(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2024 年 4 月 18 日 (18.04.2024)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2024/077672 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 19/00 (2006.01) *G01N 21/64* (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2022/128591

(22) 国际申请日: 2022 年 10 月 31 日 (31.10.2022)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202211247977.4 2022年10月12日 (12.10.2022) CN

(71) 申请人: 深 圳 先 进 技 术 研 究 院 (**SHENZHEN INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY**) [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道1068号, Guangdong 518055 (CN)。

(72) 发明人: 储军 (**CHU, Jun**); 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道1068号, Guangdong 518055 (CN)。 王亮 (**WANG, Liang**); 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道1068号, Guangdong 518055 (CN)。 刘文峰 (**LIU, Wenfeng**); 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道1068号, Guangdong 518055 (CN)。

(74) 代理人: 深 圳 市 铭 粤 知 识 产 权 代 理 有 限 公 司 (**MING & YUE INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM**); 中 国 广 东 省 深 圳 市 南 山 区 南 山 街 道 前 海 路 泛 海 城 市 广 场 2 栋 604 室, Guangdong 518066 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,

(54) **Title:** CAMP FLUORESCENT PROBES G-FLAMP2 AND G-FLAMP2B AND USE THEREOF, AND KIT

(54) 发明名称: 一种cAMP荧光探针G-Flamp2和G-Flamp2b及其应用和试剂盒

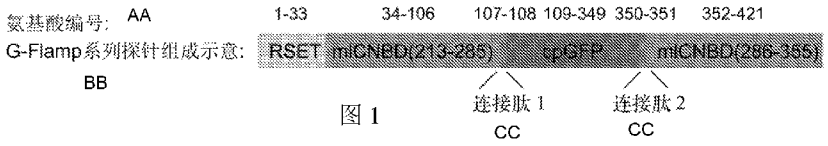


图 1

AA Amino acid No.
BB Schematic diagram of the composition of probes of G-Flamp series
CC Linker peptide

(57) **Abstract:** Provided are cAMP green fluorescent probes G-Flamp2 and G-Flamp2b and the use thereof, and a kit. The cAMP fluorescent probe G-Flamp2 has an amino acid sequence as shown in SEQ ID NO: 1; and the other cAMP fluorescent probe G-Flamp2b has an amino acid sequence as shown in SEQ ID NO: 2. The advantages comprise: (1) the probes have wide detection ranges; (2) the probes can be used in the detection of cAMP signals in living cells and living animal bodies; (3) the probes can be used for drug screening; and (4) the probes can be used in combination with fluorescent probes of other colors or photosensitive protein tools.

(57) 摘要: 提供cAMP绿色荧光探针G-Flamp2和 G-Flamp2b及其应用和试剂盒。一种cAMP荧光探针G-Flamp2，所述的G-Flamp2的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。另一种cAMP荧光探针G-Flamp2b，所述的G-Flamp2的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示。优点:(1) 检测范围广。(2)可以用在活细胞和活动物体的cAMP信号检测中。(3)可用于药物筛选。(4) 可与其他颜色的荧光探针或者光敏蛋白工具联合使用。

WO 2024/077672 A1

[见续页]

NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

— 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

一种 cAMP 荧光探针 G-Flamp2 和 G-Flamp2b 及其应用和试剂盒

技术领域

本发明涉及生物医学技术领域，具体涉及一种 cAMP 荧光探针 G-Flamp2 和 G-Flamp2b 及其应用和试剂盒。

背景技术

环磷酸腺苷(cAMP)是目前最大药物靶标 G 蛋白偶联受体(GPCR)家族的下游信使分子，细胞及活体水平的 cAMP 荧光成像是 GPCR 信号通路的基础研究和药物开发的重要方向。cAMP 荧光探针主要分为基于荧光蛋白的荧光共振能量转移探针及基于单个荧光蛋白的探针，后者动态范围较前者大且使用简单。目前基于单个荧光蛋白的 cAMP 探针分为绿色和红色 2 小类，前者主要有 Flamindo2、cADDis、cAMPr 和 G-Flamp1，后者主要有 Pink Flamindo、Red cADDis、R-FlincA、R-Flamp1m 和 R-Flamp2m。

