKLPSDDLQVPEEELGMVDLERKADKLQAQKSVDGGSFPKSFSLPIQLESADVDTAKTSDVNS
SVGKSTATLPLSFKEATLAKRFALKTRSQITKRKRMSLVKEKKAQTLAAILLAFIITWTPYNIMVLVNTFCDS
PKTFWNLYWLCYIN STVNPVCYALCNKTFRTTFKMLLLCQCDKKRRKQQYQQRQSVIFHKRAPEQAL (SEQ ID
NO:3);

[0052] 其中下划线部分为第三胞内环(ICL3),该ICL3为第253-491位氨基酸。

[0053] 在一些实施方案中,上述人乙酰胆碱受体M3R亚型的第260-490位氨基酸被截去,

并在被截去的位置上插入循环重排的荧光蛋白。在一些实施方案中,上述人乙酰胆碱受体M3R亚型的第260-491位氨基酸被截去,并在被截去的位置上插入循环重排的荧光蛋白。

[0054] 在一些实施方案中,基于G蛋白偶联受体构建的荧光探针是用于检测5-羟色胺的荧光探针,其中所述G蛋白偶联受体是特异性结合5-羟色胺的GPCR,所述基于G蛋白偶联受体构建的荧光探针是基于特异性结合5-羟色胺的GPCR构建的荧光探针。

[0055] 在一些实施方案中,所述特异性结合5-羟色胺的GPCR是人HTR2C受体,所述基于G蛋白偶联受体构建的荧光探针是基于人HTR2C受体构建的荧光探针。

[0056] 在一些实施方案中,在所述基于人HTR2C受体构建的荧光探针中,人HTR2C受体的第三个胞内环被截短并在截短的位置插入循环重排的荧光蛋白。

[0057] 在一些优选的实施方案中,在基于人HTR2C受体构建的荧光探针中,循环重排的荧光蛋白通过N端和C端的连接肽与人HTR2C受体的第三胞内环相连。在一些优选的实施方案中,循环重排的荧光蛋白两端的连接肽的长度分别是氮端为2个氨基酸,碳端为5个氨基酸。在一些优选的实施方案中,循环重排的荧光蛋白两端的连接肽分别是N端为GG,C端为GGAAA。在一些优选的实施方案中,循环重排的荧光蛋白两端的连接肽分别是N端为NG,C端为GFAAA。

[0058] 在一些实施方案中,被插入到人HTR2C受体中的循环重排的荧光蛋白是cpEGFP。在一些实施方案中,所述cpEGFP是来自GCaMP6s的cpEGFP。在另一些实施方案中,所述cpEGFP是来自GCaMP6m 或GEC01.2的cpEGFP。

[0059] 在一些优选的实施方案中,所述人HTR2C受体的氨基酸序列为:

[0060] MVNLRNAVHSFLVHLIGLLVWQCDISVSPVAAIVTDIFNTSDGGRFKFPDGVQNWPAISIVIIII MT
IGGNILVIMAVSMKKLHNATNYFLMSLAIADMLVGLLVMP LSLAILLYDYVWPLPRYLCPVWI SLDVLFSTASI
MHLCAISLDTRYVAIRNPIEHSRFSNRKAIMKIAIVWAISIGVSVPPIVIGLRDEEKVFV NNTTCVLNDPNFVLI
GSFVAFPIPLTIMVITYCLTIYVLRRLQALMLLHGHTTEPPGLSLDFLKCKCRNTAEEN SANPNQDQNARRRKKKE
RRPRGTMQAINNERKASKVLGIVFFVFLIMWCPFFITNLSVLCE KSCNQKLMKLLNVFVWIGYVCSGINPLVY
TLFNKIYRRAFSNYLRCNYKVEKKPPVRQIPRVAAT ALSGRELVNVIYRHTNEPVIEKASDNEPGIEMQVENLEL
PVNPSSVVSERISSV (SEQ ID NO:4);

[0061] 其中下划线部分为第三胞内环。

[0062] 在一些优选的实施方案中,上述人HTR2C受体的第三胞内环的第16-55位氨基酸被截去,并在被截去的位置上插入循环重排的荧光蛋白。在一些优选的实施方案中,上述人HTR2C受体的第三胞内环的第11-60位氨基酸被截去,并在被截去的位置上插入循环重排的荧光蛋白。在一些优选的实施方案中,上述人HTR2C受体的第三胞内环的第16-70位氨基酸被截去,并在被截去的位置上插入循环重排的荧光蛋白。在另一些优选的实施方案中,上述人HTR2C受体的第三胞内环的第15-68位氨基酸被截去,并在被截去的位置上插入循环重排的荧光蛋白。

[0063] 在一些更优选的实施方案中,上述人HTR2C受体的第三胞内环的第15-68位氨基酸被截去,并在被截去的位置上插入循环重排的荧光蛋白,并且其第三胞内环的第13位的亮氨酸L被突变为苯丙氨酸 F。

[0064] 在一些实施方案中,基于G蛋白偶联受体构建的荧光探针是用于检测多巴胺的荧光探针,其中所述G蛋白偶联受体是特异性结合多巴胺的GPCR。

[0065] 在一些实施方案中,所述特异性结合多巴胺的GPCR是人DRD2受体,所述基于G蛋白偶联受体构建的荧光探针是基于人DRD2受体构建的荧光探针。

[0066] 在一些实施方案中,在所述基于人DRD2受体构建的荧光探针中,人DRD2受体的第三个胞内环被截短并在截短的位置插入循环重排的荧光蛋白。

[0067] 在一些优选的实施方案中,在基于人DRD2受体构建的荧光探针中,循环重排的荧光蛋白通过N端和C端的连接肽与人DRD2受体的第三胞内环相连。在一些优选的实施方案中,循环重排的荧光蛋白两端的连接肽的长度分别是氮端为2个氨基酸,碳端为5个氨基酸。在一些优选的实施方案中,循环重排的荧光蛋白两端的连接肽分别是N端为GG,C端为GGAAA。

[0068] 在一些实施方案中,被插入到人DRD2受体中的循环重排的荧光蛋白是cpEGFP。在一些实施方案中,所述cpEGFP是来自GCaMP6s的cpEGFP。在另一些实施方案中,所述cpEGFP是来自GCaMP6m或GEC01.2的cpEGFP。

[0069] 在一些优选的实施方案中,所述人DRD2受体的氨基酸序列为:

[0070] MDPLNLSWYDDDLERQNSRPFNGSDGKADRPYNYATLLTLLIAVIVFGNVLVCMASRE KALQT
TTNYLIVSLAVADLLVATLVMPWVVYLEVVGWKFSSRIHCDIFVTLDVMMCTASILNLCAI SIDRYTAVAMPMLY
NTRYSSKRRVTVMISIVWVLSFTISCPLLFGLNNADQNECIIANPAFVVYSSIV SFYVPFIVTLLVYIKIYIVLR
RRRKRVNTRKSSRAFRAHLRAPLKGNCTHPEDMKLCTVIMKSNFSFPVNRNRRVEAARRAQELEMELSSSTSPPERT
RYSPIPPSHHQLTLPDPSHHGLHSTPDSPAKPEKNGHAKDHPKIAKIFEIQTMPNGKTRTSLKTMSRRKLSQQKEK
KATQMLAIVLGVFIIICWLPFFITHILNIHCD CNIPPVLYSAFTWLGYN SAVNP IIYTTFNIEFRKAFLKILHC
(SEQ ID NO:5);

[0071] 其中下划线部分为第三个胞内环。

[0072] 在一些优选的实施方案中,上述人DRD2受体的第253-357位氨基酸被截去,并在被截去的位置上插入循环重排的荧光蛋白。在一些优选的实施方案中,上述人DRD2受体的第254-360位氨基酸被截去,并在被截去的位置上插入循环重排的荧光蛋白。

[0073] 在一些实施方案中,基于G蛋白偶联受体构建的荧光探针是用于检测多巴胺的荧光探针,其中所述G蛋白偶联受体是特异性结合多巴胺的GPCR。

[0074] 在一些实施方案中,所述特异性结合多巴胺的GPCR是人DRD2受体,所述基于G蛋白偶联受体构建的荧光探针是基于人DRD2受体构建的荧光探针。

[0075] 在一些实施方案中,在所述基于人DRD2受体构建的荧光探针中,人DRD2受体的第三个胞内环被截短并在截短的位置插入循环重排的荧光蛋白。

[0076] 在一些优选的实施方案中,在基于人DRD2受体构建的荧光探针中,循环重排的荧光蛋白通过N端和C端的连接肽与人DRD2受体的第三胞内环相连。在一些优选的实施方案中,循环重排的荧光蛋白两端的连接肽的长度分别是氮端为5个氨基酸,碳端为3个氨基酸。在一些优选的实施方案中,循环重排的荧光蛋白两端的连接肽分别是N端为PVVSE,C端为ATR。

[0077] 在一些实施方案中,被插入到人DRD2受体中的循环重排的荧光蛋白是cpmApple,在一些实施方案中,所述cpmApple是来自R-GEC01的cpmApple。

[0078] 在一些优选的实施方案中,所述人DRD2受体的氨基酸序列为:

[0079] MDPLNLSWYDDDLERQNSRPFNGSDGKADRPYNYATLLTLLIAVIVFGNVLVCMASRE KALQT

TTNYLIVSLAVADLLVATLVMPWVVYLEVVGWKF^{SR}IHC^DIFVTL^DVMMCTASILNLCAI SIDRYTAVAMPMLY
NTRYSSKRRVTVMISIVVWLSFTISCPL^LFLGNNADQNECIIANPAFVVYSSIV SFYVPFIVTLLVYIKIYIVLR
RRRKRVN^{TK}RSSRA^{FRA}HLRAPLKG^{NCT}HPEDMKLCTVIMKSN^GSFPVNR^{RR}VEAARRAQELEM^{EM}LSSTSPPERT
RYSPIPPSHHQLTLPDPSHHGLHSTPDSPAKPEKNGHAKDHPKIAKIFEIQTMPNGKTRTSLKTMSRRKLSQQKEK
KATQMLAIVLGVFIICWLPFFITHILNIHCD CNIPPVLYSAFTWLGYVNSAVNP^{II}YTTFNIEFRKAFLKILHC
(SEQ ID NO:5);

[0080] 其中下划线部分为第三个胞内环。

[0081] 在一些优选的实施方案中,上述人DRD2受体的第223-349位氨基酸被截去,并在被截去的位置上插入循环重排的荧光蛋白。在一些优选的实施方案中,上述人DRD2受体的第268-364位氨基酸被截去,并在被截去的位置上插入循环重排的荧光蛋白。在一些优选的实施方案中,上述人DRD2受体的第224-365位氨基酸被截去,并在被截去的位置上插入循环重排的荧光蛋白。

[0082] 在一些实施方案中,基于G蛋白偶联受体构建的荧光探针是用于检测5-羟色胺的荧光探针,其中所述G蛋白偶联受体是特异性结合5-羟色胺的GPCR,所述基于G蛋白偶联受体构建的荧光探针是基于特异性结合5-羟色胺的GPCR构建的荧光探针。

[0083] 在一些实施方案中,所述特异性结合5-羟色胺的GPCR是人HTR2C受体,所述基于G蛋白偶联受体构建的荧光探针是基于人HTR2C受体构建的荧光探针。

[0084] 在一些实施方案中,在所述基于人HTR2C受体构建的荧光探针中,人HTR2C受体的第三个胞内环被截短并在截短的位置插入循环重排的荧光蛋白。

[0085] 在一些优选的实施方案中,在基于人HTR2C受体构建的荧光探针中,循环重排的荧光蛋白通过N端和C端的连接肽与人HTR2C受体的第三胞内环相连。在一些优选的实施方案中,循环重排的荧光蛋白两端的连接肽的长度分别是氮端为5个氨基酸,碳端为3个氨基酸。在一些优选的实施方案中,循环重排的荧光蛋白两端的连接肽分别是N端为PVVSE,C端为ATR。

[0086] 在一些实施方案中,被插入到人HTR2C受体中的循环重排的荧光蛋白是cpmApple,在一些实施方案中,所述cpmApple是来自R-GECO1的cpmApple。

[0087] 在一些优选的实施方案中,所述人HTR2C受体的氨基酸序列为:

[0088] MDPLNLSWYDDDLERQ^NWSRPFNGSDGKAD^RPHYNYATLLTLLIAVIVFGNVLVCMAVSRE KALQT
TTNYLIVSLAVADLLVATLVMPWVVYLEVVGWKF^{SR}IHC^DIFVTL^DVMMCTASILNLCAI SIDRYTAVAMPMLY
NTRYSSKRRVTVMISIVVWLSFTISCPL^LFLGNNADQNECIIANPAFVVYSSIV SFYVPFIVTLLVYIKIYIVLR
RRRKRVN^{TK}RSSRA^{FRA}HLRAPLKG^{NCT}HPEDMKLCTVIMKSN^GSFPVNR^{RR}VEAARRAQELEM^{EM}LSSTSPPERT
RYSPIPPSHHQLTLPDPSHHGLHSTPDSPAKPEKNGHAKDHPKIAKIFEIQTMPNGKTRTSLKTMSRRKLSQQKEK
KATQMLAIVLGVFIICWLPFFITHILNIHCD CNIPPVLYSAFTWLGYVNSAVNP^{II}YTTFNIEFRKAFLKILHC
(SEQ ID NO:4);

[0089] 其中下划线部分为第三胞内环。

[0090] 在一些优选的实施方案中,上述人HTR2C受体的第241-306位氨基酸被截去,并在被截去的位置上插入循环重排的荧光蛋白。在一些优选的实施方案中,上述人HTR2C受体的第240-309位氨基酸被截去,并在被截去的位置上插入循环重排的荧光蛋白。

[0091] 在一些实施方案中,在上述任一种基于G蛋白偶联受体构建的荧光探针中,所述改

造进一步包括在G蛋白偶联受体的C末端连接G α 蛋白肽段。G α 蛋白肽段优选可以连接在所述G蛋白偶联受体的C末端最后一个氨基酸之后。所述G α 蛋白肽段可以是任一种G蛋白碳端的20个氨基酸。在一些优选的实施方案中,所述G α 蛋白肽段的具体序列是:VF~~AAVKDTILQLNLKEYNLV~~ (G α _q20,SEQ ID NO:6)。在另一些优选的实施方案中,所述G α 蛋白肽段的具体序列是:VF~~NDCRDIIQRMHLRQYELL~~ (G α _s20,SEQ ID NO:7)。在另一些优选的实施方案中,所述G α 蛋白肽段的具体序列是:VF~~DAVTDVIIKNNLKDCGLF~~ (G α _i20,SEQ ID NO:8)。

[0092] 在优选的实施方案中,在所述任一种基于人乙酰胆碱受体M3R亚型构建的荧光探针中,在人乙酰胆碱受体M3R亚型的C末端连接G α 蛋白肽段。G α 蛋白肽段优选可以连接在所述人乙酰胆碱受体M3R亚型的C末端最后一个氨基酸之后。所述G α 蛋白肽段可以是任一种G蛋白碳端的20个氨基酸。在一个优选的实施方案中,所述G α 蛋白肽段的具体序列是:VF~~AAVKDTILQLNLKEYNLV~~ (G α _q20,SEQ ID NO:6)。在另一些优选的实施方案中,所述G α 蛋白肽段的具体序列是:VF~~NDCRDIIQRMHLRQYELL~~ (G α _s20,SEQ ID NO:7)。在另一些优选的实施方案中,所述G α 蛋白肽段的具体序列是:VF~~DAVTDVIIKNNLKDCGLF~~ (G α _i20,SEQ ID NO:8)。

[0093] 在一些实施方案中,在上述任一种基于G蛋白偶联受体构建的荧光探针中,所述改造进一步包括在G蛋白偶联受体的C端插入荧光素酶,以使得荧光素酶催化化学反应发出的光能够激发所述荧光探针中的循环重排的荧光蛋白。

[0094] 在一些实施方案中,所述荧光素酶催化化学反应发出的光的峰值接近于所述探针中包含的循环重排的荧光蛋白的激发光波长。

[0095] 在一些实施方案中,所述荧光素酶是Nanoluc。

[0096] 在另一些实施方案中,所述荧光素酶是Fluc (萤火虫荧光素酶,firefly luciferase)或Rluc (海肾荧光素酶,Renilla luciferase)。

[0097] 在一些实施方案中,在所述任一种基于人HTR2C受体构建的荧光探针中,所述荧光素酶被插入到荧光探针的C端,荧光素酶通过其N端和C端的连接肽与所述荧光探针的C端连接,并且荧光素酶N端和C端的连接肽均为GSG。

[0098] 在一些实施方案中,所述荧光素酶被插入到荧光探针GRAB-5-HT2.0的第582位和583位氨基酸之间,并且所述荧光素酶两端通过连接肽与荧光探针GRAB-5-HT2.0相连,其中荧光素酶N端和C端的连接肽均为GSG;其中荧光探针GRAB-5-HT2.0是将人HTR2C受体的第三胞内环的第15-68位截去,并在截去的位置上插入cpEGFP (优选来自GCaMP6s的cpEGFP)获得的荧光探针,其中所述cpEGFP的N端通过N端连接肽NG与人HTR2C受体相连,C端通过C端连接肽GFAAA与人HTR2C受体相连。所述人HTR2C受体的氨基酸序列是:

[0099] MVNLRNAVHSFLVHLIGLLVWQCDISVSPVAAIVTDIFNTSDGGRFKFPDGVQNWPALSIVIIII MT
IGGNILVIMAVSM~~EEKKLHNATNYFLMSLAIADMLVGLLV MPLSLLAILYDYVWPLPRYLCPVWI~~ SLDVLFSTASI
MHLCAISLDRYVAIRNPIEHSRFSNRTKAIMKIAIVWAISIGVSVPPIVIGLRDEEKV FV NNTTCVLNDPNFVLI
G SFV~~AFFIPLTIMVITYCLTIYVLR~~QALMLLHGHT~~EEPPGLSLDFLKCKCRNTAEEENSANPNQDQ~~NARRRKKKE
RRPRGTMQAINNERKASKV~~LGIVFFVFLIMWCPFFITNILSVLCE~~ KSCN~~QKLMEKLLNVFVWIGYVCSG~~INPLVY
TLFNKIYRRAFS~~NYLRCNYKVEKKPPVRQIPRVAAT~~ ALSGRELNVNIYRHTNEPVIEKASDNEPGIEMQVENLEL
PVNPSSVVSERISSV (SEQ ID NO:4);

[0100] 其中下划线部分为第三胞内环。

[0101] 本发明的另一方面涉及构建GRAB荧光探针的方法,包括将基于第一G蛋白偶联受

体构建的荧光探针的第三胞内环连同其中插入的循环重排的荧光蛋白完整截取出来,替换第二G蛋白偶联受体的第三胞内环,获得基于第二G蛋白偶联受体构建的荧光探针,即为所述GRAB荧光探针。

[0102] 本发明中,在这种构建GRAB探针的方法中,最终获得的GRAB荧光探针可以被视为是基于第二G蛋白偶联受体构建的荧光探针。

[0103] 在一些实施方案中,所述第一G蛋白偶联受体和第二G蛋白偶联受体结合相同的特异性配体或结合不同的特异性配体。

[0104] 所述基于第一G蛋白偶联受体构建的荧光探针可以是前述的任何一种GRAB探针。

[0105] 所述第二G蛋白偶联受体的特异性配体可以是神经递质、激素、代谢分子、营养分子或人工合成的激活特定受体的小分子或药物,所述第二G蛋白偶联受体可以是与神经递质、激素、代谢分子、营养分子或人工合成的激活特定受体的小分子或药物结合的G蛋白偶联受体。

[0106] 所述神经递质包括但不限于肾上腺素、去甲肾上腺素、乙酰胆碱、五羟色胺和/或多巴胺。

[0107] 所述人工合成的激活特定受体的小分子或药物包括但不限于异丙肾上腺素(ISO)。

[0108] 所述第二G蛋白偶联受体可以是人源的或动物源的。

[0109] 通过上述方法构建获得的GRAB荧光探针能够在细胞膜上表达,当与所述第二G蛋白偶联受体的特异性配体接触时可以与其结合,由此导致荧光探针的荧光强度具有可检测到的变化。通过上述方法构建获得的GRAB荧光探针可用于定性地检测所述第二G蛋白偶联受体的特异性配体的结合或其浓度改变,或者定量地分析所述第二G蛋白偶联受体的特异性配体的浓度。

[0110] 在优选的实施方案中,第一G蛋白偶联受体是人 $\beta 2$ 肾上腺素受体,所述人 $\beta 2$ 肾上腺素受体的氨基酸序列为:

[0111] MGQPGNGSAFLAPNRSHAPDHDVTQQRDEVWVVGMGIVMSLIVLAIVFGNVLVITAIKFER LQTV
TNYFITSLACADLVMGLAVVPFGAAHILMKMWTFGNFWCEFWTSIDVLCVTASIELCVIAV DRYFAITSPFKYQ
SLLTKNKARV IILMVWIVSGLTSFLPIQMHWYRATHQEAINCYANETCCDFFTN QAYAIASSIVSFYVPLVIMVF
VYSRVFQEAKRQLKIDKSEGRFHVQNLSQVEQDGRGTGHGLRRSSKFKLKEHKALKTLGIIMGTFTLCWLPPFIVN
IVHVIQDNLIRKEYVYILLNWIGYVNSGFNPLIYCRSPDF RIAFQELLCLRRSSLKAYGNGYSSNGNTGEQSGYHV
EQEKENKLLCEDLPGTEDFVGHQGTVPDNI DSQGRNCSTNDSLL (SEQ ID NO:1),

[0112] 其中下划线部分为第三胞内环。

[0113] 在一些实施方案中,循环重排的荧光蛋白被插入到所述人 $\beta 2$ 肾上腺素受体的第240位氨基酸和第241位氨基酸之间。在一些实施方案中,循环重排的荧光蛋白被插入到所述人 $\beta 2$ 肾上腺素受体的第250位氨基酸和第251位氨基酸之间。

[0114] 在一些实施方案中,循环重排的荧光蛋白通过N端和C端的连接肽与人 $\beta 2$ 肾上腺素受体的第三胞内环相连,其中,循环重排的荧光蛋白两端的连接肽分别是N端为GG,C端为GGAAA;或者,循环重排的荧光蛋白两端的连接肽分别是N端为GG,C端为SPSVA;或者,循环重排的荧光蛋白两端的连接肽分别是N端为GG,C端为APSV A。

[0115] 在一些实施方案中,被插入到人 $\beta 2$ 肾上腺素受体中的循环重排的荧光蛋白是

cpEGFP。在一些实施方案中,所述cpEGFP是来自GCaMP6s的cpEGFP。在另一些实施方案中,所述cpEGFP是来自GCaMP6m或GEC01.2的cpEGFP。

[0116] 在更优选的实施方案中,所述第二G蛋白偶联受体是人乙酰胆碱受体M3R亚型。在一些实施方案中,其具体序列是:

[0117] MTLHNSTTSPLFPNIISSSWIHSPSDAGLPPTVTHFGSYNVSRAAGNFSSPDGTTDDPLGGHTV WQ VVFIAFLTGLALVTIIGNILVIVSFKNKQLKTVNNYFLLSLACADLIIGVISMNLFTTYIIMNRW ALGNLACD LWLAIDYVASNASVMNLLVISFDRYFSITRPLTYRAKRTTKRAGVMIGLAWVISFVLW APAILFWQYFVGKRTVP PGECFIQFLSEPTITFTGTAIAAFYMPVTIMTILYWRIYKETEKRTKELAGLQASGTEAETENFVHPTGSSSRSCSSY ELQQQSMKRSNRRKYGRCHFWF^{TTKSWKPSSEQMDQDHSSSDSWNNNDAAASLENSASSDEEDIGSETRAIYSIVL} KLPGHSTILNSTKLPSSDNLQVPEEELGMVDLERKADKLQAQKSVDDGGSFPKSFSKLPIQLES^{AVDTAKTSDVNS} SVGKSTATLPLSFKEATLAKRFALKTRSQITKRKRMSLVKEKKAQ^{TL}SAILLAFIITWTPYNIMVLVNTFC^{DCSCI} PKTFWNLGWLCYINST VNPVCYALCNKTFRTTFKMLLL CQCDKKRRKQYQQRQSVIFHKRAPEQAL (SEQ ID NO:3);

[0118] 其中下划线部分的序列是其第三胞内环并被替换。

[0119] 在另一些优选的实施方案中,第一G蛋白偶联受体是人HTR2C受体,所述人HTR2C受体的氨基酸序列为:

[0120] MVNLRNAVHSFLVHLIGLLVWQCDISVSPVAAIVTDIFNTSDGGRFKFPDGVQNW^{PALSIVIIII} MT IGGNILVIMAVSMEKKLHNATNYFLMSLAIADMLVGLLVMP^{LSLLAILDYVWPLPRYLCPVWI} SLDVLFSTASI MHLCAISLDRYVAIRNPIEHSR^{FNSRTKAIMKIAIVWAISIGVSPIPVIGLRDEEKV^{FV}} NNTTCVLNDPNFVLI GSFVAFFIPLTIMVITYCLTIYV^{LRRQALMLLHGHTEEPGLSLDFLKCKCRNTAEEENSANPNQDQ^{NARRRKKKE}} RRPRTMQAINNERKASKVLGIVFFVFLIMWCPFFITNILSVLCE KSCNQKLMEKLLNVFVWIGYVCSGINPLVY TLFNKIYRRAFSNYLR^{CNYKVEKKPPVRQIPRVAAT} ALSGRELVNVIYRHTNEPVIEKASDNEPGIEMQVENLEL PVNPSSVVSERISSV (SEQ ID NO:4);

[0121] 其中下划线部分为第三个胞内环。

[0122] 在一些优选的实施方案中,上述人HTR2C受体的第三胞内环的第16-55位氨基酸被截去,并在被截去的位置上插入循环重排的荧光蛋白。在一些优选的实施方案中,上述人HTR2C受体的第三胞内环的第11-60位氨基酸被截去,并在被截去的位置上插入循环重排的荧光蛋白。在一些优选的实施方案中,上述人HTR2C受体的第三胞内环的第16-70位氨基酸被截去,并在被截去的位置上插入循环重排的荧光蛋白。在另一些优选的实施方案中,上述人HTR2C受体的第三胞内环的第15-68位氨基酸被截去,并在被截去的位置上插入循环重排的荧光蛋白。

[0123] 在一些更优选的实施方案中,上述人HTR2C受体的第三胞内环的第15-68位氨基酸被截去,并在被截去的位置上插入循环重排的荧光蛋白,并且其第三胞内环的第13位的亮氨酸L被突变为苯丙氨酸 F。

[0124] 在一些优选的实施方案中,在基于人HTR2C受体构建的荧光探针中,循环重排的荧光蛋白通过N端和C端的连接肽与人HTR2C受体的第三胞内环相连,其中,循环重排的荧光蛋白两端的连接肽分别是N端为GG,C端为GGAAA;或者,循环重排的荧光蛋白两端的连接肽分别是N端为NG,C端为GF^{AAAA}。

[0125] 在一些实施方案中,被插入到人HTR2C受体中的循环重排的荧光蛋白是cpEGFP。在

一些实施方案中,所述cpEGFP是来自GCaMP6s的cpEGFP。在另一些实施方案中,所述cpEGFP是来自GCaMP6m 或GEC01.2的cpEGFP。

[0126] 在更优选的实施方案中,所述第二G蛋白偶联受体是人HTR2B受体或人HTR6受体。

[0127] 在一些实施方案中,人HTR2B受体的氨基酸序列是:

[0128] MALSYRVSELQSTIPEHILQSTFVHVISSNWSGLQTESIPEEMKQIVEEQGNKLHWAALLILMVII P
TIGGNTLVILAVSLEKKLQYATNYFLMSLAVADLLVGLFVMPIALLTIMFEAMWPLPLVLCPAWLF LDVLFSTAS
IMHLCAISVDYRIAIAKKPIQANQYNSRATAFIKITVVWLISIGIAIPVPIKGIETDVPNPN ITCVLTKERFGDF
MLFGSLAAFFTPLAIMIVTYFLTIHALQKKAYLVKNKPPQRLTWLTVSTVFQRDETPCSSPEKVAMLDGSRKDKAL
PNSGDETLMRRTSTIGKKSQTISNEQRASKVLGIVFFLFLMWCP FFITNITLVLCDSNQTTLQMLLEIFVWI
GYVSSGVNPLVYTLFNKTFRDAFGRYITCNYRATKSVKT LKRSSKIYFRNPMMAENSKFFKKHGIRNGINPAMYQ
SPMRLRSSTIQSSSIILLDTLLLTENEGDKTEE RVSYV (SEQ ID NO:9);

[0129] 其中下划线部分为第三胞内环。

[0130] 在一些的实施方案中,人HTR6受体的氨基酸序列是:

[0131] MVPEPGPTANSTPAWGAGPPSAPGGSGWVAAALCVVIALTAAANSLIALICTQPALRNTSNFF LVS
LFTSDLMVGLVVMPPAMLNLYGRWVLARGLCLLWTAFDVMCCSASILNLCLISLDRYLLILS PLRYKLRMTPLR
ALALVLGAWSLAALASFLPLLLGWHELGHARPPVPGQCRLASLPFVLVASGLT FFLPSGAICFTYCRILLAARK
QAVQVASLTTGMSAQASETLQVPRTPRPGVESADSRRLATKHSRKALKASLTGILLGMFFVTWLPFFVANIVQAV
CDCISPGLFDVLTWLGVCNSTMNPIIYPLFMRDFKRA LGRFLPCPRCPRERQASLASPSLRTSHSGPRPGLSLQQ
VLPLPLPPDSDSDSAGSGSSGLRLTAQLL LPGEATQDPPLPTRAAAVNFFNIDPAEPELRPHPLGIPTN (SEQ
ID NO:10);

[0132] 其中下划线部分为第三胞内环。

[0133] 本发明还涉及通过上述方法构建获得的GRAB探针。

[0134] 本发明的另一方面涉及编码上述基于G蛋白偶联受体构建的荧光探针的多核苷酸。

[0135] 本发明的另一方面涉及包含上述多核苷酸的表达载体。

[0136] 本发明的另一方面涉及包含上述多核苷酸或上述表达载体的宿主细胞。

[0137] 在一些实施方案中,所述宿主细胞是神经元细胞。

[0138] 本发明的另一方面涉及利用上述任一种基于G蛋白偶联受体构建的荧光探针检测待测样品或待测组织中是否存在所述G蛋白偶联受体的特异性配体的方法,所述方法包括使所述基于G蛋白偶联受体构建的荧光探针在细胞膜上表达,并使表达的荧光探针与待测样品或待测组织接触,测定所述基于G 蛋白偶联受体构建的荧光探针与待测样品或待测组织中接触之前的荧光信号强度F0和接触之后的荧光信号强度F,根据F相对于F0的荧光强度变化确定待测样品或待测组织中是否存在所述G蛋白偶联受体的特异性配体。

[0139] 在一些实施方案中,所述荧光信号强度变化包括荧光信号强度增加或降低。

[0140] 本发明的另一方面涉及利用上述任一种基于G蛋白偶联受体构建的荧光探针对待测样品或待测组织中所述G蛋白偶联受体的特异性配体的浓度变化进行定性检测的方法,所述方法包括使所述基于G 蛋白偶联受体构建的荧光探针在细胞膜上表达,并使表达的荧光探针与含有所述特异性配体的待测样品或待测组织接触,在第一个时间点测定所述荧光探针的荧光信号强度F1,所述第一个时间点是在所述荧光探针与所述待测样品或待测组织

中接触之前或是在所述荧光探针与所述待测样品或待测组织中接触之后,在第一时间点之后的第二时间点测定所述荧光探针的荧光信号强度F2,根据F2相对于F1 的荧光信号强度变化确定所述特异性配体浓度在第二时间点相对于第一时间点的变化。

[0141] 在一些实施方案中,所述荧光信号强度变化包括荧光信号强度增加、降低或不变。在一些实施方案中,所述特异性配体的浓度变化包括其浓度增大、减小或不变。

[0142] 本发明的另一方面涉及利用上述任一种基于G蛋白偶联受体构建的荧光探针对待测样品或待测组织中所述G蛋白偶联受体的特异性配体的浓度变化进行定量检测的方法,所述方法包括:

[0143] (1) 使所述荧光探针与分别包含已知浓度的所述特异性配体的不同样品反应,测定所述特异性配体浓度与荧光信号强度的对应关系的标准曲线;

[0144] (2) 使所述荧光探针在细胞膜上表达,并使表达的荧光探针与含有所述特异性配体的待测样品或待测组织接触,测定荧光信号强度,根据测得的荧光信号强度和步骤(1)中获得的标准曲线获得所述待测样品或待测组织中的特异性配体的浓度。

[0145] 本发明的另一方面涉及药物筛选方法,包括使上述任一种基于G蛋白偶联受体构建的荧光探针在细胞膜上表达,将药物候选者加入到细胞中,测定药物候选者加入前后的荧光信号强度,根据药物候选者加入后的荧光信号强度相对于加入前的荧光信号强度的变化确定所述药物候选者是否是所述G蛋白偶联受体的激动剂。

[0146] 本发明的另一方面涉及药物筛选方法,包括:

[0147] (1) 使上述任一种基于G蛋白偶联受体构建的荧光探针在细胞膜上表达,向细胞中加入可激活所述 G蛋白偶联受体的分子,测定荧光信号强度变化;

[0148] (2) 向细胞中加入药物候选者,筛选能够逆转步骤(1)中的荧光信号强度变化的药物候选者,作为能阻断所述G蛋白偶联受体的拮抗剂。

[0149] 其中,如果步骤(1)中加入可激活所述G蛋白偶联受体的分子后荧光信号强度增大,步骤(2)中的逆转是指加入药物候选者后荧光信号强度减小;如果步骤(1)中加入加入可激活所述G蛋白偶联受体的分子后荧光信号强度减小,步骤(2)中的逆转是指加入药物候选者后荧光信号强度增大。

[0150] 本发明的另一方面涉及检测G蛋白偶联受体的特异性配体在动物体内分布的方法,包括使上述基于G蛋白偶联受体构建的荧光探针在动物体内表达,实时测定动物体内的荧光信号强度,根据动物体内不同区域的荧光信号强度有无、强弱和变化情况确定所述特异性配体在动物体内不同区域是否存在、不同区域之间的浓度是否有差别、以及同一区域的浓度是否随时间发生变化。

[0151] 在一些实施方案中,在测定荧光信号强度之前,诱导动物体产生所述特异性配体。

[0152] 在一些实施方案中,通过气味刺激或视觉刺激诱导动物体产生所述特异性配体。

[0153] 在上述任一种方法中,测定荧光信号强度时,可以通过外界光源的激发使得循环重排的荧光蛋白产生荧光信号。

[0154] 在上述任一种方法中,当所述荧光探针中还包括在G蛋白偶联受体的C末端插入的荧光素酶时,通过BRET(生物发光共振能量转移)进行检测,其中无需通过外界光源的激发使得循环重排的荧光蛋白产生荧光信号,而是在测定荧光信号强度之前,使所述荧光探针与所述荧光素酶的底物接触。

[0155] 利用本发明的荧光探针和方法,可以实现对G蛋白偶联受体的特异性配体的高效、准确的检测,有较高的时间分辨率,可以实时追踪G蛋白偶联受体的特异性配体在特定环境中的动态变化。

[0156] 虽然下述实施例以不同神经递质为例对本发明进行描述,但本领域技术人员应当理解,本发明的荧光探针利用了G蛋白偶联受体的七个跨膜区结构上的共性,因而可用于G蛋白偶联受体的其它配体,如激素、代谢分子或营养分子,而限于神经递质。

附图说明

[0157] 图1是 β_2 肾上腺素受体在不同位置插入循环重排荧光蛋白的示意图(上图)及荧光成像结果(下图)。其中采用Nikon共聚焦显微镜A1进行荧光成像。

[0158] 下图左上角数字对应荧光蛋白插入在GPCR的氨基酸位置,其在受体上的对应位置在上图中以短横线标示。下图中,箭头表示成功表达在细胞膜上的融合蛋白。

[0159] 图2是GRAB-EPI 0.1对饱和浓度(2 μ M) ISO的典型反应。在加入ISO后,受体发生构象改变,从而导致荧光信号产生快速的升高,其平均幅度为6% $\Delta F/F_0$ 。用生理溶液将ISO洗去后,受体的构象回复到非激活态,相应的细胞荧光值也回到基线。其中下图为采用伪彩色表示的单个细胞在加入ISO前后的荧光强度示意图,可以观察到在细胞膜上的荧光值在加入ISO前后有明显的可逆的变化。

[0160] 图3显示采用不同的循环重排荧光蛋白构建GRAB-EPI探针及其表现。利用循环重排的EGFP构建的探针具有较好的折叠和细胞膜运输,而采用循环重排的superfolder GFP构建的探针则无法正确折叠,下图中图像采集使用Olympus IX81倒置荧光显微镜拍摄,其中箭头所指为可见的明显细胞内荧光蛋白的聚集。

[0161] 图4显示改变荧光蛋白在 β_2 肾上腺素受体第三个胞内环的插入位点获得的结果。发现信号变化约为15% $\Delta F/F_0$ 的探针,表现出对配体的敏感、快速、可逆的光学变化。

[0162] 图5显示将 β_2 AR的短ICL3移植到 M_{1-5} R中产生GRAB-ACh探针。a: β_2 AR和 M_{1-5} R的序列比对,其中显示了TM5和TM6之间的区域,移植的边界用黑色虚线表示。b: M_{1-5} R- β_2 R ICL3-cpEGFP嵌合体对ACh (100 μ M)的荧光响应,只有衍生自 M_3 R的探针显示出可检测到的荧光增加,数据由TECAN荧光分析仪采集($n=6-10$ 孔/嵌合体, >100 个细胞/孔)。 M_1 R, $\Delta F/F_0$ -2.11 $\pm$ 1.58%; M_2 R, $\Delta F/F_0$ 2.09 $\pm$ 1.19%; M_3 R, $\Delta F/F_0$ 22.03 $\pm$ 0.86%; M_4 R, $\Delta F/F_0$ 2.16 $\pm$ 1.63%; M_5 R, $\Delta F/F_0$ -0.49 $\pm$ 0.16%。

[0163] 图6显示乙酰胆碱的GRAB-ACh探针的构建。a:GRAB-ACh探针的原理。b:基于不同毒蕈碱受体的GRAB-ACh探针在HEK293T细胞中的典型上膜模式,基于 M_3 R的探针,命名为GRAB-ACh 1.0,具有良好的上膜特性。c&d:GRAB-ACh 1.0的优化,随机突变cpEGFP的连接肽序列(N末端2个氨基酸, C末端5个氨基酸)进行筛选,效果最好的单个残基(c图)被进一步组合(d图),产生被命名为GRAB-ACh 2.0的探针,其 $\Delta F/F_0$ 接近100%。每个数据点是2-10个细胞的平均反应。e-g:GRAB-ACh 1.0&2.0在 HEK293T细胞中的反应。伪彩图是它们对于灌流100 μ M ACh的峰值反应(e图),f图显示了e图实验的定量值,g图显示了GRAB-ACh 1.0&2.0的组数据(GRAB-ACh 1.0: $\Delta F/F_0$ 24.62 $\pm$ 1.51%, $n=19$ 个细胞; GRAB-ACh 2.0: $\Delta F/F_0$ 90.12 $\pm$ 1.74%, $n=29$ 个细胞; $Z=-5.79$, $p<0.001$)。h-j:GRAB-ACh 2.0与基于FRET探针的毒蕈碱受体的比较,在灌流100 μ M ACh时,与FRET探针相比,GRAB-ACh 2.0在峰值反应($\Delta F/F_0$

94.0±3.0% 相对于 Δ FRET 比率 6.6±0.4%, i 图) 和信噪比 (724±9 相对于 8.3±1.1, j 图) 上都显示出显著更强的信号 (n=每组10个细胞)。g 图中进行 Mann-Whitney 秩和非参数检验, *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001; n.s., 无显著性。所有比例尺为 10 μ m。

[0164] 图7显示针对荧光蛋白和GPCR之间的连接肽段长度进行优化筛选的结果。其中信号变化最高的 ON 探针为2-5的连接肽段长度, 最好的OFF探针为1-1的连接肽段长度。图中每个柱下的数字表示为氮端肽段长度-碳端肽段长度, 如1-3代表氮端1个氨基酸, 碳端3个氨基酸。

[0165] 图8显示通过连接肽随机突变优化 GRAB-ACh 1.0。a: 连接 cpEGFP 的 N 和 C 末端的两个和五个氨基酸连接肽 (左图) 被单独随机突变为 20 个可能的氨基酸。单独测试 7 个残基的 373 个变体, 并在 HEK293T 细胞中对它们对于 ACh (100 μ M) 的 $\Delta F/F_0$ 反应进行定量检测 (右图)。选择每个残基上效果最好的一个到四个突变进行第二轮筛选。b: 第二轮筛选中 23 个候选者各自的序列信息和 $\Delta F/F_0$ 反应, 其中 GRAB-ACh 2.0 的 $\Delta F/F_0$ 接近于 0.9。

[0166] 图9显示出基于毒蕈碱受体的 FRET 探针对 ACh 的反应较差。a: 如之前报道构建基于 M₁R 的 FRET 探针 (Markovic, D., et al. FRET-based detection of M₁muscarinic acetylcholine receptor activation by orthosteric and allosteric agonists. PLoS one 7, e29946 (2012)), 其中 CFP 被插入到它的 ICL3 的 K361 和 K362 之间, YFP 被融合至它的 C 末端, 嵌合蛋白上膜效果较差。b: ACh (100 μ M) 在 YFP 通道中诱导微小的荧光降低, 并在 CFP 通道中诱导荧光增加 (n=10 个细胞的平均结果)。c: 灌流 ACh 后, ACh 探针的 FRET 比率 (CFP/YFP) 显示出中度增加。

[0167] 图10显示 GRAB 探针的光谱性质及其 pH 敏感性。基于绿色荧光蛋白构建的 GRAB 探针, 其激发峰和发射峰都与 GFP 类似, 分别位于 490 纳米和 520 纳米附近, 同时其荧光强度也表现出对溶液 pH 值的敏感性。

[0168] 图11显示 GRAB 探针在由配体激活的情况下产生特异性的荧光信号的变化。当加入受体的特异性阻断剂时, 同样浓度的激动剂无法由于无法与受体结合无法产生荧光信号的变化。

[0169] 图12显示针对 GPCR 结合配体的结构域进行突变可以显著影响探针的表现。A: 针对 β 2 肾上腺素受体的配体结合区域进行突变后, 激动剂 ISO 无法引起荧光信号的上升。B: 通过突变降低乙酰胆碱受体对于配体的亲和力后, 乙酰胆碱荧光探针表现出对于乙酰胆碱的亲和力降低。

[0170] 图13显示 GRAB 探针表现出配体浓度依赖的荧光信号变化。A: GRAB-EPI 1.0 探针对于不同浓度的激动剂 ISO 所表现出的荧光信号增强, 与内源的 β 2 肾上腺素受体类似。B: GRAB-ACh 1.0 探针对于不同浓度的乙酰胆碱表现的荧光值变化, 与内源 M3 型乙酰胆碱受体相似。

[0171] 图14显示 GRAB-ACh 2.0 对 ACh 的检测具有亚秒级动力学和微摩尔的灵敏度。a: 快速灌流系统的图示, 其中装有 ACh 和红色罗丹明-6G 染料的玻璃吸管被置于 GRAB-ACh 2.0 表达细胞附近, 白线表示进行的行扫描。b: 对 ACh 和 Tio 进行的行扫描实验, 灌流 ACh 或 Tio 导致 GRAB-ACh 2.0 荧光的增大或减小, 时间常数分别为 185ms 和 696ms。c: b 图的组数据, 平均的 on 时间常数为 279.4±32.6ms, n=18, off 时间常数为 762.3±74.9ms, n=11。d&e: GRAB-ACh 2.0 对 ACh 的剂量依赖反应。GRAB-ACh 2.0 ($\sim 0.7 \mu$ M, n=4) 的 pEC₅₀ = -6.12±0.11M, 与

WT-M₃R的Kd (0.5-2μM) (Jakubík, J., Bacáková, L., El-Fakahany, E.E. & Tucek, S. Positive cooperativity of acetylcholine and other agonists with allosteric ligands on muscarinic acetylcholine receptors. *Molecular pharmacology* 52, 172-179 (1997)) 非常接近。AF-DX384, 一种M₃R的拮抗剂, 完全阻断了荧光增加。d图中的单位是μM, 为使用同一个HEK293T 细胞进行的3次试验的平均反应。

[0172] 图15显示GRAB探针与G蛋白介导的信号通路的偶联具有明显的下降。通过钙染料处理细胞后, 进行不同浓度乙酰胆碱的灌流实验, 比较在表达GRAB-ACh 1.0探针和内源M₃型乙酰胆碱受体的细胞中的钙信号是否有差别。其中下图为钙信号与配体浓度的反应曲线, 可见表达GRAB探针的细胞其钙信号的偶联程度降低5倍左右。