活细胞中 cAMP 荧光成像是指将 cAMP 荧光探针表达在细胞中，然后利用荧光显微镜检测探针荧光的强度变化。荧光探针是 cAMP 荧光成像分析的关键。近几年，国际上知名实验室利用不同荧光蛋白、不同 cAMP 感应模块及不同的融合位点，开发了不同性能和光谱的 cAMP 单荧光蛋白探针，包括 Tetsuya Kitaguchi 博士开发的 Flamindo/Flamindo2/Pink Flamindo 探针、Anne Marie Quinn 博士开发的 cADDis/Red cADDis 探针、Kazuki Horikawa 博士开发的 R-FlincA 探针及 Justin Blau 博士开发的 cAMPr 探针。对于绿色 cAMP 探针，申请人已开发更高性能的探针 G-Flamp1(CN201911251920.X 和 CN202010354936.X)。

综上，开发高性能的绿色 cAMP 荧光探针，提高其在实际应用中的亮度和动态范围，对于提高探测灵敏度和多色成像具有重要意义。

发明内容

本发明的目的在于克服上述技术问题，提供一种动态范围大、荧光亮度高、

检测灵敏度高，可检测细胞受刺激后 cAMP 浓度改变，可与已有的其他荧光波段（如红色）探针或者红光敏感的工具蛋白联合使用，同时进行双色成像或者进行光学控制/荧光成像联用的 cAMP 荧光探针 G-Flamp2 和 G-Flamp2b 及其应用和试剂盒。

本发明的目的在于提供一种动态范围较大、荧光亮度高，可检测细胞受刺激后 cAMP 浓度改变，可与已有的其他荧光波段（如红色）探针或者红光敏感的工具蛋白联合使用，同时进行双色成像或者进行光学控制/荧光成像联用的 cAMP 荧光探针 G-Flamp2b 及其应用和试剂盒。

为实现上述目的，本发明采用的技术方案如下。

第一方面，本发明提供一种 cAMP 荧光探针 G-Flamp2 和 G-Flamp2b，所述的 G-Flamp2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：1 所示；

所述的 G-Flamp2b 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示。

进一步的，所述的荧光探针 G-Flamp2 和 G-Flamp2b 最佳的单光子的激发波长为 440±10 nm。

进一步的，所述的荧光探针 G-Flamp2 和 G-Flamp2b 最佳的双光子的激发波长为 900~940 nm。

第二方面，本发明提供一种 cAMP 荧光探针 R-Flamp2 和 G-Flamp2b 的制备方法。

一种 cAMP 荧光探针 G-Flamp2 的制备方法为：对 G-Flamp1 的氨基酸进行如下突变：K118N，K126E，S207R，T248S，E316V，I333T，得到 G-Flamp2 探针；

G-Flamp2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：1 所示。

一种 cAMP 荧光探针 G-Flamp2b 的制备方法为：对 G-Flamp1 的氨基酸进行如下突变：G42E，G61D，V66D，K118N，K126E，F183Y，S207R，T248S，E316V，I333T，R350N，V351S，E355K，S378I，得到 G-Flamp2b 探针。

G-Flamp2b 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：2 所示。

第三方面，本发明提供一种 cAMP 荧光探针 G-Flamp2 或 G-Flamp2b 在检测 cAMP 中的应用。

第四方面，本发明提供一种cAMP荧光探针G-Flamp2或G-Flamp2b在活细胞和/或动物活体中检测cAMP中的应用。

第五方面，本发明提供一种荧光探针G-Flamp2和G-Flamp2b的试剂盒。

第六方面，本发明提供一种活细胞中cAMP荧光成像检测方法。

一种活细胞中 cAMP 荧光成像检测方法包括以下步骤：

(1) 活细胞培养，细胞密度约 50%-80%时，转染 G-Flamp2 或 G-Flamp2b 质粒；

(2) 转染后的细胞培养过夜，饥饿细胞 2~4 小时后，将培养基换为无色透明的活细胞荧光成像缓冲液；

(3) 单光子的激发波长 440±10 nm 下，荧光显微镜成像分析。

第七方面，本发明提供一种哺乳动物细胞中 cAMP 荧光成像检测方法。

一种哺乳动物细胞中 cAMP 荧光成像检测方法包括以下步骤：

(1) 哺乳动物细胞培养，培养基为含 10% 胎牛血清和 1% penicillin-streptomycin 的 DMEM 培养液，培养温度为 37℃，CO_2 含量为 5%；

细胞密度约 50%-80%时，转染 G-Flamp2 或 G-Flamp2b 质粒；

(2) 转染后的哺乳动物细胞培养过夜，用不含血清和酚红的培养基饥饿细胞 2~4 小时后，将培养基换为无色透明的活细胞荧光成像缓冲液；

(3) 单光子的激发波长 440±10 nm，荧光显微镜成像分析，成像频率为 15 s/frame (15 秒每帧)，在第十帧加入 Forskolin，至 Forskolin 终浓度 60μM，检测 G-Flamp2 或 G-Flamp2b 探针荧光的强度变化。

本发明提供的荧光探针 G-Flamp2，是 G-Flamp1 的氨基酸进行如下突变获得的：K118N，K126E，S207R，T248S，E316V，I333T，在 37℃生理温度培养哺乳动物细胞中，亮度较 G-Flamp1 提高 60%，动态范围（$\Delta F/F_0$）为 12。G-Flamp2 的 $\Delta F/F_0$ 要高于 G-Flamp1 的 ΔF/F0（~10），为动态范围最大的 cAMP 绿色荧光探针。因此，该探针在同等表达量下，荧光亮度更高，响应幅度更大，即灵敏度更高。本发明提供的荧光探针 G-Flamp2 为绿色 cAMP 探针，最适单光子的激发波长为 440±10 nm，最适双光子的激发波长为 900~940 nm。荧光探针 G-Flamp2 是绿色探针，能够与已有的大量红色探针或者其他工具蛋白联合使用，可同时进行双色成像或者进行光学控制/荧光成像联用。将本发明提供的荧光探针 G-Flamp2 表达在哺乳动物细胞中，利用普通的荧光显微镜，即可检测细胞受特定刺激后 cAMP 浓度改变。

本发明提供的荧光探针 G-Flamp2b，是 G-Flamp1 的若干氨基酸进行如下突变获得的：G42E，G61D，V66D，K118N，K126E，F183Y，S207R，T248S，E316V，I333T，R350N，V351S，E355K，S378I，其在 HEK293T 细胞中荧光亮度较 G-Flamp1 提高 210%，因此，该探针在同等表达量下，荧光亮度更高，即可以在更低的表达量下使用。本发明提供的荧光探针 G-Flamp2b 为绿色 cAMP 探针，最适单光子的激发波长为 440±10 nm，最适双光子的激发波长为 900~940 nm。本发明提供的荧光探针 G-Flamp2b 是绿色探针，能够与已有的大量红色探针或者其他工具蛋白联合使用，可同时进行双色成像或者进行光学控制/荧光成像联用。将本发明提供的荧光探针 G-Flamp2b 表达在哺乳动物细胞中，利用普通的荧光显微镜，即可检测细胞受特定刺激后 cAMP 浓度改变。

与现有技术相比，本发明提供的一种 cAMP 荧光探针 G-Flamp2 和 G-Flamp2b 及其应用和试剂盒的优点：

(1)荧光亮度高、灵敏度高。

(2)可以用于溶液中 cAMP 浓度检测。

(3)可以用于活细胞和活动物体的 cAMP 信号检测。

(4)应用范围广，可与红色探针或红色光敏蛋白工具联合使用。

附图说明

图 1 为本发明提供的 2 种荧光探针的设计示意图；

图 2 为本发明提供的 2 种荧光探针探针的亲和力曲线；

图中 A 为 G-Flamp2 探针的亲和力曲线；B 为 G-Flamp2b 探针的亲和力曲线；在 pH 7.2 的 HEPES 缓冲液中，G-Flamp2 或 G-Flamp2b 探针在不同 cAMP 浓度下的归一化的荧光响应；

图 3 为 G-Flamp2（A 图）和 G-Flamp2b（B 图）探针的荧光激发和发射光谱；

图 4 为 G-Flamp1 和 G-Flamp2 以及 G-Flamp1 和 G-Flamp2b 在 HEK293T 细胞中的亮度比较；其中，统计用 t 检验；***为 $P<0.001$,**为 $P<0.05$；