[0173] 图16显示利用Gα蛋白碳端肽段可以稳定GPCR于激活状态但无法传递下游信号的特点, 在GRAB 探针的末端连接Gα蛋白肽段, 从而通过竞争内源G蛋白结合而降低G蛋白介导的下游通路的激活。A: GRAB-ACh 2.0-Gq20探针荧光成像图, 可见探针折叠良好并表达在细胞膜上。B: GRAB-ACh 2.0-Gq20 在加入饱和乙酰胆碱时所表现的荧光信号增强, 其信号变化约为70% ΔF/F₀。C: 采用钙成像方法获得表达不同探针的细胞在不同浓度的神经递质处理下钙信号的变化, 通过计算Kd值可见连接Gα肽段的探针对于G蛋白介导的下游通路偶联有明显的下降。

[0174] 图17显示基于GPCR受体内吞原理所构建的荧光探针检测受体对内吞信号通路的偶联。A: 内吞探针的原理。B: 基于β₂肾上腺素受体构建的探针pHluorin-β₂AR表现出明显的内吞信号通路的激活, 即细胞荧光信号的下降。

[0175] 图18显示GRAB探针对于arrestin介导的内吞信号通路的偶联效率大大降低。A: 针对GRAB-EPI 1.0 探针, 采用饱和浓度的激动剂ISO处理30分钟, 观测到细胞膜上的荧光值不随时间而发生改变。B: GRAB-EPI 1.0探针和内源β₂肾上腺素受体的内吞信号偶联效率比较, 可以发现GRAB探针几乎完全阻断了内吞信号通路的偶联, 从而真实地反映配体浓度的动态改变。

[0176] 图19是GRAB探针在培养的神经元中的荧光成像图。A: GRAB-EPI 1.0在皮层神经元中的成像。B: GRAB-ACh 1.0在皮层神经元中的荧光成像图(左图)及其局部放大图(右图)。

[0177] 图20显示GRAB探针在培养神经元中的反应。A: GRAB-ACh 1.0探针在培养的皮层神经元中表现出配体特异性的荧光信号上升。B: GRAB-EPI 1.0探针及GRAB-ACh 1.0探针在神经元中表现出配体浓度依赖的荧光反应。

[0178] 图21显示GRAB探针对于特定神经递质的反应特异性。A&B: GRAB-ACh 1.0仅对肾上腺素(Epi) 及其类似物(ISO)产生可重复性的, 可逆的特异性反应, 该反应在加入阻断剂ICI时不存在。C&D: GRAB-ACh 1.0探针仅对乙酰胆碱产生可重复性的特异反应, 而对其他主要神经递质没有荧光响应。

[0179] 图22显示GRAB-ACh 1.0探针特异性的检测果蝇嗅觉系统的内源乙酰胆碱释放。在给予乙酸异戊酯气味后, 触角神经叶处的探针光学信号表现出快速的上升, 其幅度为气味分子浓度依赖的(上图)。同时, 荧光信号的上升表现出嗅球特异性, 在接受感受乙酸异戊酯的嗅觉受体神经元投射的嗅球中, 如DM2, 其信号较大, 而在不接受该类神经元投射的嗅球如DA1中, 荧光信号不发生变化(下图)。

[0180] 图23显示利用红色钙指示剂RGECO检测在体过表达GRAB探针对于细胞钙信号的影

响。A:为在单独表达RGECO的果蝇和共同表达RGECO和GRAB-ACh 1.0探针的果蝇中,气味分子引发的触角神经叶的DM2嗅球钙信号上升具有相似的幅度。B:为多个果蝇的统计结果。

[0181] 图24显示GRAB-ACh探针在小鼠海马急性采集脑片上的表现。A:为双光子显微镜下GRAB-ACh 探针在海马神经元中的荧光成像,从左至右分别是用红色染料Alexa 594对神经元染色成像、转入 GRAB-ACh的神经元成像、前二者图像叠加,可见GRAB探针均匀分布于神经元的细胞膜上,并且在神经元的轴突等位置都有可见表达。B:为表达GRAB-ACh的细胞相比于未表达的细胞表现出特异的乙酰胆碱引发的荧光上升。C:为GRAB-ACh探针表达的细胞对于M型受体的激动剂乙酰胆碱,0xo-M 有荧光响应,而对尼古丁及生理溶液(ACSF,人工脑脊液)本身没有明显的荧光强度的变化。

[0182] 图25显示选择用于构建荧光探针的人源去甲肾上腺素受体。a:去甲肾上腺素NE和肾上腺素Epi 的化学结构。b:N端融合表达绿色荧光蛋白pHluorin的三种不同去甲肾上腺素受体ADRA1D、ADRB3、ADRA2A在哺乳动物细胞HEK293T中的表达情况。b图中ADRA1D和ADRB3中的箭头指示上膜情况较差的细胞,ADRA2A中的箭头指示上膜情况较好的细胞。Scale=50 μ m。

[0183] 图26显示去甲肾上腺素荧光探针的开发及优化。a:针对ADRA2A受体第三个胞内环ICL3进行截短并插入循环重排荧光蛋白cpEGFP的示意图。b:第一轮筛选获得具有对NE有荧光信号变化的 GRAB-NE1.0。c:第二轮对插入位点细致筛选后获得荧光亮度较好,对NE的荧光信号改变更大的 GRAB-NE2.0。d:通过药物灌流实验,在100 μ M NE情况下NE1.0和2.0版本分别有超过100%和200%的荧光信号变化,且该类探针的反应是可逆的,药物洗掉后荧光强度恢复至初始值。e:GRAB-NE1.0 和2.0的伪彩图。Scale=10 μ m。

[0184] 图27显示GRAB-NE2.0在连接肽段上的继续优化。a:连接肽段的截短筛选库示意图。b:连接肽段的截短筛选并没有产生比GRAB-NE2.0荧光强度更高,荧光信号变化更大的探针。c:连接肽段氨基酸突变库的示意图。d:第三轮对连接肽段的筛选得到荧光强度更高,对NE荧光信号变化更大的 GRAB-NE2.1,其为第三个连接氨基酸的甘氨酸突变为苏氨酸。

[0185] 图28显示GRAB-NE探针的基本刻画及GRAB-NE2.2的开发。a:GRAB-NE2.0的药物特异性分析。其只对神经递质NE和Epi具有荧光信号变化,对饱和浓度的 β 型受体特异激活剂ISO和其他神经递质均没有反应。加入 α 受体特异阻断剂Yohimbine (2 μ M) 和ADRA2A受体的配体结合区域S204A突变均可抑制配体引起的NE探针信号变化。b:依次灌流10nM到100 μ M的NE得到GRAB-NE2.0的配体浓度依赖曲线,该反应还可被加入1 μ M的阻断剂Yohimbine完全抑制(单位: μ M)。c:引入T373K突变获得GRAB-NE2.2,其浓度依赖曲线比较于GRAB-NE2.1左移,其对配体NE的亲和力提高10倍。d: GRAB-NE2.1、GRAB-NE2.1S204A、GRAB-NE2.2在HEK293T细胞中的表达及上膜情况。e:GRAB-NE 优化提高后的NE2.1和NE2.2版本比GRAB-NE2.0版本在荧光强度和荧光反应信号上都有所提升。f: GRAB-NE2.2对配体NE和Epi具有类似的浓度依赖曲线,两种配体的亲和力均得到提高。比例尺为10 μ m。

[0186] 图29显示GRBA-NE2.2探针具有快速的反应动力学。a:NPEC基团笼锁NE在紫外光激活下释放游离的NE和NPEC基团的示意图。b:利用405nm激光光解GRAB-NE2.2周围白色区域,可观测到 GRAB-NE2.2在光解100 μ M NPEC-NE时20%的荧光信号变化,在10 μ M阻断剂Yohimbine存在下,该荧光信号变化被抑制。c:GRAB-NE2.2在模拟光解反应、100 μ M NPEC-NE及加入10 μ M Yohimbine 时荧光信号的变化图。将光解时间点周围2000ms时间进行放大可

拟合光解反应引起GRAB-NE2.2探针荧光信号上升的速率常数为104ms。

[0187] 图30是GRAB-NE探针与下游G蛋白信号解偶联的刻画。a&b:绿色荧光蛋白在NE受体蛋白 ADRA2A第三个胞内环的插入将G α i蛋白与GPCR解偶联的示意图。c&d:GRAB-NE2.0与PTX共转后不改变NE2.0对配体的浓度依赖曲线(单位: μ M)。e:在digitonin(一种皂苷,作用为在细胞膜上打通孔道,可让外源加入的药物进入细胞内,尤其是脂溶性差本身难以跨越细胞膜的小分子(GTP γ S等))处理下加入GTP γ S抑制G α 蛋白的活化循环也未改变GRAB-NE2.0对NE的浓度依赖曲线。f.通过在100 nM NE处理下GRAB-NE2.0、受体蛋白ADRA2A及TPA(可直接激活细胞内PLC(GPCR的下游),在TGF- α assay中可作为阳性对照,检验系统是否正常工作)引起的下游TGF α 释放实验发现GRAB-NE2.0激活下游信号的强度仅为受体蛋白的1/3。

[0188] 图31显示GRAB-NE2.1在培养的神经元中对特异性的神经递质具有光学信号变化。a&b:共转 GRAB-NE2.1和PSD95-mcherry可看到,GRAB-NE在神经元膜上分布较为均匀,细胞胞体部分略有聚集(1),但树突膜上分布较好(如1、2箭头)。与PSD95共定位的树突棘上也具有明显的分布(如1、2三角形)。c:在100 μ M NE药物灌流时,细胞膜上及树突棘均有约200%的荧光信号变化,与哺乳动物细胞中类似,细胞胞体因上膜情况不好,反应约为60%。d:转染GRAB-NE2.1的神经元药物灌流时及药物洗脱后的伪彩图。e:细胞胞体,细胞膜,树突棘的荧光反应信号比较。f&g:GRAB-NE2.1神经元细胞胞体对不同浓度NE的依赖曲线,药物灌流从10nM到100 μ M,配体亲和力为790nM(单位: μ M)。比例尺为10 μ m。

[0189] 图32显示神经递质荧光探针GRAB-NE2.1在培养的大鼠心肌细胞中对特异性的神经递质具有光学信号变化。a:GRAB-NE2.1在大鼠心肌细胞中的表达及上膜情况。b:在100 μ M NE药物灌流时, GRAB-NE2.1在心肌细胞中有大于300%的荧光信号变化,且该反应是可逆的。c:GRAB-NE2.1在心肌细胞中反应的伪彩图。d&e:该探针在心肌细胞中的反应也具有配体浓度依赖性,一次灌流1nM到100 μ M的NE,可得到该探针的配体浓度依赖曲线,亲和力为500nM;用1 μ M的阻断剂Yohimbine可抑制该反应(单位: μ M);比例尺为50 μ m。

[0190] 图33显示出GRAB-5-HT2.1探针在HEK293T细胞中表现出配体浓度依赖的荧光反应, K_d 值约为131 nM,与HTR2C受体在生理情况下的亲和力类似。

[0191] 图34显示了:A:GRAB-5-HT2.1探针仅对五羟色胺产生特异的反应,而对其它主要神经递质如 Gly,Epi,Ach等没有荧光响应。B:五羟色胺和HTR2C的特异性激动剂CP809可以引起GRAB-5-HT2.1 探针荧光信号的改变,而HTR2B的特异性激动剂BWT23C83和HTR1B的特异性激动剂CGS12066B则不能引起探针信号的改变;HTR2C的特异性拮抗剂RS102221可以拮抗五羟色胺引发的GRAB-5-HT2.1 探针荧光信号的增加,而HTR2B的特异性拮抗剂SB204741则不能拮抗信号的增加。

[0192] 图35显示基于不同的HTR受体构建的一系列的五羟色胺荧光探针,在加入饱和浓度的五羟色胺后的响应。

[0193] 图36显示GRAB-5-HT2.0探针特异性地检测果蝇嗅觉系统的内源五羟色胺释放。在给予气味(乙酸异戊酯,香蕉味)刺激后,探针的光学信号表现出快速的上升。

[0194] 图37显示基于DRD2构建的探针GRAB-GDA3.0在饱和浓度的多巴胺处理下的信号变化。

[0195] 图38显示GRAB-GDA3.0在HEK293T细胞中的药理学表征。GRAB-GDA3.0只能被多巴

胺和 hDRD2特异性的激动剂喹吡罗(quinpirole)激活,并且被hDRD2特异性的拮抗剂Haloperidol阻断。

[0196] 图39显示在MB中气味激发GRAB-GDA3.0(图中显示为GDA)信号。A:气味刺激后果蝇体内2-PT 成像示意图。GRAB-GDA3.0在多巴胺能神经元(DAN)中表达,由TH-GAL4驱动,关注蕈状体(MB),它接收多巴胺能增强信号。MB β' lobe用虚线勾出。比例尺为25 μ m。B:位于DAN的细胞膜上的GDA 能够报道突触间隙中的多巴胺释放。C1-C3:IA(1%乙酸异戊酯, isoamyl acetate, 5秒)刺激后 β' lobe 中的GRAB-GDA3.0的伪彩成像。比例尺为25 μ m。D:在一只果蝇中对IA刺激后 β' lobe中的 GRAB-GDA3.0信号的3次试验的平均时间。

[0197] 图40显示MB中气味激发的GRAB-GDA3.0(图中显示为GDA)信号是多巴胺特异性的。A-C:IA激发的 β' lobe中的GDA信号可被hDRD2特异性拮抗剂halo(10 μ M haloperidol)阻断。在施用halo之前和之后在一只果蝇中的伪彩成像。比例尺为25 μ m(A图);在施用halo之前和之后在同一只果蝇中的三次试验的平均时间(B图);统计学结果显示halo对GDA的明显抑制(C图)。误差线表示SEM(n=6)。D-F:IA 的激发MB β' lobe中的GDA信号不能被章鱼胺受体拮抗剂epinastine(10 μ M)阻断。在施用epinastine之前和之后在一只果蝇中的伪彩成像。比例尺为25 μ m(D图);在施用epinastine之前和之后在同一只果蝇中的三次试验的平均时间(E图);统计学结果显示epinastine对GDA无抑制效果(F图)。误差线表示 SEM(n=6)。G-J:当在DAN中表达DAT-RNAi并由TH-GAL4驱动时,GDA信号的衰减 τ 。DAT位于DAN 的突触前膜,它从间隙循环释放DA(G图)。一只WT果蝇和一只DAT缺陷果蝇中的平均时间。衰减曲线的拟合结果显示在H图中;误差线表示SEM(n=6)。WT果蝇和DAT缺陷果蝇中气味刺激后的伪彩成像。比例尺为25 μ m(J图)。

[0198] 图41显示基于cpmApple的多巴胺荧光探针的构建。A:构建的文库中的变体的配体诱导反应($\Delta F/F_0$)。进行灌流以测试92个变体的性能,其中16个未显示出荧光,56个没有显示出配体诱导的反应,16个显示出on反应,5个显示出off反应。虚线矩形框表示具有最高on反应和off反应的候选物。222-349/267-364表示cpmApple向HTR2C的插入位点。B:左图是所选出的两个候选物的成像特性,右图是相应的反应曲线,比例尺为20 μ m,结果显示为平均值 $\pm$ SEM,红色曲线n=6个细胞,蓝色曲线n=5 个细胞。C:左图是连接肽随机突变文库中的变体的配体诱导反应($\Delta F/F_0$)。图中仅显示了变体的反应特性。虚线矩形框表示具有最大反应的候选物。中间图显示了微调文库的最佳候选物的成像特性。右图是相应的反应曲线,比例尺为20 μ m,结果显示为平均值 $\pm$ SEM,红色曲线n=5个细胞,黑色曲线n=6 个细胞。D:右图是连接肽随机突变文库中的变体的配体诱导反应($\Delta F/F_0$)和相对亮度。文库是五个独立文库的混合物,每个独立文库是针对一个氨基酸随机突变的文库。红色点表示起始模板的特性,它是从微调文库中选出的最佳候选者。黑色点表示连接肽随机突变文库的变体的特性。左图中X表示随机突变连接肽氨基酸的位置,连接肽氨基酸被单独地逐一随机突变。

[0199] 图42显示基于cpmApple的五羟色胺荧光探针的构建。A:由cpRFP插入策略和微调策略构建的文库中的变体的配体诱导反应($\Delta F/F_0$)。虚线矩形框表示具有最高on反应和off反应的候选物。240-306/239-309表示cpmApple向HTR2C的插入位点。B:左图是所选出的两个候选物的成像特性,右图是相应的反应曲线,比例尺为20 μ m,结果显示为平均值 $\pm$ SEM,红色曲线n=8个细胞,蓝色曲线n=6 个细胞。C:右图是连接肽随机突变文库中的变体

的配体诱导反应 ($\Delta F/F_0$) 和相对亮度。文库是五个独立文库的混合物,每个独立文库是针对一个氨基酸随机突变的文库。红色点表示起始模板的特性,它是从微调文库中选出的最佳候选者。黑色点表示连接肽随机突变文库的变体的特性。左图中X表示随机突变连接肽氨基酸的位置,连接肽氨基酸被单独地逐一随机突变。

[0200] 图43是基于生物发光共振能量转移的五羟色胺荧光探针的信号变化情况。其中R为535nm通道的信号强度与450nm通道的信号强度的比值。其中dR是 ΔR ,即R的变化值。其中535nm通道指示GRAB 探针的发射波长,450nm通道为Nanoluc的发射波长,两者比例作为能量共振转移的一种测量。

[0201] 图44显示特异的受体阻断剂(Tio)可以阻断乙酰胆碱探针GRAB-ACh 1.0对配体乙酰胆碱的响应。

[0202] 图45显示了基于乙酰胆碱M3R受体构建的荧光探针的优化筛选。a&b:从ICL3的N端7个位点和C 端8个位点中各随机挑选一个位点,截短这两个位点之间的肽段并插入cpEGFP;c:从Opera Phenix上的筛选结果中挑选出一部分用Confocal灌流来证实;d:部分突变体的灌流结果。

[0203] 图46显示了对cpEGFP与M3R受体的连接肽段的优化,其中显示C端第一个氨基酸是组氨酸His时探针的表现更佳。

[0204] 图47显示了通过对连接肽段的优化筛选获得GRAB-ACh4.0。

[0205] 图48显示了GRAB-ACh4.0的灌流结果。

[0206] 图49显示了GRAB-ACh4.0对其配体乙酰胆碱的亲和能力与报道的野生型M3R受体无显著差异。

[0207] 图50显示了GRAB-ACh4.0能够且仅能够被ACh激活产生荧光强度变化。

[0208] 图51显示了GRAB-ACh4.0不激活下游Gq引导的信号通路。

[0209] 图52显示了使用表达GRAB-5HT1.0探针的细胞系进行药物筛选的实验结果。

[0210] 图53显示了在乙酰胆碱探针的C端连接不同G α 蛋白肽段均能使探针对下游G蛋白信号通路的偶联能力下降。

具体实施方式

[0211] 本发明的基于G蛋白偶联受体(GPCR)激活的荧光探针(GPCR Activation Based Sensor,本发明中也称为GRAB探针、基于G蛋白偶联受体构建的荧光探针)的原理是:将循环重排的荧光蛋白插入到GPCR 的第三胞内环中,配体与GPCR的结合会诱导GPCR的构象改变,由此导致循环重排的荧光蛋白的构象改变,引起荧光信号强度的变化,从而将配体诱导的GPCR的构象改变转换为光学信号的变化。

[0212] G蛋白偶联受体(GPCR)是表达在细胞质膜上的一类七次跨膜蛋白,GPCR蛋白质主体由7段跨细胞质膜的 α 螺旋结构构成,N端和3个loop位于胞外,C端和3个loop位于胞内。在针对G蛋白偶联受体的研究中,晶体结构的解析帮助科学家了解其在配体激活后引发细胞内下游通路的具体机理。通过利用G 蛋白肽段稳定受体的方法,Masashi Miyano组第一次对于经典的GPCR即视觉中的感光受体视紫红质 rhodopsin进行了晶体结构的解析(Palczewski,K.et al.Crystal Structure of Rhodopsin:A G Protein-Coupled Receptor.Science(New York,NY) 289,739-745 (2000))16.,发现在对其激活态与非激活态

的结构对比中,他们发现GPCR在配体结合后引发了一系列的构象改变,该构象改变最明显的为第五和第六个跨膜区域的向外伸展,从而暴露出一个结构孔洞以便于G蛋白的碳端进入。随后,通过多种稳定GPCR晶体结构的方法,尤其是可以将受体稳定于激活状态的单链抗体nanobody的应用,brian kobilka组于2012年前后成功解析出 β 2肾上腺素受体的晶体结构也被解析出(Rasmussen,S.G.F.et al. Crystal structure of the human beta2adrenergic G-protein-coupled receptor.Nature 450,383-387 (2007); Rasmussen,S.G.F.et al.Crystal structure of the β 2adrenergic receptor-Gs protein complex.Nature 477, 549-555 (2011);Cherezov,V.et al.High-Resolution Crystal Structure of an Engineered Human β 2adrenergic Receptor.Science 318,1258-1265 (2007)),与视紫红质rhodopsin类似, β 2肾上腺素受体的激活同样伴随着明显的分子构象改变,其中变化最大的也为第五和第六个跨膜区。为了进一步证实该特异性的构象改变为多数GPCR所共有的保守激活模式,进而针对M型乙酰胆碱受体(Kruse,A.C. et al.Structure and dynamics of the M3muscarinic acetylcholine receptor.Nature 482,552-556 (2012)), opioid(Huang,W.et al.Structural insights into micro-opioid receptor activation.Nature 524,315-321 (2015))受体进行了晶体结构的解析,并且同样发现其具有类似的构象改变模式,因此推测该激活模式可能为大多数GPCR所共有。通过GPCR的晶体结构解析可知,GPCR本身可以被视作自然演化的特异性配体探针,其反应即为保守的构象改变,以介导下游通路的激活。根据不同GPCR在激活态和非激活态晶体结构的解析,其配体结合所导致的构象改变模式十分保守,为第五和第六个跨膜区的向外折叠。

[0213] 如上所述,已解析的GPCR晶体结构信息显示,GPCR在激活过程中构象改变最大的位置为第五和第六个跨膜区,而第三个胞内环为连接第五第六跨膜区的区域,其作为一段柔性区域随着跨膜区的构象改变产生伸展。与此相对应,在初步筛选中也发现,第三个胞内环中插入荧光蛋白不仅可以保持受体本身的正确折叠和上膜运输,还可以在受体构象改变时有较好的荧光信号变化。

[0214] 本发明中,将循环重排的荧光蛋白与GPCR构建融合蛋白,当配体分子浓度发生变化时,GPCR 的构象随之发生变化,进而影响荧光蛋白生色团环境,导致荧光强度的变化,这种荧光强度的变化可以通过光学成像方法进行实时检测,因此,可利用循环重排荧光蛋白的荧光强度变化来指示配体(例如外源神经递质)的浓度变化。本发明中,该探针被命名为GRAB探针,即为GPCR Activation Based Sensor的缩写。由于大多数已知的神经递质皆有对应的特异性GPCR,因此,本发明的循环重排的荧光蛋白与GPCR构建的融合蛋白可以作为探针,用于检测神经递质;此外,本发明的探针还可以用于检测其它GPCR的配体。

[0215] 本发明中,GRAB探针是指在GPCR的第五和第六个跨膜区之间的第三胞内环中的适当位置插入循环重排的荧光蛋白,并在循环重排的荧光蛋白的N端和C端以连接肽与第三胞内环相连,由此构建的融合蛋白,它可用作检测该GPCR的配体的探针。

[0216] 本发明提供基于G蛋白偶联受体构建的荧光探针(GRAB探针),所述荧光探针是对G蛋白偶联受体进行改造获得的融合蛋白,所述改造包括在G蛋白偶联受体的第五跨膜区和第六跨膜区之间的第三胞内环中插入循环重排的荧光蛋白。

[0217] 本文所述的“G蛋白偶联受体(GPCR)”是跨膜受体的大蛋白家族,其感应细胞外的

分子,激活细胞内的信号转导途径并最终激活细胞反应。结合和激活这些受体的配体包括光敏化合物、气味、信息素、激素和神经递质,并且大小变化从小分子至肽至大蛋白。GPCR涉及许多疾病,也是所有现代药用药物的一半左右的靶标。基于序列同源性和功能相似性,GPCR可以分为至少5类:A类视紫红质样、B类促胰液素样、C类代谢型/信息素、D类真菌信息素、和E类cAMP受体。

[0218] A类视紫红质样受体包括:胺受体:乙酰胆碱、 α 肾上腺素受体、 β 肾上腺素受体、多巴胺、组胺、5-羟色胺、章鱼胺和痕量胺;肽受体:血管紧张素、铃蟾肽、缓激肽、C5a过敏毒素、Fmet-leu-phe、APJ样物质、白细胞介素-8、趋化因子受体(C-C趋化因子、C-X-C趋化因子、B0N20受体(CXC6R)、C-X3-C趋化因子和XC趋化因子)、CCK受体、内皮素受体、黑皮质素受体、神经肽Y受体、神经降压素受体、阿片样物质受体、生长抑素受体、速激肽受体(P物质(NK1)、K物质(NK2)、神经调节肽K(NK3)、速激肽样1和速激肽样2)、加压素样受体(加压素、催产素和Conopressin)、甘丙肽样受体(甘丙肽、抑咽侧体神经肽和GPCR 54)、蛋白酶激活样受体(例如,凝血酶)、食欲肽&神经肽FF、硬骨鱼紧张肽II受体、肾上腺髓质素(G10D)受体、GPR37/内皮素B样受体、趋化因子受体样受体和神经调节肽U受体;激素蛋白受体:促卵泡激素、促黄体素-绒毛膜促性腺激素、促甲状腺素和促性腺激素;(Rhod)视蛋白受体;嗅觉感受器;前列腺素类受体:前列腺素、前列环素和血栓烷;核苷酸样受体:腺苷和嘌呤受体;大麻受体;血小板活化因子受体;促性腺激素释放激素受体;促甲状腺素释放激素&促分泌素受体:促甲状腺素释放激素、生长激素促分泌素和生长激素促分泌素样;褪黑素受体;病毒受体;溶性鞘脂(Lysosphingolipid)&LPA(EDG)受体;白三烯M受体:白三烯B4受体BLT1和白三烯M受体BLT2;和A类孤儿/其他受体:血小板ADP&KI01受体、SREB、Mas原癌基因、RDC1、ORPH、LGR样(激素受体)、GPR、GPR45样、半胱氨酰白三烯、Mas相关受体(MRGs)和GP40样受体。

[0219] GPCR的B类(促胰液素受体家族)包括多肽激素受体(降钙素、促肾上腺皮质激素释放因子、肠抑胃肽、胰高血糖素、胰高血糖素样肽-1,-2、生长激素释放激素、甲状旁腺激素、PACAP、促胰液素、血管活性肠肽、利尿激素、EMR1、蛛毒素受体(Latrophilin)),认为在质膜介导细胞间相互作用的分子(脑特异性血管生成抑制因子(BAI))以及调节应激反应和寿命的一组果蝇蛋白(Methuselah样蛋白)。

[0220] C类代谢型谷氨酸/信息素受体包括代谢型谷氨酸、I组代谢型谷氨酸、II组代谢型谷氨酸、III组代谢型谷氨酸、其他代谢型谷氨酸、细胞外钙传感、推定的信息素受体、GABA-B受体(GABA-B受体由两个亚基构成(B1,B2),是一个二聚体蛋白)和孤儿GPCR5受体。

[0221] GPCR涉及各种生理过程,包括视觉、嗅觉、行为和情绪调节、免疫系统活性和炎症调节、自主神经系统传输、细胞密度感应和许多其他。已知失活的G蛋白以其失活状态结合至受体。一旦识别配体,受体或其亚基转变构象,并且因此机械地激活G蛋白,G蛋白从受体脱离。现在受体可以激活另一G蛋白,或者切换回其失活状态。相信受体分子存在于活性和失活生物物理状态之间的构象平衡中。配体结合至受体可以使平衡向活性受体状态转变。

[0222] 本发明可使用的G蛋白偶联受体包括但不限于 β 2肾上腺素受体(ADRB2)、 α 2A肾上腺素受体(ADRA2A)、乙酰胆碱受体M3R亚型(M3型毒蕈碱性乙酰胆碱受体,CHRM3)、多巴胺D2受体(DRD2)、5-羟色胺2C受体(HTR2C)、5-羟色胺2B受体(HTR2B)、5-羟色胺受体6(HTR6),这些受体是本领域技术人员熟知的,其序列可以通过多种途径,例如公知的数据库

查询获得。

[0223] 本领域技术人员可以容易地确定G蛋白偶联受体的N端、跨膜区、胞内环和C端,例如,基于其氨基酸序列和与已知G蛋白偶联受体的跨膜区的相似性。各种生物信息学方法可以用于确定蛋白中跨膜区的位置和结构,例如,可以利用BLAST程序或CLUSTAL W程序,在本领域中常规进行比对和氨基酸序列比较。基于与已知含有跨膜区的G蛋白偶联受体的比对,本领域技术人员可以预测其它GPCR 的跨膜区的位置和结构。还有许多程序可用于预测蛋白中跨膜区的位置和结构。例如,可以使用以下程序的一种或其组合:TMpred,其预测跨膜蛋白片段;TopPred,其预测膜蛋白的拓扑结构; PREDATOR,其从单个和多个序列预测二级结构;TMAP,其从多个比对的序列预测蛋白的跨膜区;和ALOM2,其从单个序列预测跨膜区。按照标准命名法,跨膜区和胞内环的编号是相对于GPCR的N 端。

[0224] 本文所使用的术语“循环重排的荧光蛋白(circular permutated FP,cpFP)”是本领域技术人员熟知的,是指将原始的荧光蛋白的分子末端连接后,再将蛋白从任意位点断开形成新的碳端和氮端,由此形成的荧光蛋白。荧光蛋白本身具有其自身的三个氨基酸组成的生色团中心,其发生的化学反应决定了荧光蛋白的光谱性质以及荧光强度,荧光蛋白的生色团大多数位于蛋白质的内部,受到周围 β 折叠的桶装结构保护,将荧光蛋白与靶蛋白融合时,荧光蛋白末端的牵扯难以引起生色团周围的环境变化,难以改变荧光蛋白的荧光强度。循环重排的荧光蛋白的生色团相对靠近新形成的末端,当它与靶蛋白连接后,靶蛋白的构象变化会牵扯循环重排的荧光蛋白的末端,导致生色团周围环境的变化,从而使得荧光蛋白的荧光强度增大或减小,由此将靶蛋白发生的构象变化转变为其荧光强度的变化,从而可以通过光学成像方法进行实时检测。循环重排的荧光蛋白最早衍生自绿色荧光蛋白,其氨基酸序列与 GFP 同源性非常高,Roger Tsien最早在开发基因编码的钙指示剂过程中首次设计并应用了循环重排的绿色荧光蛋白(Baird,G.S.,Zacharias,D.a.&Tsien,R.Y.Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins.Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96,11241-11246 (1999))。目前已经构建出了多种循环重排的荧光蛋白用于探针的构建,它们对蛋白质的构象变化具有高度的灵敏性,并且通过荧光的改变来表征构象的变化。本发明可使用的cpFP包括循环重排的增强绿色荧光蛋白(circular permutated EGFP,cpEGFP)和循环重排的红色荧光蛋白(circular permutated RFP,cpRFP)。cpEGFP可以是来自GCaMP6s或GCaMP6m(Chen,T.-W.et al.Ulttrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity.Nature 499,295-300 (2013))的cpEGFP,或是来自GEC01.2(Zhao,Y.et al.An Expanded Palette of Genetically Encoded Ca^{2+} Indicators.Science 333, 1888-1891 (2011))的cpEGFP.cpRFP可以是cpmApple,例如来自R-GEC01(Yongxin Zhao,et al,An Expanded Palette of Genetically Encoded Ca^{2+} indicators,Science,2011)的cpmApple。它们的序列可从 NCBI数据库或addgene数据库得到。本领域技术人员应当理解,本发明中,还可以使用任何其它循环重排的荧光蛋白,包括但不限于,循环重排的绿色荧光蛋白、红色荧光蛋白、红外荧光蛋白、黄色荧光蛋白、蓝色荧光蛋白等,例如循环重排的绿色荧光蛋白(cpGFP)、循环重排的superfolder GFP、循环重排的mApple(cpmApple)、循环重排的mCherry(cpmCherry)、循环重排的mKate(cpmKate)、循环重排的增强绿色荧光蛋白(cpEGFP),循环重排的Venus(cpVenus)、循环重排的Citrin

(cpCitrine)、循环重排的增强黄色荧光蛋白(cpEYFP)、和循环重排的红外荧光蛋白(cp infrared fluorescent protein, cpiRFP, 参见Daria M Shcherbakova, et al, Near-infrared fluorescent proteins for multicolor in vivo imaging, Nature methods, 2013; Pandey N, et al, Tolerance of a Knotted Near-Infrared fluorescent protein to random circular permutation, Biochemistry, 2016), 不局限于上述cpEGFP和cpmApple。其中cpiRFP的激发波长更长, 因此具有更好的组织穿透性及受到较少的组织自发荧光影响。

[0225] 在本发明的一些实施方案中, 使用来自GCaMP6s的循环重排荧光蛋白cpEGFP, 其具体序列是:

[0226] NVYIKADKQKNGIKANFHIRHNIEDGGVQLAYHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSVQSKLSKDP NEKR DHMVLLEFVTAAGITLGMDELYKGGTGGSMVRKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSG EGECDATYGLTLK FICTTGKLPVPWPTLVTTLTYGVCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYIQERTI FFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLV NRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYN (SEQ ID NO:11)。

[0227] 在本发明的一些实施方案中, 使用循环重排荧光蛋白cpmApple, 其具体氨基酸序列:

[0228] PVVSERMYPEDGALKSEIKKGLRLKDGGHYAAEVKTTYKAKKPVQLPGAYIVDIKLDIVSHNE DYTIV EQCERAEGRHSTGGMDLYKGGTGGSLVSKGEEDNMAIIKEFMRFKVHMEGSGVNGHEFEIE GEGEGRPYEAFQT AKLKVTGGPLPFAWDILSPQFMYGSKAYIKHPADIPDYFKLSFPEGFRWERV MNFEDGGIIHVNQDSSLQDGVFIYKVKLRGTNFPDPGPMQKKTMGWEATR (SEQ ID NO:12)。

[0229] 此外, 在本发明中, 还可以用循环重排的荧光素酶(cp luciferase)来替代荧光蛋白, 运用同样的原理, 将受体的构象改变牵扯荧光素酶的折叠改变, 从而改变其催化底物的活性。

[0230] 对于特定的G蛋白偶联受体来说, 可以容易地通过实验确定合适的可用的循环重排的荧光蛋白。例如可以通过检测插入循环重排的荧光蛋白后, GRAB探针是否能够正确折叠以及检测GRAB探针与其配体结合后是否能导致荧光信号强度发生变化来确定所插入的循环重排的荧光蛋白是否适用。

[0231] 本发明的基于G蛋白偶联受体构建的荧光探针(即GRAB探针)应当能够在细胞膜上表达。检测所述探针是否能够在细胞膜上表达的方法是本领域技术人员众所周知的, 例如可以通过将所述探针在细胞(例如HEK293T细胞)中表达, 并通过荧光蛋白在细胞中的表达形态学进行分析, 表达在细胞膜的蛋白为细胞最外周很薄的一圈, 可通过荧光通道与明场通道进行对比得知细胞轮廓, 然后进行分析。未能正常上膜的探针常常聚集在细胞内, 其在显微镜下为在细胞内的聚团信号。还可以通过表达另一个已知的细胞膜定位的蛋白, 通过计算荧光探针信号与该蛋白的共定位进行定量测量。

[0232] 本发明的基于G蛋白偶联受体构建的荧光探针当与所述G蛋白偶联受体的特异性配体接触时应当可以与其结合, 由此导致探针的荧光强度具有可检测到的变化。对此进行检测的方法是本领域技术人员所知道的, 例如可以使所述探针与所述G蛋白偶联受体的特异性配体接触, 然后通过对表达荧光探针的细胞进行荧光成像, 在加入配体前后进行连续拍照记录, 通过分析加入配体前后记录得到的荧光强度变化检测荧光探针对特定配体是否具有荧光响应。

[0233] 本发明中,所述“荧光强度具有可检测到的变化”是指GRAB探针在结合配体后的荧光强度的变化 $\Delta F/F_0$ 的绝对值大于等于5%、大于等于10%、大于等于15%、大于等于20%、大于等于30%、大于等于60%、大于等于70%、大于等于80%、大于等于90%、大于等于100%、大于等于200%、大于等于300%、大于等于350%、大于等于500%甚至更大的变化。所述变化可以是荧光强度增加,也可以是荧光强度降低。荧光变化越大,说明该探针的性质越优良,更有可能用于细胞内检测。

[0234] 本发明中所述的“GRAB探针在结合配体后的荧光强度的变化 $\Delta F/F_0$ ”是指GRAB探针在结合配体后相对于结合配体前的相对荧光强度变化值,其中 F_0 是指GRAB探针结合配体前的平均荧光值, ΔF 是指GRAB探针结合配体后的平均荧光值 F 与GRAB探针结合配体前的平均荧光值 F_0 的差值($\Delta F = F - F_0$)。在本发明中, ΔF 也可被称为 dF 。

[0235] 本文中所述的G蛋白偶联受体的“配体”或“特异性配体”可互换使用,是指能够结合并激活(或抑制)所述G蛋白偶联受体的分子,包括光敏化合物、气味、信息素、激素和神经递质。G蛋白偶联受体与其配体的结合具有高度的特异性,配体只与特定的受体结合,受体也只与特定的配体结构。G蛋白偶联受体与其配体结合的特异性是指G蛋白偶联受体与该配体的结合亲和性显著高于与一种或更多种其它分子的结合亲和性。“显著高于”中的“显著”可以指具有统计学上的显著性。不同G蛋白偶联受体可结合的配体、或者不同配体可结合的G蛋白偶联受体,对于本领域技术人员来说是众所周知的。

[0236] 本发明中所述的配体可以是天然配体或人工合成的配体。天然配体是指天然存在于体内的与体内的G蛋白偶联受体结合的分子。人工合成的配体是指非天然存在于体内并与体内G蛋白偶联受体结合的分子,人工合成的配体可以是天然配体的类似物,可以是G蛋白偶联受体的激动剂或拮抗剂,它可以作为潜在的药物,用于激活或抑制G蛋白偶联受体。

[0237] 本发明中,在一些实施方案中,在GRAB探针中,对G蛋白偶联受体的第五跨膜区和第六跨膜区之间的第三胞内环截短并在截短的位置插入循环重排的荧光蛋白。

[0238] 所述“截短”是指部分序列被删除。“截短并在截短的位置插入循环重排的荧光蛋白”是指用可循环重排的荧光蛋白替换被删除的部分序列。

[0239] 本发明中,在一些实施方案中,所述循环重排的荧光蛋白两端分别通过连接肽与G蛋白偶联受体的第三胞内环相连。

[0240] 本文使用的术语“连接肽”或“连接肽段”可以互换使用,是指连接G蛋白偶联受体的第三胞内环和循环重排的荧光蛋白的短肽。本发明中,由于循环重排的荧光蛋白被插入到G蛋白偶联受体的第三胞内环中,因此本文所述的“连接肽”包括位于循环重排的荧光蛋白N端的N端连接肽和位于循环重排的荧光蛋白C端的C端连接肽。本发明中,连接肽的作用是帮助融合蛋白正确折叠,同时在传递受体构象改变和荧光蛋白亮度变化之间起桥梁作用。因此所使用的连接肽应当是能起到所述作用的连接肽。连接肽的选择可以通过本领域熟知的各种方法检测GRAB探针是否能够正确折叠以及检测 GRAB探针与其配体结合后是否能导致荧光信号强度发生变化来确定。当循环重排的荧光蛋白被插入到G蛋白偶联受体的第三胞内环时,循环重排的荧光蛋白的N端可以通过N端连接肽与该第三胞内环相连,循环重排的荧光蛋白的C端可以通过C端连接肽与该第三胞内环相连。本发明中,允许以“N端连接肽-C端连接肽”的方式表示探针中使用的连接肽段。

[0241] 本发明中,连接肽可以包括柔性氨基酸或由柔性氨基酸组成。所述“柔性氨基酸”

通常是侧链较小的氨基酸,不会影响融合蛋白的构象。本发明中的柔性氨基酸可以包括甘氨酸和丙氨酸。

[0242] 本发明中,组成连接肽的氨基酸包括但不限于柔性氨基酸,还可以包括其它氨基酸,本领域技术人员可以通过适当的方式验证不同氨基酸组成的连接肽是否可行。

[0243] 本发明中,在一些实施方案中,所述特异性配体是神经递质,包括但不限于肾上腺素、去甲肾上腺素、乙酰胆碱、五羟色胺和/或多巴胺。所述G蛋白偶联受体是与神经递质特异性结合的G蛋白偶联受体,例如但不限于与肾上腺素、去甲肾上腺素、乙酰胆碱、五羟色胺和/或多巴胺特异性结合的G蛋白偶联受体。

[0244] 肾上腺素受体主要有两大类,一类为 α 受体(例如人ADRA2A受体),对于肾上腺素和去甲肾上腺素的亲和力类似。另一大类为 β 受体(例如人 $\beta 2$ 肾上腺素受体),其对肾上腺素亲和力较高,对去甲肾上腺素亲和力低10-100倍左右。在体内,外周心血管等系统中主要为肾上腺素介导功能,大脑中主要为去甲肾上腺素。

[0245] 本发明中,在一些实施方案中,在荧光探针的C末端进一步偶联G α 蛋白肽段,它可以成功地竞争内源G蛋白从而显著降低G蛋白信号通路的偶联,使得GRAB探针在细胞内表达时免于导致明显的细胞信号系统的紊乱。

[0246] 本文中所述的“G α 蛋白肽段”是指G蛋白碳端的20个氨基酸,它属于G蛋白的 α 亚基。G蛋白的 α 亚基包括三大类: $\alpha_s, \alpha_i, \alpha_q$ 。本文中所述的所述“G $\alpha_q, \alpha_s, \alpha_i$ ”与“G q, Gs, Gi ”可互换使用。所述 G α 蛋白肽段可以是任何一种G蛋白碳端的20个氨基酸。在一些优选的实施方案中,所述G α 蛋白肽段可以具有下述序列:VF_{AAVKDTILQLNLKEYNLV}(G $\alpha_q 20$, SEQ ID NO:6)。在另一些优选的实施方案中,所述G α 蛋白肽段可以具有下述序列:VF_{NDCRDIIQRMHLRQYELL}(G $\alpha_s 20$, SEQ ID NO:7)。在另一些优选的实施方案中,所述G α 蛋白肽段可以具有下述序列:VF_{DAVTDVIIKNNLKDCGLF}(G $\alpha_i 20$, SEQ ID NO:8)。

[0247] 本发明中,在一些实施方案中,在荧光探针的C端进一步插入荧光素酶。当配体与GRAB探针结合时,受体的结构发生变化,该结构变化会使位于C端的荧光素酶与位于第三胞内环的循环重排的荧光蛋白在空间距离和相对位置上发生变化,改变发生在两者之间的共振能量转移效率,从而使荧光蛋白的荧光信号发生变化,从而使得该荧光探针可以在无外界激发光的情况下成像。

[0248] 本文中使用的术语“荧光素酶”是指能够使荧光素(天然存在的荧光团)氧化发射光能的酶。本领域技术人员熟知多种不同的荧光素酶和荧光素/荧光素酶系统。可用于本发明的荧光素酶包括但不限于 Nanoluc、萤火虫荧光素酶(firefly luciferase, FLuc)、海肾荧光素酶(Renilla luciferase, RLuc)。

[0249] 可用于本发明的荧光素酶是指其催化底物荧光素发射光的波长接近于本发明的GRAB探针中循环重排的荧光蛋白的激发波长的那些荧光素酶。对于不同的循环重排的荧光蛋白,如果其激发波长不同,则可以使用不同的荧光素酶。例如本发明中的cpEGFP的激发波长为488nm,因此当GRAB探针中使用 cpEGFP时,可使用的荧光素酶包括海肾荧光素酶,它以腔肠素作为底物并且发射在480nm的光;还包括Gaussia荧光素酶,它以腔肠素作为底物,发射470nm的光。

[0250] 在对GPCR在激活过程前后的晶体结构分析中,猜测GPCR的构象改变可能可以分为两步。其中第一步为配体结合导致的受体跨膜区(第五和第六跨膜区)的构象改变,第二步