图 5 为单光子激发下，G-Flamp1、G-Flamp2 和 G-Flamp2b 探针在 HEK293T 细胞中的响应；其中，激发波长为 440±10 nm，荧光接收波长为 530±15 nm；曲线数据表示：平均值±均值标准误差 (Standard error of mean，SEM)。

具体实施方式

为使本领域的技术人员更好地理解本发明的技术方案，以下实施例对本发明的作进一步详细描述，以下实施例仅用于说明发明，但不用来限制本发明的范围。

实施例 1

对 G-Flamp1 的若干氨基酸进行突变，即得到 G-Flamp2 探针，其氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示。

对 G-Flamp1 的若干氨基酸进行突变，即得到 G-Flamp2b 探针，其氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示。

实施例 2

将 G-Flamp2 探针表达在细菌中，室温培养 3 天收集菌体，在 pH=7.2 的 HEPES 缓冲液(含 150 mM KCl 及 50 mM HEPES)中超声破碎，然后离心获取上

清液（含探针）。

取 120 μL 探针溶液，利用多功能酶标仪 Infinite M1000 PRO 检测探针对不同 cAMP 浓度的的响应。荧光的激发波长为 450 nm，接收波长为 515 nm。

获取 $\Delta F/F_0$ 与 cAMP 浓度的曲线，即可得 G-Flamp2 在不同 cAMP 浓度下荧光变化，及解离常数 K_d（图 2A）。同时可以获取荧光激发和发射光谱（图 3A）。

将 G-Flamp2b 探针表达在细菌中，室温培养 3 天收集菌体，在 pH=7.2 的 HEPES 缓冲液(含 150 mM KCl 及 50 mM HEPES)中超声破碎，然后离心获取上清液（含探针）。

取 120 μL 探针溶液，利用多功能酶标仪 Infinite M1000 PRO 检测探针对不同 cAMP 浓度的的响应。荧光的激发波长为 450 nm，接收波长为 515 nm。

获取 ΔF/F0 与 cAMP 浓度的曲线，即可得 G-Flamp2b 不同 cAMP 浓度下荧光变化，及解离常数 Kd（图 2B）。同时可以获取荧光激发和发射光谱（图 3B）。

实施例 3

HEK293T 细胞培养在 12 孔板中，培养基为含 10%胎牛血清和 1% penicillin-streptomycin 的 DMEM 培养液，培养温度为 37℃，CO_2 含量为 5%。用 Lipofectamine 2000 试剂盒转染相同质量的可表达 G-Flamp1 和 G-Flamp2 的质粒至不同孔的细胞中。约 40 小时后，用无色透明的活细胞荧光成像缓冲液清洗细胞一遍，然后将细胞重悬在 200 μl 的活细胞荧光成像缓冲液中，转移至 96 孔酶标板，37℃静置 10 分钟后，用酶标仪检测细胞的荧光强度，即得到附图 4A。

HEK293T 细胞培养在 12 孔板中，培养基为含 10%胎牛血清和 1% penicillin-streptomycin 的 DMEM 培养液，培养温度为 37℃，CO_2 含量为 5%。用 Lipofectamine 2000 试剂盒转染相同质量的可表达 G-Flamp1 和 G-Flamp2b 的质粒至不同孔的细胞中。约 40 小时后，用无色透明的活细胞荧光成像缓冲液清洗细胞一遍，然后将细胞重悬在 200 μl 的活细胞荧光成像缓冲液中，转移

至 96 孔酶标板，37℃静置 10 分钟后，用酶标仪检测细胞的荧光强度，即得到附图 4B。

实施例 4

将 HEK293T 细胞培养在玻璃底的培养皿中，培养基为含 10%胎牛血清和 1% penicillin-streptomycin 的 DMEM，培养温度为 37℃，CO_2 含量为 5%。

细胞密度为 50%-80%左右时，用 Lipofectamine 2000 试剂盒转染 G-Flamp1 或 G-Flamp2 质粒。过夜培养后，用不含血清和酚红的培养基（购自 GIBCO 公司）饥饿细胞 2 到 4 小时，然后将培养基换为无色透明的活细胞荧光成像缓冲液，采用本实验室自行搭建的 IX83 单光子荧光显微镜（激发波长 450 nm 左右，最大发射波长 530 nm 左右）进行成像分析。