为受体跨膜区的构象改变牵扯胞内环打开从而暴露G蛋白的结合区域。对于不同的受体而言,其因具有特异性的配体而引发不同程度的跨膜区的构象改变(Kruse, A.C. et al. Activation and allosteric modulation of a muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* 504, 101-106 (2013); Wacker, D. et al. Structural features for functional selectivity at serotonin receptors. *Science* (New York, N.Y.) 340, 615-619 (2013))。然而,由于内源G蛋白仅有少数类型,其胞内环的构象改变很可能具有很大程度的同源性(Rasmussen, S.G.F. et al. Crystal structure of the β 2adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature* 477, 549-555 (2011); Kruse, A.C. et al. Structure and dynamics of the M3 muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* 482, 552-556 (2012); Huang, W. et al. Structural insights into micro-opioid receptor activation. *Nature* 524, 315-321 (2015))。因此,在本发明中,可以利用胞内环构象改变的保守性,将已经可以成功引发荧光蛋白亮度变化的GPCR受体的胞内环替换其他受体的相应胞内环,而保留受体外源结合配体的区域不变。通过构建嵌合式受体,一方面可以利用受体与荧光蛋白的良好偶联,拓展探针感受不同的神经递质,另一方面由于不同受体结合配体后引发的构象改变程度不同,其作为天然的筛选库可能可以提高探针的信噪比。

[0251] 因此,本发明还提供构建GRAB探针的方法,包括将基于第一G蛋白偶联受体构建的荧光探针的第三胞内环连同其中插入的循环重排的荧光蛋白完整截取出来,替换第二G蛋白偶联受体的第三胞内环,获得基于第二G蛋白偶联受体构建的荧光探针。

[0252] 如前所述,本领域技术人员可以容易地确定G蛋白偶联受体的N端、跨膜区、胞内环和C端。

[0253] 在一些实施方案中,所述第一G蛋白偶联受体和第二G蛋白偶联受体可以结合相同的特异性配体或结合不同的特异性配体。

[0254] 本发明还涉及编码本发明的GRAB探针的多核苷酸,包含该多核苷酸的表达载体以及包含该多核苷酸或表达载体的宿主细胞。

[0255] 术语“表达载体”是指在适当的宿主细胞中能够表达目的蛋白的表达载体,是包含可操作地连接的基本调控元件的基因构建体,其中,可操作地连接的基本调控元件使插入的基因得以表达。优选地,将重组载体构造为,携带编码本发明的GRAB探针的编码多核苷酸或者其片段。可以将所述重组载体转化或者转染进宿主细胞。

[0256] 本发明的表达载体还可以通过将本发明的多核苷酸连接(插入)于适当的载体而获得。只要能够在宿主内复制,则对将会插入本发明的基因的载体并无特别的限制。例如,可以使用质粒载体、噬菌体载体、病毒载体等。具体地,可以使用商业化的表达载体,例如pDisplay载体,可以购自invitrogen公司,另外可以使用如逆转录病毒、腺病毒和痘苗病毒等动物病毒和如杆状病毒等昆虫病毒,能够用于本发明的质粒并不限于所述实例。

[0257] 为了将本发明的多核苷酸可操作地连接于载体,本发明的载体除了启动子以及本发明的多核苷酸之外,还可以包含顺式元件,如增强子、剪接信号、Poly A (聚A) 添加信号(poly A addition signal)、选择标记、和核糖体结合序列。

[0258] 可将构造的载体通过转化(或者转染)导入宿主细胞。可以使用任何方法进行转化。通常,转化方法有以下几种:CaCl₂沉淀法;电穿孔法;磷酸钙沉淀法;原生质融合法;碳化娃纤维介导的转化法;土壤杆菌(Agrobacterium)介导的转化法;PEG介导的转化法;硫酸

葡聚糖、阳离子脂质体(Lipofectamine) 和干燥/抑制的转化法等。通过如上所述的载体以及采用该载体的转染,能够将编码本发明的GRAB探针的基因导入宿主细胞内。

[0259] 只要能够表达本发明的GRAB探针,对于在本发明中使用的宿主细胞没有特别的限制。在优选的实施方案中,宿主细胞是HEK293T。在另一些优选的实施方案中,所述宿主细胞是神经元细胞。

[0260] 本发明还涉及利用GRAB荧光探针检测待测样品或待测组织中是否存在所述G蛋白偶联受体的特异性配体的方法,利用GRAB荧光探针对待测样品或待测组织中所述G蛋白偶联受体的特异性配体的浓度变化进行定性检测的方法,利用GRAB荧光探针对待测样品或待测组织中所述G蛋白偶联受体的特异性配体的浓度变化进行定量检测的方法,药物筛选方法,以及检测G蛋白偶联受体的特异性配体在动物体内分布的方法。在这些检测方法中,需要测定荧光信号强度的变化,由此获得检测结果或筛选结果。

[0261] 应当理解,本发明的检测方法是通过荧光探针的荧光强度的变化确定配体或激动剂是否存在、配体或激动剂浓度是否有变化。其中,荧光强度的变化可以是荧光强度增加或降低。根据本发明公开的内容,本领域技术人员应当可以容易地确定根据荧光强度的增加或降低如何判断配体或激动剂是否存在、配体或激动剂浓度是否有变化。例如,如果所获得的荧光探针是ON探针,即加入配体后荧光信号增强的探针,那么在检测过程中,当荧光强度增加时,可以判断存在配体或激动剂、或者配体或激动剂的浓度增加;当荧光强度不变时,可以判断不存在配体或激动剂、或者配体或激动剂的浓度不变;当荧光强度降低时,可以判断不存在配体或激动剂、或者配体或激动剂的浓度减小。如果所获得的荧光探针是OFF探针,即加入配体后荧光信号减弱的探针,那么在检测过程中,当荧光强度降低时,可以判断存在配体或激动剂、或者配体或激动剂的浓度增加;当荧光强度不变时,可以判断不存在配体或激动剂、或者配体或激动剂的浓度不变;当荧光强度增加时,可以判断不存在配体或激动剂、或者配体或激动剂的浓度减小。

[0262] 本发明中所述的“荧光信号强度的变化”可以指荧光信号强度的变化 $\Delta F/F_0$ 大于等于5%、大于等于10%、大于等于15%、大于等于20%、大于等于30%、大于等于60%、大于等于70%、大于等于80%、大于等于90%、大于等于100%、大于等于200%、大于等于300%、大于等于350%、大于等于500%甚至更大的变化。所述变化可以是荧光强度增大,也可以是荧光强度减小。

[0263] 本发明中所述的“荧光信号强度的变化 $\Delta F/F_0$ ”可以指变化后相对于变化前的相对荧光强度变化值,其中 F_0 是指变化前的平均荧光值, ΔF 是指变化后的平均荧光值 F 与变化前的平均荧光值 F_0 的差值($\Delta F = F - F_0$)。

[0264] 本文所述的“待测样品”可以包括活生物体外的样品,包括但不限于细胞培养物或其提取物;从哺乳动物获得的活组织检查材料或其提取物;以及血液、唾液、尿、粪便、精液、泪液或其他体液或它们的提取物。对待测样品的检测可以是在体外进行的。

[0265] 本文所述的“待测组织”可以包括生物体内的任何组织,包括但不限于心脏组织、脑组织等。对待测组织的检测可以是在体内进行的。

[0266] 本发明中,人毒蕈碱乙酰胆碱受体 M_3R 亚型也被称为人乙酰胆碱受体M3R亚型、M3R受体、M3R型受体、M3R或 M_3R 、CHRM3、chrm3等。

[0267] 本发明中,五羟色胺也被称为5-羟色胺。

[0268] 本发明任一项技术方案的方法可以在体外或体内进行。

[0269] 本发明任一项技术方案的方法可以是非治疗性的。

[0270] 应当理解,本发明的荧光探针可以在GPCR的第三胞内环的不同位置上插入循环重排的荧光蛋白,插入的荧光探针两端可以通过不同的连接肽与GPCR的第三胞内环相连,所使用的循环重排的荧光蛋白可以是各种不同的循环重排的荧光蛋白。因此,本发明中,不同的循环重排的荧光蛋白、在第三胞内环上的不同插入位置、以及不同的连接肽可以相互组合,所形成的各种不同组合的方案,都在本发明的保护范围之内。

[0271] 此外,应当理解,本发明中,当提及数值或范围时,所使用的术语“约”是指在给定数值或范围的20%以内、10%以内,或5%以内。

[0272] 本发明中使用的缩写包括:

[0273] GPCR G蛋白偶联受体

[0274] EGFP 增强绿色荧光蛋白

[0275] GFP 绿色荧光蛋白

[0276] YFP 黄色荧光蛋白

[0277] RFP 红色荧光蛋白

[0278] CFP 蓝色荧光蛋白

[0279] cp 循环重排的(当其后为荧光蛋白缩写时,例如cpEGFP为循环重排的增强绿色荧光蛋白)

[0280] Epi 肾上腺素

[0281] NE 去甲肾上腺素

[0282] ISO 异丙肾上腺素

[0283] Ach 乙酰胆碱

[0284] ICI或ICI118,551 β 2型肾上腺素受体特异性阻断剂

[0285] Tio(tiotropium bromide) 噻托溴铵

[0286] AF-DX384或AF-DX 毒蕈碱型乙酰胆碱受体拮抗剂

[0287] 5-HT 5-羟色胺

[0288] GABA γ -氨基丁酸

[0289] DA 多巴胺

[0290] Gly 甘氨酸

[0291] Glu 谷氨酸

[0292] ACSF 人工脑脊液

[0293] PTX 百日咳毒素

[0294] DAN 多巴胺能神经元

[0295] MB 蕈状体

[0296] 实施例1材料与方法

[0297] 1、GRAB探针构建及突变筛选的分子克隆

[0298] 本发明中,所有分子克隆都采用Gibson assembly (Gibson,D.G.et al.Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases.Nature methods 6, 343-345 (2009))的方法,即利用序列互补实现同源片段的重组连接。采用约30个碱基的同

源互补序列实现序列之间的有效拼接,该互补序列设计与引物上。所有重组正确的克隆在北京大学生命科学学院设备中心进行测序确定。

[0299] GRAB探针表达载体使用invitrogen公司的pDisplay载体。其GPCR基因部分扩增于全长人类基因组cDNA (hORFeome database 8.1),首先通过Gateway克隆方法转移到以pDisplay载体构建的带有 att序列的终载体上,再通过Gibson assembly的方法将特定循环重排荧光蛋白插入受体特定位置。在 GRAB探针的优化过程中所采用的不同荧光蛋白扩增于其相应的融合蛋白中,其中G-GECO(参见 Yongxin Zhao,et al,An Expanded Palette of Genetically Encoded Ca²⁺indicators,Science,2011)为Robert Campbell教授实验室提供,ASAP1(参见Francois St-Pierre,et al,High-fidelity optical reporting of neuronal electrical activity with an ultrafast fluorescent voltage sensor, Nature Neuroscience,2014)为 Michael Lin教授实验室提供,GCaMP6(Chen TW,et al, Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity,nature, 2013)为实验室自行从GCaMP5依据文献突变得到的。在探针的突变筛选过程中,突变引入的方法为在特定引物中引入随机碱基组合,从而构建定点突变库。

[0300] GPCR基因序列可以从NCBI数据库及Addgene数据库中获得,网址如下:

[0301] NCBI:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

[0302] Addgene:<https://www.addgene.org/>

[0303] 嵌合式探针的构建方法为通过PCR扩增将特定受体的不包含第三个胞内环的片段及GRAB探针的第三个胞内环片段进行扩增,进而通过Gibson assembly方法进行序列拼接,实现嵌合式探针的构建。对于不同的GPCR,其第三个胞内环的序列预测为基于UNIPROT数据库进行。

[0304] 基于受体内吞构建的荧光探针的分子采用pDisplay载体构建,具体为在GPCR基因的氮端通过 Gibson assembly方法连接pHluorin基因,并在之间用3个氨基酸(GGA)的短肽段相连,保证分子的正确折叠。为了进一步增强GPCR与内吞通路的偶联,在GPCR的碳端末尾融合人AVPR2基因的最后 29个氨基酸(第343-371个氨基酸)。该部分已经被证明与 β -arrestin具有高亲和力,因而可以增强GPCR 与内吞信号通路的偶联。

[0305] GRAB探针转基因果蝇的质粒构建为将全长GRAB探针克隆到果蝇表达载体pUAST载体中,其中包含可受转录因子Gal4调控的UAS序列。GRAB探针果蝇载体经过大量质粒抽提后,由Fungene 生物科技公司进行果蝇胚胎注射及转基因果蝇的筛选。

[0306] 2、细胞培养和转染

[0307] GRAB探针的筛选和优化在HEK293T细胞系中进行。HEK293T培养于含有10%FBS(北方同正生物技术公司)的DMEM(Gibco)培养基中,并在含有5%的二氧化碳的37度恒温箱中培养。根据细胞的生长状况及密度,采取每两天进行一次细胞传代,每次传代保留四分之一的步骤进行细胞培养。对 HEK293T细胞进行质粒转染和成像实验时,首先在24孔板孔中在成像圆玻片,进而将细胞进行胰酶消化后均匀铺于玻片上。为了保证细胞的均匀,在接种细胞后采用水平震荡的方法混匀孔板中的细胞。质粒转染在细胞传代到孔板后的8-12小时后进行,保证细胞与玻片底部贴紧并伸展。对于HEK293T 细胞系,采用PEI介导的质粒转染方法,具体为以DNA:PEI=1:4的比例将DNA和PEI混匀在DMEM 溶液中,室温静止15分钟后加入待转染的细胞溶液中。在细胞转染4小时后用含有5%FBS的DMEM 溶液进行换液,洗去PEI以

保证细胞状态良好。GRAB探针的表达和成像在转染后36个小时左右进行。

[0308] 大鼠神经元的原代培养采用新出生的Sprague-Dawley大鼠,在酒精清洗大鼠皮肤后,采用手术器械对其头部进行解剖,取出大脑后将皮层表面的血管膜小心去除,皮层组织剪碎后置于0.25%的胰酶溶液中,在37度恒温培养箱中消化10分钟。消化后用含有5%FBS的DMEM溶液终止消化,并用移液枪缓慢吹吸十次,进一步破碎细胞。静置5分钟后,吸出上层溶液,舍去含有组织碎片的沉淀,在离心机中进行1000rpm,5分钟的离心。之后弃掉上清,用培养神经元所用的Neurobasal+B27溶液重悬神经元,并利用细胞计数板进行密度计算。计算细胞密度后,根据 $0.5-1 \times 10^6$ 细胞/ml的密度稀释并种植于铺好多聚赖氨酸(sigma)的玻片上。原代神经元培养于Neurobasal+B27溶液中,每隔两天进行半换液。解剖后6-8天对原代培养的神经元进行转染,采用磷酸钙转染方法。在进行细胞转染后的1.5小时后,通过显微镜观察溶液是否产生小而均匀的磷酸钙沉淀,并用pH为6.8的HBS溶液进行换液。HBS清洗过后,神经元重新置于Neurobasal+B27培养基中进行培养,直到48小时后进行成像实验。

[0309] 3、细胞的荧光成像和药物灌流

[0310] 通过转染将特定GRAB探针DNA导入细胞后,通过荧光成像结合灌流实验进行刻画。HEK293T 细胞的成像实验采用Olympus IX81倒置显微镜,采用40x NA:1.35油镜及475/28的激发光滤片和515LP的发射光滤片进行荧光成像。光学信号采用Sutter Instruments公司的Lambda DG-4作为荧光光源,通过Zyla sCMOS DG-152V-C1e FI相机(Andor)进行采集。曝光时间设定在50ms一下,采用每5秒成像一次的采集频率。整个成像系统通过micromanager软件实现统筹控制。

[0311] 神经元的成像实验采用倒置的Nikon激光扫描共聚焦纤维镜,其为基于倒置的Ti-E显微镜和A1Si 光谱检测共聚焦系统的显微镜。采用40x NA:1.35的油镜及488的激光进行成像。激光扫描共聚焦显微镜的显微镜本体,PMT及图像获取和处理系统都由NIS element 软件控制。

[0312] GRAB探针对配体的响应检测($\Delta F/F_0$)采用药物灌流的方法进行。细胞置于标准的生理溶液下,溶液配方为:

[0313]	NaCl	150mM
	KCl	4mM
	MgCl ₂	2mM
	CaCl ₂	2mM
	HEPES	10mM
	葡萄糖	10mM

[0314] 生理溶液的pH值校正为7.4左右后,以部分溶液稀释小分子药物,配置小分子配体的相应浓度溶液。药物小分子中异丙肾上腺素ISO、ICI118,551、AF-DX购买于sigma公司,乙酰胆碱购买于solarbio 公司,Tiotropium Bromide购买于德信佳公司。如无明确说明,异丙肾上腺素ISO灌流浓度为2 μ M,乙酰胆碱灌流浓度为100 μ M。

[0315] 灌流体系搭置于显微镜上,包括注射针管制成的溶液导入系统,多通阀门,成像工作台以及吸液泵。灌流过程中,成像工作台置于倒置显微镜的物镜上方,将接种细胞的玻片放入工作台中,通过控制不同管道的开关进行不同药物的灌流实验。为了保证工作台内的溶液高度,灌流速度被设定为一秒一滴左右。在每次使用药物处理细胞后,采用生理溶液进

行五分钟以上的冲洗,保证没有残留药物影响之后的实验。每次实验结束后,灌流管道和工作台采用75%的乙醇冲洗三次,确保残留药物和杂质被充分洗净。

[0316] 针对GRAB探针动力学的检测,采用局部喷灌药物系统进行实验。该实验采用Olympus正置显微镜BX51进行,采用40xNA:0.80的水镜进行成像,采用710M相机(DVC)进行图像采集。药物喷灌系统采用Sutter instruments公司的ROE-200进行控制,药物喷灌针的位置有MPS-1操作杆进行控制。对于探针的动态学刻画实验中,成像采用50HZ的频率,其分辨率为768x484像素以及2x2的面元划分进行处理。

[0317] 4、采用荧光酶标仪检测探针表现

[0318] 对于GRAB探针,对于不同神经递质浓度的相应曲线,采用荧光酶标仪进行测量。酶标仪为TECAN公司的Safire2全光谱扫描仪。细胞首先被平均铺于预先用多聚赖氨酸处理的96孔板中,进而采用PEI方法进行转染。测量荧光信号前,首先用生理溶液对细胞进行换液,除去培养基对于荧光信号采集的干扰。采用480纳米为激发波长,520纳米为发射波长,分别对于细胞在生理溶液中和加入特定药物后的荧光值进行读取。实验采用加入100倍终浓度的少量药物溶液,以避免溶液液面变化导致的荧光信号变化。对于不同的探针进行检测筛选时,每个探针进行6个孔细胞的重复,取其平均值减少由于噪音导致的荧光变化。

[0319] 5、双光子活体果蝇的成像

[0320] 果蝇饲养于25度的培养箱中,采用标准培养基进行饲养,UAS-GRAB转基因果蝇与GH146-Gal4 品系进行杂交后,选择其中表现出较强荧光信号的果蝇进行气味处理实验。待实验的成年果蝇在羽化后的0-2天内转移到新的培养管中,并在室温中果蝇放置8-12天。成像过程前,活体果蝇首先被固定在小皿中,进而手术去除其眼尖方形头骨部分,暴露部分大脑。在成像的触角神经叶附近的脂肪组织和气囊被手术取出,以防其对荧光信号进行干扰。为了进一步减少果蝇在成像过程中的运动导致成像质量下降,采用手术钳将其平衡帮下方的肌肉剪断。整个解剖和成像过程中果蝇大脑处于预冷的生理溶液中,其配方如下。

[0321]	NaCl	108mM
	KCl	5mM
	HEPES	5mM
	海藻糖	5mM
	蔗糖	5mM
	NaHCO ₃	26mM
	NaH ₂ PO ₄	1mM
	CaCl ₂	2mM
	MgCl ₂	2mM

[0322] 果蝇成像实验采用Olympus双光子显微镜进行。具体包括olympus BX61WI显微镜,25xNA: 1.05的水镜镜头,Ti:Sapphire laser锁模激光器进行双光子激发。针对GRAB探针的成像实验,发射光的波长设定为950纳米,以成功激发荧光蛋白产生荧光。刺激果蝇所用的气味分子乙酸异戊酯(IA)购买于sigma公司,按1:100的比例稀释于矿物油中,在实验中进一步通过与气流的混合进行5-40倍的浓度稀释。混有气味分子的气流通过实验台上约1厘米宽的空洞给予到距离果蝇触须约1厘米远的位置,通过控制气流将不同浓度气味分子进行实验。每轮成像过程为17.8秒,其中5到10秒之间提供特异性的气味分子。在气味功能成

像实验后,采用高分辨率对于成像区域进行逐层扫描,以获得嗅球的分布信息,并根据文献报道的触角神经叶处的嗅球分布进行辨识。

[0323] 6、图像数据处理

[0324] 荧光成像数据采用ImageJ软件进行处理。针对GRAB探针在HEK293T细胞系和神经元中的荧光表现,选择整个细胞胞体为数据处理的区域。对于活体果蝇成像,在同样Z轴的荧光采集图像通过 ImageJ软件进行分析。荧光信号的变化采用其相对变化来指示,其荧光信号首先减去无探针表达的背景区域,从而得到荧光蛋白强度的真实体现,之后通过计算加入药物后的荧光值F和加入前的平均荧光值 F_0 ,得到相对荧光变化值 $\Delta F/F = (F - F_0)/F_0$,作为探针对于特定药物的荧光响应。 $\Delta F/F_0$ 随时间的变化进而在Origin 8.6软件中进行作图表示。

[0325] 7、统计学检测

[0326] 本发明中,图中所显示的数据方式为平均值±均值标准误。

[0327] 除非特别说明,本实施例中所述材料与方法适用于下述实施例2-7。在其它实施例中,没有明确提及的材料和方法,采用本实施例中所述的材料与方法,除非与这些实施例中所述的材料与方法相矛盾。

[0328] 实施例2构建肾上腺素特异性的和乙酰胆碱特异性的荧光探针

[0329] 1、将荧光蛋白插入针对 $\beta 2$ 肾上腺素受体的不同位点以寻找具有正确定位的融合蛋白

[0330] 以人 $\beta 2$ 肾上腺素受体((Rasmussen,S.G.F.et al.Crystal structure of the $\beta 2$ adrenergic receptor-Gs protein complex.Nature 477,549-555(2011);Cherezov,V.et al.High-Resolution Crystal Structure of an Engineered Human β Protein Coupled Receptor.Science 318,1258-1265(2007))为基础构建肾上腺素的特异性荧光探针。荧光蛋白选用G-GECO中使用的循环重排荧光蛋白cpEGFP。

[0331] 人 $\beta 2$ 肾上腺素受体的序列参考NCBI gene ID:154,链接为<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/154>,其具体氨基酸序列为:

[0332] MGQPGNGSAFLAPNRSHAPDHDVTQQRDEVWVVGMGIVMSLIVLAIVFGNVLVITAIKFER LQTV TNYFITSLACADLVMGLAVVPFGAAHILMKMWTFGNFWCEFWTSIDVLCVTASIETLCVIAVD RYFAITSPFKYQ SLLTKNKARVILMVWIVSGLTSFLPIQMHWRATHQEAINCYANETCCDFFTNQA YAIASSIVSFYVPLVIMVF VYSRVFQEAKRQLQKIDKSEGRFHVQNLSQVEQDGRGTGHGLRRSSKFCLEHKALKTLGIIMGFTLCLWLPFFIVN IVHVIQDNLRKEVYILLNWIGYVNSGFNPLIYCRSPDFRIAF QELLCLRRSSLKAYGNGYSSNGTGEQSGYHV EQEKENKLLCEDLPGTEDFVGHQGTVPDNDISQ GRNCSTNDSLL (SEQ ID NO:1)。

[0333] 其中下划线部分是第三胞内环。

[0334] 本实施例中所使用的cpEGFP为GCaMP6s中的cpEGFP,具体序列为:

[0335] NVYIKADKQKNGIKANFHIRHNIEDGGVQLAYHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSVQSKLSKDP NEKR DHMVLLEFVTAAGITLGMDELYKGGTGGSMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGE GEGDATYGKLTLLK FICTTGKLPVPWPTLVTTLTYGVCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYIQERTIFF KDDGNYKTRAEVKFEGDTLV NRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYN (SEQ ID NO:11)。

[0336] 初步选择循环重排荧光蛋白插入位点为从人 $\beta 2$ 肾上腺素受体的氮端开始到碳端的每一个肽链环。在获得了不同位点插入的融合蛋白表达载体后,将其转染入HEK293T细胞

系中,并观察期是否具有有良好的荧光强度和膜分布。有些位点插入荧光蛋白后,融合荧光蛋白由于无法正确折叠和运输,其在细胞内的荧光为网状分布,可能为驻留在内质网的错误折叠蛋白,如图1所示,筛选获得了两个具有良好荧光强度和细胞膜荧光分布的融合蛋白,分别为在受体第二个胞内环140位(整个受体的第140位)氨基酸之后插入的融合蛋白和在受体第三个胞内环240位(整个受体的第240位)之后插入的融合蛋白。

[0337] 2、通过荧光成像结合药物灌流检测正确折叠的探针是否可以感受神经递质产生光学信号变化

[0338] 在找到可以定位在细胞膜上的融合蛋白后,进一步检测其是否能够将受体在激活过程中的构象变化转变为荧光强度的改变。对于上述筛选获得的两个具有良好荧光强度和细胞膜荧光分布的融合蛋白,采用含有 $\beta 2$ 肾上腺素特异的激动剂异丙肾上腺素ISO的溶液分别灌流用它们转染的HEK293T细胞,观察在加入激动剂前后是否有荧光强度的变化。其中之一(受体240位之后插入荧光蛋白)在加入 $2\mu\text{M}$ ISO后表现出较小但可逆的荧光增强,平均变化幅度约为 $6\% (\Delta F/F_0)$ (图2),该荧光探针被命名为为 GRAB-EPI 0.1,其具有检测肾上腺素及其类似物的能力。

[0339] 3、优化循环重排荧光蛋白以及荧光蛋白在人肾上腺素受体第三个胞内环的插入位点

[0340] 分别从GCaMP6s、GCaMP6m、GEC01.2中克隆出其使用的循环重排荧光蛋白cpEGFP (Chen,T.-W. et al.Ultasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity.Nature 499,295-300 (2013) (GCaMP6s、GCaMP6m);Zhao,Y.et al.An Expanded Palette of Genetically Encoded Ca^{2+} Indicators.Science 333,1888-1891 (2011) (GEC01.2);它们的序列可从NCBI数据库或addgene数据库得到。GEC01.2是G-GEC0中的一个版本,GCaMP6s/f/m为GCaMP6的三个不同亚版本),以及在电压敏感的荧光探针ASAP1中使用的循环重排的superfolder GFP (St-Pierre,F.et al.High-fidelity optical reporting of neuronal electrical activity with an ultrafast fluorescent voltage sensor.Nature neuroscience 17, 884-889 (2014)),并将它们插入到人 $\beta 2$ 肾上腺素受体的第250位氨基酸之后。使构建的融合蛋白表达载体转染HEK293T细胞,如图3所示,使用不同的cpEGFP构建的荧光探针都可以成功地折叠并运输到细胞膜上,并且其在同样浓度($2\mu\text{M}$)的激动剂ISO的处理下表现出类似的荧光强度变化。然而,采用循环重排的superfolder GFP构建的荧光探针难以正确地折叠及运输上膜,其表现为在内质网等细胞内结构中的聚集,如图3中箭头所示,这导致了其在配体结合后无法表现出荧光信号的变化。在综合考虑荧光蛋白的亮度、探针的折叠及膜表达和探针的信号变化后,选择来自GCaMP6s的循环重排cpEGFP作为GRAB探针中所采用的荧光蛋白。

[0341] 在人 $\beta 2$ 肾上腺素受体的第三个胞内环的不同插入位点插入来自GCaMP6s的循环重排cpEGFP。对分别得到的融合蛋白进行克隆和在HEK293T细胞中表达后,采用同样浓度($2\mu\text{M}$)的激动剂ISO进行灌流处理,并通过荧光成像观测其在加入激动剂前后的荧光变化。如图4所示,荧光蛋白插入到受体的250位氨基酸之后获得的探针荧光上升更加显著,其在同样浓度($2\mu\text{M}$)的ISO处理下可以达到 $15\% \Delta F/F_0$ 的荧光增强,该探针被命名为GRAB-EPI 1.0。

[0342] 4、通过构建嵌合式受体的方法构建乙酰胆碱荧光探针

[0343] 基于已成功构建的肾上腺素荧光探针GRAB-EPI 1.0 (图5中上图中的 $\beta_2\text{AR}$),将其

第三个胞内环连同插入的循环重排荧光蛋白截取出来(图5),替换人毒蕈碱乙酰胆碱受体($M_{1-5}R$)相应的第三个胞内环(ICL3)部分,以使构象敏感的cpEGFP插入到人毒蕈碱乙酰胆碱受体($M_{1-5}R$)的所有五个亚型的第三个胞内环中(图6a),构建相应神经递质的荧光探针 $M_{1-5}R-\beta_2R$ ICL3-cpEGFP嵌合体。

[0344] 其中:

[0345] M_1R 的序列参考NCBI gene ID 1128;

[0346] M_2R 的序列参考NCBI gene ID 1129;

[0347] M_3R 的序列参考NCBI gene ID 1131;

[0348] M_4R 的序列参考NCBI gene ID 1132;

[0349] M_5R 的序列参考NCBI gene ID 1133。

[0350] 截取的具体序列:

[0351] RVFQEAKRQLQKIDKSEGRFHVQNLSQVEQGGNVYIKADKQKNGIKANFHIRHNIEDGGVQLAYHYQQ
NTPIGDGPVLLPDNHVLSVQSKLSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDLYKGGTGGSMVSKGEELFTGVVPIL
VELDGDVNGHKFSVS GEGEGDATY GKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLT YGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEG
YIQERTIFFKDDGNYKTRA EVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNGGAAA
DGRTGHGLRRSSKFCLKEHKALKT

[0352] 其中下划线部分是插入的荧光蛋白序列。斜体为连接肽段。

[0353] 为了测试 $M_{1-5}R-\beta_2R$ ICL3-cpEGFP嵌合体是否能够检测ACh,在HEK293T细胞中表达它们,其中表达 $M_3R-\beta_2R$ ICL3-cpEGFP的细胞显示出嵌合体的良好膜表达,在灌流ACh(100 μ M)时表现出提高的荧光反应($\Delta F/F_0$)(~30%) (图5b、图6b-f,箭头所指)。这些结果表明来源于 M_3R 的探针可以检测ACh,它被命名为GRAB-ACh 1.0。

[0354] M_3R 受体的具体序列如下:

[0355] MTLHNSTTSPLFPNISSSWIHSPSDAGLPPGTVTHFGSYNVSRAAGNFSSPDGTTDDPLGGHT VWQ
VVFIAFLTGILALVTIIGNILVIVSFKNKQLKTVNNYFLLSLACADLIIGVISMNLFTTYIIMNR WALGNLACD
LWLAIIDYVASNASVMNLLVISFDYFSITRPLTYRAKRTTKRAGVMIGLAWVISFVL WAPAILFWQYFVGKRTVP
PGECFIQFLSEPTITFGTAIAAFYMPVTIMTILYWR IYKETEKRTKELAG LQASGTEAETENFVHPTGSSRSCSS
YELQQQSMKRSNRRKYGRCHF WFTTKSWKPSSEQMDQDHSSSDSWNNNDAAASLENSASSDEEDIGSETRAIYSIV
LKLPGHSTILNSTKL PSSDNLQVPEEELGMVDLERKADKLQAQKSVDDGGSF PKSF SKLP IQLES AVDTAKTSDVN
SSVGKSTATLPLSFKEATLAKRFALKTRSQITKRKRMSLVKEKKAQTL SAILLAFIITWTPYNIMVLVNTFCDCS
IPKTFWN LGYWLCYIN STVNPVCYALCNKTFRTTFKMLLLCQCDKKRRKQQYQQRQSVIFHKRAPEQAL (SEQ
ID NO:3)。

[0356] 其中下划线部分为第三胞内环(ICL3),该ICL3参照uniprot数据库定义,为253-491位氨基酸。

[0357] 5、优化循环重排荧光蛋白与GPCR之间的连接肽段

[0358] 循环重排荧光蛋白cpEGFP与受体第三个胞内环之间具有连接肽段,该连接肽段是人为加入的一段由少数氨基酸组成的肽段,其一方面可以帮助融合蛋白正确折叠,另一方面在传递受体构象改变和荧光蛋白亮度变化之间起到了桥梁作用。根据循环重排荧光蛋白设计原理,连接肽段位置代替原始荧光蛋白第145位天冬酰胺,与生色团有密切的相互作用(Baird,G.S.,Zacharias,D.a.&Tsien,R.Y. Circular permutation and receptor

insertion within green fluorescent proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96,11241-11246 (1999))。

[0359] 在所述步骤中,在肾上腺素荧光探针的构建中,采用柔性氨基酸(甘氨酸,丙氨酸)构成短连接肽段,帮助融合蛋白进行正确的折叠。肽段的长度为氮端2个氨基酸GG,碳端5个氨基酸GGAAA。该连接肽随ICL3一起从GRAB-EPI 1.0中被截取出来,被移植到乙酰胆碱荧光探针中。

[0360] 以GRAB-ACh 1.0为基础,对该连接肽段进行优化。首先在以柔性氨基酸(甘氨酸,丙氨酸)为主的基础上,针对肽段的长度进行筛选。具体策略是分别将氮端和碳端的肽段长度分别改变为0-5个氨基酸,并且将氮端和碳端进行随机组合,从而得到所有可能的排列。将包含各种排列的融合蛋白表达载体在HEK293T细胞中表达并进行灌流实验,结果如图7所示,氮端的氨基酸数目对于探针在配体加入后是荧光上升还是下降有决定性的作用,而碳端的氨基酸数目影响了探针的具体信号变化。具体地说,根据探针在加入配体后的荧光变化,可以将其分为两类,一类为加入配体后荧光信号增强的ON探针,反之为荧光下降的OFF探针。根据荧光探针与GPCR的偶联原理,推测ON探针中的荧光蛋白的生色团在加入配体前部分呈暴露状态,因而被水分子进攻而淬灭,具有较低的荧光强度;在加入配体导致受体构象改变后,胞内环的牵扯引发荧光蛋白的重新折叠,将生色团进行良好的保护,从而使得其荧光发射强度增强。相应地,OFF探针的机制可能与之相反。在筛选结果中,ON探针仅发现于氮端肽段长度为2个氨基酸的探针中,而氮端肽段长度为1、3、4、5个氨基酸的探针都表现为OFF探针。对于探针的信号变化,ON探针中碳端肽段氨基酸越长其信号变化越高,而OFF探针中却是碳端肽段氨基酸越短信号变化越高。综合氮端和碳端的连接肽段长度筛选,鉴定出最好的ON探针为2-5的肽段长度组合(即N端为GG,C端为GGAAA),而最好的OFF探针为1-1的长度组合(即N端为G,C端为G)。

[0361] 接下来,固定连接肽段长度为2-5的组合,通过改变探针序列的氨基酸种类以获得信号变化更大的探针。使用定点突变产生在GRAB-ACh 1.0的cpEGFP的N和C末端的2-和5-氨基酸连接肽上的723个随机点突变的文库(图6c和图8)。然后分别在HEK293T细胞中表达这些突变体,并筛选对于ACh灌流具有较大反应($\Delta F/F_0$)的候选者。从中筛选鉴别具有最佳 $\Delta F/F_0$ (~70%)的变体,命名为GRAB-ACh 1.5(连接肽序列为N端GG,碳端SPSVA)(图6d)。然后进行第二轮定点突变和筛选,使用最优连接肽残基的组合(图6c和图8)。在筛选23个组合变体之后,鉴别出在ACh灌流时具有最大 $\Delta F/F_0$ 增加的变体,命名为GRAB-ACh 2.0(图6c和图8),它以GG-APSV A为连接肽段。进一步的分析显示GRAB-ACh 2.0保留了优秀的表达和上膜特性(图6e),与GRAB-ACh 1.0相比其动力学范围有所扩大(扩大2.5倍)(图6f,g),与基于FRET的探针相比,峰信号反应增加(GRAB-ACh 2.0: $\Delta F/F_0 = 94.0 \pm 3.0\%$,基于FRET的探针: $\Delta \text{RatioFRET} = 6.6 \pm 0.4\%$,GRAB-ACh 2.0高~20倍),与传统的基于FRET的ACh探针(Markovic,D.,et al.FRET-based detection of M1muscarinic acetylcholine receptor activation by orthosteric and allosteric agonists.PloS one 7,e29946 (2012))相比,信噪比(SNR)提高(~60倍)(图6i-j和图9)。

[0362] 分别将GRAB-ACh 1.5的整个ICL3和GRAB-ACh 2.0的整个ICL3连同其中的cpEGFP和连接肽一起移植到GRAB-EPI 1.0中,取代其第三个胞内环部分,分别获得GRAB-EPI 1.1和GRAB-EPI 2.0,将它们的表达载体转染到HEK293T细胞中,并进行药物灌流实验,其中

GRAB-EPI 1.1加入激动剂 ISO (2 μ M) 后探针荧光上升约60%, GRAB-EPI 2.0加入激动剂ISO (2 μ M) 后探针荧光上升约70%。

[0363] 使用表达GRAB-EPI 1.0的HEK293T细胞对荧光探针的光谱性质及其pH敏感性进行了测量,其主要激发峰位于490纳米附近,发射峰位于520纳米附近。在使用triton处理导致细胞膜通透的情况下,外界溶液的不同pH值会导致荧光蛋白的亮度变化,其pKa大约为7.0 (图10)。

[0364] 实施例3 GRAB探针具有配体结合导致受体构象改变特异性的光学信号变化

[0365] 为了确定探针的荧光变化为受体激活特异的,分别采用受体的特异性阻断剂处理表达实施例2中的表达GRAB-EPI 1.0和GRAB-ACh 1.0的HEK293T细胞,观察在阻断剂存在的情况下是否可以消除配体引发的荧光信号变化。针对单个细胞,首先用相应配体进行实验,观察到有信号值的增加之后,再将配体完全洗掉,再次以阻断剂和配体的混合溶液灌流细胞。选用的阻断剂为:ICI,针对 β 2肾上腺素受体 (Rasmussen, S.G.F. et al. Crystal structure of the human beta2adrenergic G-protein-coupled receptor. Nature 450, 383-387 (2007)), 噻托溴铵 (Tiotropium Bromide, Tio) 针对M3乙酰胆碱受体 (Wood, M.D. et al. Functional comparison of muscarinic partial agonists at muscarinic receptor subtypes hM1, hM2, hM3, hM4 and hM5 using microphysiology. British journal of pharmacology 126, 1620-1624 (1999))。结果发现,在阻断剂存在时,激动剂ISO或配体ACh不能引起荧光强度的增加 (图11),这揭示着阻断剂特异性的阻碍了受体荧光探针和激动剂ISO或配体ACh的相互结合,从而使得受体荧光探针无法被激活,因而没有在激活后发生的构象变化以及荧光强度的变化。

[0366] 针对受体与配体的结合位点进行突变实验,以进一步验证探针的荧光变化为受体激活特异性的。针对 β 2肾上腺素受体,将GRAB-EPI 1.0中受体与配体的结合位点113位和114位氨基酸进行突变,观察表达该突变探针的HEK293T细胞在对激动剂ISO的荧光反应。这两个突变已经被证实可以显著降低受体和配体的亲和力 (Del Carmine, R. et al. Mutations inducing divergent shifts of constitutive activity reveal different modes of binding among catecholamine analogues to the beta (2) -adrenergic receptor. British journal of pharmacology 135, 1715-1722 (2002))。表达该突变探针的细胞在激动剂ISO的作用下没有任何荧光强度的增加。针对M₃型乙酰胆碱受体,在GRAB-ACh 1.0中配体结合区域的第506位氨基酸进行突变 (Y506F),观察表达该突变探针的HEK293T细胞在对配体乙酰胆碱的荧光反应该突变已知可以降低十倍左右的配体结合能力 (Wood, M.D. et al. Functional comparison of muscarinic partial agonists at muscarinic receptor subtypes hM1, hM2, hM3, hM4 and hM5 using microphysiology. British journal of pharmacology 126, 1620-1624 (1999))。在表达该突变乙酰胆碱探针的细胞中,观测到乙酰胆碱与探针的亲和力下降约10倍左右,其Kd值从1 μ M下降到10 μ M。(图12)

[0367] 以上实验表明,GRAB探针在加入配体后导致的荧光信号变化确实是由于受体激活后发生的构象变化导致的,该构象变化牵扯循环重排的荧光蛋白发生微环境的改变,从而导致荧光值的增加。

[0368] 实施例4 GRAB探针具有配体浓度依赖的光学响应

[0369] 针对肾上腺素探针GRAB-EPI 1.0和乙酰胆碱探针GRAB-ACh 1.0,进行不同浓度的配体实验(图 13),使用分别表达GRAB-EPI 1.0和GRAB-ACh 1.0的HEK293T细胞进行。发现其可以对于较大范围的神经递质浓度变化表现出浓度依赖的荧光信号变化,其曲线符合希尔分布。通过计算曲线的Kd值并与文献中受体对于配体的Kd值进行比较(Wacker,D.et al.Structural features for functional selectivity at serotonin receptors.Science(New York,N.Y.) 340,615-619(2013);Gainetdinov,R.R.,Premont,R.T.,Bohn, L.M.,Lefkowitz,R.J.&Caron,M.G.Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions. Annual review of neuroscience 27,107-144(2004)),发现GRAB探针并没有改变受体对于特定配体的亲和力。配体浓度依赖的反应曲线表明,GRAB探针可以敏感地,定量地检测生理情况下不同浓度的神经递质信号。

[0370] 本实验说明,基于受体构建的GRAB神经递质探针不仅可以定性地报道神经递质的结合和浓度改变,还可以定量地分析神经递质在特定区域的绝对浓度。

[0371] 实施例5 GRAB-ACh探针检测的亚秒级动力学和微摩尔灵敏度

[0372] 对用快速局部灌流系统递送激动剂或拮抗剂的表达GRAB-ACh 2.0的HEK293T细胞的膜表面荧光信号进行高速线扫描($\sim 2,000\text{Hz/line}$)共聚焦成像(图14a-b)。局部ACh灌流引发GRAB-ACh 2.0表达细胞的荧光密度快速增加,用单指数函数拟合,具有时间常数 $280 \pm 32\text{ms}$ (图14b-c,左图)。局部灌流噻托溴铵(tiotropium,Tio),毒蕈碱拮抗剂(AF-DX384)(Casarosa,P.,et al.Preclinical evaluation of long-acting muscarinic antagonists:comparison of tiotropium and investigational drugs.The Journal of pharmacology and experimental therapeutics 330,660-668(2009)),在灌流 $100\mu\text{M}$ ACh的GRAB-ACh 2.0表达细胞中降低了荧光信号,其具有较慢的时间常数 $762 \pm 75\text{ms}$ (图14b-c,右图)。

[0373] 为了确定传感器的灵敏度,对灌流含有不同浓度的ACh的溶液的表达式GRAB-ACh 2.0的HEK293T 细胞的荧光强度(图14d)进行测量。ACh浓度从 10nM 增加到 $100\mu\text{M}$ 以浓度反应的关系逐渐增加 GRAB-ACh 2.0表达细胞的荧光强度,用Boltzmann等式拟合, EC_{50} 为 $\sim 0.7\mu\text{M}$ (图14e),与野生型 M_3R (WT- M_3R) (Jakubik,J.,Bacakova,L.,El-Fakahany,E.E.&Tucek,S.Positive cooperativity of acetylcholine and other agonists with allosteric ligands on muscarinic acetylcholine receptors.Molecular pharmacology 52,172-179(1997))相当。

[0374] 实施例6 GRAB探针与下游信号通路的解偶联

[0375] 本实施例中,验证基于重要的信号分子GPCR的荧光探针在细胞的过量表达是否会引起不必要的信号通路激活。针对该问题,分别对GPCR已知的两大主要信号通路,即G蛋白介导的信号通路和arrestin介导的内吞信号通路进行实验(Gainetdinov,R.R.,Premont,R.T.,Bohn,L.M.,Lefkowitz,R.J. &Caron,M.G.Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions.Annual review of neuroscience 27,107-144(2004)),观察GRAB探针对于GPCR的下游通路的偶联能力。

[0376] 针对G蛋白介导的信号通路,使用实施例2中构建的GRAB-ACh 1.0探针,通过钙成像检测下游的钙信号以表征G蛋白介导的信号通路敏感性。由于GRAB探针占据绿光光谱,采用红色的钙染料Ca1590,用不同浓度的乙酰胆碱处理表达GRAB-ACh 1.0的HEK293T细胞,通

过得到钙信号与配体浓度的反应曲线计算出Kd值,进而比较其敏感性是否有明显差别。实验结果显示(图15),相比于内源M3型乙酰胆碱受体(图15中显示为WT-CHRM3或WT-M₃R,即与GRAB-ACh 1.0相对应的未插入cpEGFP的天然M3型乙酰胆碱受体),GRAB-ACh 1.0探针对于G蛋白介导的信号通路敏感性降低,其Kd值约下降5倍左右。