成像频率为 15 s/frame（15 秒每帧），在第十帧加入 Forskolin（购自碧云天生物技术公司），Forskolin 终浓度为 60 μM（例：培养皿中有 500 μL 活细胞荧光成像缓冲液，将 4μL 12mM 的母液稀释于 300 μL 活细胞荧光成像缓冲液中，第十帧时将此稀释好的 300μL Forskolin 溶液滴入正在成像的细胞皿中）。

Forskolin 刺激后，细胞中 G-Flamp1 和 G-Flamp2 荧光强度的变化，见附图 5A。至此完成了哺乳动物细胞内 cAMP 浓度变化的荧光成像步骤。

将 HEK293T 细胞培养在玻璃底的培养皿中，培养基为含 10%胎牛血清和 1% penicillin-streptomycin 的 DMEM，培养温度为 37℃，CO_2 含量为 5%。

细胞密度为 50%-80%左右时，用 Lipofectamine 2000 试剂盒转染 G-Flamp1 或 G-Flamp2b 质粒。过夜培养后，用不含血清和酚红的培养基（购自 GIBCO 公司）饥饿细胞 2 到 4 小时，然后将培养基换为无色透明的活细胞荧光成像缓冲液，采用本实验室自行搭建的 IX83 单光子荧光显微镜（激发波长 450 nm 左右，最大发射波长 530 nm 左右）进行成像分析。

成像频率为 15 s/frame（15 秒每帧），在第十帧加入 Forskolin（购自碧云天生物技术公司），Forskolin 终浓度为 60 μM（例：培养皿中有 500 微升活细胞荧光成像缓冲液，将 4 微升 12mM 的母液稀释于 300 微升活细胞荧光成像缓冲液中，第十帧时将此稀释好的 Forskolin 溶液滴入正在成像的细胞皿中）。

Forskolin 刺激后，细胞中 G-Flamp1 和 G-Flamp2b 荧光强度的变化，见附图 5B。至此完成了哺乳动物细胞内 cAMP 浓度变化的荧光成像步骤。

以上详细描述了本发明的优选实施方式，但是，本发明并不限于上述实施方式中的具体细节，在本发明的技术构思范围内，可以对本发明的技术方案进行多种变换，这些简单变型均属于本发明的保护范围。

另外需要说明的是，在上述具体实施方式中所描述的各个具体技术特征和步骤，在不矛盾的情况下，可以通过任何合适的方式进行组合，为了避免不必要的重复，本发明对各种可能的组合方式不再另行说明。

此外，本发明的各种不同的实施方式之间也可以进行任意组合，只要其不违背本发明的思想，其同样应当视为本发明所公开的内容。

权利要求书

1. 一种 cAMP 荧光探针 G-Flamp2 和 G-Flamp2b，其特征在于：所述的 G-Flamp2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示；

所述的 G-Flamp2b 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示。

2. 根据权利要求 1 所述的一种 cAMP 荧光探针 G-Flamp2 和 G-Flamp2b，其特征在于：所述的荧光探针 G-Flamp2 及 G-Flamp2b 最佳的单光子的激发波长为 440±10 nm。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的一种 cAMP 荧光探针 G-Flamp2 和 G-Flamp2b，其特征在于：所述的荧光探针 G-Flamp2 及 G-Flamp2b 最佳的双光子的激发波长为 900~940 nm。

4. 一种 cAMP 荧光探针 G-Flamp2 和 G-Flamp2b 的制备方法，其特征在于，所述的方法为：对 G-Flamp1 的氨基酸进行如下突变：K118N, K126E, S207R, T248S, E316V, I333T，得到 G-Flamp2 探针；

对 G-Flamp1 的氨基酸进行如下突变：G42E，G61D，V66D，K118N，K126E，F183Y，S207R，T248S，E316V，I333T，R350N，V351S，E355K，S378I，得到 G-Flamp2b 探针。

5. 一种 cAMP 荧光探针 G-Flamp2 和 G-Flamp2b 在检测 cAMP 中的应用。

6. 一种 cAMP 荧光探针 G-Flamp2 和 G-Flamp2b 在活细胞和/或动物活体中检测 cAMP 中的应用。

7. 一种包含权利要求 1~4 任意一项所述的荧光探针 G-Flamp2 和 G-Flamp2b 的试剂盒。

8. 一种活细胞中 cAMP 荧光成像检测方法，其特征在于，所述的方法包括以下步骤：

(1) 活细胞培养，细胞密度在约50%-80%时，转染G-Flamp2或G-Flamp2b

质粒；

(2) 转染后的细胞培养过夜，饥饿细胞2~4小时后，将培养基换为无色透明的缓冲液；

(3) 单光子的激发波长440±10 nm下，荧光显微镜成像分析。

9. 一种哺乳动物细胞中 cAMP 荧光成像检测方法，其特征在于，所述的方法包括以下步骤：

(1) 哺乳动物细胞培养，培养基为含 10% 胎牛血清和 1% penicillin-streptomycin 的 DMEM 培养液，培养温度为 37℃，CO_2 含量为 5%；

细胞密度约 50%-80%时，转染 G-Flamp2 或 G-Flamp2b 质粒；

(2) 转染后的哺乳动物细胞培养过夜，用不含血清和酚红的培养基饥饿细胞 2~4 小时后，将培养基换为无色透明的活细胞荧光成像缓冲液；

(3) 单光子的激发波长 440±10nm，荧光显微镜成像分析，成像频率为 15 秒每帧，在第十帧加入 Forskolin，至 Forskolin 终浓度 60 μM，检测 G-Flamp2 或 G-Flamp2b 探针荧光的强度变化。

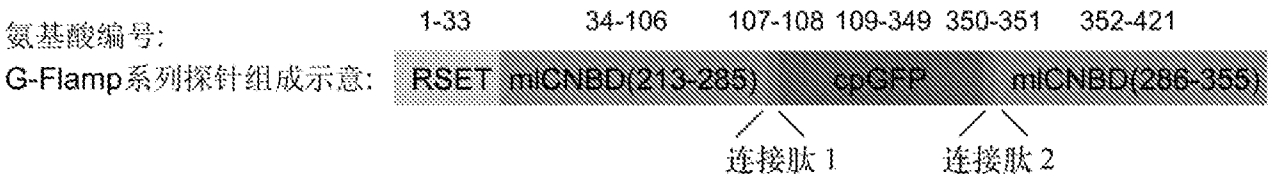

氨基酸编号:
1-33
34-106
107-108
109-349
350-351
352-421
G-Flamp系列探针组成示意:
RSET
mlCNBD(213-285)
cpGFP
mlCNBD(286-355)
连接肽 1
连接肽 2