[0377] 接下来借鉴在GPCR晶体结构解析中常用的利用G α 蛋白肽段替代G蛋白的方法。G α 蛋白肽段为G蛋白的碳端20个氨基酸,在晶体结构中,G α 蛋白碳端在插入激活后的GPCR胞内环并稳定GPCR于激活状态的过程中发挥重要作用(Palczewski, K. et al. Crystal Structure of Rhodopsin: A G Protein-Coupled Receptor. Science (New York, NY) 289, 739-745 (2000))。由于G α 蛋白碳端肽段可以代替G蛋白起到稳定GPCR于激活状态的作用,并且其本身无法引发下游信号,猜想是否可以通过在GRAB探针的碳端末尾人为偶联G α 蛋白碳端肽段,从而导致G α 蛋白碳端肽段与内源的G蛋白竞争GRAB探针的胞内环位置,进而降低G蛋白介导的下游信号的激活。

[0378] 以乙酰胆碱探针为例,在实施例2中构建的GRAB-ACh 2.0探针的碳端最后一个氨基酸之后连接G α_q 蛋白的碳端20个氨基酸(具体序列为VF_{AAVKDTILQLNLKEYNLV}),观察其是否仍然具有乙酰胆碱引发的荧光上升,同时采用钙成像的方法,观察其是否可以降低下游G蛋白通路的信号传递。将该带有G α 蛋白肽段的探针命名为GRAB-ACh 2.0-G α_q 20,其中G α_q 20表示其连接的为G α_q 蛋白的碳端20个氨基酸。从结果(图16)中发现,GRAB-ACh 2.0-G α_q 20仍然具有良好的细胞膜定位和荧光强度,并且在配体乙酰胆碱的处理下表现出明显的荧光信号上升,其信号变化平均为70% $\Delta F/F_0$,略低于GRAB-ACh 2.0 (90%)。采用上文所述的钙成像方法,针对不同浓度的乙酰胆碱得到钙信号的反应曲线,其表现出明显的钙信号偶联的下降。与连接G α 肽段的探针相比,其钙信号偶联的能力下降约10倍左右,与内源M3R型受体(即CHRM3)相比其信号偶联能力下降50倍。这表明,在GRAB探针的末端融合G α 肽段后,其成功地竞争内源G蛋白从而显著降低了G蛋白信号通路的偶联,使得GRAB探针在细胞内表达时免于导致明显的细胞信号系统的紊乱。

[0379] 另外,在实施例2中构建的GRAB-ACh 2.0探针的基础上,在该探针的C端最后一个氨基酸之后分别连接来源于不同G α 蛋白的碳端的20个氨基酸(分别是G α_q 20: VF_{AAVKDTILQLNLKEYNLV} (SEQ ID NO:6)、G α_s 20: VF_{NDICRDIIQRMHLRQYELL} (SEQ ID NO:7)、G α_i 20: VF_{DAVTDVIIKNNLKDCGLF} (SEQ ID NO:8))后,通过检测不同乙酰胆碱浓度下钙信号的大小,检测这些乙酰胆碱探针对于下游G蛋白信号通路的偶联能力(结果参见图53,其中chrm3为表达未修饰的野生型乙酰胆碱受体M3R)。从图53中可以看到,由于G α 蛋白肽段与内源G蛋白相互竞争,因此这些乙酰胆碱探针对于下游G蛋白信号通路的偶联能力下降。

[0380] 除了G蛋白介导的下游通路外,GPCR另一条重要的下游通路为arrestin等蛋白介导的与受体内吞相关的信号通路。为了更加稳定地检测细胞外的神经递质动态变化,理想的探针应不受到内吞系统的调节,从而可以稳定真实的反应外源神经递质浓度的变化。针对该问题,首先检测GRAB探针是否会与arrestin信号通路偶联而导致受体探针的内吞。进而推测,若GRAB探针可以偶联内吞信号通路并导致受体内吞,其应该表现为细胞膜上的荧光信号的降低。若其细胞膜上的荧光信号在长时间的(大于五分钟)的配体处理下不表现明显的变化,则可能是探针与内吞信号通路的偶联受到了破坏。首先构建基于受体内吞的荧光探针分子(融合pH敏感荧光蛋白的GPCR)(具体构建方法参见实施例1,在天然 β_2 肾上腺素

受体 (β_2 AR) 基因的氮端通过Gibson assembly方法连接pHluorin基因,之间用3个氨基酸 (GGA) 的短肽段相连,并在其碳端末尾融合人AVPR2基因的最后29个氨基酸 (第343-371个氨基酸),获得pHluorin- β_2 AR,证明肾上腺素受体可以稳定地激活内吞信号通路,具体表现为pHluorin- β_2 AR 的荧光强度在加入激动剂ISO之后一段时间后表现出明显的下降 (图17)。

[0381] 由于肾上腺素受体可以稳定地激活内吞信号通路,进而对于基于其构建的肾上腺素探针 GRAB-EPI 1.0进行长时间的配体处理实验,观察其细胞膜的荧光强度是否随着激动剂ISO处理时间的增长表现出明显的荧光下降。获得了探针在30分钟激动剂ISO处理下的荧光值曲线,发现 GRAB-EPI 1.0的荧光值不随时间有明显的变化,在激动剂处理的长时间内维持相似的荧光强度,在 30分钟后洗去激动剂,荧光信号回到基础值,说明该荧光变化为可逆的受体激活的反应 (图18)。据此可认为,GRAB探针与arrestin介导的内吞信号通路的偶联效率大大降低,这可能是由于GRAB探针中的荧光蛋白占据了arrestin等蛋白的结合位点导致其难以偶联该信号通路。对于探针本身来讲,降低的信号偶联可以更好的保证其荧光变化为外源配体浓度变化的真实体现。

[0382] 实施例7神经递质荧光探针的应用

[0383] 1、神经递质荧光探针在培养的神经元中对特异性的神经递质进行响应

[0384] 在培养的神经元中分别表达肾上腺素探针GRAB-EPI 1.0和乙酰胆碱探针GRAB-ACh 1.0,并观测其在该体系下的表达情况以及对特定神经递质的响应。

[0385] 对原代培养的大鼠皮层神经元进行磷酸钙转染,约48小时后对神经元进行成像刻画。观察到表达神经递质荧光探针的神经元,其形态正常,具有良好且伸展的轴突树突网络。基于受体构建的荧光探针均匀的表达于神经元的细胞膜上,在神经元的不同结构,如突触棘上也可以清晰的看到探针的表达 (图19)。

[0386] 采用灌流神经递质溶液的方法,观察表达神经递质探针的神经元的光学响应。记录到神经递质特异的光学信号,该信号具有快速,稳定的特点,在不同的神经元中具有良好的重复性。进一步,采用特异的受体阻断剂(Tio)将受体稳定于非激活状态,在此情况下,神经递质无法引发受体的激活,对应的光学信号也没有配体引发的变化 (图44)。为了证明在神经元中表达的神经递质探针仍然具有对不同浓度神经递质的敏感响应,探针光学信号的配体浓度依赖曲线如图20所示,在培养细胞系中类似符合希尔方程,其Kd值与文献报道的值相似 (Wood, M.D. et al. Functional comparison of muscarinic partial agonists at muscarinic receptor subtypes hM1, hM2, hM3, hM4 and hM5 using microphysiology. *British journal of pharmacology*126, 1620-1624 (1999); Hoffmann, C., Leitz, M.R., Oberdorf-Maass, S., Lohse, M.J. & Klotz, K.N. Comparative pharmacology of human β -adrenergic receptor subtypes - Characterization of stably transfected receptors in CHO cells. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*369, 151-159 (2004))。

[0387] 采用饱和浓度的不同神经递质,依次处理表达同一个神经递质探针的神经元。结果发现,只有探针对应检测的神经递质可以引发可重复性的光学信号反应,而其他主要的神经递质即使在高浓度也无法引发任何光学信号的变化 (图21)。该结果说明,这些神经递质的荧光探针能够特异性地检测相应的神经递质,而不受其他神经递质浓度变化的影响的

特性。

[0388] 2、利用双光子成像方法检测果蝇嗅觉系统中乙酰胆碱的释放

[0389] 果蝇的中枢神经系统以乙酰胆碱作为主要的兴奋性神经递质参与信息传递。在其嗅觉系统中,嗅觉受体神经元接收气味分子的激活后,通过释放乙酰胆碱将感觉信息传递至第二级嗅觉神经元,即触角神经叶 (antennal lobe) (Ng,M.et al.Transmission of olfactory information between three populations of neurons in the antennal lobe of the fly.Neuron 36,463-474 (2002))。经典的钙成像方法通过在触角神经叶表达钙指示剂以观测嗅觉信息的传递,然而钙信号作为细胞内的第二信使,本身并不具有分子特异性,无法反映具体是何神经递质在信息传递中发挥作用 (Wang,J.W.,Wong,A.M.,Flores,J.,Vosshall,L.B. &Axel,R.Two-photon calcium imaging reveals an odor-evoked map of activity in the fly brain.Cell 112, 271-282 (2003))。本实施例采用开发的基因编码的乙酰胆碱探针,将乙酰胆碱探针特异性的表达在触角神经叶处,即嗅觉受体神经元的突触后,以检测嗅觉受体神经元接收嗅觉信息释放出的乙酰胆碱。通过果蝇胚胎注射结合遗传筛选的方法,将GRAB-ACh 1.0转入果蝇,构建了UAS-GRAB-ACh 1.0 的转基因果蝇,与GH146-Gal4 (Ruta,V.et al.A dimorphic pheromone circuit in Drosophila from sensory input to descending output.Nature 468,686-690 (2010)) 品系杂交后,特异性地在触角神经叶处表达 GRAB-ACh 1.0探针,通过双光子成像观察在气味刺激下该突触网络中内源乙酰胆碱的释放。

[0390] 观测到,在给予乙酸异戊酯 (IA) 的气味处理后,触角神经叶处的特定部位产生了特异性的荧光上升。为了验证该反应是气味特异性引发的乙酰胆碱释放,通过给予不同浓度的气味分子,观察到当气味分子浓度为零时,荧光信号没有任何的变化,而当气味分子浓度逐渐升高时,荧光反应也随之呈现浓度依赖性 (图22上图),这表明该反应确实为气味分子导致的神经递质释放。

[0391] 触角神经叶可分为不同的区域,对应不同的嗅球,不同的嗅球由于接受不同嗅觉神经元的投射,其对于特定嗅觉气味分子具有特异性的激活模式。实验发现,乙酸异戊酯可以特异性地引发在嗅球 DM2、DM3、DL1处的荧光信号变化,在DM2处的变化幅度最大,这之前文献中采用钙成像获得的结果一致。相对应的是,在DA1嗅球处,乙酸异戊酯无法引发光学信号的增强,这与之前的报道认为DA1主要接受性激素气味分子的激活相吻合 (Wang,J.W.,Wong,A.M.,Flores,J.,Vosshall,L.B.& Axel,R.Two-photon calcium imaging reveals an odor-evoked map of activity in the fly brain.Cell 112, 271-282 (2003);Couto,A.,Alenius,M.&Dickson,B.J.Molecular,anatomical,and functional organization of the Drosophila olfactory system.Current Biology 15,1535-1547 (2005)) (图22下图)。

[0392] 为了验证在触角神经叶处过表达GRAB-ACh 1.0探针是否偶联内源G蛋白信号通路进而影响了细胞的钙信号,利用基因编码的红色钙指示剂RGECO (Yongxin Zhao,et al,An Expanded Palette of Genetically Encoded Ca²⁺indicators,Science,2011) 直接测量在触角神经叶处的钙信号。在用乙酸异戊酯气味刺激时,表达GRAB-ACh1.0探针的果蝇与只表达RGECO的果蝇相比并没有明显的钙信号差别 (图23),这暗示着在体内过表达GRAB探针并没有导致可观测的钙信号的紊乱。

[0393] 3、在小鼠活体脑片中应用病毒表达及双光子成像检测乙酰胆碱探针的表现

[0394] GRAB探针在培养的神经元及活体果蝇中都表现出良好的检测特定神经递质的能力,进而希望能够在哺乳动物大脑中表达荧光探针,用以检测更加复杂的神经网络中神经递质的动态变化。采用慢病毒包裹GRAB-ACh 1.0探针基因以表达在小鼠的海马神经元中,通过局部喷灌乙酰胆碱的方法检测其荧光表现。GRAB探针在小鼠活体脑片中同样表现出稳定的反应,再加入乙酰胆碱后其表现出快速的荧光上升,平均幅度约为10%-15%。由于GRAB-ACh 1.0乙酰胆碱探针为基于M3受体构建,采用M3受体的特异性激动剂Oxo-M同样可以引发明显的荧光增强,而N型乙酰胆碱的激动剂尼古丁无法引发荧光信号的变化,揭示了GRAB探针信号的特异性(图24)。

[0395] 实施例8用人ADRA2A受体构建肾上腺素和/或去甲肾上腺素的特异性荧光探针

[0396] 1、材料与方法

[0397] GRAB探针构建及突变筛选的分子克隆

[0398] 本文中,所有分子克隆都采用Gibson assembly (Gibson,D.G.,et al.,Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases.Nat Methods,2009.6 (5):p.343-5)的方法,即利用序列互补实现同源片段的重组连接。采用约30个碱基的同源互补序列实现序列之间的有效拼接,该互补序列设计与引物上。所有重组正确的克隆在北京大学生命科学学院设备中心进行测序确定。

[0399] GRAB探针构建载体为invitrogen公司的pDisplay载体。其GPCR基因部分扩增于全场人类基因组 cDNA(hORFeome database 8.1),首先通过Gateway克隆方法转移到以pDisplay载体构建的带有att序列的终载体上,再通过Gibson assembly的方法将特定循环重排荧光蛋白插入受体特定位置。在探针的突变筛选过程中,突变引入的方法为在特定引物中引入随机碱基组合,从而构建定点突变库。其余克隆构建方式类似。

[0400] 细胞培养和转染

[0401] HEK293T细胞以10cm培养皿培养在含10%FBS即1%PS的DMEM (DPF全培养基)中,培养箱温度 37℃,CO₂含量5%。根据细胞生长状况换液或者传代。换液时倒去原培养基,加入新培养基15mL即可。传代在细胞密度达到80%以上进行。首先倒去原培养基,用2mL,0.01M PBS洗涤两次,去除残留的镁离子和血清。加入0.5mL,0.25%胰蛋白酶-EDTA,于37℃消化1min。以2mL培养基终止反应,轻轻吹打细胞至完全从皿底脱离并分散,再加入2mL培养基,吹打均匀。取约1mL细胞悬液至新的10cm培养皿,加入14mL培养基,轻轻晃匀,放回培养箱。

[0402] 筛选过程需要将细胞传至24孔板(灌流)或96孔板(opera phenix)中。按上述传代方法将细胞用胰酶消化,并加4mL培养基形成均匀的细胞悬液后,按50%密度,取适当体积的细胞悬液传代至铺有干净的成像零号圆玻片的24孔板或96孔板中。24孔板每孔加入约500μL培养基,96孔板每孔加入约100μL 培养基,混匀,放至培养箱中培养。

[0403] 细胞贴壁8-12h后进行转染。将DNA与PEI以1:3的比例混匀在DMEM中,室温孵化15-20min后加入待转染的细胞培养液中,混匀。24孔板每孔转染DNA约800ng,96孔板300ng。转染4h后进行换液,转染完成24h后进行荧光观察。

[0404] 大鼠神经元的原代培养采用新出生的Sprague-Dawley大鼠,在酒精清洗大鼠皮肤后,采用手术器械对其头部进行解剖,取出大脑后将皮层表面的血管膜小心去除,皮层组织剪碎后置于0.25%的胰酶溶液中,在37度恒温培养箱中消化10分钟。消化后用含有5%FBS

的DMEM溶液终止消化,并用移液枪缓慢吹吸十次,进一步破碎细胞。静置5分钟后,吸出上层溶液,舍去含有组织碎片的沉淀,在离心机中进行1000rpm,5分钟的离心。之后弃掉上清,用培养神经元所用的Neurobasal+B27溶液重悬神经元,并利用细胞计数板进行密度计算。计算细胞密度后,根据 $0.5-1 \times 10^6$ 细胞/ml的密度稀释并种植与铺好多聚赖氨酸(sigma)的玻片上。原代神经元培养于Neurobasal+B27溶液中,并每隔两天进行半换液。对原代培养的神经元的转染于解剖后6-8天进行,采用磷酸钙转染方法。在进行细胞转染后的1.5 小时后,通过显微镜观察溶液是否产生小而均匀的磷酸钙沉淀,并用pH为6.8的HBS溶液换液。HBS清洗过后,神经元重新置于Neurobasal+B27培养基中进行培养,直到48小时后进行成像实验。

[0405] 细胞的荧光成像和药物灌流

[0406] 灌流体系搭置于显微镜上,包括溶液导入系统,成像池以及吸液泵。灌流过程中,成像池置于倒置显微镜的物镜上方,将接种细胞的玻片放入池中,通过控制溶液导入系统不同管道的开关进行不同药物的灌流实验,其灌流速度被设定为一秒一滴左右。为保证焦面的稳定,需使液面高度始终保持不变,因此各溶液流速应调节一致。调节吸液速度维持池内液面高度没过玻片。

[0407] 灌流前先手动选定待测细胞区域(ROI)及背景区域,再进入灌流实验。曝光时间设定为50ms一下,采集频率为每5秒成像一次。灌流使用的溶液为生理溶液4k(调pH=7.3-7.4),药物溶液用4k配制成所需浓度。程序运行时间设定不超过5min,使用4k平衡稳定约60-90s后,灌注药物,灌注60s后换回4k 进行冲洗。绿色荧光蛋白所用激发光为488nm,红色荧光蛋白激发光为568nm,激光强度根据激光器工作状态和细胞表达效率进行调整。

[0408] 程序结束后,导出采集到的时间-荧光强度数据表,将ROI扣除背景得到相应荧光值 F_t ,以加入药物前该荧光值的均值为起始荧光 F_0 ,计算 $\Delta F/F_0 = \frac{(F_t - F_0)}{F_0}$,做该比值与时间关系曲线,观察药物的加入对荧光强度的影响。

[0409] 神经元的成像实验采用倒置的Nikon激光扫描共聚焦纤维镜,其为基于倒置的Ti-E显微镜和A1Si 光谱检测共聚焦系统的显微镜。采用40x NA:1.35的油镜及488的激光进行成像。激光扫描共聚焦显微镜的显微镜本体,PMT及图像获取和处理系统都由NIS element 软件控制。

[0410] GRAB探针对配体的响应检测采用药物灌流的方法进行。细胞置于标准的生理溶液下,溶液配方为:

[0411]	NaCl	150mM
	KCl	4mM
	MgCl ₂	2mM
	CaCl ₂	2mM
	HEPES	10mM
	葡萄糖	10mM

[0412] 生理溶液的pH值校正为7.4左右后,以部分溶液稀释小分子药物,配置小分子配体的相应浓度溶液。

[0413] Opera PhenixTM的使用

[0414] Opera Phenix™每次可对96孔板中央60个孔进行共聚焦成像,使用63倍水镜。实验前将细胞培养基更换为100μL生理溶液,置于样品架上,再导入仪器内。选择合适的成像焦面,激发波长和激光强度,选定所有成像孔以及每孔中的成像视野。运行程序,仪器会自动将所有选定区域进行成像。第一次成像完成后,取出96孔板,将每孔中的生理溶液更换为含所需浓度药物的生理溶液,再进行一次成像。

[0415] 两次成像完成后,使用Harmony软件分析程序,利用mCherry红色荧光对每个视野细胞的膜区域进行定位(RFP带有的CAAX序列使之能够定位于膜上),统计可圈定区域(ROI)的数目,计算圈定区域内cpEGFP与mCherry荧光强度比值(GR ratio)等,最终导出分析结果报告。对比加药前后GR ratio的变化可以判断荧光探针是否对药物响应,以及响应的强弱。

[0416] Opera Phenix™与灌流的区别主要有两点。一是由于软件数据处理程序的限制,Opera Phenix™不能自动扣除背景荧光;二是,由于图像的采集不是动态连续的,加药过程也必须将孔板拿出,因此前后两次采集的ROI可能是不同的,共聚焦焦面也可能有差别,此时单纯的cpEGFP荧光变化绝对值可能是由这些测量变化引起的,不能作为是否对药物响应的标准。这也是引入RFP的原因。本发明中,通过合理设计,使GFP与RFP表达计量比一定,即外界条件不变时,每一个细胞的GR ratio都可以近似相等(但荧光绝对强度不一定相等)。RFP能反映ROI和焦面等的变化,但没有对药物的荧光强度响应。因此可以采取测定GR ratio来衡量探针响应情况,GR ratio下降对应加药后cpEGFP荧光强度下降,即 off探针,GR ratio上升对应加药后cpEGFP荧光强度上升,即 on探针。

[0417] 光解笼锁NPEC-NE探究神经递质反应动力学

[0418] 100μM的NPEC-NE由DMSO配制,光解实验在Nikon激光扫描共聚焦显微镜完成,光刺激为80%的405nm激光施行76ms的光刺激,刺激面积为2x2pixel的矩形(1pixel=0.62μm)。

[0419] 图像数据处理

[0420] 荧光成像数据采用ImageJ软件进行处理。针对GRAB探针在HEK293T细胞系和神经元中的荧光表现,选择整个细胞胞体为数据处理的区域。荧光信号的变化通常采用其相对变化来指示,其荧光信号首先减去无探针表达的背景区域,从而得到荧光蛋白强度的真实体现,之后通过计算加入药物后的荧光值F和加入前的平均荧光值 F_0 ,得到相对荧光变化值 $\Delta F/F_0 = (F - F_0)/F_0$,作为荧光探针对于特定药物的荧光响应。 $\Delta F/F_0$ 随时间的变化进而在Origin 8.6软件中进行作图表示。伪彩图由Matlab完成。

[0421] 统计学检测

[0422] 在本发明中,图中所显示的数据方式为平均值±均值标准误。

[0423] 2、选择用于构建荧光探针的人源去甲肾上腺素受体蛋白

[0424] 选取三种不同亚型的人源去甲肾上腺素受体蛋白与绿色荧光蛋白pHluorin分别进行融合表达,通过共聚焦显微镜在488nm激光下观察绿色荧光,检测其在细胞膜上的表达情况(图25b)。其中人ADRA2A受体具有良好的膜定位和对配体较高的亲和力。因此选择人ADRA2A受体作为荧光探针构建的基本单元。

[0425] 人ADRA2A的序列参见NCBI gene ID:150,其氨基酸序列具体为:

[0426] MFRQEQLAEGSFAPMGSLQPDAGNASWNGTEAPGGGARATPYSLQVTLTLVCLAGLLMLLT VFGNV
LVIIAVFTSRALKAPQNLFLVSLASADILVATLVIPFSLANEVMGYWYFGKAWCEIYLALDV LFCTSSIVHLCAI
SLDRYWSITQAIEYNLKRTPRRIKAIITVWVISAVISFPPLISIEKKGGGGGPQPAEP RCEINDQKWYVISSCI

GSFFAPCLIMILVYVRIYQIAKRRTVRPPSRRGPDVAAPPGGTERRPNGLGPERSAGPGGAEEPLPTQLNGAPG
EPAPAGPRDTDALDLEESSSSDHAERPPGPRRPERGPRGKGKARASQVKPGDSLPRRPGATGIGTPAAGPGEERV
GAAKASRWRGRQNREKRFTFVLAVVIGVFVVCW FPFFFTYYTLTAVGCSVPRTLKFFFWFGYCNSSLNPVIYITIF
NHDFRRAFKKILCRGDRKRIV (SEQ ID NO:2)。

[0427] 其中下划线部分为第三个胞内环,具体为218-374位氨基酸,按照uniprot数据库定义。

[0428] 3、针对人ADRA2A受体第三个胞内环ICL3进行截短并插入循环重排荧光蛋白cpEGFP获得对高浓度NE有光学信号变化的GRAB-NE1.0

[0429] 人ADRA2A受体的第三个胞内环具有157(参考uniprot数据库)个氨基酸。猜想受体的第三个胞内环的长度可能影响本身构象改变转化为荧光变化的效率,过长的胞内环可能会将构象的改变缓冲,从而难以影响插入的荧光蛋白。因此针对人ADRA2A受体的ICL3进行截短插入cpEGFP。所使用的cpEGFP与实施例2中相同,是GCaMP6s中使用的循环重排荧光蛋白cpEGFP,其具体序列是:

[0430] NVYIKADKQKNGIKANFHIRHNIEDGGVQLAYHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSVQSKLSKDP NEKR
DHMVLLFEVTAAGITLGMDLYKGGTGGSMVRKGEELFTGVVPIVELDGDVNGHKFSVSG EGEDATYGKLT
FICTTGKLPVPWPTLVTTLTYGVCFSRYPDHMKQHDFKFSAMPEGYIQERTI FFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLV
NRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYN (SEQ ID NO:11)。

[0431] 采用截短插入的方法,在157个氨基酸的ICL3上每隔10个氨基酸选取一个插入位点,共设计了14个插入位点。按照位点的顺序将其分为靠近N端和靠近C端两组,每组7个位点,将两组的插入位点随机选取进行ICL3截短并在两位点间插入cpEGFP,即得到有49种可能性的截短插入库(图26a)。将它们在分别在HEK293T细胞中表达,在高内涵成像系统Opera Phenix上分别检测饱和浓度的激动剂(去甲肾上腺素NE,浓度为100 μ M和无激动剂时细胞膜上的荧光强度,同时检测同一启动子下通过CAAX修饰定位在膜上的红色荧光蛋白信号作为内参。通过筛选,选取在加入配体前具有较高绿色荧光强度 (Fluorescent Intensity=GR ratio pre),并在加入配体后荧光强度变化值($\Delta F/F_0$)最大的克隆命名为 GRAB-NE1.0(如图26b),测序得到该克隆在ICL3上的截短插入位点为ICL3的78和138位(即ICL3的第79-138位被截去),即截短了ICL3的60个氨基酸。在激光共聚焦显微镜下进行药物灌流实验,在100 μ M的去甲肾上腺素作用下,GRAB-NE1.0探针有大于100%的荧光强度变化,且这一变化是可逆的(如图26d、e)。

[0432] 本发明中,当描述截短位点时,所给出的编号对应氨基酸的C端,所以被截去的位置是在编号对应氨基酸的C端,本实施例、下述实施例以及本发明的全文中,除非另外指出,均按如此理解。

[0433] 4、针对截短的人ADRA2A受体ICL3进行cpEGFP插入位点的精细调整,获得对NE有更高光学信号变化的GRAB-NE2.0

[0434] 在已截短的ICL位点78和138两边每隔1个氨基酸各设置一个插入位点,即从73-83共11个位点(即在73-83任一位点之后插入),133-143共11个位点(即在133-143任一位点之前插入)进行插入位点的精细调整,共121种可能性。同样地,将它们在分别在HEK293T细胞中表达,通过筛选(药物为100 μ M NE去甲肾上腺素),获得荧光强度较高, $\Delta F/F_0$ 最大的克隆命名为GRAB-NE2.0(如图26c),测序得到该克隆在ICL3上的截短插入位点为ICL3的78和

143位(即ICL3的第79-143位被截去)。在激光共聚焦显微镜下进行药物灌流实验,在100 μ M的去甲肾上腺素作用下,GRAB-NE2.0探针有大于200%的荧光强度变化(如图26d、e)。

[0435] 5、针对截短的人ADRA2A受体ICL3与cpEGFP间连接肽段进行筛选,获得基础荧光强度更高,对NE有更高光学信号变化的GRAB-NE2.1

[0436] 在确定了最优的荧光蛋白插入位点后,在GRAB-NE2.0探针的基础上,针对荧光蛋白与受体之间的连接肽段进行优化。

[0437] 在前述步骤中,在人ADRA2A受体为基础的去甲肾上腺素特异性荧光探针的构建过程中,采用柔性氨基酸(甘氨酸,丙氨酸)构成的短连接肽段,帮助融合蛋白能够正确的折叠。肽段的长度为氮端2个氨基酸GG,碳端5个氨基酸GGAAA。以此为基础,针对肽段的长度进行了筛选。具体策略是分别将cpEGFP两边序列的5个氨基酸长度改变为0-5个氨基酸,由远离cpEGFP方向开始截短,并且将氮端和碳端进行随机组合,从而得到所有可能的25种排列(如图27a)。将它们在分别在HEK293T细胞中表达,通过高通量的筛选(使用100 μ M NE),发现以GRAB-NE2.0为模板进行的连接肽段长度的改变没有能够提高荧光探针的亮度和反应(如图27b)。

[0438] 在上述实验的基础上,固定连接肽段长度为2-5的组合,尝试改变氨基酸种类以获得信号变化更大的探针。利用设计随机引物的方法,在待突变的氨基酸位点采用NNB的碱基编码,以获得20种不同氨基酸的可能性,并尽量减少出现终止密码子的概率。共构建了7个针对不同连接肽段氨基酸位点随机突变的筛选库,每个筛选库有20种可能性(如图27c)。将它们在分别在HEK293T细胞中表达,通过高通量的筛选,获得了比GRAB-NE2.0亮度更高,反应更大的GRAB-NE2.1,这一新荧光探针的连接肽段序列为GG-TGAAA,其亮度及反应大约均是GRAB-NE2.0的1.5倍(如图27d、28e)。

[0439] 6、去甲肾上腺素GRAB探针具有配体结合导致受体构象改变特异性的光学信号变化,且该特异性与相应受体一致

[0440] 分别采用ADRA2A受体的特异性阻断剂(Yohimbine,2 μ M)、 β 2型肾上腺素受体特异性阻断剂(ICI118,551,2 μ M)及其他神经递质处理表达GRAB-NE2.1的细胞,观察在这些情况下是否可以还可以获得配体结合引发的荧光信号变化。结果表明,去甲肾上腺素NE和肾上腺素Epi都可激活GRAB-NE2.1,而 β 型受体特异性激活剂ISO却不能激活该探针,这与ADRA2A受体可同时结合NE和Epi,却不能结合ISO相吻合,证明GPCR改造成为的神经递质荧光探针保留了内源GPCR对配体的选择性及特异性。另外, α 受体的特异阻断剂Yohimbine可以抑制由NE引起的探针荧光信号增强。同时,ADRA2A受体的配体结合口袋的突变S204A可以破坏GRAB-NE2.1的荧光信号变化(如图28a、d)。这些结果进一步说明GRAB-NE探针具有受体激活特异的荧光信号变化。另外加入其它常见的神经递质分别处理转染了GRAB-NE2.1的细胞,他们都不能够显著地激活GRAB-NE2.1获得荧光信号的改变(如图28a)。这说明去甲肾上腺素GRAB探针的荧光变化为受体激活特异的,

[0441] 7、去甲肾上腺素GRAB探针具有配体浓度依赖的光学响应

[0442] 使用1nM到1mM不同浓度的配体(去甲肾上腺素NE,浓度为1nM到1mM)处理表达GRAB-NE2.1探针的HEK293T细胞,发现其可以对于较大范围的神经递质浓度变化表现出浓度依赖的荧光信号变化,其曲线符合玻尔兹曼分布(如图28b、c)。通过计算曲线的EC₅₀值为0.9 μ M,与文献中配体结合受体的Kd值在同一个数量级,可见去甲肾上腺素GRAB探针并没有

改变受体对于特定配体的亲和力。由于受体结合配体的亲和力历经不断进化,可灵敏地将神经递质信号传递到细胞内下游信号,因此与受体自身灵敏度相似的神经递质荧光探针可以敏感地,定量地检测生理情况下不同浓度的神经递质信号。

[0443] 向GRAB-NE2.1探针引入T373K的突变,获得配体亲和力提高10倍的GRAB-NE2.2探针(如图28c、d、e),该探针虽然在本底荧光强度和荧光信号变化上较GRAB-NE2.1小,但是约100nM的配体亲和力有助于更灵敏的检测到神经递质的信号。其对去甲肾上腺素NE和肾上腺素Epi均具有百nM级的亲和力(如图28f)。这说明GPCR与配体结合区域的突变可以调节探针与配体结合的亲和力,以此来获得具有更高或更低配体亲和力的荧光探针,一方面可以覆盖更广泛的检测范围,另一方面可以实现检测单个动作电位刺激下神经递质的释放。

[0444] 8、去甲肾上腺素GRAB探针的快速动力学可实现亚秒级动态检测

[0445] 通过笼锁神经递质,可以利用光解反应快速激活和释放某一区域的神经递质,然后利用显微镜快速扫描探针的信号,以获得探针结合配体后荧光强度变化所需的时间常数。使用笼锁的神经递质NPEC caged NE(即NPEC-NE)(图29a),选用405nm激光激活NPEC-caged NE,选用GRAB-NE2.2在HEK293T 细胞中进行实验。用短时程高能量的405nm激光光解时,可看到光解后荧光信号的上升,在加入探针特异性抑制剂Yohimbine之后和不加入笼锁神经递质NPEC-NE时进行光解均不能观察到光解后荧光信号的上升(图29b、c)。这说明光解后荧光信号的上升是由光解特异性释放NE后,被GRAB-NE2.2探针检测到的结果。利用单指数增长方程对荧光信号的上升进行拟合,可得到该荧光信号上升的速率常数约为100ms。这一速率常数已经足够特异地捕捉在复杂神经网络中化学突触信号传递的过程。

[0446] 9、去甲肾上腺素GRAB探针与下游信号通路的解偶联

[0447] 针对去甲肾上腺素受体的G蛋白介导的信号通路进行实验,观察GRAB探针对于GPCR的下游通路的偶联能力,以确定细胞内的过量表达是否会引起不必要的信号通路激活。

[0448] 针对依赖G蛋白的信号传递通路,GRAB-NE受体是基于ADRA2A受体开发的荧光探针,而 ADRA2A受体内源是与G α i蛋白偶联引起下游抑制性信号的传递。通过抑制G α i蛋白的偶联,检测荧光探针对配体亲和力的改变与否可用来判断该荧光探针是否需要下游G α i蛋白的偶联维持其激活状态(如图30a、b)。分别通过在细胞中共表达PTX百日咳毒素(通过催化G α i蛋白的ADP核糖基化,PTX使G α i不能活化)和加入GTP γ S(可结合G α i蛋白抑制GTP的解离,从而抑制G蛋白的活化)两种方法抑制G α i蛋白的偶联,结果发现这两种方法都不能改变GRAB-NE2.0荧光探针对配体的亲和力(图30c-e),可见荧光探针本身已经不需要G蛋白的偶联稳定自身的激活构象。

[0449] 配体激活是否引起下游G蛋白的激活需要通过直接的信号传递强度进行判定。用传统的抗性筛选方法构建G α i嵌合体G蛋白细胞系,将表达G α i嵌合体蛋白及抗生素抗性蛋白的质粒转染入细胞内,通过质粒上的同源重组序列实现细胞基因组的插入,进而通过抗性筛选获得稳定细胞系(G α i嵌合体蛋白的作用为可将偶联G α i蛋白通路的GPCR受体激活转为G α q通路的受体激活,即可以用G α q通路下游检测方法(如TGF α assay)进行检测)。随后借助G α q信号通路常用检测手段TGF α shedding实验,将G α i偶联的信号激活转嫁于G α q引起的TGF α 的shedding信号,从而可以通过TGF α shedding的强度判断下游G蛋白激活的强度。在10 μ M

NE的作用下,GRAB-NE2.0探针引起的TGF α 信号仅为内源ADRA2A受体的1/3(图 30f),可见该探针的构建确实大大减小了该探针对下游G蛋白的偶联,使得GRAB探针在细胞内表达时免于导致明显的细胞信号系统的紊乱。这可能是由于cpEGFP的插入影响了GPCR与G蛋白偶联结合的位置,从而无法完成G蛋白的偶联。而cpEGFP的插入一定程度上模拟了G蛋白的偶联对GPCR结构造成的扭转,帮助GPCR结合配体后稳定在激活状态。

[0450] 10、去甲肾上腺素GRAB荧光探针在培养的神经元中对特异性的神经递质具有光学信号变化

[0451] 将基于ADRA2A受体构建的神经递质荧光探针GRAB-NE2.1表达在培养的神经元中,并观测其在该体系下的表达情况以及对特定神经递质的响应。对原代培养的大鼠皮层神经元进行磷酸钙转染,约 48小时后对神经元进行成像刻画,观察到,表达GRAB-NE2.1的神经元,其形态正常,具有良好且伸展的轴突树突网络。GRAB-NE2.1除在细胞体位置有少量聚集外,均匀地表达于神经元的细胞膜上,在神经元的不同结构,通过共转染PSD95-mcherry,还可观察到荧光探针在树突棘上的分布(图31a、b)。

[0452] 采用灌流神经递质溶液的方法,观察表达神经递质探针的神经元的光学信号变化,记录到神经递质特异的光学信号(图31c、d),该信号由于胞体的少量聚集导致光学信号变化小,但在细胞膜部分及突触上的信号都与HEK293T细胞中类似(图31e)。且信号具有快速,稳定的特点,在不同的神经元中具有良好的重复性。探针光学信号的配体浓度依赖曲线与培养细胞系中类似,符合玻尔兹曼方程,其EC₅₀值与文献报道的值相似(图31f、g)。采用特异的受体阻断剂Yohimbine可抑制配体引发的神经递质探针的光学信号变化(图31f)。

[0453] 11、肾上腺素/去甲肾上腺素荧光探针在培养的大鼠心肌细胞中对特异性的神经递质具有光学信号变化

[0454] 通过脂质体将GRAB-NE2.1探针转染至原代培养的大鼠心肌细胞,用药物灌流手段检测其在心肌细胞中对配体结合的光学信号变化以及对配体的亲和力。结果显示,该探针在心肌细胞中具有很好的膜定位表达,在100 μ M饱和去甲肾上腺素情况下具有大于300%的光学信号变化(如图32a、b、c)。在用不同浓度的激动剂(去甲肾上腺素NE)处理下,该探针在心肌细胞中对配体的亲和力也与之之前测定的相似,约为0.5 μ M(如图32d、e)。

[0455] 实施例9遗传编码的五羟色胺荧光探针的构建

[0456] 除非特别说明,本实施例中所使用的材料与方法与实施例1相同。

[0457] 针对不同的五羟色胺受体进行初步筛选,发现人HTR1D、人HTR2C受体在插入荧光蛋白后仍然具有较好的表达和膜定位。之后,以人HTR2C为例,筛选荧光蛋白的最优插入位点。

[0458] 1、以人HTR2C受体构建五羟色胺特异性的荧光探针

[0459] 以人HTR2C受体为骨架构建五羟色胺特异性的荧光探针,采取逐步确定荧光蛋白最佳插入位点的方法。针对人HTR2C受体的第三个胞内环,每隔5个氨基酸作为一个插入位点插入荧光蛋白,同时对第三胞内环进行特定氨基酸位置上的截短并在截短位置插入荧光蛋白,获得探针库。使用荧光共聚焦显微镜配合灌流系统对初步构建的探针库进行筛选,筛选的过程中,将在感受到配体后荧光强度降低的探针称为“OFF探针”,把荧光强度增加的探针称为“ON探针”。经过第一轮筛选(筛选药物为五羟色胺5HT,浓度为10 Mm),从中挑选出响应最大的两个探针对其进行测序,发现这两个探针都对人 HTR2C受体的第三个胞内环进行

了不同程度的截短,其中一个探针的截短发生在第三个胞内环(ICL3)的第15到55位(即ICL3的第16-55位被截去,命名为 15_N-55_C),另一个探针的截短发生在ICL3的第10到60位(即ICL3的第11-60位被截去,命名为 10_N-60_C)。

[0460] 其中人HTR2C受体的序列参见NCBI gene ID:3358, isoform a,其氨基酸序列具体为:

[0461] MVNLRNAVHSFLVHLIGLLVWQCDISVSPVAAIVTDIFNTSDGGRFKFPDGVQNWPAISIVIIII MT
IGGNILVIMAVSMEKKLHNATNYFLMSLAIADMLVGLLVMP LSLAILYDYVWPLPRYLCPVWI SLDVLFSTASI
MHLCAISLDRYVAIRNPIEHSRFSNRKAIMKIAIVWAISIGVSVPPIVIGLRDEEKVFV NNTTCVLNDPNFVLI
GSFVAFFIPLTIMVITYCLTIYVLRRLQALMLLHGHTEEPGLSLDFLKCKKRNTAEEENSANPNQDQARRRRKKKE
RRPRGTMQAINNERKASKVLGIVFFVFLIMWCPFFITNILSVLCE KSCNQKLMEKLLNVFVWIGYVCSGINPLVY
TLFNKIYRRAFSNYLRCNYKVEKKPPVRQIPRVAAT ALSGRELVNVIYRHTNEPVIEKASDNEPGIEMQVENLEL
PVNPSSVVSERISSV (SEQ ID NO:4)

[0462] 其中下划线部分为第三个胞内环,具体为236-311位,参考uniprot数据库定义。

[0463] 其中所使用的荧光蛋白为循环重排的cpEGFP,与实施例2中相同,是GCaMP6s中使用的循环重排荧光蛋白cpEGFP,其具体序列是:

[0464] NVYIKADKQKNGIKANFHIRHNIEDGGVQLAYHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSVQSKLSKDP NEKR
DHMVLLFEVTAAGITLGMDELYKGGTGGSMVRKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSG EGEDATYGLKTLK
FICTTGKLPVPWPTLVTTLTYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYIQERTI FFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLV
NRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYN (SEQ ID NO:11)。

[0465] 2、优化荧光蛋白在HTR2C受体第三个胞内环的插入位点

[0466] 筛选策略为固定第三个胞内环N端的前10位或者前15个位氨基酸,对荧光蛋白在胞内环C端的插入位点进行系统的扫描(命名为 10_N-X_C 或者 15_N-X_C ,即ICL3的第11-X位氨基酸或第16-X位氨基酸被截去);同理,固定第三个胞内环第55位或者第60位以后的氨基酸,对荧光蛋白在胞内环N端的插入位点进行扫描(命名为 X_N-55_C 或者 X_N-60_C ,即ICL3的第X+1-55位氨基酸或第X+1-60位氨基酸被截去)并筛选。具体筛选方法是将在不同位置插入荧光蛋白的人HTR2C受体分别转入HEK293T细胞,用五羟色胺进行灌流,测量 $\Delta F/F_0$ 。在 10_N-X_C 的筛选库里 10_N-60_C 这个组合显示出最大的OFF响应;在 15_N-X_C 的筛选库里,当荧光蛋白插入位点的组合变为 15_N-70_C (即ICL3的第16-70位被截去)时,探针显示出20%左右的ON响应。此后,固定人HTR2C受体第三个胞内环第70位后面的氨基酸序列,对荧光蛋白在第三个胞内环N端的插入位点进行扫描(命名为 X_N-70_C),未发现更好的探针。

[0467] 然后,对插入位点进行更精确的筛选,将左边的插入位点定为第三个胞内环的第13位到第17位氨基酸,右边插入位点定为第66位到74位氨基酸,对这些位点进行排列组合构建探针库并实施筛选。具体筛选方法同上,通过对荧光蛋白在人HTR2C受体插入位点进行系统的筛选,得到了一个具有80%ON响应的五羟色胺荧光探针 14_N-68_C (即ICL3的第15-68位被截去),并将其名为GRAB-5-HT1.0。

[0468] 3、优化循环重排荧光蛋白与HTR2C受体之间的连接肽段

[0469] 初始的连接肽段中,N端的肽段长度为2个氨基酸,序列为GG;C端的肽段长度为5个氨基酸,序列为GGAAA。在GRAB-5-HT1.0的基础上,依次对连接肽段的每一个位点做随机化突变,筛选到表现出色的探针,就将这个位置的氨基酸固定下来,继续对下一个位点的连接

肽段进行随机化突变。发现当把N端连接肽段第一位的甘氨酸G突变成天冬酰胺N之后,探针的信号有3倍的增加,从80%增加到接近300%,因此,将第一位的氨基酸固定为天冬酰胺。完成全部连接肽段的筛选后,得到的最好的五羟色胺探针在感受到饱和浓度的五羟色胺时,荧光信号大概有350%的上升,将其命名为 GRAB-5-HT2.0,其连接肽为N端NG,碳端GFAAA。

[0470] 根据连接肽段的筛选结果,发现N端连接肽段的第一位氨基酸改变之后对探针的表现影响较大,考虑到氨基酸之间的相互作用,又对N端连接肽段前面的三个位点,也就是人HTR2C受体第三个胞内环的第12,13和14位使用同样的策略进行筛选。结果发现第12和14位氨基酸的改变对于探针的表现没有影响,而将第13位的亮氨酸L突变为苯丙氨酸F后,探针的信号增加到了接近500%,将其命名为 GRAB-5-HT2.1。

[0471] 4、五羟色胺探针具有配体浓度依赖的光学响应

[0472] 使用不同浓度的五羟色胺去激活GRAB-5-HT2.1探针,发现其可以在五羟色胺浓度变化的较大范围内表现出浓度依赖的荧光信号的增加(图33),且曲线符合希尔分布。通过计算GRAB-5-HT2.1的Kd 值并与文献中报道的HTR2C受体对于5-HT的Kd值进行比较,发现对人HTR2C受体的改造没有影响其对于自身配体的亲和力,这是因为5-HT与人HTR2C受体结合的区域主要位于后者的跨膜区以及胞外区域,而本发明中改造的是人HTR2C受体的第三个胞内环。配体浓度依赖的反应曲线表明,五羟色胺探针可以敏感地、定量地检测生理情况下不同浓度的五羟色胺信号。

[0473] 5、五羟色胺探针具有特异性配体引发的光学信号变化

[0474] 在使用饱和浓度的不同神经递质,处理表达在HEK293T细胞中五羟色胺探针GRAB-5-HT2.1,结果发现只有五羟色胺可以引发该探针产生较大的荧光信号的改变(图34A),而其它的神经递质即使在高浓度下也不能引起GRAB-5-HT2.1探针光学信号的改变。

[0475] 向GRAB-5-HT2.1探针中加入HTR2C受体特异性的激动剂(CP809)可以引起荧光信号的改变,而 HTR2B受体特异性的激动剂(BWT23C83)和HTR1B受体特异性的激动剂(CGS12066B)不能使荧光信号发生改变;首先向GRAB-5-HT2.1的探针中加入五羟色胺引起荧光信号的增加,随后向其中加入HTR2C 受体特异性的拮抗剂(RS102221)可以拮抗五羟色胺引发的GRAB-5-HT2.1探针荧光信号的增加,而向其中加入HTR2B受体特异性的拮抗剂(SB204741)则不能拮抗五羟色胺引发的探针荧光信号的增加(图 34B)。这说明使用人HTR2C受体构建的探针具有受体亚型特异性。

[0476] 6、通过构建嵌合式受体的方法构建一系列的五羟色胺荧光探针

[0477] 根据已经解析出的人HTR1B和人HTR2B受体的结构,对其与配体的结合位点进行分析,发现这些位点均不涉及HTR受体的第三个胞内环,因此考虑可以采用构建嵌合式受体的方法构建基于其它五羟色胺受体的荧光探针。通过对HTR的不同受体进行序列比对,将其原始的第三个胞内环替换为以人 HTR2C受体构建的GRAB-5-HT2.1的第三个胞内环,并加入饱和浓度的5-HT观察其荧光信号的变化。发现以人HTR2B和人HTR6受体构建的探针展示出了较好的膜定位,同时在加入饱和浓度的5-HT后有荧光信号的增加(图35)。

[0478] HTR2B的序列参见NCBI gene ID:3357, isoform 1,其具体序列为:

[0479] MALSYRVSELQSTIPEHILQSTFVHVISSNWSGLQTESIPEEMKQIVEEQGNKLHWAALLILMVII P
TIGGNTLVILAVSLEKKLQYATNYFLMSLAVADLLVGLFVMPIALLTIMFEAMWPLPLVLCPAWLF LDVLFSTAS

IMHLCAISVDRYIAIKKPIQANQYNSRATAFIKITVVWLISIGIAIPVPIKGIETDVDNPNN ITCVLTKERFGDF
MLFGSLAAFFTPLAIMIVTYFLTIHALQKKAYLVKNKPPQRLTWLTVSTVFQRDETPCSSPEKVAMLDGSRKDKAL
PNSGDETLMRRTSTIGKKSQTISNEQRASKVLGIVFFLFLMWCP FFITNITLVLCDSCNQTTLQMLLEIFVWI
GYVSSGVNPLVYTLFNKTFRDAFGRYITCNyrATKSVKT LKRSSKIYFRNPMAENSKFFKKHGIRNGINPAMYQ
SPMRLRSSTIQSSSIILLDTLLLTENEGDKTEE RVSyv (SEQ ID NO:9)

[0480] 其中下划线部分为第三个胞内环,具体为240-324位,参考uniprot数据库。

[0481] HTR6的序列参见NCBI gene ID:3362, isoform 1,其具体序列为:

[0482] MVPEPGPTANSTPAWGAGPPSAPGGSGWVAALCVVIALTAAANSLIALICTQPALRNTSNFF LVS
LFTSDLMVGLVVMPPAMLNALYGRWVLARGLCLLWTAFDVMCCSASILNLCLISLDRYLLILS PLRYKLRMTPLR
ALALVLGAWSLAALASFLPLLLGWHELGHARPPVPGQCRLLASLPFVLVASGLT FFLPSGAICFTYCRILLAARK
QAVQVASLTTGMSAQASETLQVPRTPRPGVESADSRRLATKHSRKALKASLTGILLGMFFVTWLPFFVANIVQAV
CDCISPLFDVLTWLGycNSTMNPIIYPLFMRDFKRA LGRFLPCPRCPRERQASLASPSLRTSHSGPRPGLSLQQ
VLPLPLPPDSDSDSAGSGSSGLRLTAQLL LPGEATQDPPLPTRAANAFFNIDPAEPELRPHPLGIPTN (SEQ
ID NO:10)

[0483] 其中下划线部分为第三个胞内环,具体为209-265位,参考uniprot数据库。

[0484] 7、利用双光子成像的方法检测果蝇中枢神经系统中五羟色胺的释放

[0485] 利用GRAB-5-HT2.0构建UAS-GRAB-5-HT的转基因果蝇,与Trh-Gal4品系杂交后,将该探针特异性地表达在五羟色胺能神经元中,利用双光子成像的手段成功检测到了给予乙酸异戊酯气味刺激时嗅觉刺激引起的五羟色胺能神经元的神经活动(图36)。

[0486] 8、使用表达GRAB-5-HT1.0的细胞系进行高通量药物筛选

[0487] 构建稳定表达GRAB-5-HT1.0探针的HEK293T细胞系,采用高通量药物筛选平台(用基于电脑操控机械臂进行实验操作的平台,使用电脑控制进行药物加入,析出及荧光信号检测,从而达到较好的重复性以及稳定性),对表达GRAB-5-HT1.0探针的细胞加入5-羟色胺后检测其荧光变化,相比于加入溶剂(control)组可观测到稳定的信号上升(图52)。从图中可以观察到,该检测方法具有较好的重复性和灵敏度(用Z factor表示,Z factor为高通量筛选过程中刻画系统是否足够灵敏及稳定的参数,其公式在图 52中显示)。一般而言,适合进行高通量筛选的体系,其Z factor需要大于0.4.这表示基于GRAB探针构建稳定细胞系的方法进行高通量药物筛选具有足够的灵敏度和稳定性。

[0488] 实施例10遗传编码的多巴胺探针的构建

[0489] 除非特别说明,本实施例中所使用的材料与方法与实施例1相同。

[0490] 1、构建遗传编码的多巴胺探针

[0491] 人多巴胺受体在体内有5个亚型,分别被命名为DRD1-DRD5。在构建荧光探针时,首先对于部分受体进行初步筛选,采用在其第三个胞内环任意位点插入荧光蛋白,观察其表达和上膜情况的方法,得到一个较好的候选受体,人DRD2受体。随后采取和实施例2中肾上腺素探针类似的策略,逐步确定荧光蛋白的最优插入位点。具体来说,针对人DRD2受体的第三个胞内环,每个15个氨基酸作为一个插入位点。将在不同位置插入循环重排的荧光蛋白的人DRD2受体在HEK293T细胞中表达,用多巴胺进行药物灌流实验,最终鉴定出多个对于多巴胺敏感的荧光探针,其中信号变化最大的荧光探针为人 DRD2受体的第253位氨基酸到357位氨基酸被截去并在截去的位置上插入循环重排的荧光蛋白。在确定构象改变敏感的

位点后,接下来对其周围氨基酸位点进行进一步的筛选,即氮端围绕252位氨基酸,碳端围绕357位氨基酸,进行排列组合,并将它们在HEK293T细胞中表达并用多巴胺进行药物灌流实验。得到的最好的探针为第254位到360位氨基酸被截去并在截去的位置上插入循环重排的荧光蛋白,其在饱和浓度的多巴胺处理下可以达到110%的信号变化(图37),被命名为GRAB-GDA3.0,其连接肽段为氮端GG,碳端GGAAA。

[0492] 其中人DRD2受体的序列参见NCBI gene ID:1813, isoform long, 其具体氨基酸序列是:

[0493] MDPLNLSWYDDDLERQNSRPFNGSDGKADRPYNYATLLTLLIAVIVFGNVLCMAVSRE KALQT
TTNYLIVSLAVADLLVATLVMPWVVYLEVVGWKFSSRIHCDFVTLDMCTASILNLCAI SIDRYTAVAMPMLY
NTRYSSKRRVTVMISIVVWLSFTISCPLLFGLNNADQNECIIANPAFVVYSSIV SFYVPFIVTLLVYIKIYIVLR
RRRKRVNTRKSSRAFRAHLRAPLKGNCTHPEDMKLCTVIMKSNGSFVNRNRRVEAARRAQELEMELSSSTSPPERT
RYSPIPPSHHQLTLPDPSHHGLHSTPDSPAKPEKNGHAKDHPKIAKIFEIQTMPNGKTRTSLKTSRRKLSQQKEK
KATQMLAIVLGVFIIICWLPFFITHILNIHCD CNIPPVLYSAFTWLGYN SAVNP I IYTTFNIEFRKAFLKILHC
(SEQ ID NO:5)

[0494] 其中下划线部分为第三个胞内环,具体为214-373位,参考uniprot数据库。

[0495] 其中所使用的荧光蛋白为循环重排的cpEGFP,与实施例2中相同,是GCaMP6s中使用的循环重排荧光蛋白cpEGFP,其具体序列是:

[0496] NVYIKADKQKNGIKANFHIRHNIEDGGVQLAYHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSVQSKLSKDP NEKR
DHMVLLFVTAAGITLGMDELYKGGTGGSMVRKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSG EGEDATYGLTLK
FICTTGKLPVPWPTLVTTLTYGVQCFSRYPDHMKQHDFKSA MPEGYIQERTI FFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLV
NRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYN (SEQ ID NO:11)

[0497] 药理学研究表明GRAB-GDA3.0只能被DA激活,而不能被其它神经递质激活,此外,它也可以分别被DRD2特异性的激动剂(多巴胺,Dopamine)或拮抗剂(haloperidol)激活或抑制(图38)。

[0498] 2、气味在蕈状体(MB)中激发GDA信号

[0499] 构建转基因果蝇UAS-GRAB-GDA3.0,它在特定的细胞中表达GRAB-GDA3.0探针,由相应的 GAL4品系驱动。首先,在所有果蝇中的多巴胺能神经元(DAN)中表达GRAB-GDA3.0,并通过体内双光子成像检查气味(乙酸异戊酯)诱导的反应(图39A)。DAN的细胞膜中表达的GRAB-GDA3.0基本上能够通过位于突触前位置的探针报道多巴胺(DA)释放(图39B)。在数秒内释放气味之后,在整个蕈状体(MB),特别是 β' lobe中观察到了稳健的GRAB-GDA3.0信号(图39C和D)。

[0500] 3、MB中气味激发的GDA信号对于DA是特异性的

[0501] 对GRAB-GDA3.0进行了药理学研究,将不同的药物通过孵育在果蝇成像所处的溶液中,发现它的GDA信号可以被DRD2特异性拮抗剂halo(haloperidol)完全阻断(图40A-C),而作为对照,它不能被章鱼胺受体特异性拮抗剂依匹斯汀(epinastine)阻断(图40D-F)。这些结果证明GDA信号对于DA是特异性的。

[0502] 另外,还从基因研究的角度进一步证明它对于GDA的特异性,比较正常果蝇与DAT表达量降低的果蝇之间GDA信号衰减的速度(后面写的用DAT-RNAi进行基因水平的研究就是该实验,即),在DAN中,多巴胺转运蛋白(DAT)位于突触前膜中,从突触间歇循环释放DA。

在DAN中使用DAT-RNAi抑制 DAT表达(图40G)。理论上,DAT-RNAi果蝇中GDA信号的衰减时间应当比WT果蝇长。事实上,DAT-RNAi果蝇中气味诱导的GDA信号($\tau=1.85s$)的持续时间确实比WT果蝇($\tau=0.48s$)长(图40H-J)。

[0503] 实施例11红色荧光的多巴胺和五羟色胺探针的构建

[0504] 1、材料与方法

[0505] 分子克隆 GRAB探针质粒被克隆到pDisplay载体(Invitrogen)中,在编码区之前具有IgK前导序列,在跨膜区之前具有终止密码子。cpmApple基因(cpmApple是一种cpRFP,RFP就是red fluorescent protein红色荧光蛋白)由R-GECO1(Yongxin Zhao,et al,An Expanded Palette of Genetically Encoded Ca²⁺indicators,Science,2011)(由Dr.Robert E.Campbell赠送)扩增。全长人GPCR cDNA从hORFeome 数据库8.1中扩增。使用Gibson assembly进行所有分子克隆,包括定点突变,所使用的引物具有30个碱基的重叠。通过Sanger测序对正确的克隆进行验证。

[0506] CpmApple氨基酸序列:

[0507] PVVSERMYPEDGALKSEIKKGLRLKDGGHYAAEVKTTYKAKKPVQLPGAYIVDIKLDIVSHNE DYTIVEQCERAEGRHSTGGMDELYKGGTGGSLVSKGEEDNMAIIKEFMRFKVMHEGSGVNGHEFEIE GEGEGRPYEAFQTAKLKVTGGPLPFAWDILSPQFMYGSKAYIKHPADIPDYFKLSFPEGFRWERV MNFEDGGIIHVNQDSSLQDGVFIYKVKLRGTNFPDPGPMQKKTMGWEATR (SEQ ID NO:12)

[0508] 细胞培养和转染 HEK293T细胞在37℃和5%CO₂的条件下生长,使用添加有10%FBS和青霉素-链霉素的DMEM。将细胞置于24孔板中的12-mm玻璃盖片上。皮层神经元如下所述培养。将P1大鼠解剖并用0.25%Trypsin-EDTA(Gibco)消化,然后置于聚-D-赖氨酸涂覆的盖玻片上,密度为0.5-1x10⁶个细胞/ml。转染时,通过PEI方法瞬时转染HEK293T细胞,比例为1μg DNA:4μg PEI。转染后4-6h更新培养基,24h后进行成像。培养的神经元用磷酸钙方法转染,1.5h后使用1xHBS (pH6.8)溶解沉淀区。体外神经元在7-9d后转染,转染后48h进行实验。

[0509] 荧光成像和培养细胞的灌流 HEK293T细胞和培养的皮层神经元用标准胞外Tyrode溶液进行灌流,其含有(单位为mM):150NaCl,4KCl,2MgCl₂,2CaCl₂,10HEPES和10葡萄糖,pH为7.4。将盖玻片放置在自制的灌流室中,并与miniature manifold(多通管道接头)连接,进行灌流。HEK293T细胞和神经元的成像使用Nikon共聚焦系统。

[0510] 2、产生红色GRAB探针的策略

[0511] 将循环重排的红色荧光蛋白cpmApple插入到GPCR的第三个胞内环中,从而将配体诱导的GPCR的构象变化转换为光信号。产生红色GRAB探针的流程如下:第一步,寻找cpmApple在GPCR中的最佳插入位点,在整个第三胞内环中每隔5个氨基酸插入cpmApple,并在特定氨基酸位点进行截短并在截短处插入cpmApple。在层流室中用饱和配体灌流筛选在HEK293细胞中具有最大荧光反应的单个构建体。第二步,微调插入位点。在对可能的插入位点进行定位之后,用与第一步类似的方法在最佳反应位点周围逐个残基地对插入位点进行微调。第3步,优化cpmApple的N末端和C末端的连接肽序列,首先通过重复突变和筛选,独立地对cpmApple连接肽的N末端和C末端进行优化,然后将最优的N和C连接肽序列组合在一起筛选。在筛选过程中,筛选同时具有较高 $\Delta F/F_0$ 和较高荧光亮度的突变体。

[0512] 3、构建红色荧光多巴胺探针

[0513] 按照上述策略的步骤流程,寻找具有最大配体诱导反应和最佳膜定位的cmpApple最佳插入位点。选择人多巴胺受体DRD2(同实施例10是相同的受体)构建探针,对构建的文库中的92个变体进行了灌流。其中16个没有荧光,56个没有配体诱导的反应。其中15个显示出on反应(on-response)。其中5个显示出off反应(off-response)。本文中,on反应表示当细胞被灌流含有饱和浓度配体的缓冲液时,荧光信号增强。off反应表示当细胞被灌流含有饱和浓度配体的缓冲液时,荧光信号降低。on反应和off反应的结果显示在图41A中。最佳的on反应候选物DRD 222-349cmpApple(即DRD的 223-349位被截去并在截去的位置上插入cmpApple)显示出超过13%的on反应,最佳的off反应候选物DRD 267-364cmpApple(即DRD的268-364位被截去并在截去的位置上插入cmpApple)显示出超过22%的off反应。成像特性和反应曲线显示在图41B中。本文中,DRD之后的数字表示cmpApple 的插入位点。这两个候选物都显示出良好的膜定位。由于on反应探针通常在成像中具有较好的信噪比,因此利用on反应候选物进行下一步优化。在对插入位点微调之后,配体诱导的反应增加到32%。图41C的左图显示了最强的反应。最佳的on候选物DRD 223-365cmpApple(即DRD的224-365位被截去并在截去的位置上插入cmpApple)显示出32%的on反应(图41C,右图)。膜定位良好(图41C,中间图)。然后,采用第三个步骤对DRD 223-365cmpApple的连接肽序列进行优化。在cmpApple的 N末端具有5个连接肽氨基酸,在C末端具有三个连接肽氨基酸。独立地对连接肽氨基酸逐个进行随机突变,一些变体显示出较高的 $\Delta F/F_0$ 和较高的亮度,其中一个变体的连接肽段的初始序列是 PVVSE(N端),ATR(C端)(图41D)。

[0514] 4、构建红色荧光五羟色胺探针

[0515] 采用与红色荧光多巴胺探针相似的策略构建五羟色胺的红色GRAB探针。选择人五羟色胺受体HTR2C(序列同实施例9)构建探针。在通过cpmApple插入策略和之后的微调策略构建的文库中,获得了HTR2C 240-306cpmApple(即HTR2C的241-306位被截去并在截去的位置上插入cmpApple),它具有27%的on反应,和HTR2C 239-309cpmApple(即HTR2C的240-309位被截去并在截去的位置上插入cmpApple),它具有21%的off反应(图42A和图42B)。它们的连接肽段均为PVVSE(N端),ATR(C端)。对cpmApple的N末端的连接肽的5个氨基酸进行了随机突变,一些变体显示出较高的 $\Delta F/F_0$ 和较高的亮度(图42C)。

[0516] 实施例12五羟色胺BRET探针的构建

[0517] 生物发光来源于化学反应,相比于荧光,它不需要外界光源的激发即可成像,避免了外界激发光引发的组织自发荧光、光毒性、光漂白等不利因素,特别适用于活体动物成像尤其是深层组织成像。Nanoluc是一种具有极高催化活性和发光亮度的荧光素酶,它使用furimazine (2-furanylmethyl-deoxycoelenterazine)作为底物,催化化学反应发出的光的峰值为450nm,这与本发明各个GRAB探针所使用的cpEGFP的激发光488nm相近。根据光的共振能量转移原理,当Nanoluc 与本发明各个GRAB探针在空间上的距离和相对位置达到要求时,即可发生能量转移。

[0518] 因此,本实施例中,利用Nanoluc发出的光作为五羟色胺探针的能量供体,从而在无外界激发光的情况下检测到探针的荧光信号。这样的一种无须外界激发光即可成像的五羟色胺探针将有利于在活体动物中研究五羟色胺相关神经微环路的功能。

[0519] 根据G蛋白偶联受体在结合配基时的结构变化特点,选定五羟色胺受体HTR2C的肽段作为 Nanoluc的插入位点。以实施例9中获得的GRAB-5-HT2.0为基础,在它的C端不同位

置插入Nanoluc 并在HEK293T细胞中表达,待探针在细胞中表达24小时之后,加入furimazine。用酶标仪进行荧光信号的检测。

[0520] 当配基五羟色胺(5-HT)与受体结合时,受体的结构发生变化,该结构变化会使位于C端的Nanoluc 与位于第三胞内环的cpEGFP在空间距离和相对位置上发生变化,改变发生在两者之间的共振能量转移效率,从而使cpEGFP的荧光信号发生变化。该探针可以在无外界激发光的情况下成像,且荧光信号变化可以反映五羟色胺与受体的结合过程。

[0521] 通过优化插入位置和连接肽段,获得了一个探针版本。在该版本中,加入10 μ M的5-HT后,该探针显示6%的信号增强,该信号变化可以被HTR2C的拮抗剂所抑制,如图43所示。该探针具体插入位置是在实施例9中获得的GRAB-5-HT2.0的582位与583位氨基酸之间(即插入荧光蛋白之后整个探针的第582位和583位氨基酸之间)。Nanoluc的N端和C端的连接肽段均为GSG。

[0522] 该探针的应用方式包括:通过转基因或病毒注射使活体动物的脑区表达该探针,将Nanoluc的底物furimazine加入动物的食物中,使动物通过摄食的方式获取底物。一段时间后,用生物发光成像装置观测动物脑区中五羟色胺信号的变化情况。

[0523] 实施例13乙酰胆碱探针的优化筛选

[0524] 1、材料与方法

[0525] 同实施例1。

[0526] 2、乙酰胆碱受体和cpEGFP

[0527] 同实施例2,其中人乙酰胆碱受体M3R亚型在本实施例中也被称为M3R受体或CHRM3。

[0528] 3、截短ICL3并插入cpEGFP

[0529] 在M3R受体的ICL3上两个随机的位点之间将ICL3截短、再在截短位置插入cpEGFP(图45a)。通过引物设计构建大小为7*8=56个的文库(图45b)。由于是随机截短ICL3,为了尽量覆盖文库中所有可能的组合,将筛选规模扩大到了200个克隆(图45c)。利用高通量筛选系统,得到了一个信号增强达到30%的克隆,它在M3R受体上的截短位点在第259位和第490位氨基酸(图45d)。在图45中,该克隆显示为“259-490”。

[0530] 4、优化cpEGFP与M3R受体的连接肽段

[0531] 为了系统地优化乙酰胆碱探针的表现(主要是乙酰胆碱探针的基础荧光强度及其对饱和浓度配体的反应大小),在上述步骤获得的克隆259-490基础上,同时对N端连接肽段的一个氨基酸和C端连接肽段的一个氨基酸进行随机突变(原始连接肽段为GG-GGAAA)。N端连接肽段有2个氨基酸残基位点,C端连接肽段有5个氨基酸残基位点,组合起来总共构成2*5=10个文库;因为每个位点随机突变时都有可能突变成人体内20种氨基酸的任何一种,所以每个文库包括了20*20=400种可能的氨基酸残基组合(图46a,b)。利用Opera Phenix高内涵筛选平台对这10个文库共计4000个质粒进行初步筛选,由于Opera Phenix高内涵筛选平台一次只能筛选60个质粒,为工作量考虑,在每一个文库内只取100个质粒。

[0532] 对10个文库的1000个质粒进行筛选后,发现:当cpEGFP与M3R之间的C端连接肽段第一个位点为组氨酸(Histidine,His,H)时,探针的基础荧光强度更大、对饱和浓度配体的反应也更大(图46c),即其连接肽段为GG-HGAAA,因此,将C端连接肽段的第一个位点固定为H,在此基础上再对剩下的6个位点逐个进行随机突变(图46c,d)。

[0533] 将C端连接肽段的第一个位点固定为H后,对剩余的6个位点逐个进行随机突变,发现当C端连接肽段的第2个位点突变为N时,探针对乙酰胆碱的反应增加了近一倍,基础荧光强度也稍有增大(图47e),其连接肽段序列为GG-HNAAA,该探针被命名为GRAB-ACh3.0。

[0534] 将C端连接肽段的第一、第二个位点分别固定为H、N,并在此基础上继续对余下的5个位点逐个进行随机突变(图47b,e),这一轮随机突变发现:非人为引入的6个碱基对的缺失使乙酰胆碱探针的反应大小再翻一番(图47f)——在对C端连接肽段第四个位点进行随机突变的文库中,由于意外原因缺失了6个碱基对,使得M3R受体的第491位氨基酸Q被进一步截去,并且C端连接肽段第四个位点被突变成了赖氨酸(Lysine, Lys, K)(图47g)。该探针被命名为GRAB-ACh4.0。在探针GRAB-ACh4.0中, M3R受体的260-491位被截去,并插入cpEGFP, cpEGFP与M3R受体之间的连接肽段为N端GG, C端HNAAK。

[0535] 用灌流实验验证GRAB-ACh4.0的表现。在Confocal下,当加入饱和浓度(100 μ mol/L)的ACh时,单个细胞表达的GRAB-ACh4.0探针反应能达到超过250%(图48a);而在拮抗剂噻托溴铵(Tiotropium bromide, Tio)存在的情况下,单个细胞表达的探针荧光信号增强几乎完全被屏蔽,这说明探针的荧光信号增强(即加入ACh时的反应)完全是由ACh引起的(图48a)。对18个细胞进行了同样的灌流,并统计了它们加入ACh时的反应大小和有拮抗剂存在时加入ACh的反应大小,可以看见,这18个细胞在加药时的平均反应超过了250%,大部分细胞的反应高于200%,有一些甚至达到了350%(图48b,c)。

[0536] 5、GRAB-ACh4.0与ACh的结合能力与野生型M3R受体无显著差异

[0537] 乙酰胆碱探针的一个重要性质是其与乙酰胆碱的结合能力K_d。只有K_d在合适范围内,乙酰胆碱探针才能检测在体乙酰胆碱的浓度,如果K_d过大或过小,体内乙酰胆碱的浓度可能已经高过饱和浓度,或低于乙酰胆碱探针的检测下限,无法定量检测乙酰胆碱的浓度。利用Opera Phenix对GRAB-ACh4.0与乙酰胆碱的结合能力进行了测量(图49)。可以看到,乙酰胆碱探针GRAB-ACh4.0的K_d=2.61 $\times 10^{-7}$,并且可以检测浓度从10⁻⁹到10⁻⁵mol/L的乙酰胆碱。从其他文章对乙酰胆碱浓度进行的测量和人源乙酰胆碱受体的K_d来看,GRAB-ACh4.0探针与乙酰胆碱的结合能力与报道的人源乙酰胆碱M3R受体接近(Jakubik, J., Bacakova, L., El-Fakahany, E.E. & Tucek, S. Positive cooperativity of acetylcholine and other agonists with allosteric ligands on muscarinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* 52, 172-179 (1997)),可以对体内乙酰胆碱浓度进行定量的测量。

[0538] 6、GRAB-ACh4.0有很强的特异性

[0539] 为了验证乙酰胆碱探针GRAB-ACh4.0的特异性,在Opera PhenixTM上向表达了GRAB-ACh4.0的HEK293T细胞中加入不同的神经递质,并检测探针的反应。可以看到,GRAB-ACh4.0探针在HEK293T细胞中有很高的特异性——加入拮抗剂Tio后,探针的反应几乎减少至无,说明GRAB-ACh4.0的荧光强度变化确实是由乙酰胆碱的结合引起的;加入其它的神经递质时,GRAB-ACh4.0的荧光强度也几乎没有变化,说明GRAB-ACh4.0探针不与其它的神经递质结合(图50)。综上所述,GRAB-ACh4.0能够且仅能够被ACh激活,产生荧光强度的变化。

[0540] 7、GRAB-ACh4.0不激活下游Gq引导的信号通路

[0541] 检测GRAB-ACh4.0与下游G α q的偶联情况。首先,以G α q细胞系为背景构建了三种稳

定表达的细胞系:M3R(图51中标记为CHRM3),GRAB-ACh4.0,和空白(图51中标记为Gq)细胞系;接着,用TGF α 的释放程度表征G α q蛋白被激活的程度。可以看到,只有表达了野生型M3R的稳定细胞系在施加梯度浓度的ACh时会激活G α q引导的信号转导通路,而表达了GRAB-ACh4.0的稳定细胞系对G蛋白 α 亚基的偶联程度则几乎与背景细胞系持平,这说明GRAB-ACh4.0探针不会激活G α q引导的信号转导通路(图51a)。组织纤溶酶原激活物(Tissue Plasminogen Activator,TPA)是一种血清蛋白酶,它可以直接将细胞膜溶解,使细胞膜即使在没有G α q的下游信号时也能释放带有碱性磷酸酶的TGF- α ,因此将加入了TPA的细胞作为阳性对照。加入TPA后的上清反应最大,这说明底物和酶均没有问题;加入ACh后只有表达M3R的细胞系中出现G蛋白的激活,而表达GRAB-ACh4.0的细胞系则没有G蛋白的激活,这说明GRAB-ACh4.0探针不会偶联G蛋白、激活下游信号通路、扰乱细胞正常的生理功能;拮抗剂Tio可以完全屏蔽M3R所引起的下游信号,说明M3R的下游G蛋白的激活确实是由ACh的结合引起的(图51b)。

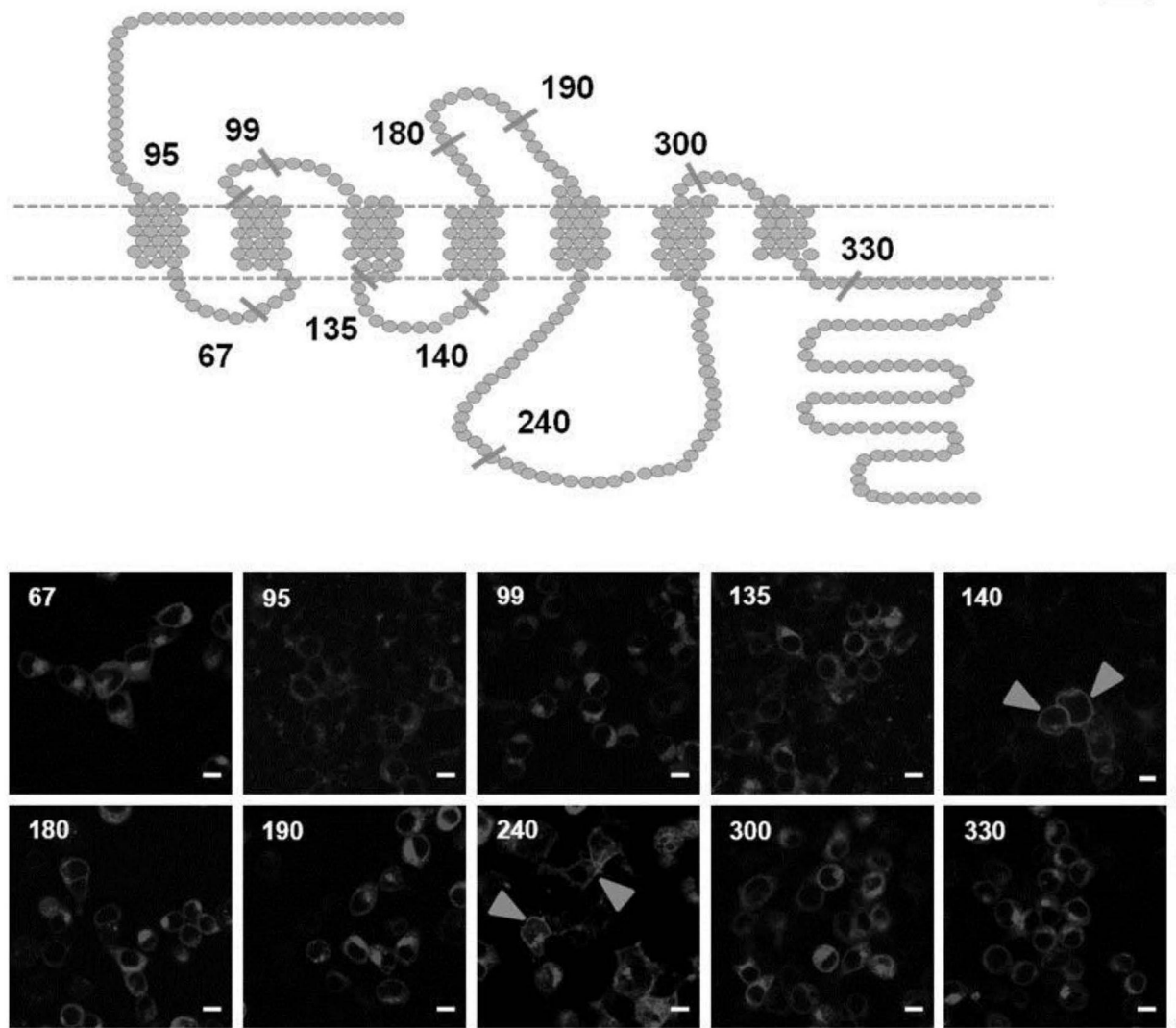


图1

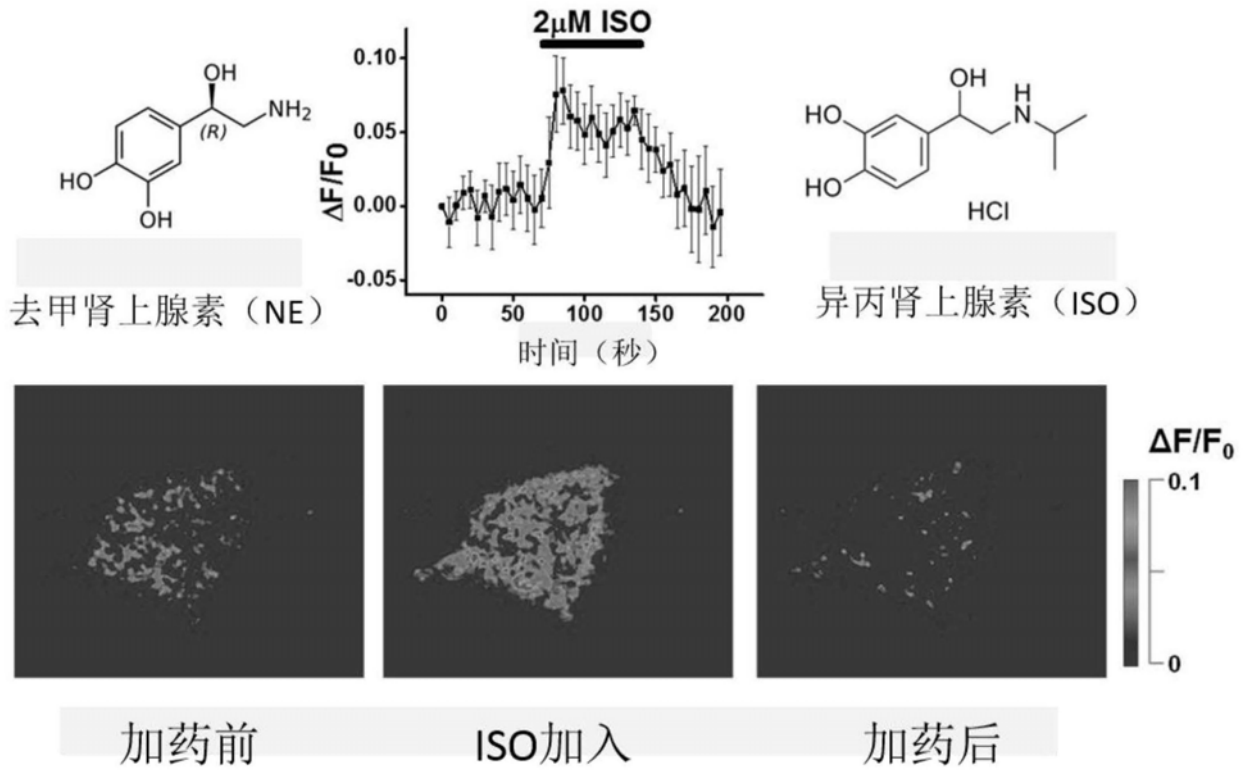


图2

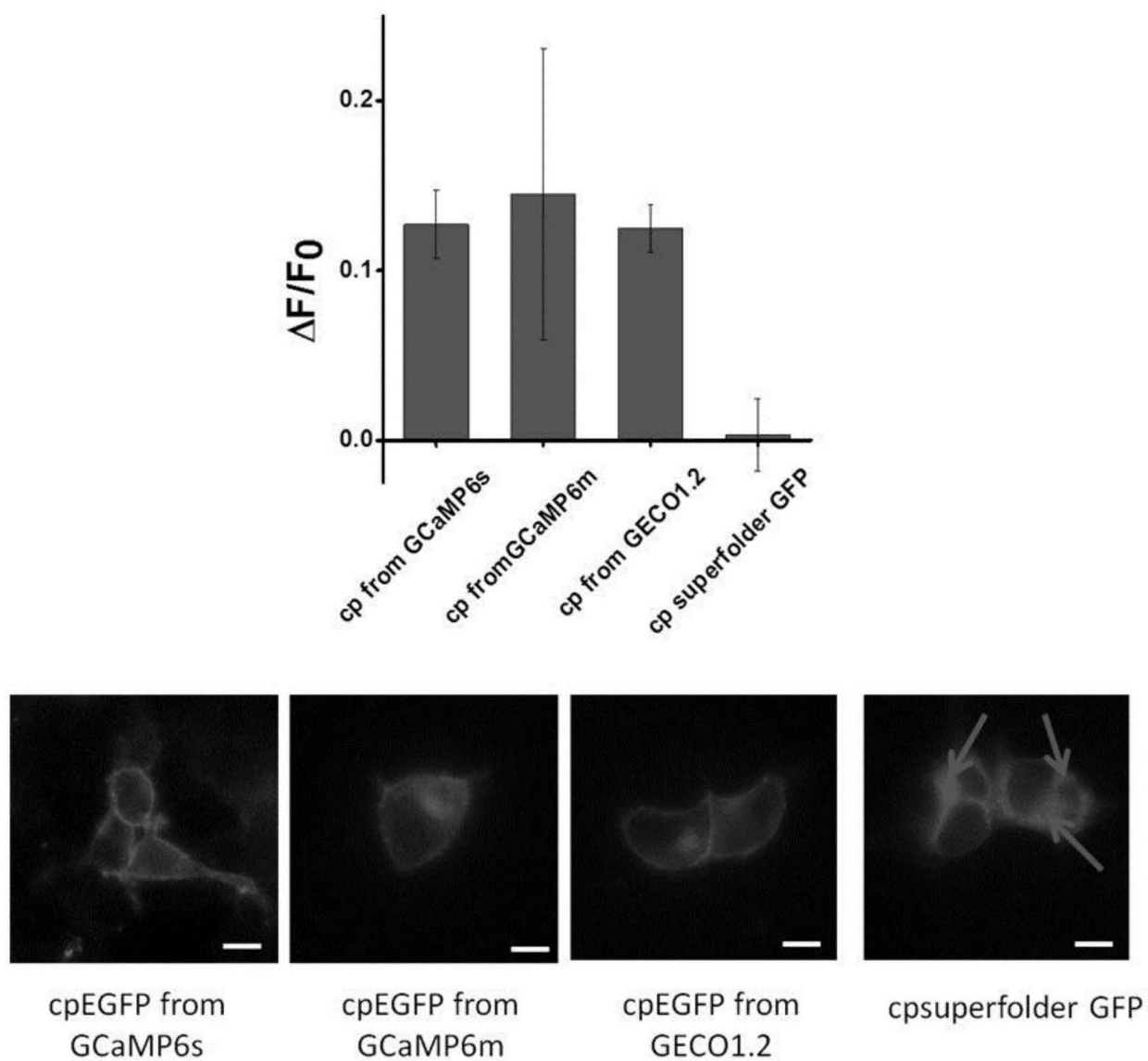


图3

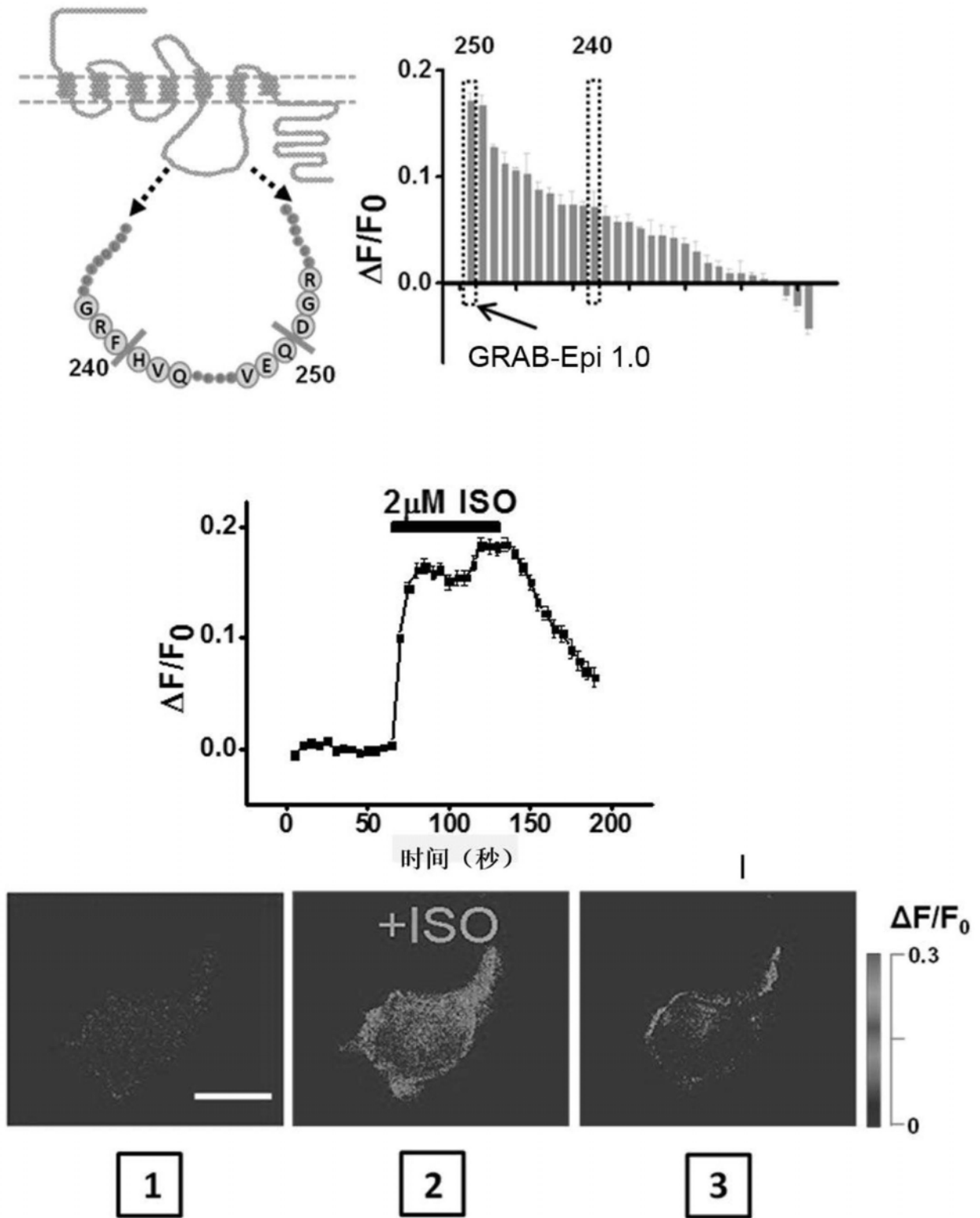


图4

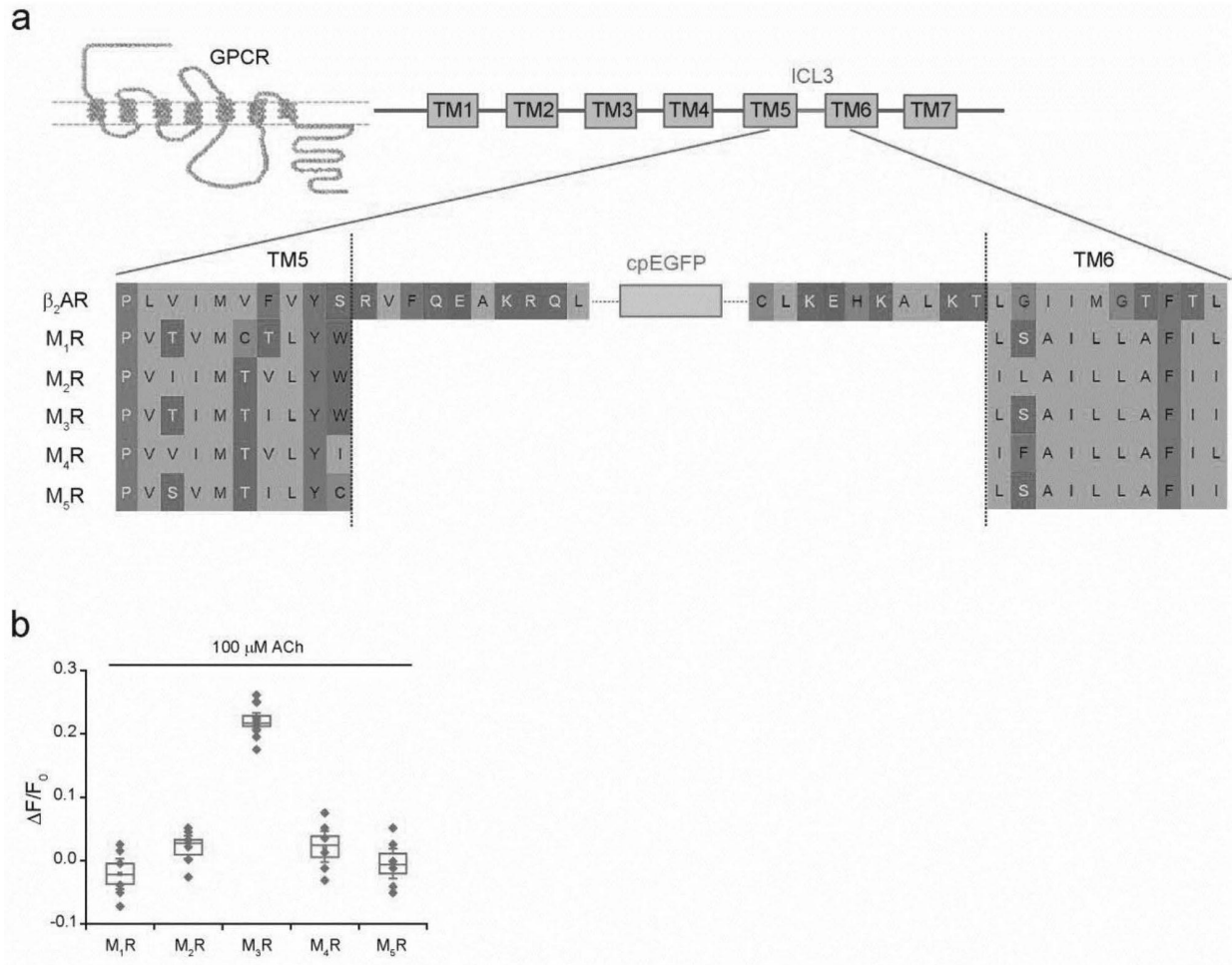


图5

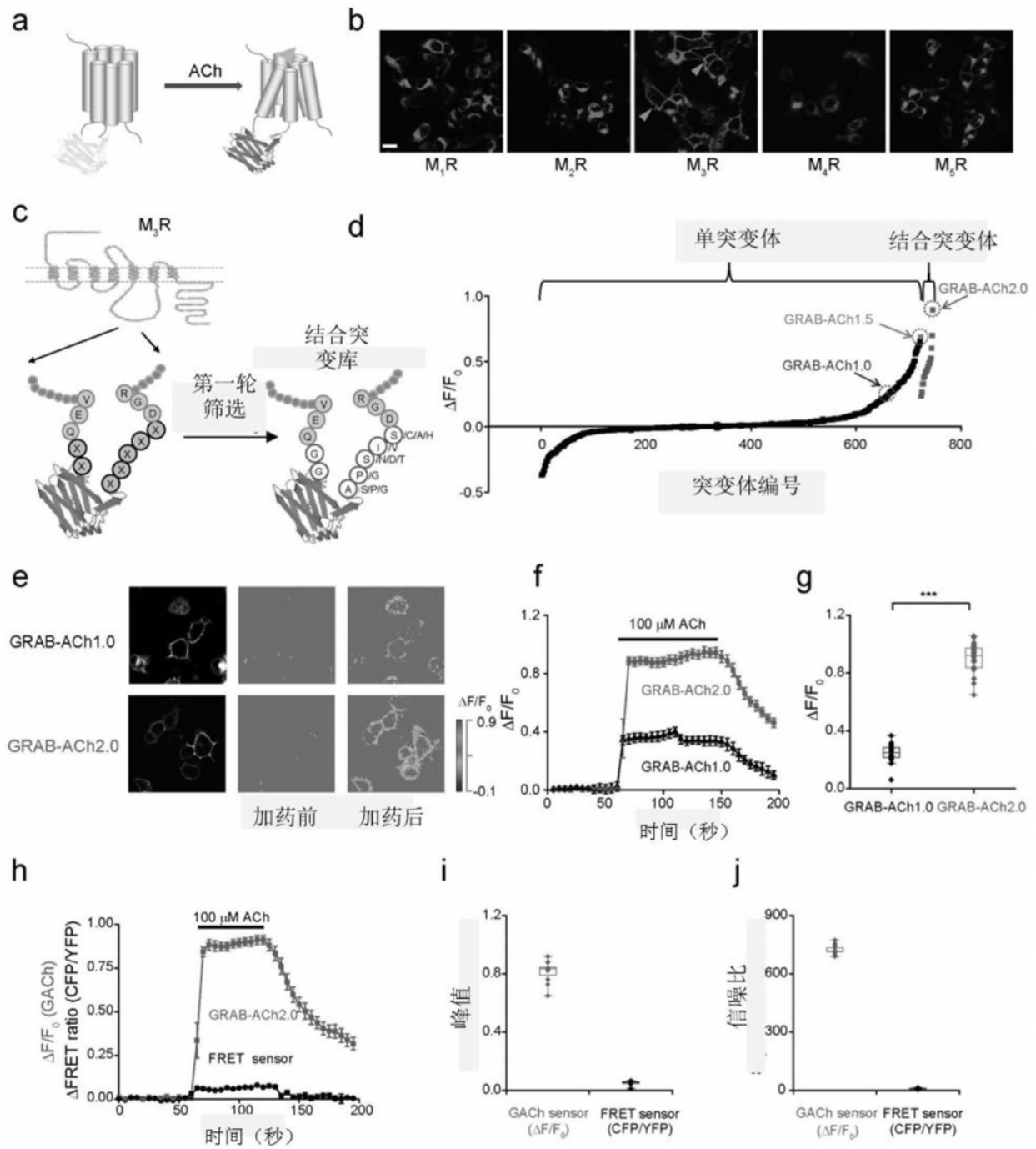


图6

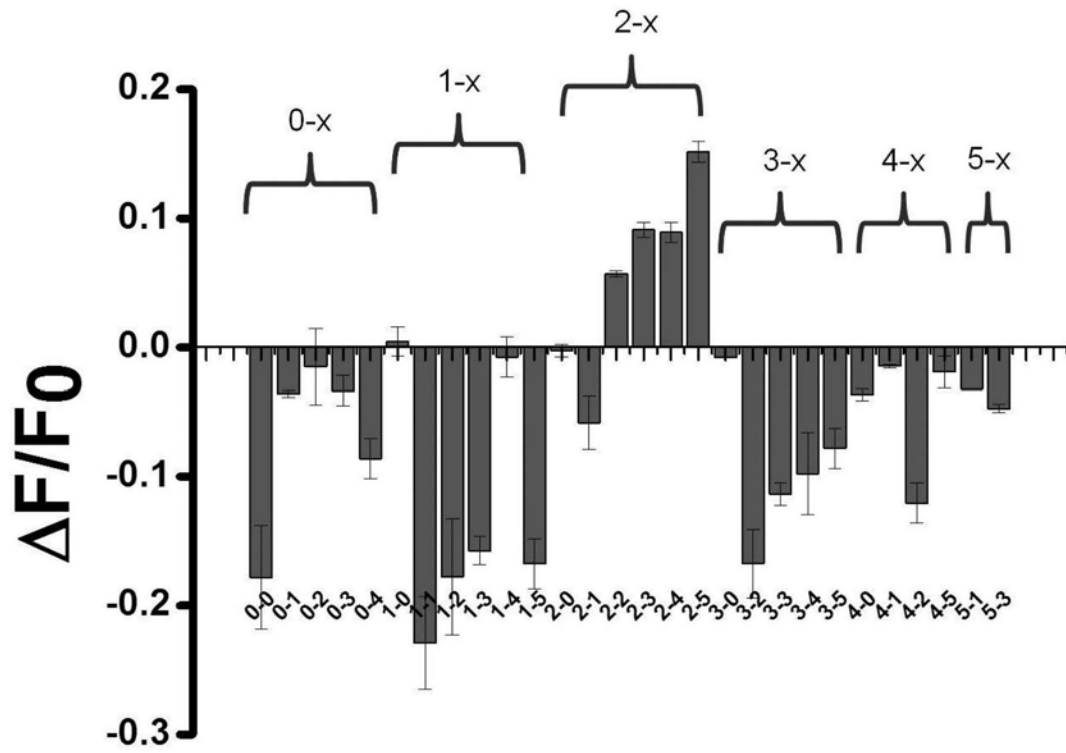


图7

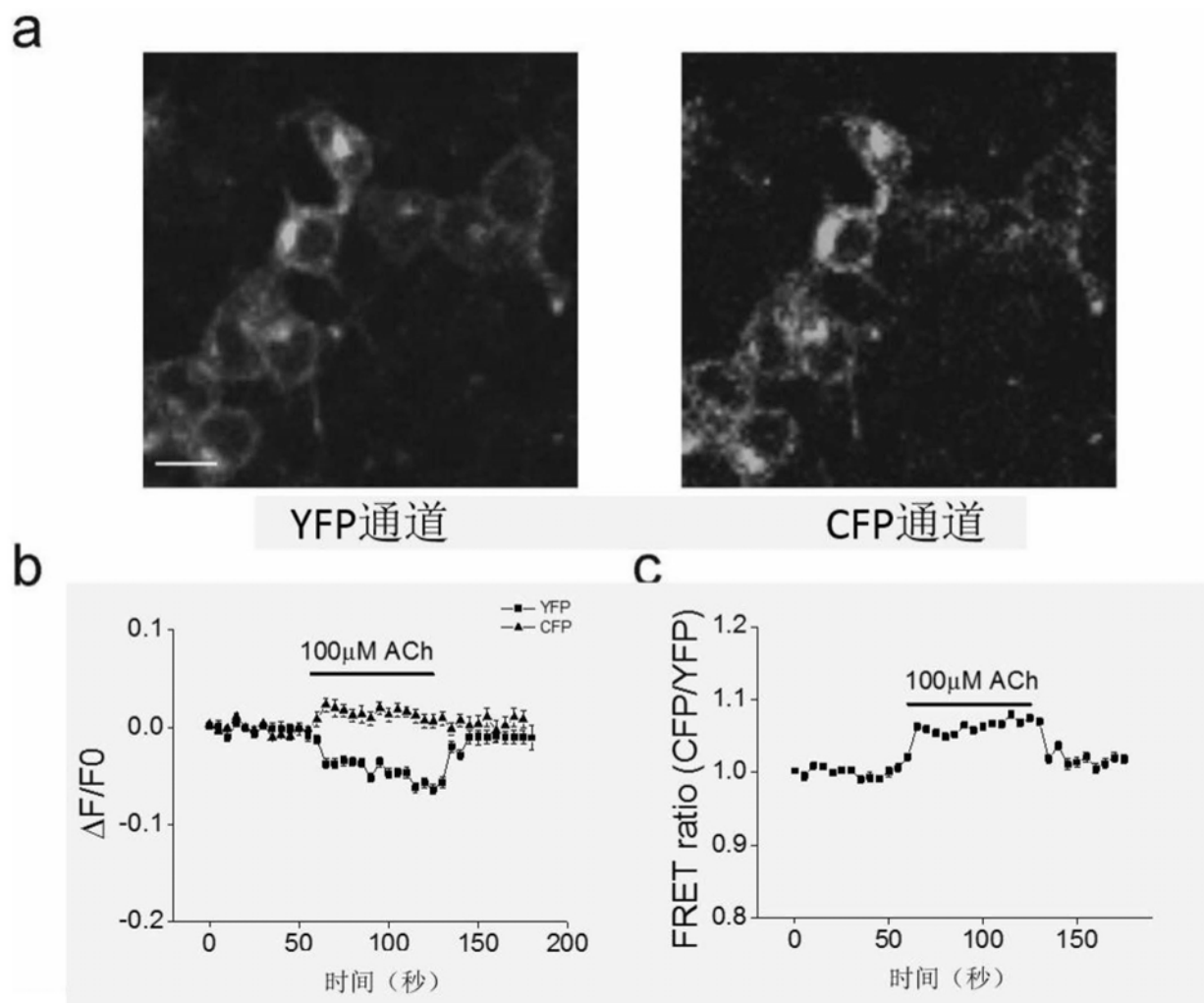


图9

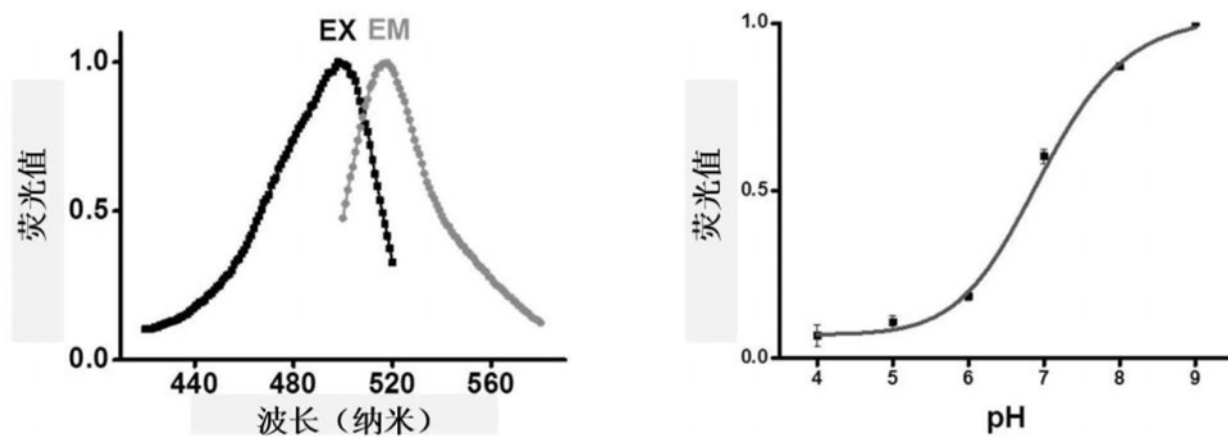
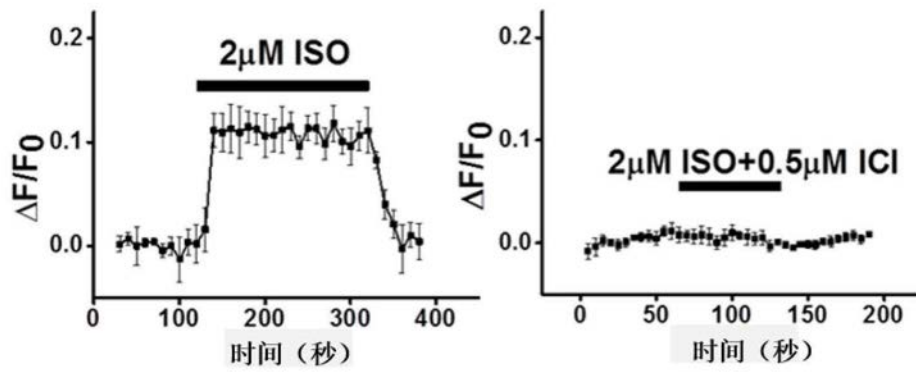


图10

GRAB-Epi1.0



GRAB-ACh 1.0

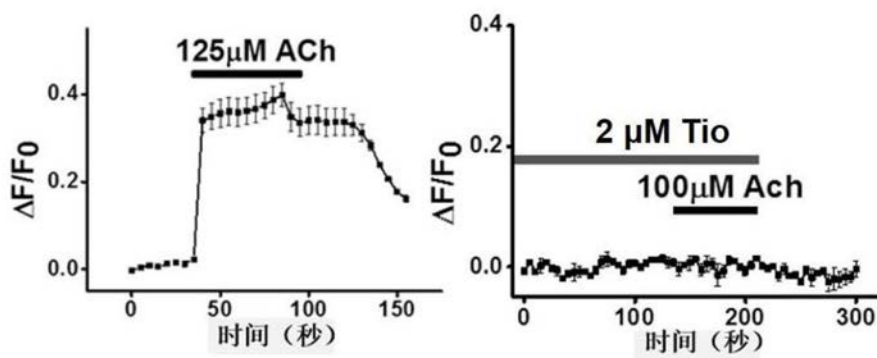
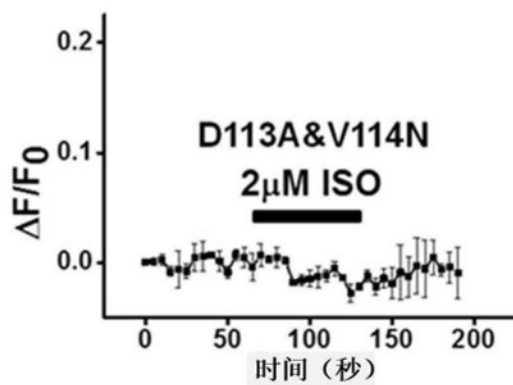


图11

A

GRAB-Epi1.0



B

GRAB-ACh1.0

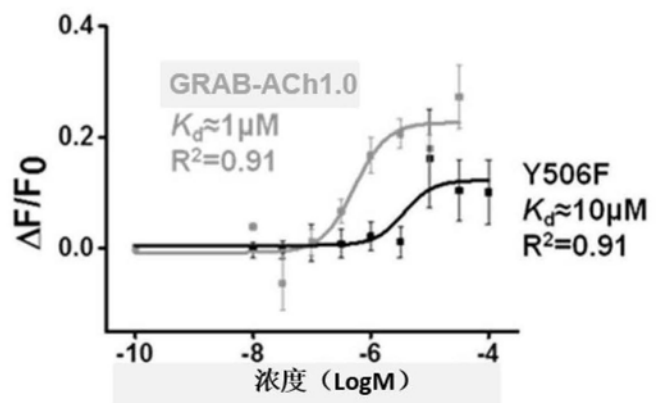


图12

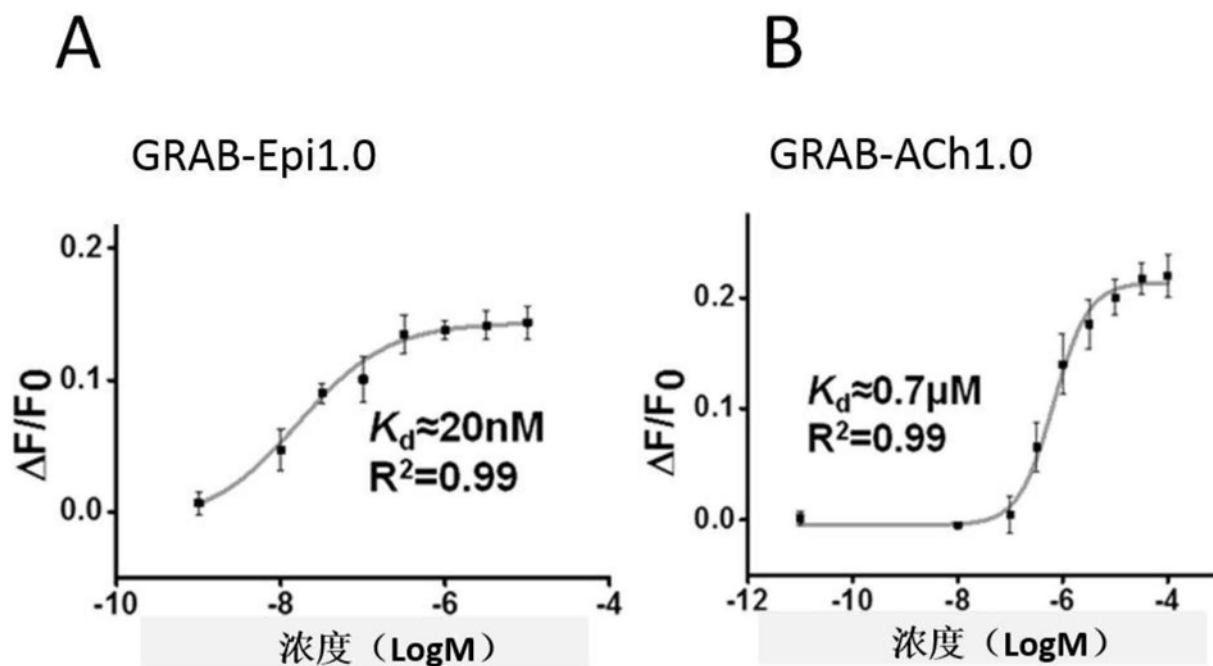


图13

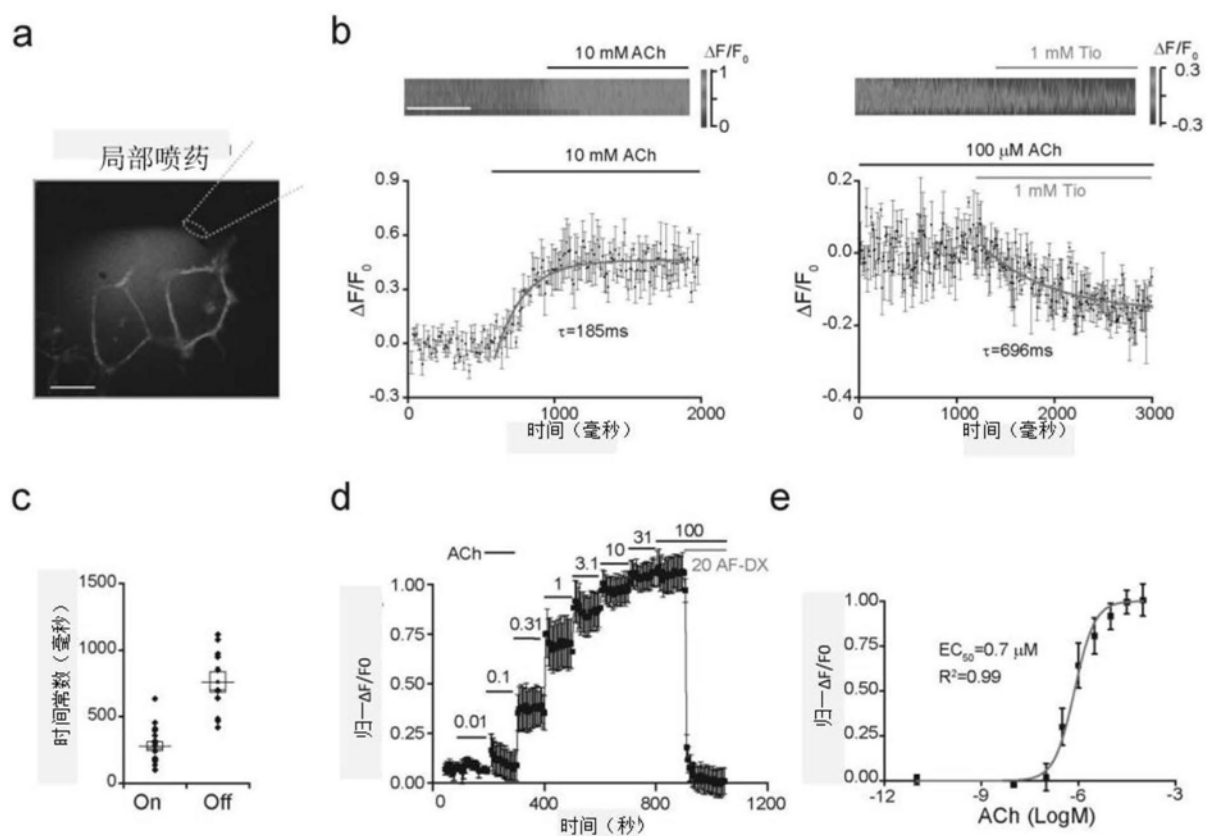


图14

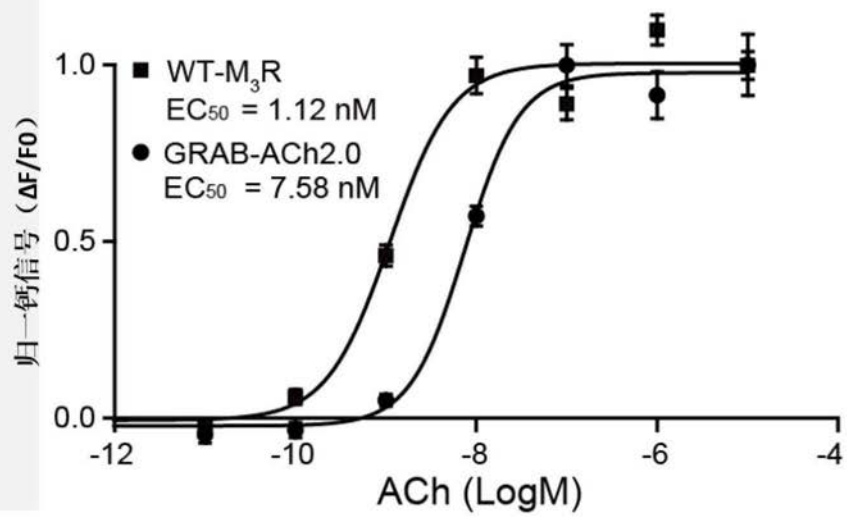
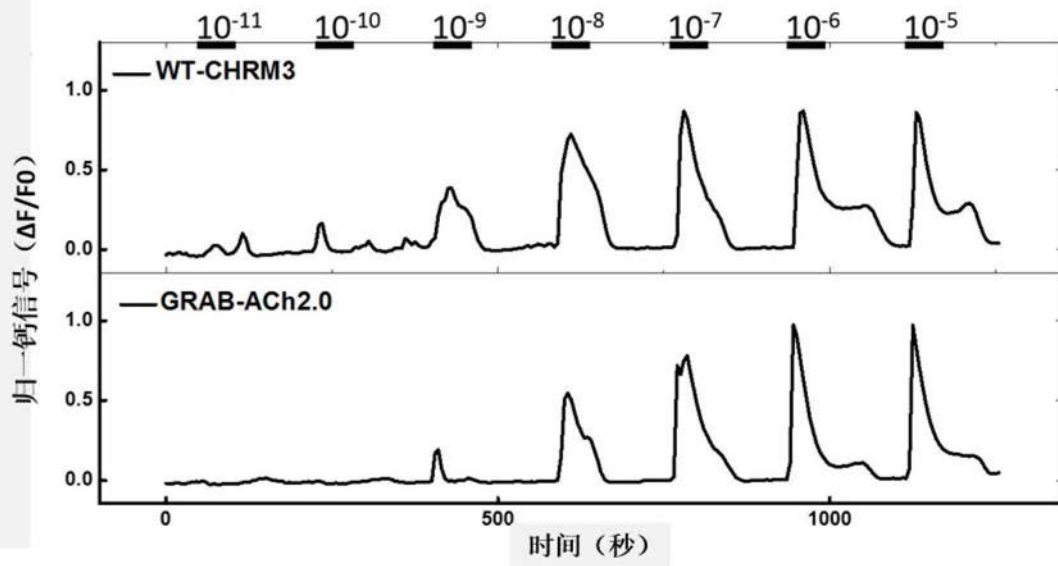


图15

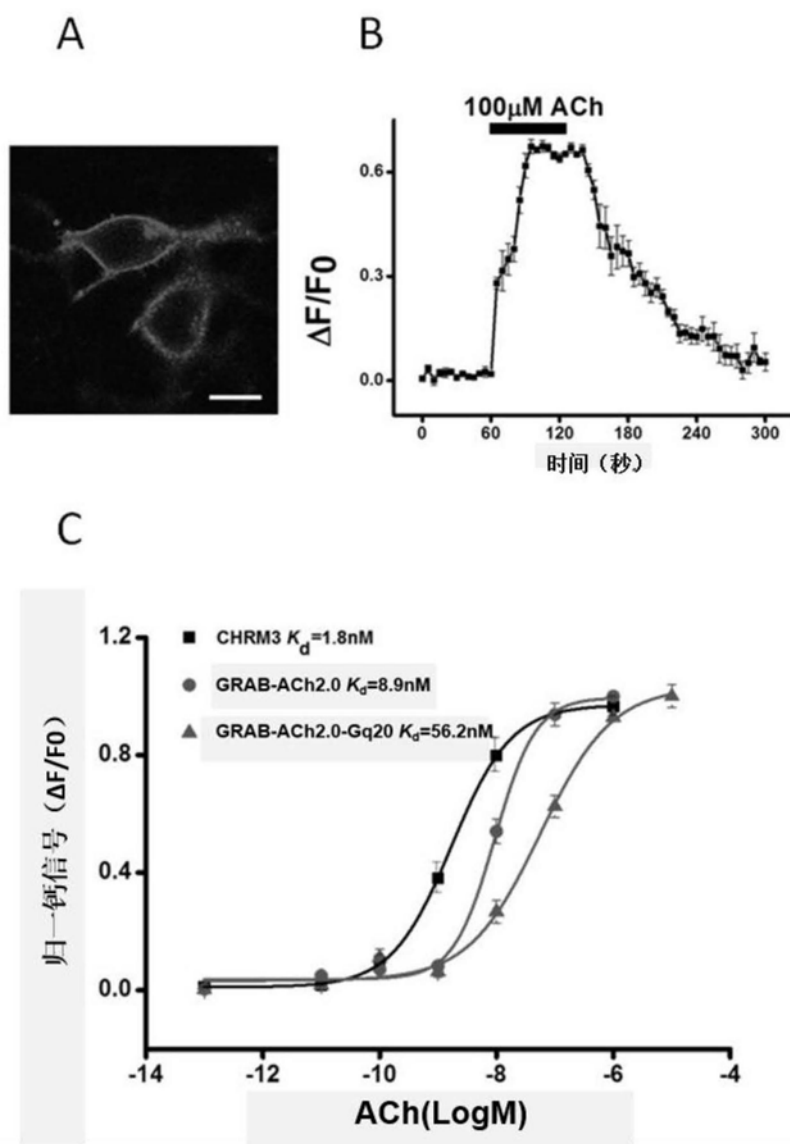
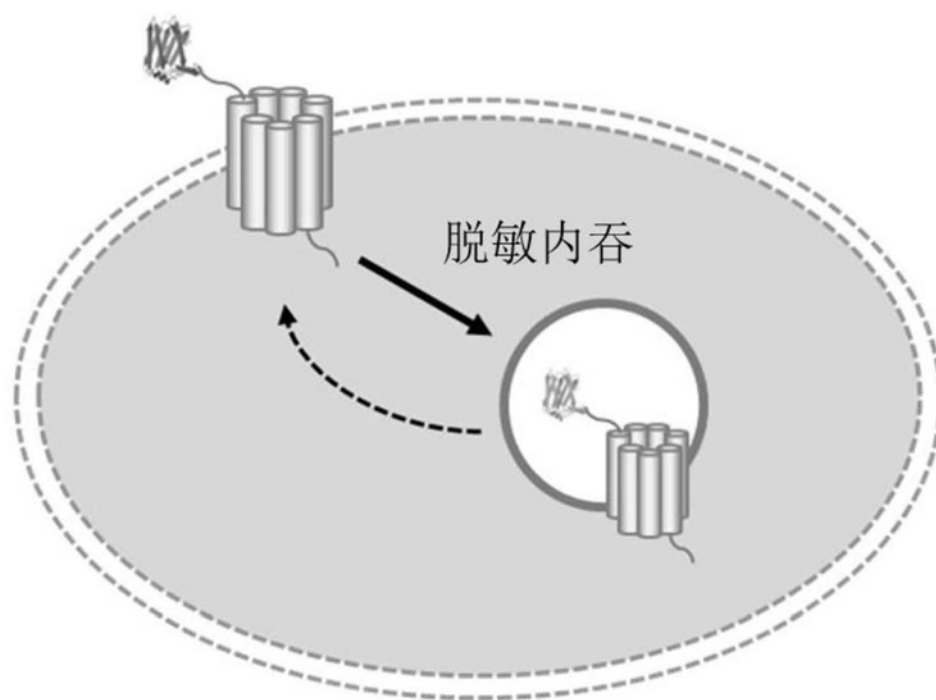


图16

A



B

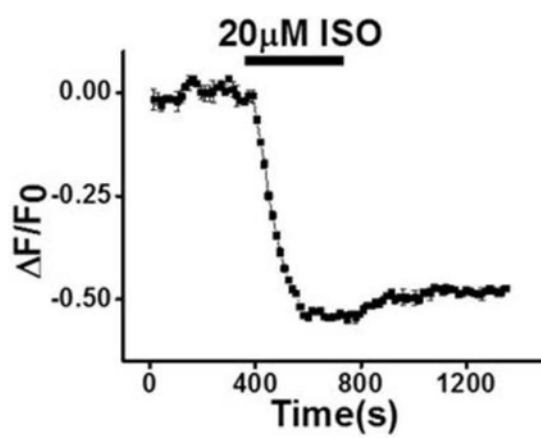


图17

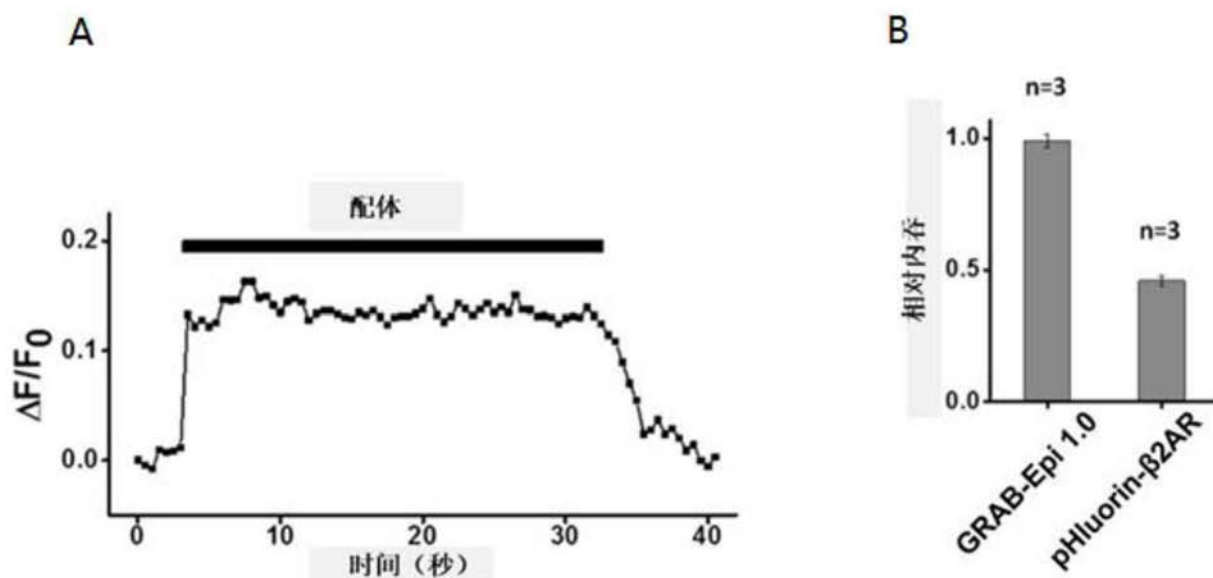
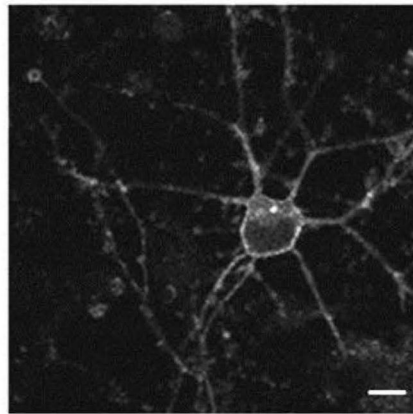


图18

A



B

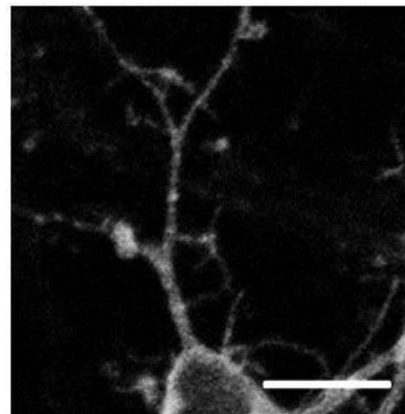
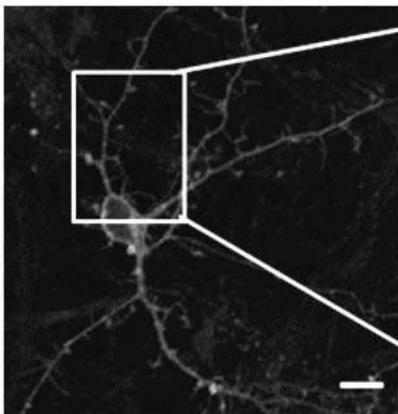
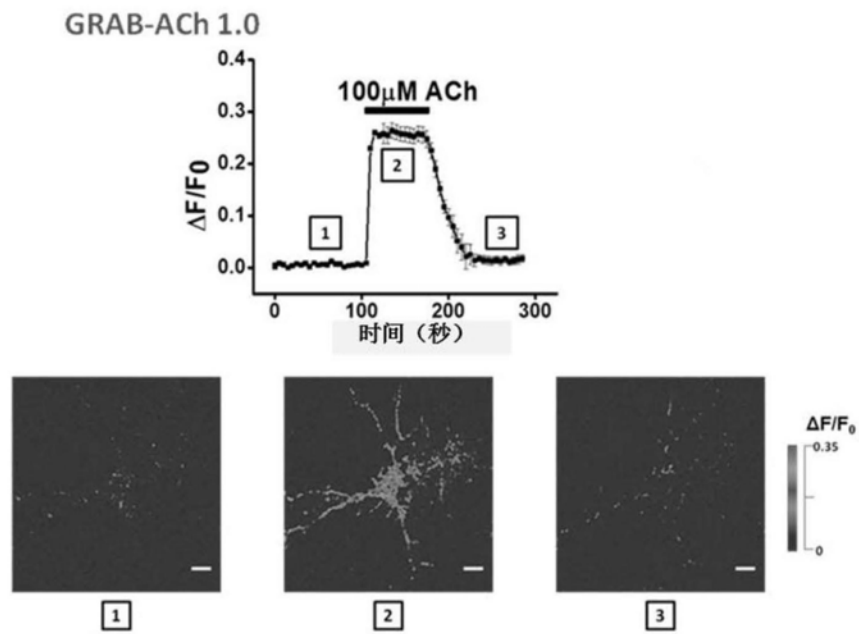


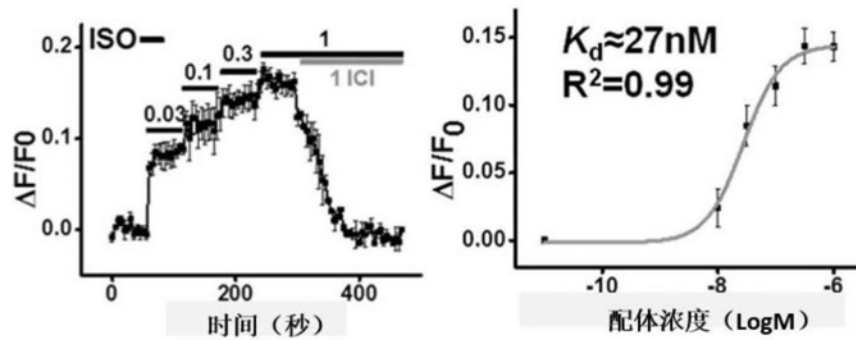
图19

A



B

GRAB-Epi 1.0



GRAB-ACh 1.0

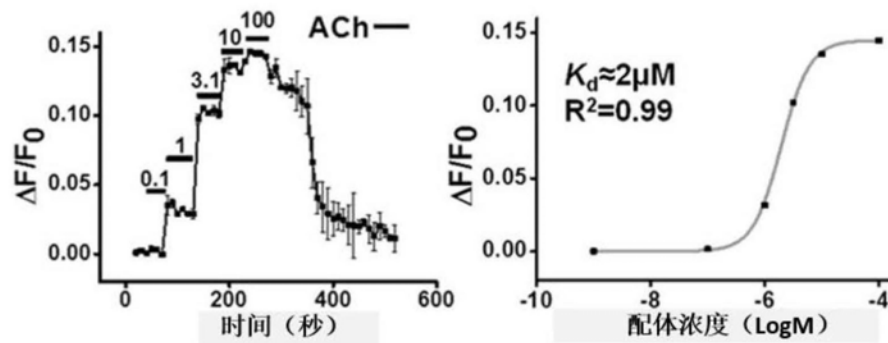


图20

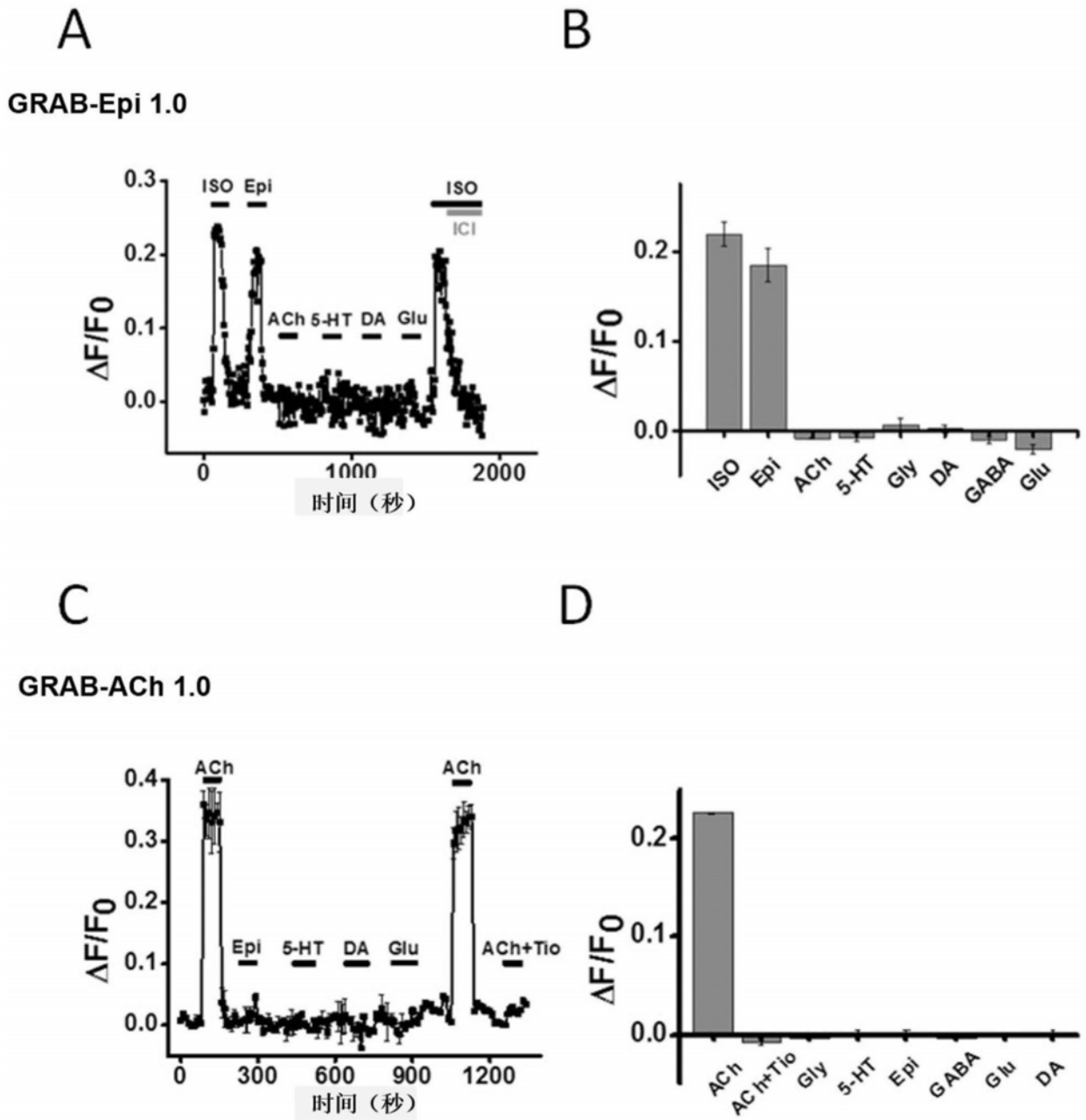


图21

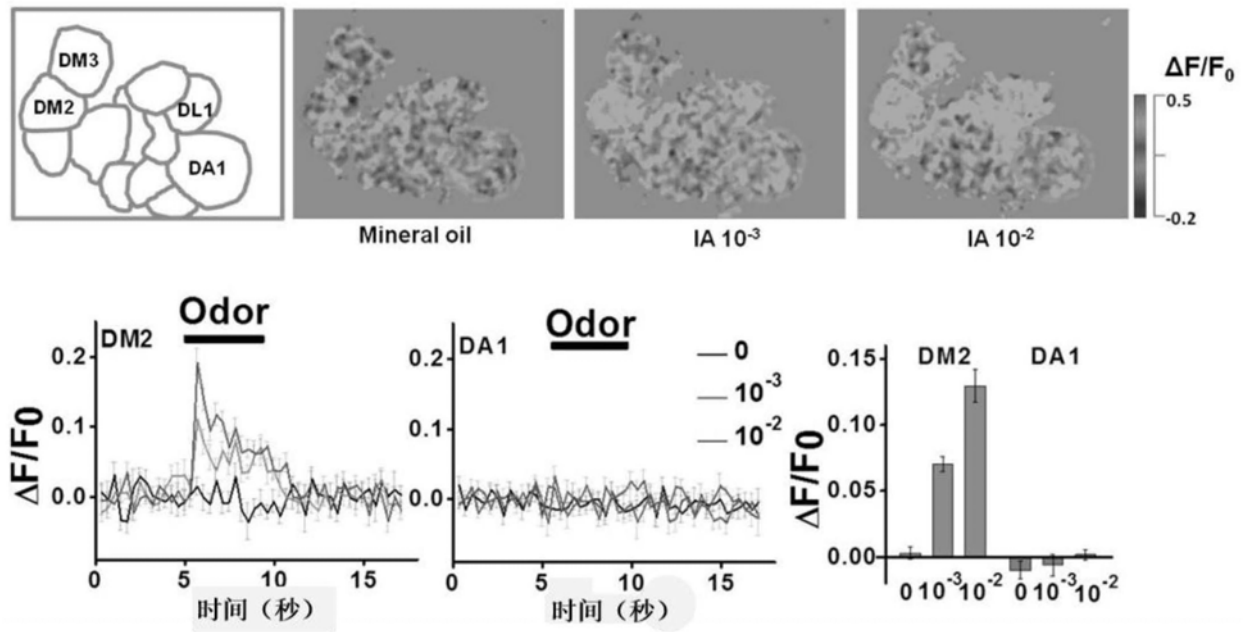
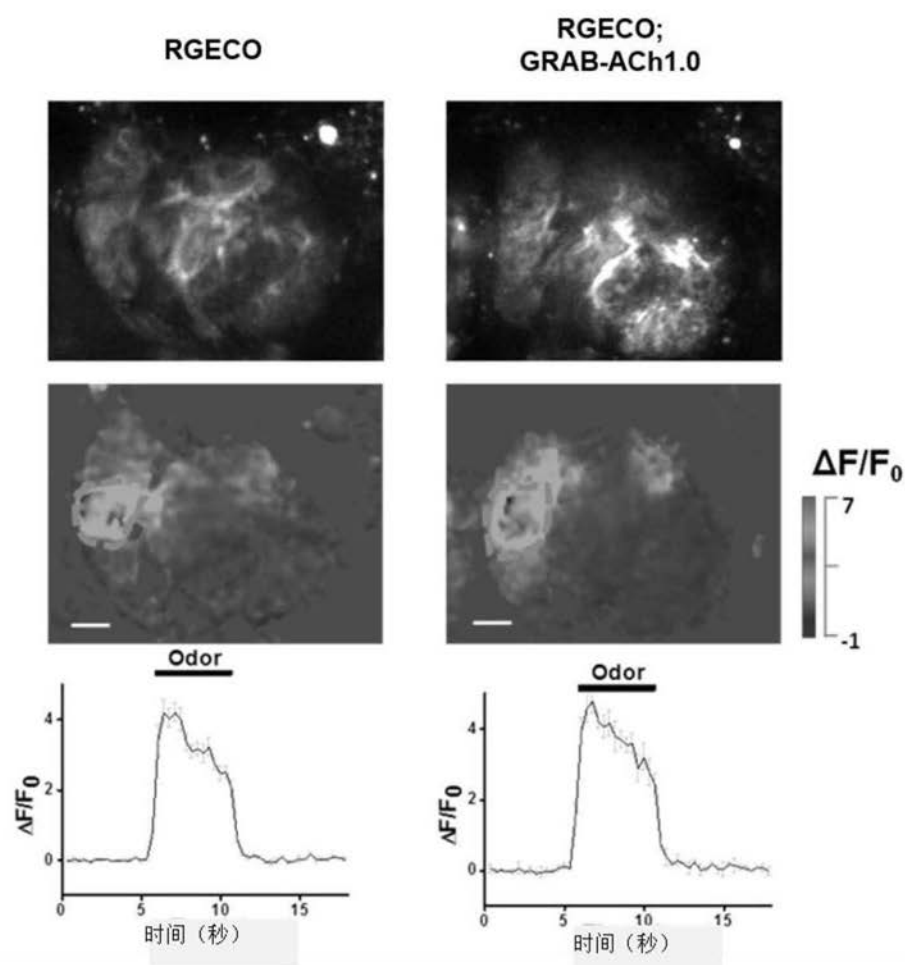


图22

A



B

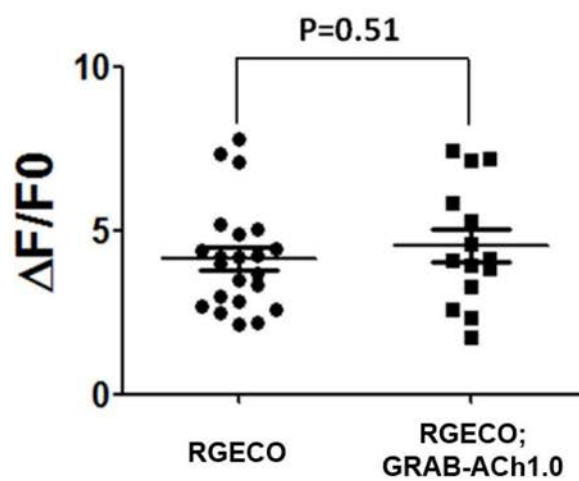
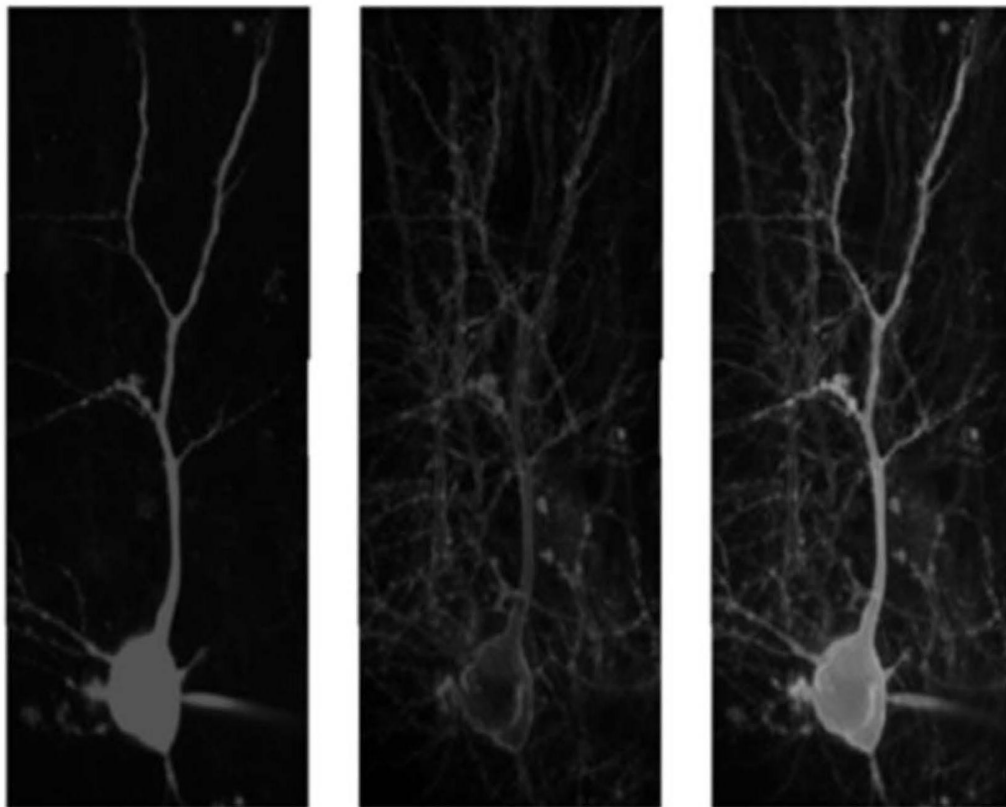


图23

A

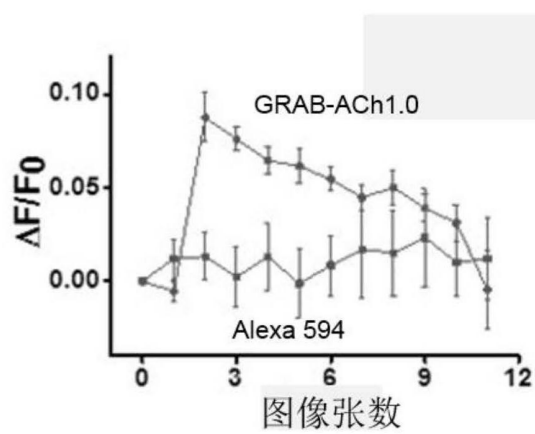


Alexa 594

GRAB-ACh

Merge

B



C

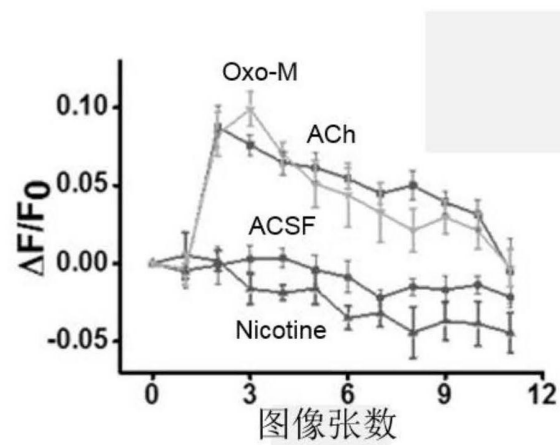


图24

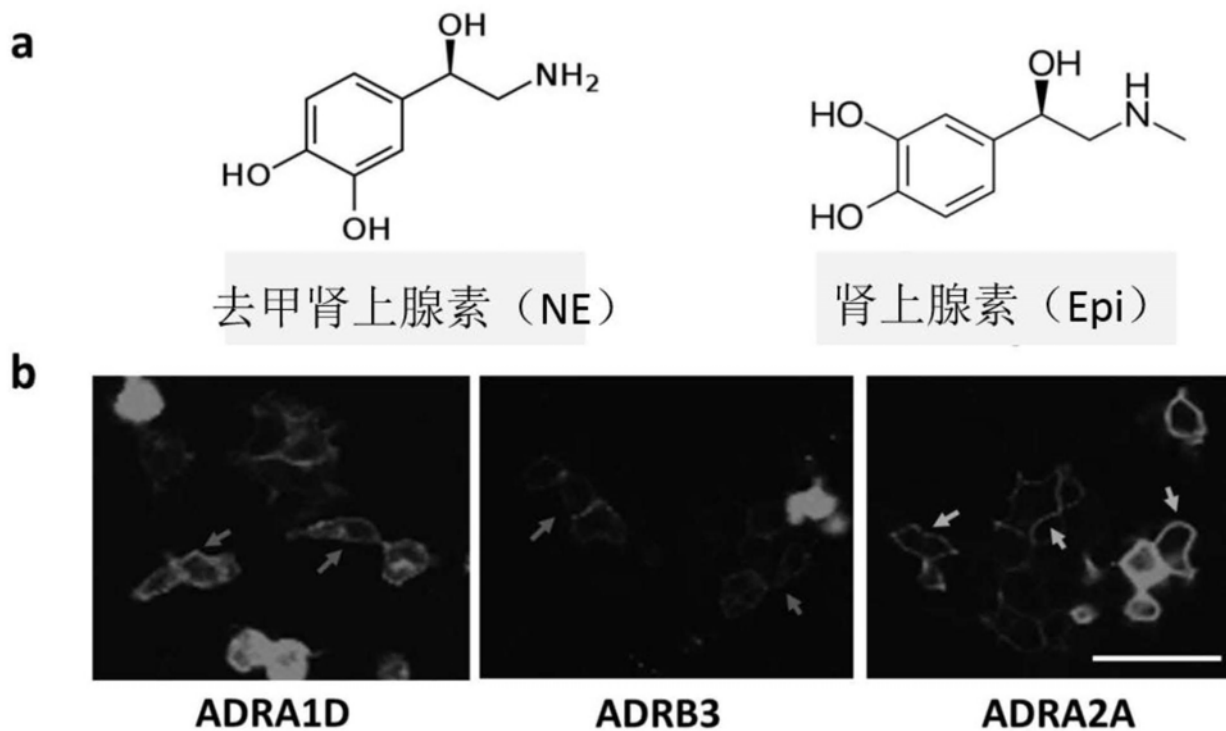


图25

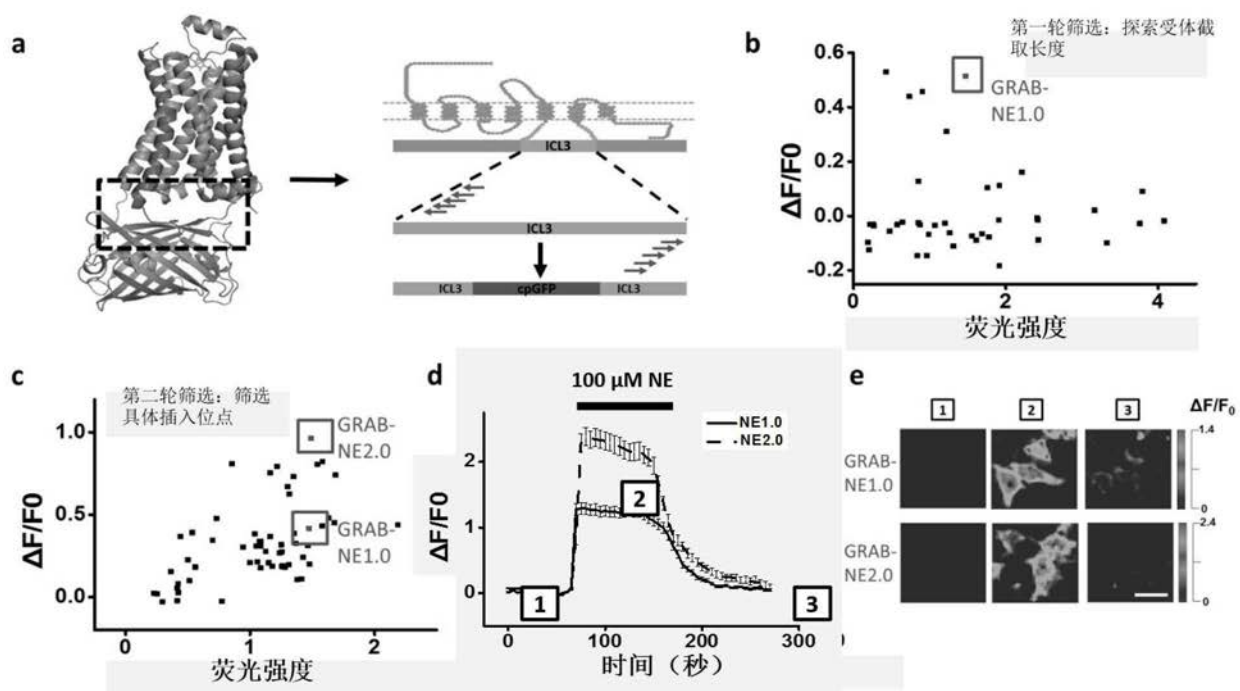


图26

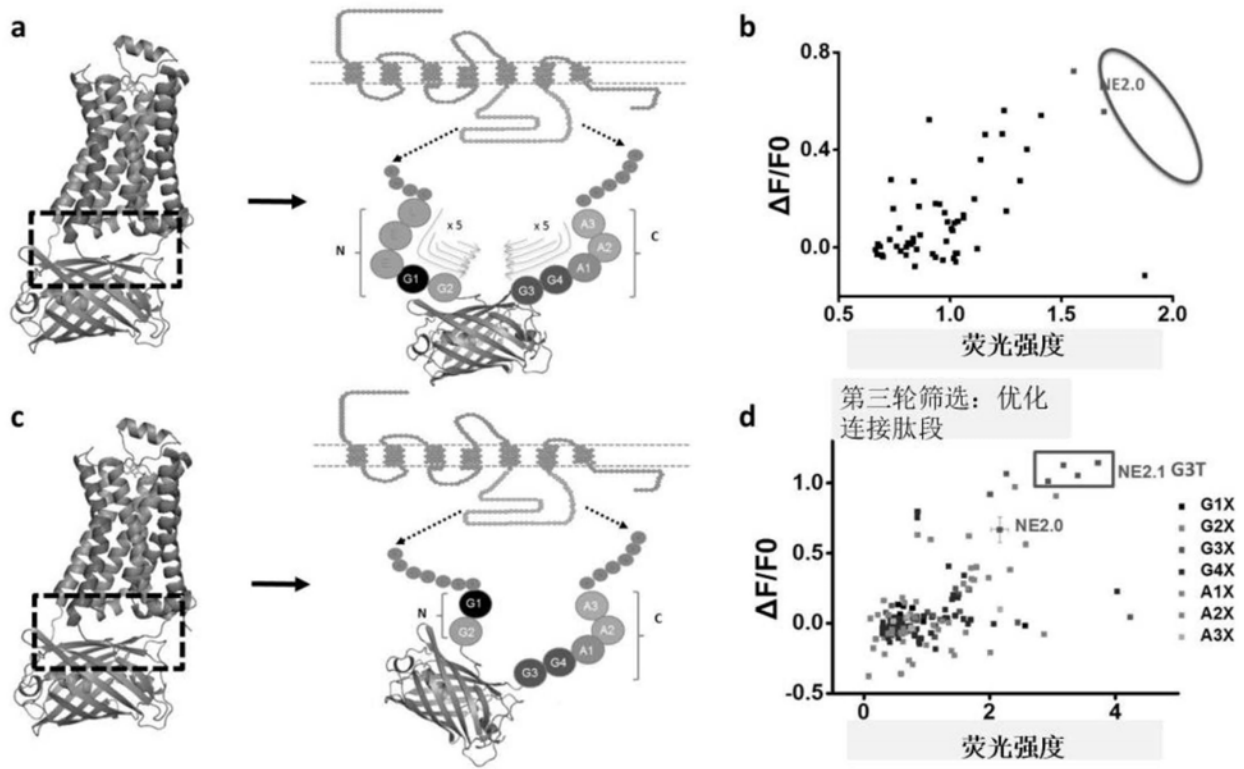


图27

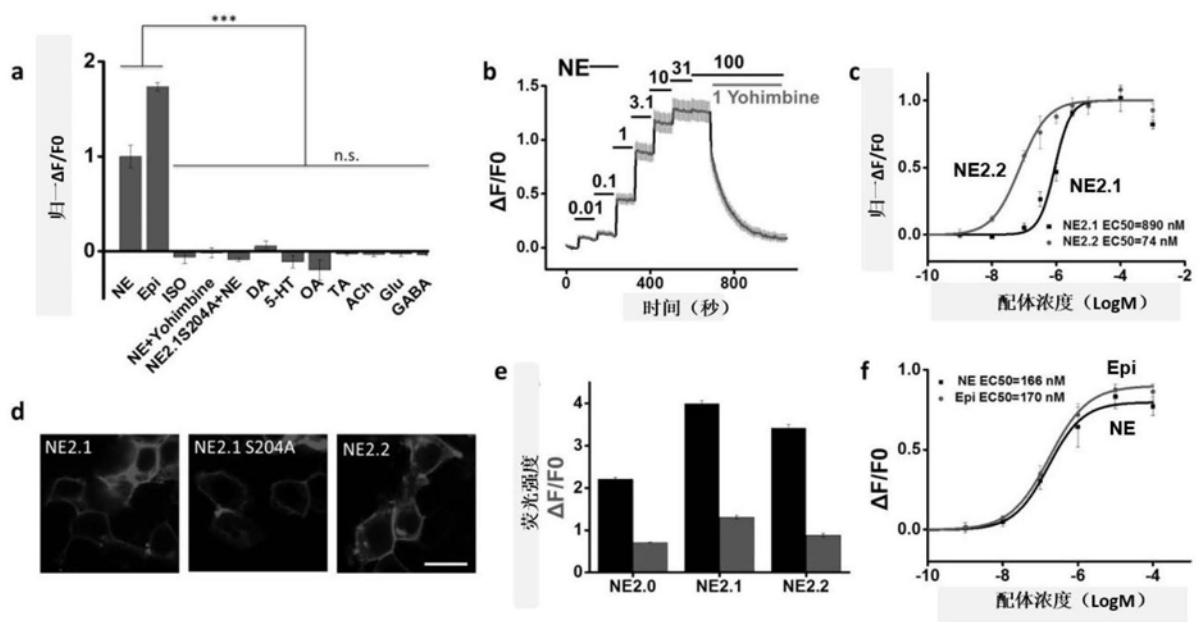


图28

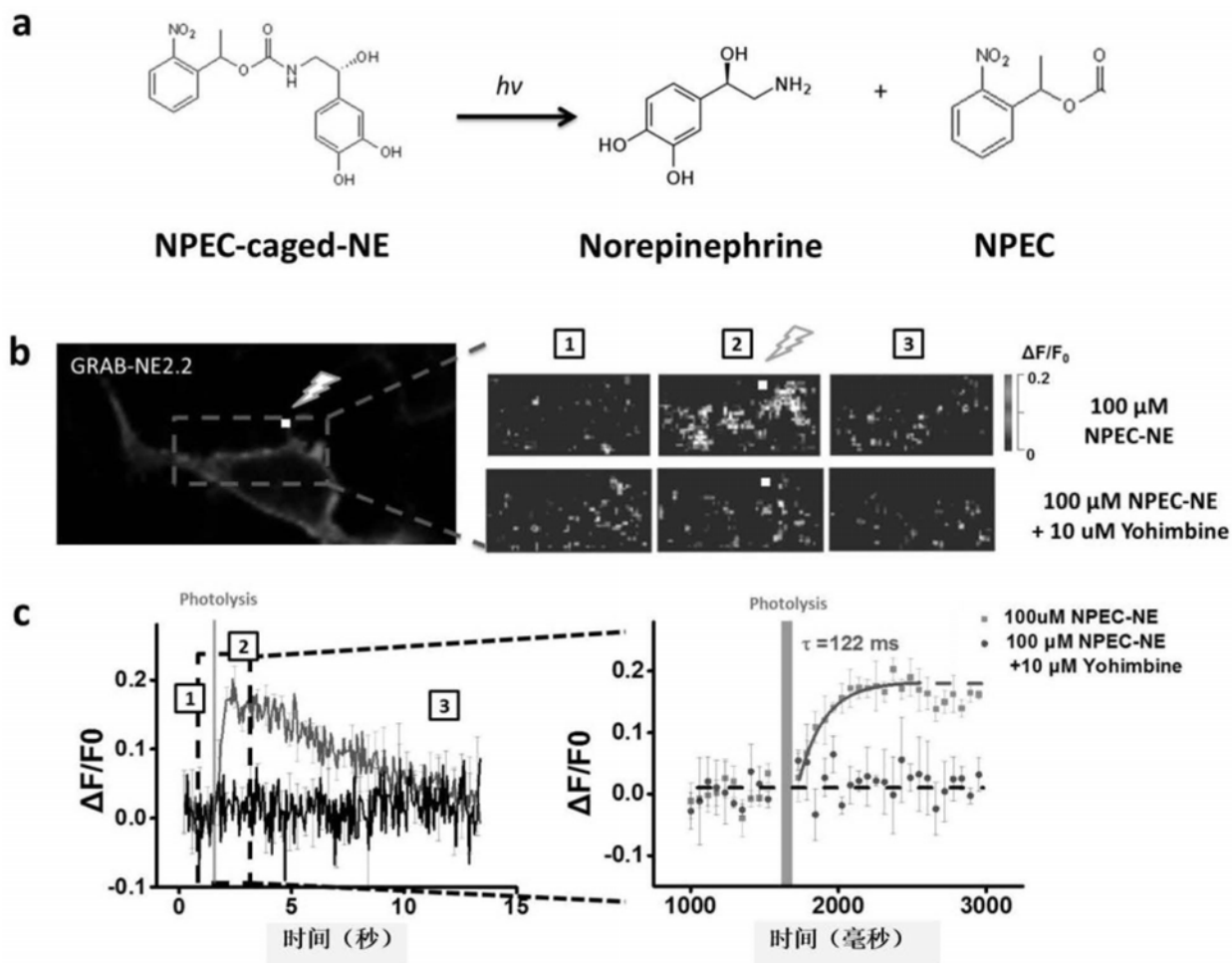


图29

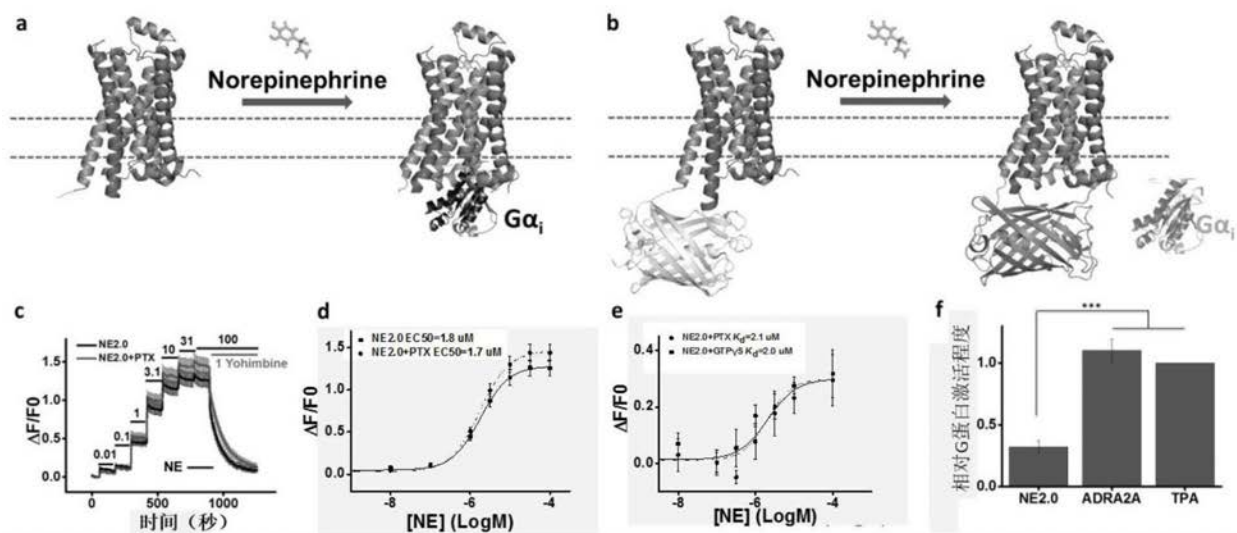


图30

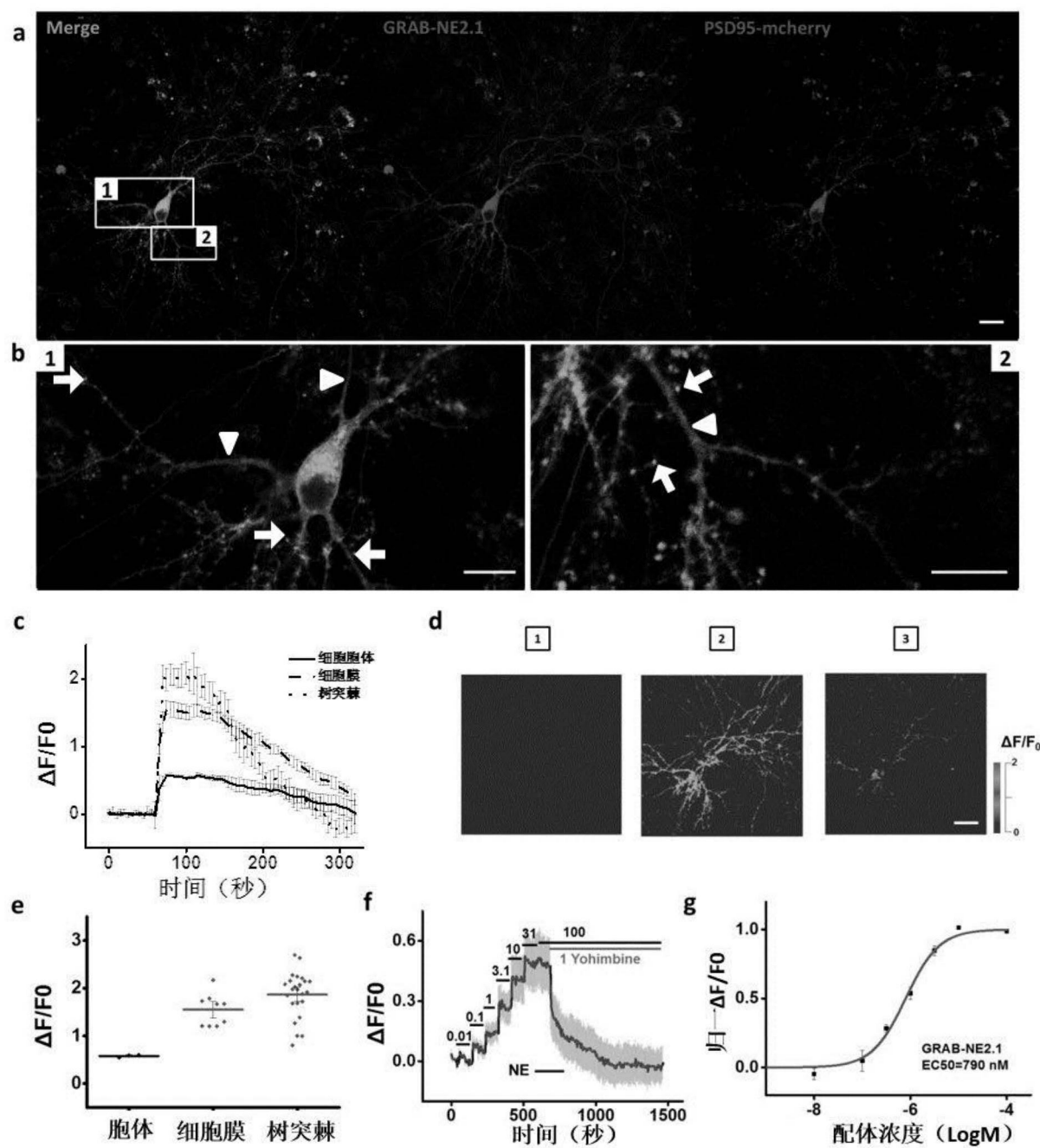


图31

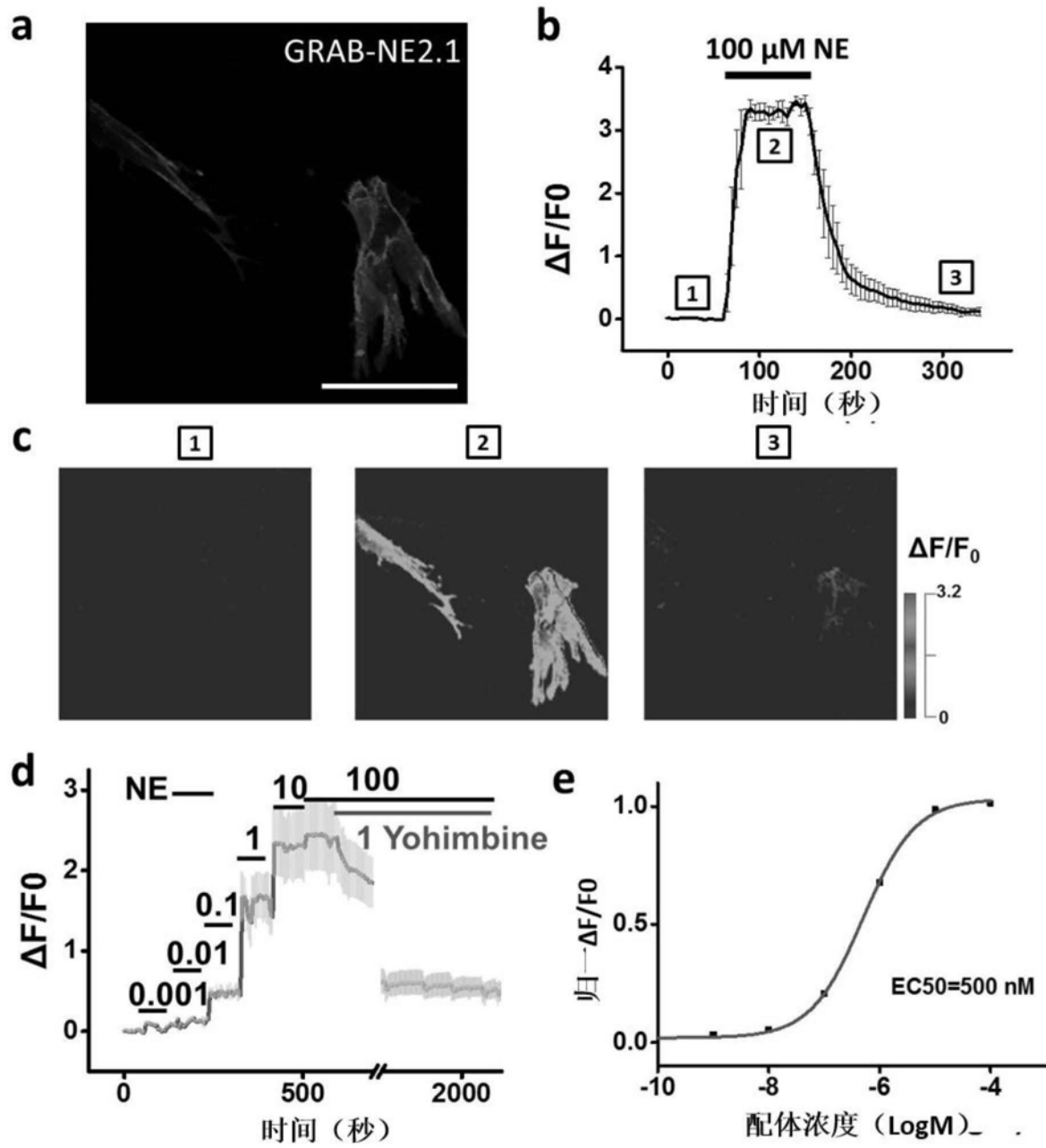


图32

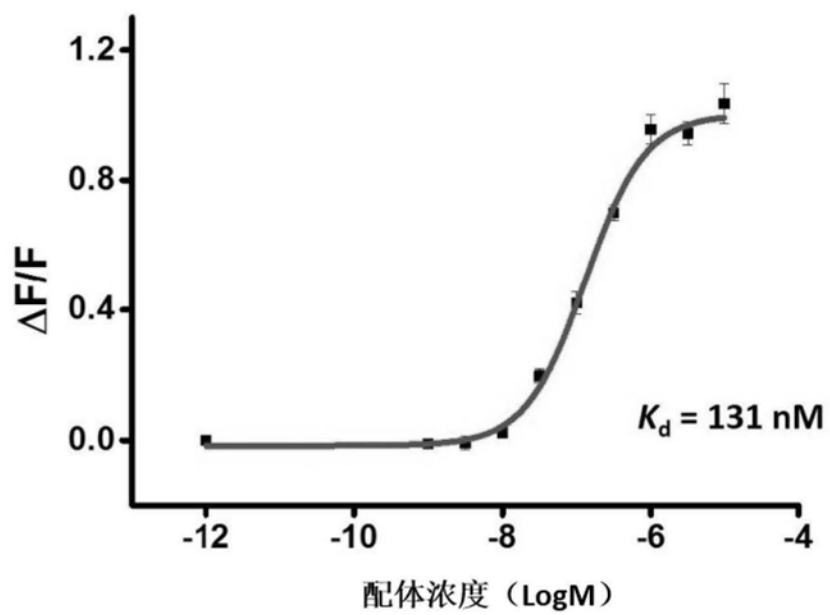


图33

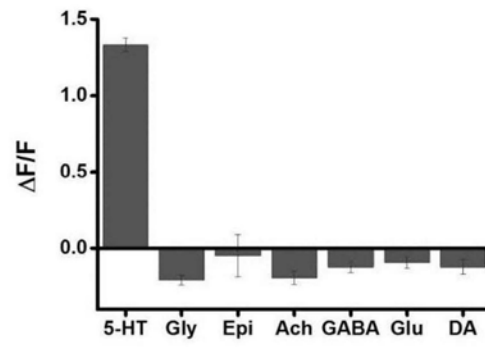
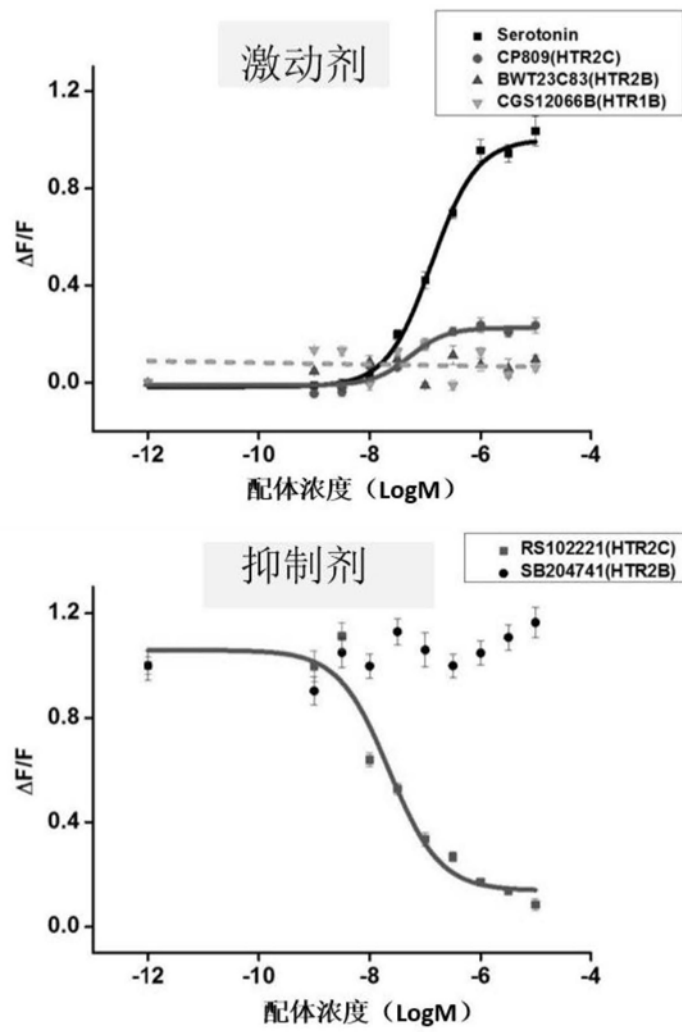
A**B**

图34

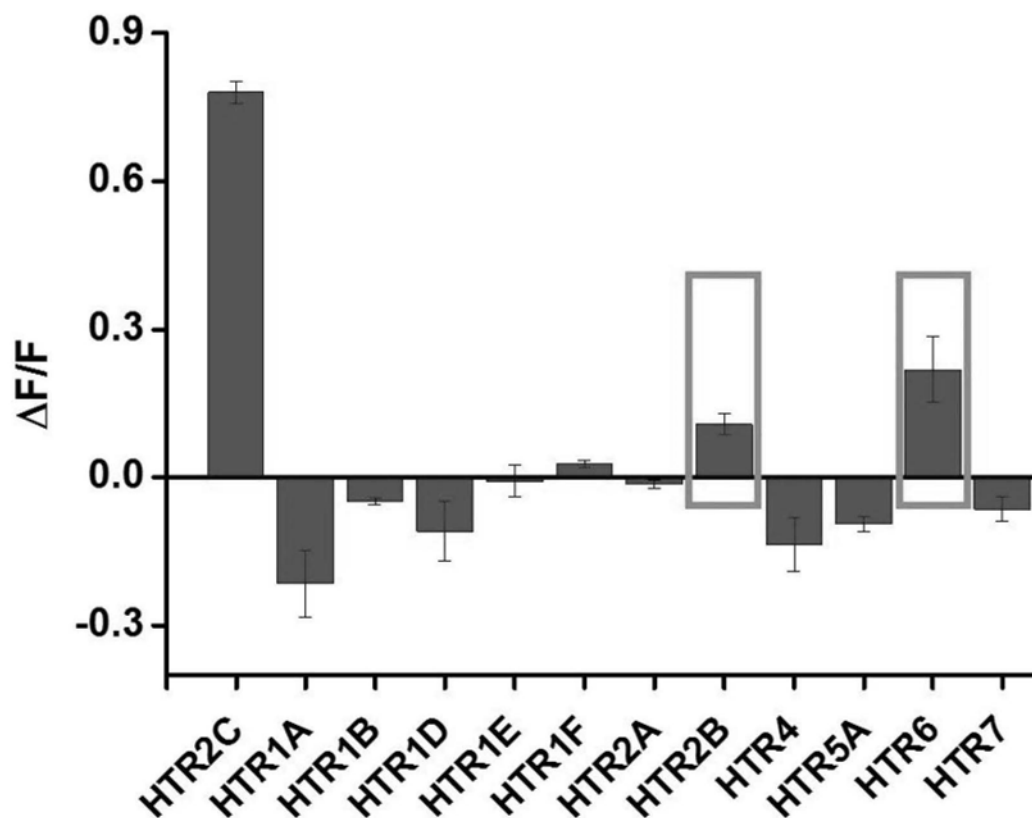


图35

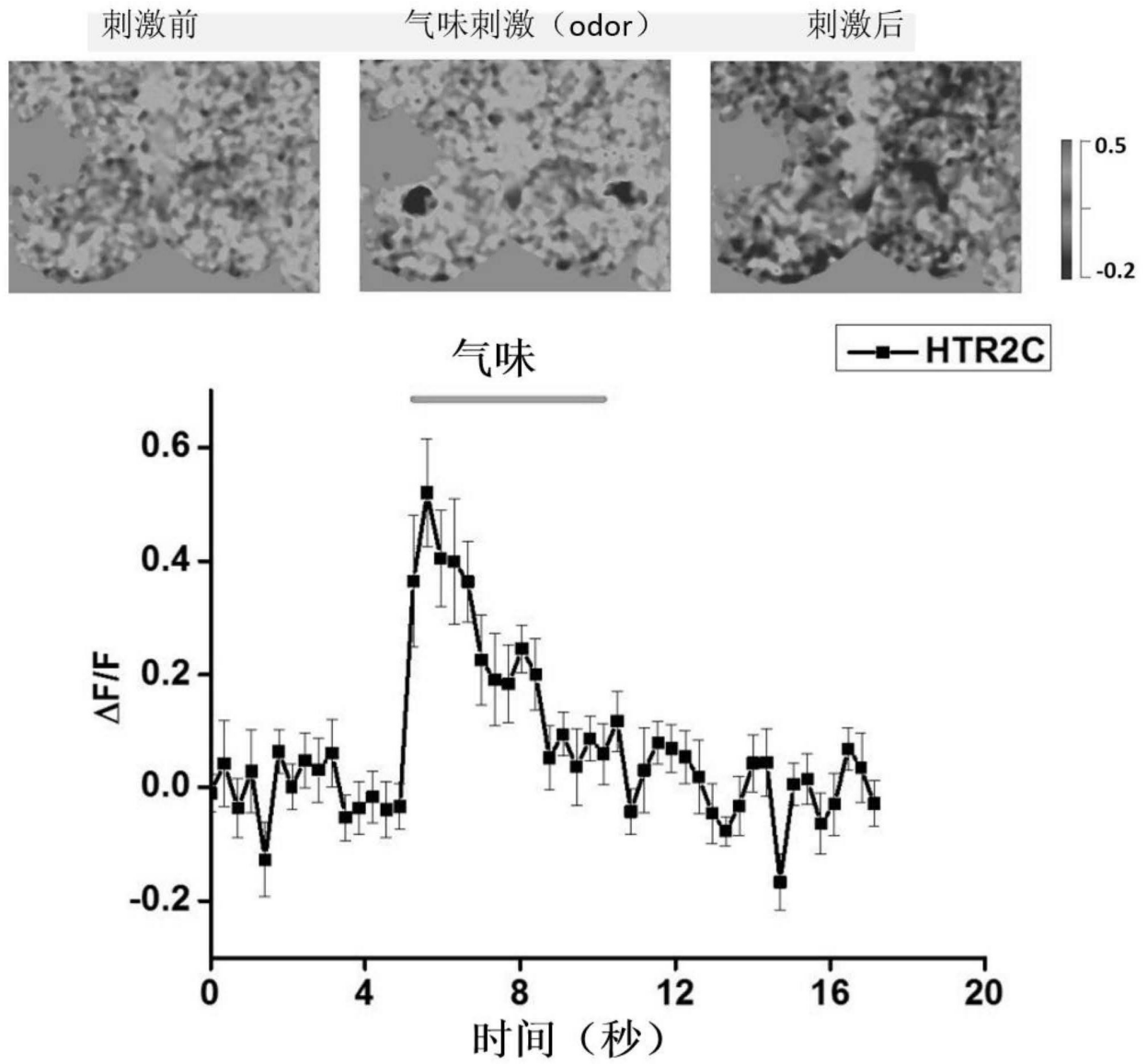


图36

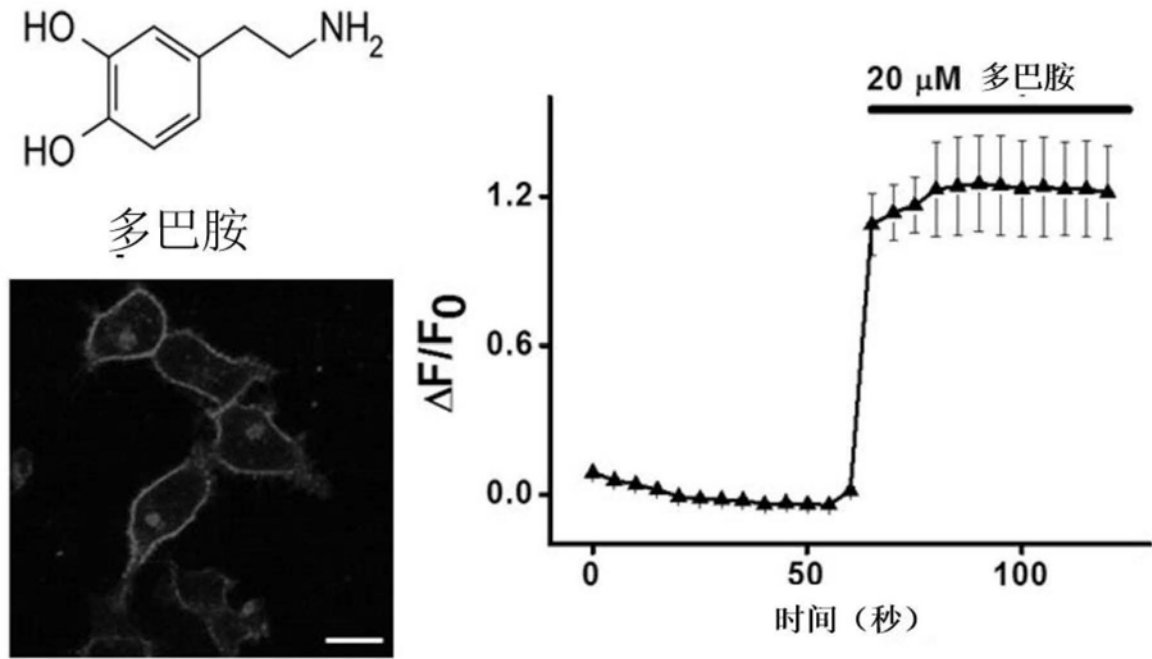


图37

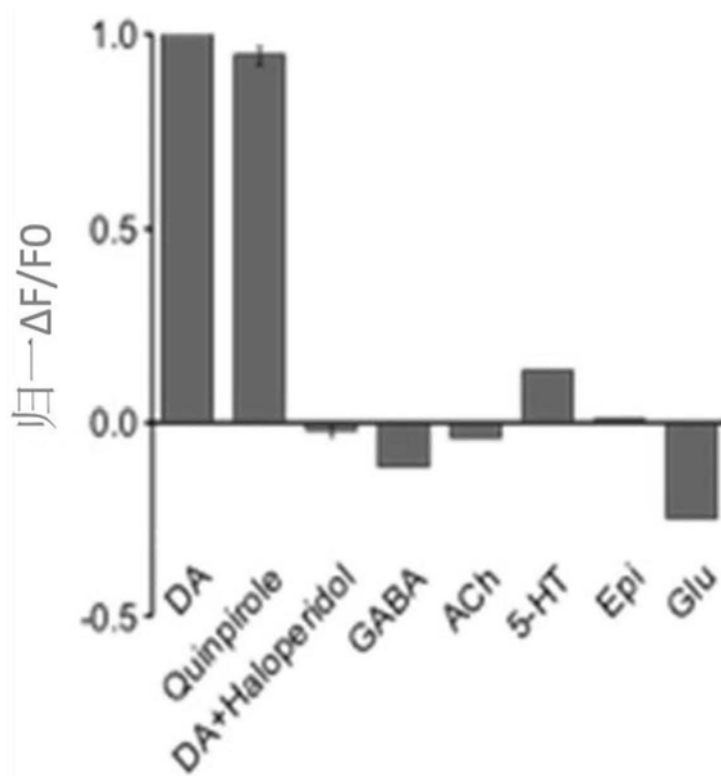


图38

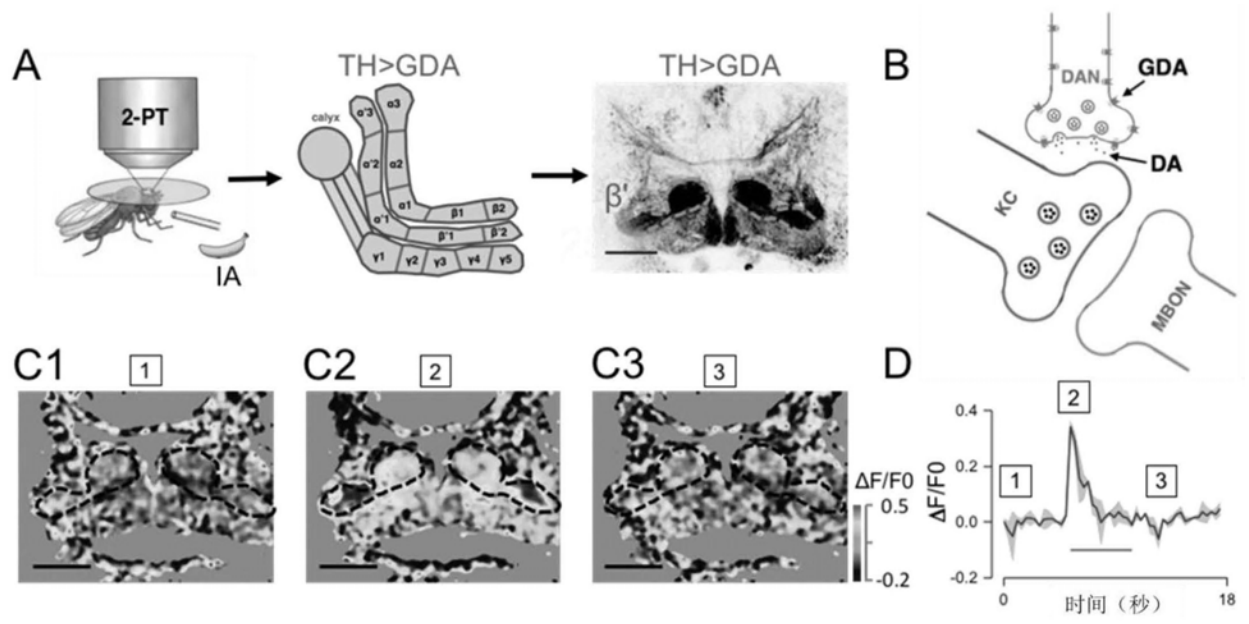


图39

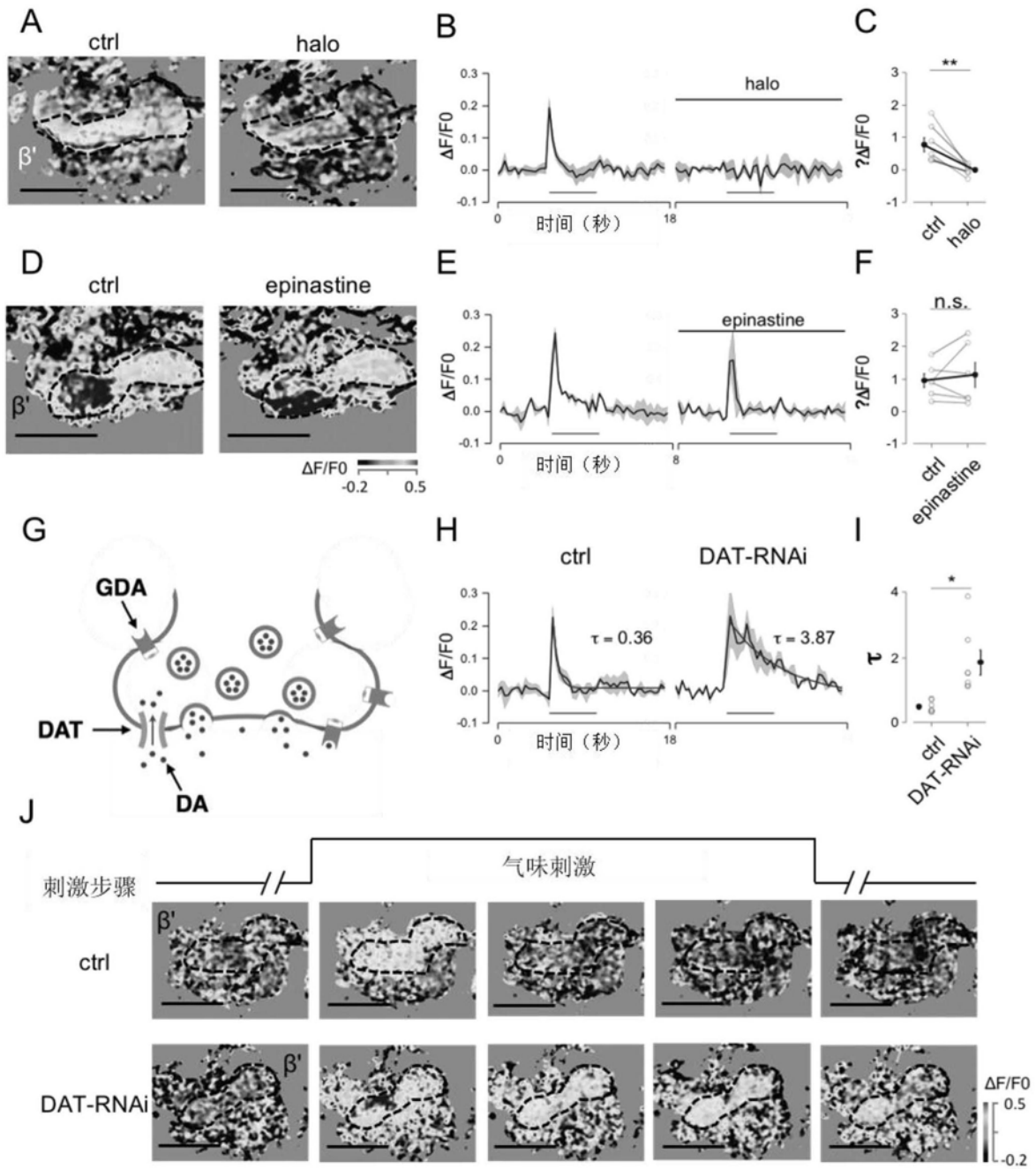


图40

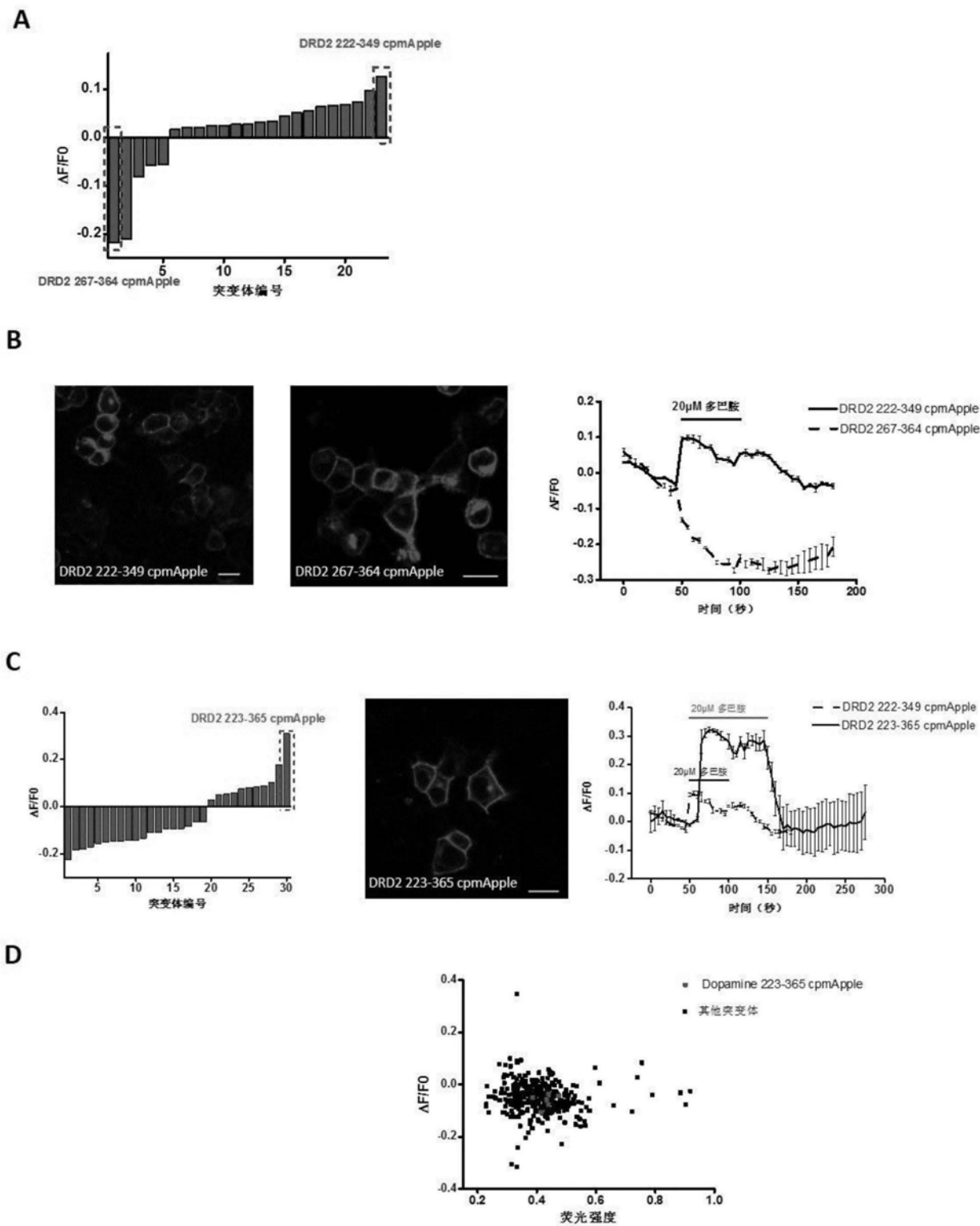


图41

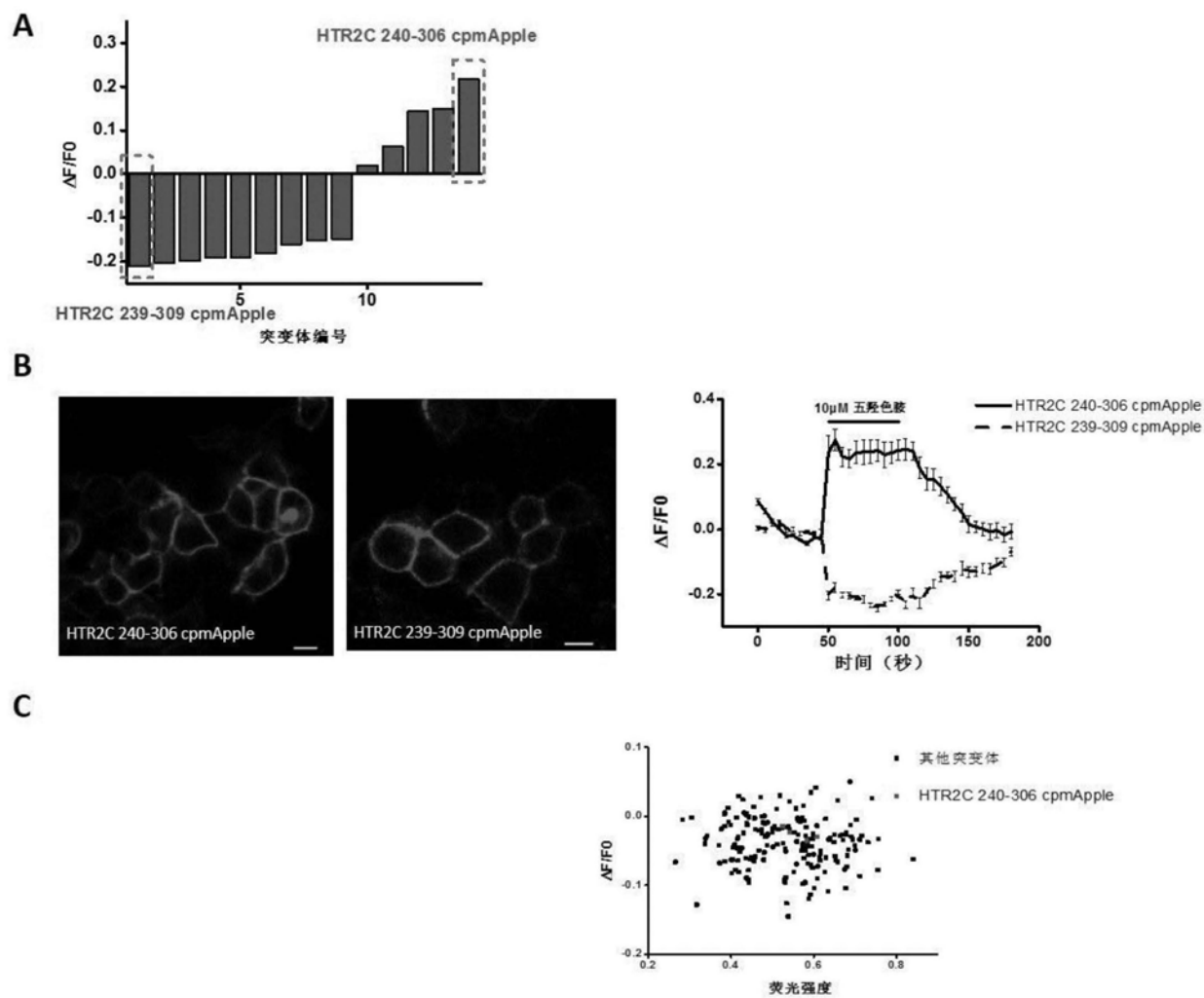


图42

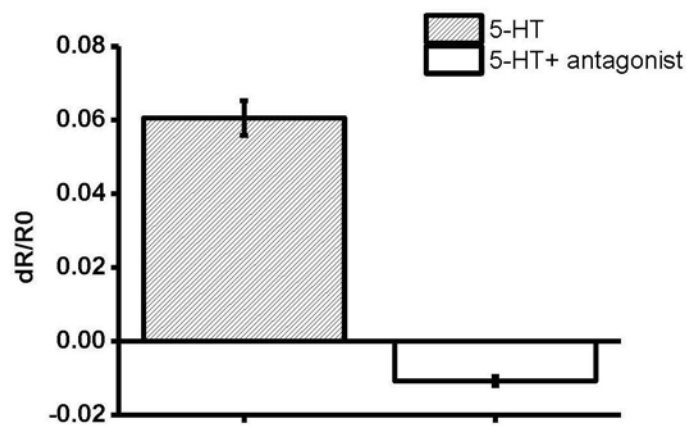


图43

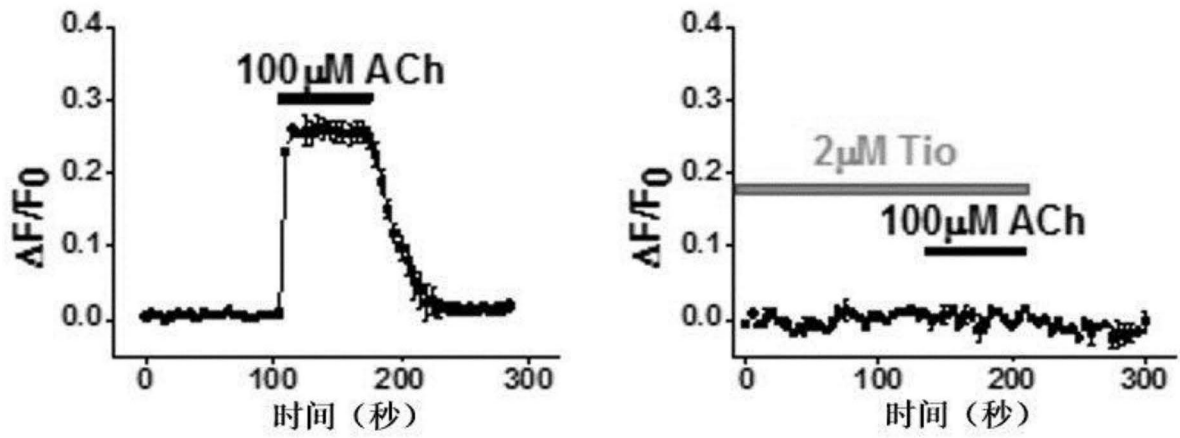


图44

ICL3:第三个胞内环
cpEGFP:循环重排绿色荧光蛋白

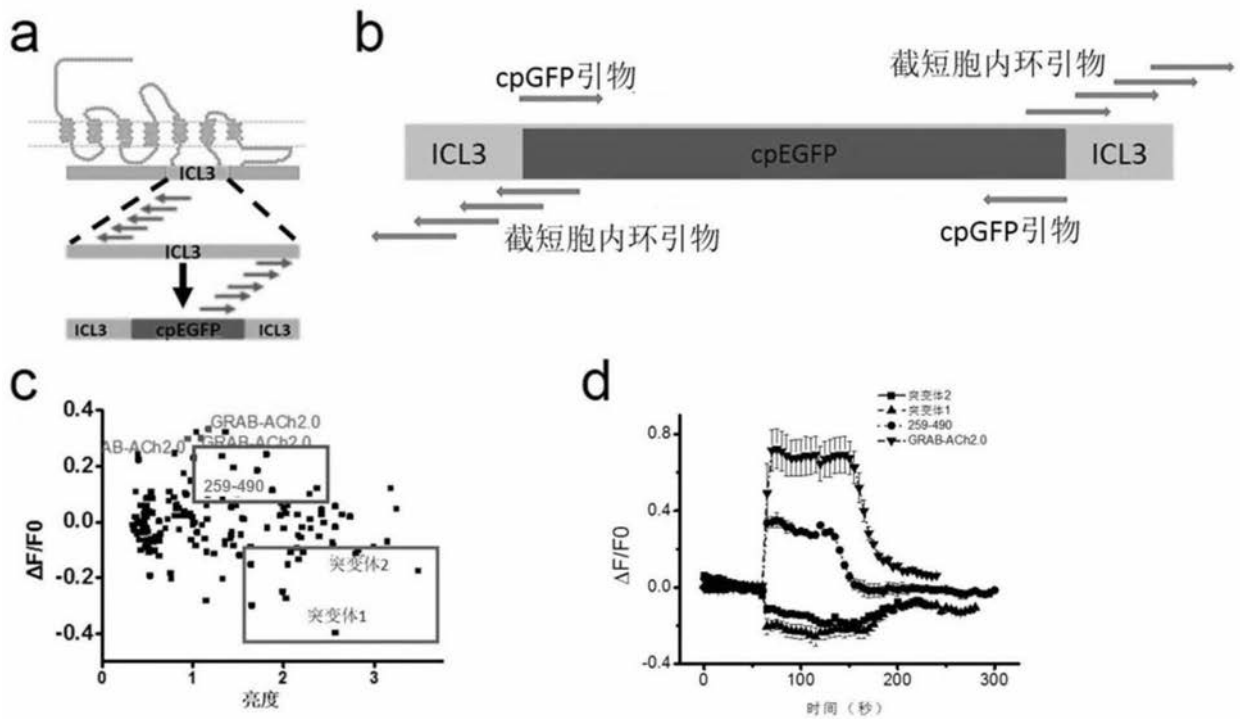


图45

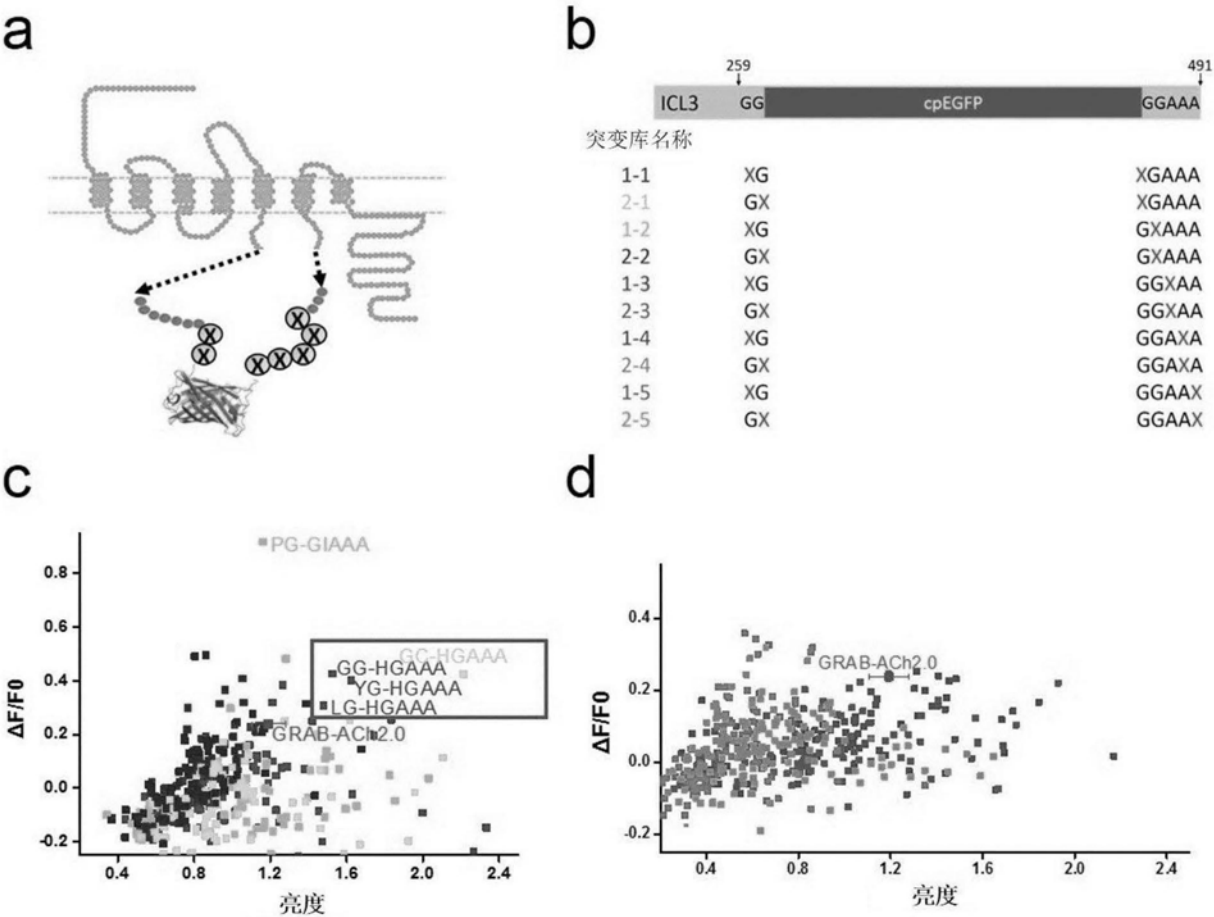


图46

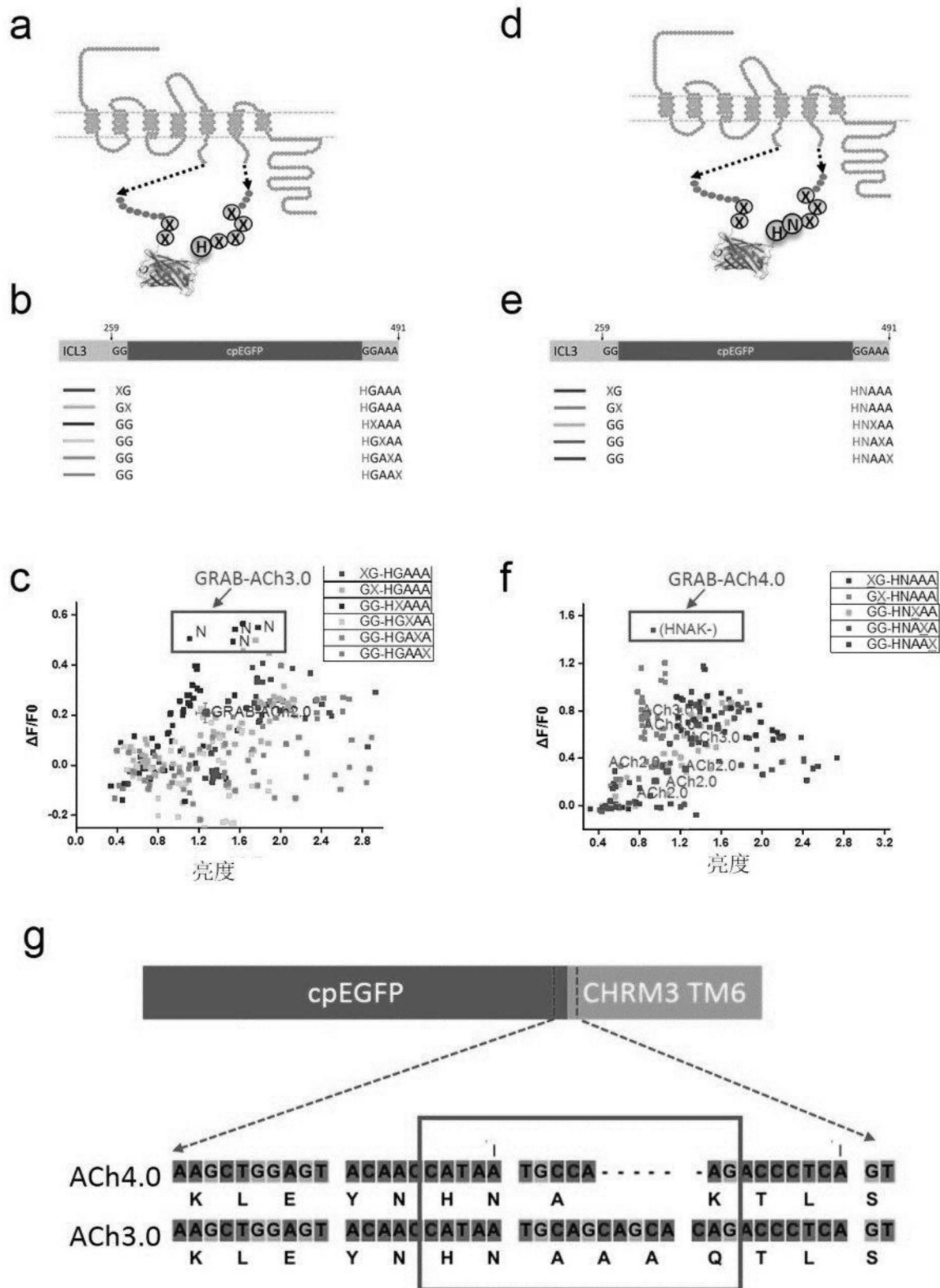


图47

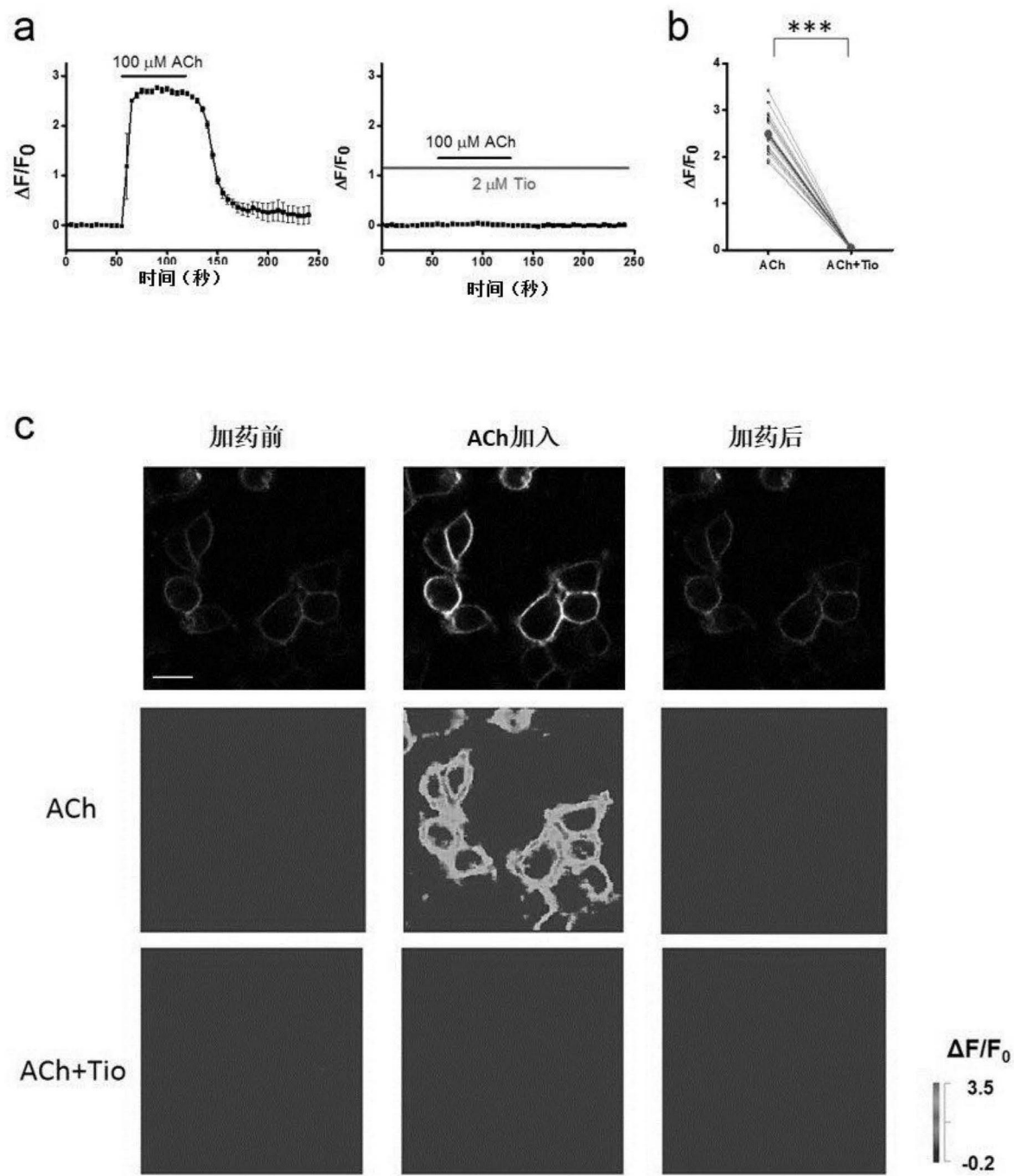


图48

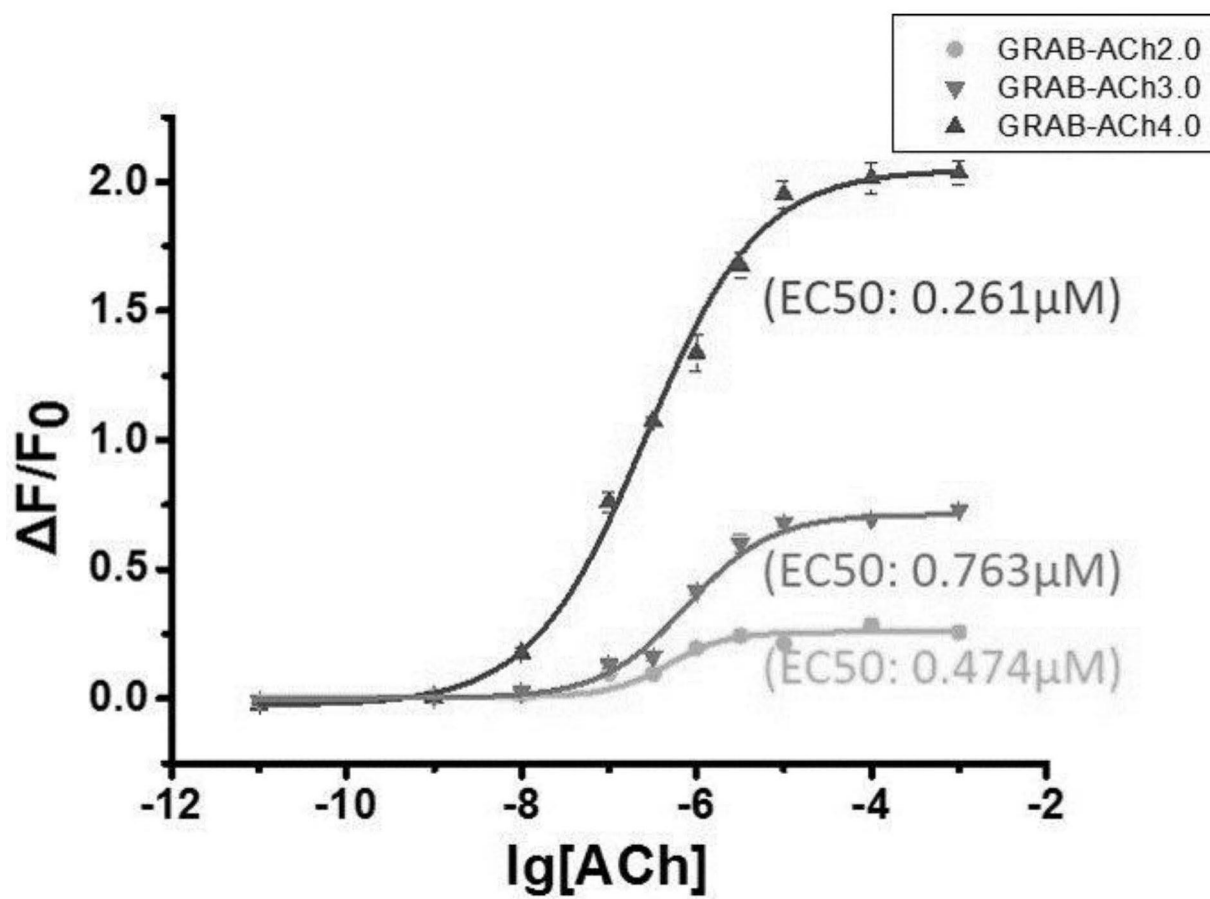


图49

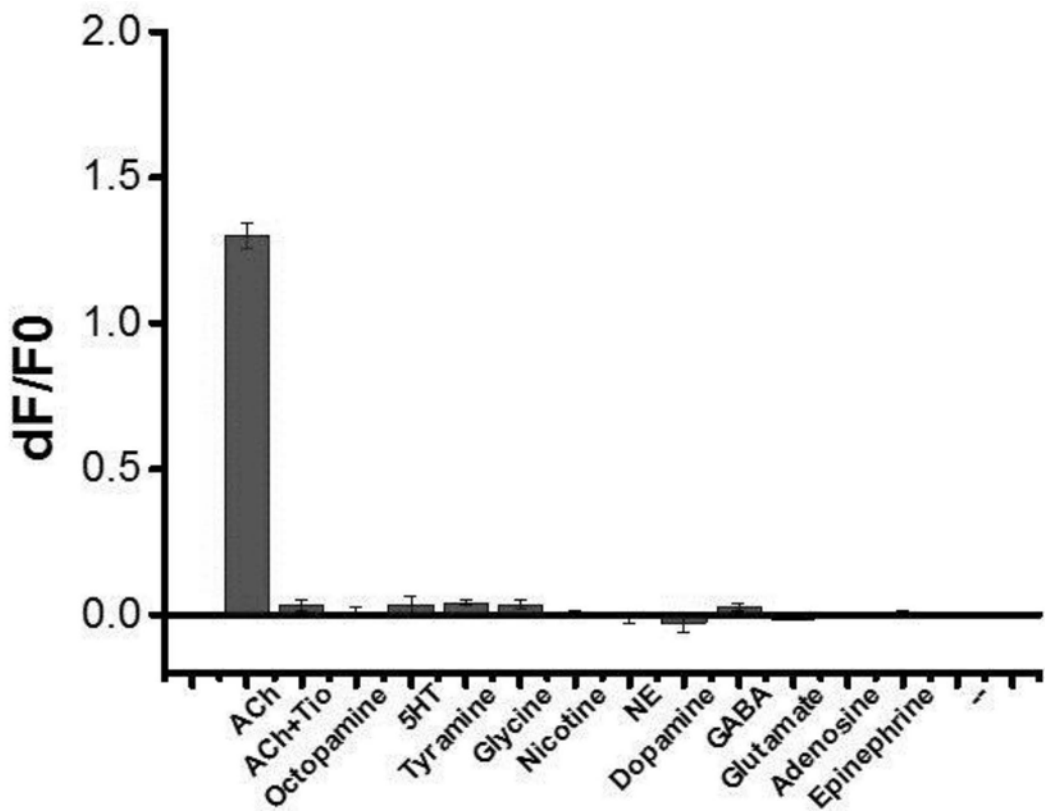


图50

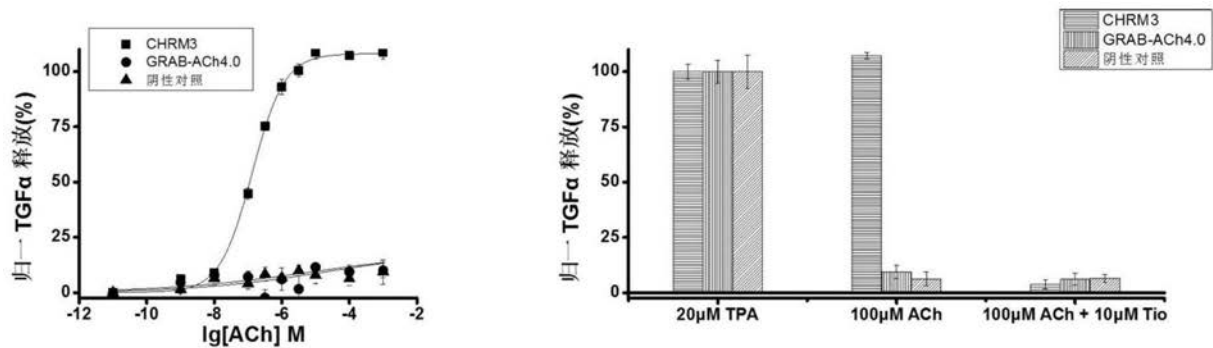


图51

$$Z\text{-factor} = 1 - \frac{3 \times (\sigma_p + \sigma_n)}{|\mu_p - \mu_n|}$$

(σ = 标准差, p = 信号, n = 背景)

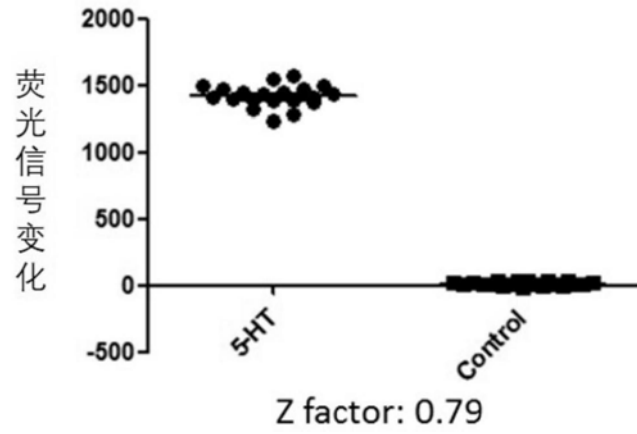


图52

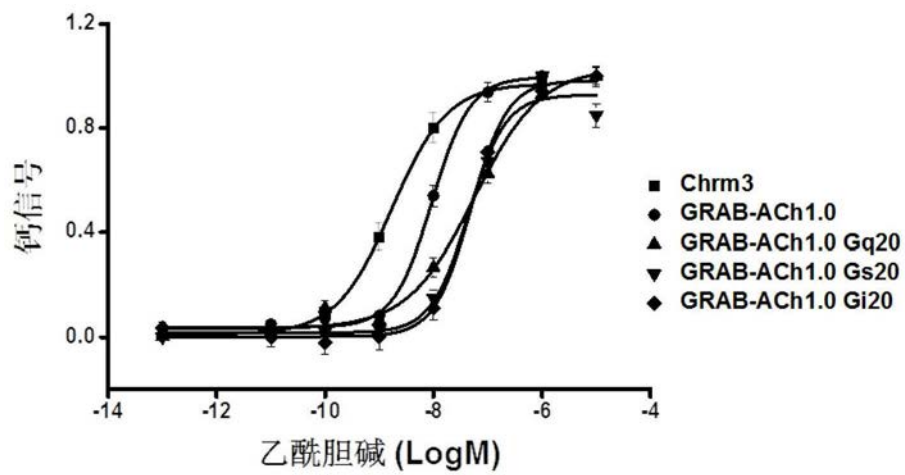


图53