图 1

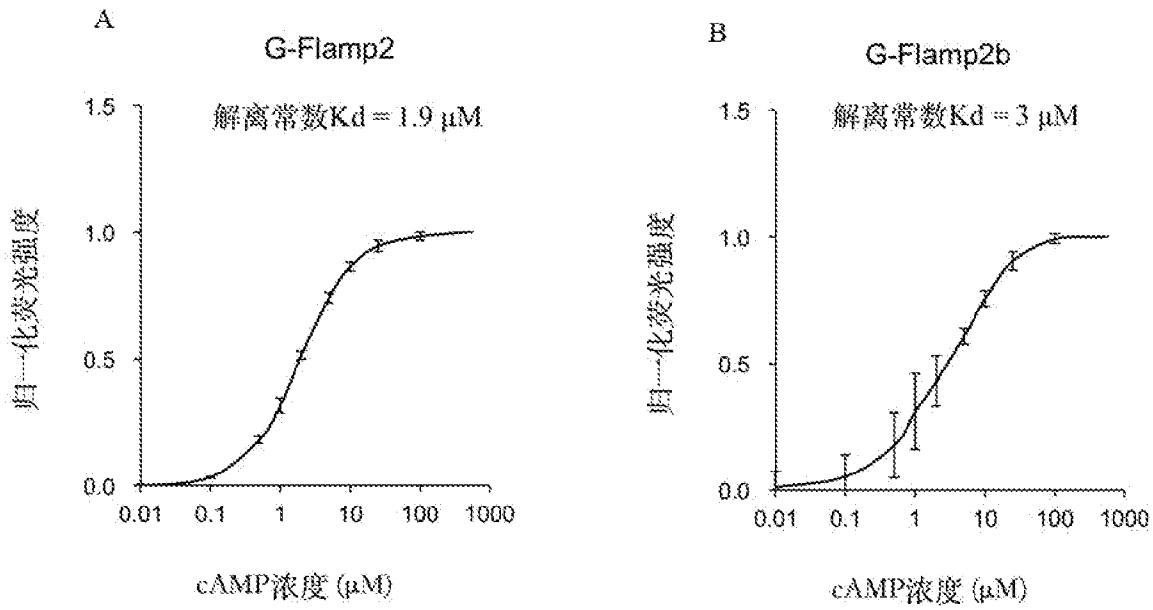
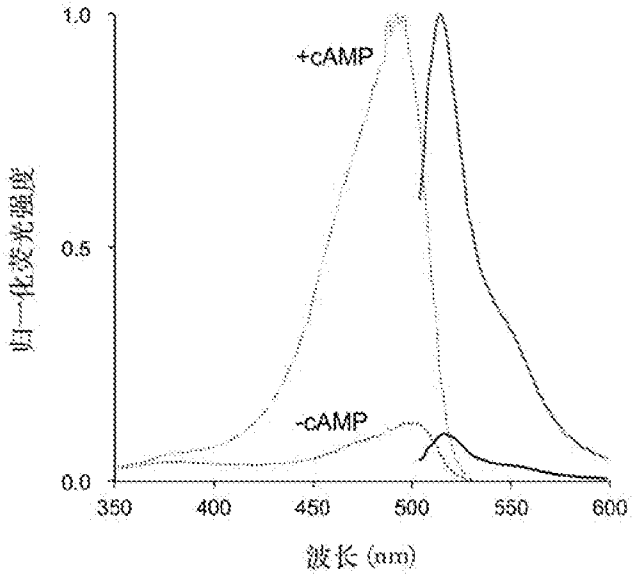

A
G-Flamp2
解离常数Kd = 1.9 μM
归一化荧光强度
1.5
1.0
0.5
0.0
0.01
0.1
1
10
100
1000
cAMP浓度 (μM)
B
G-Flamp2b
解离常数Kd = 3 μM
归一化荧光强度
1.5
1.0
0.5
0.0
0.01
0.1
1
10
100
1000
cAMP浓度 (μM)

图 2

A


1.0
0.5
0.0
归一化荧光强度
+cAMP
-cAMP
350
400
450
500
550
600
波长 (nm)

B

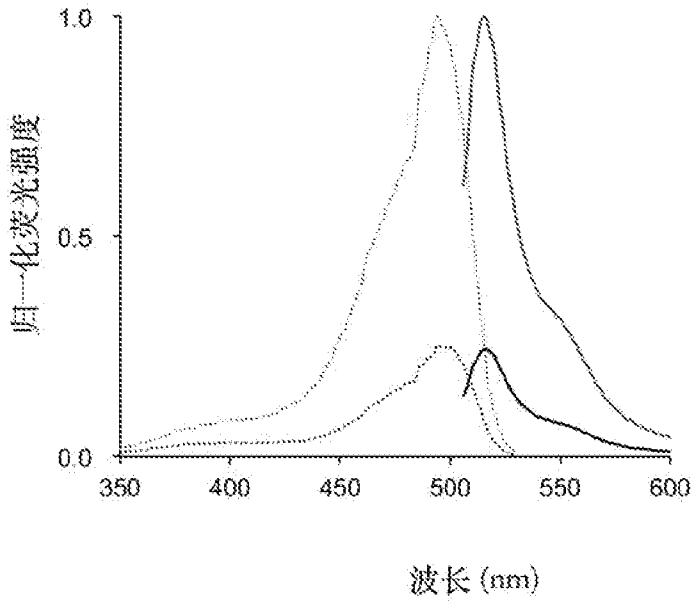

1.0
0.5
0.0
归一化荧光强度
350
400
450
500
550
600
波长 (nm)

图 3

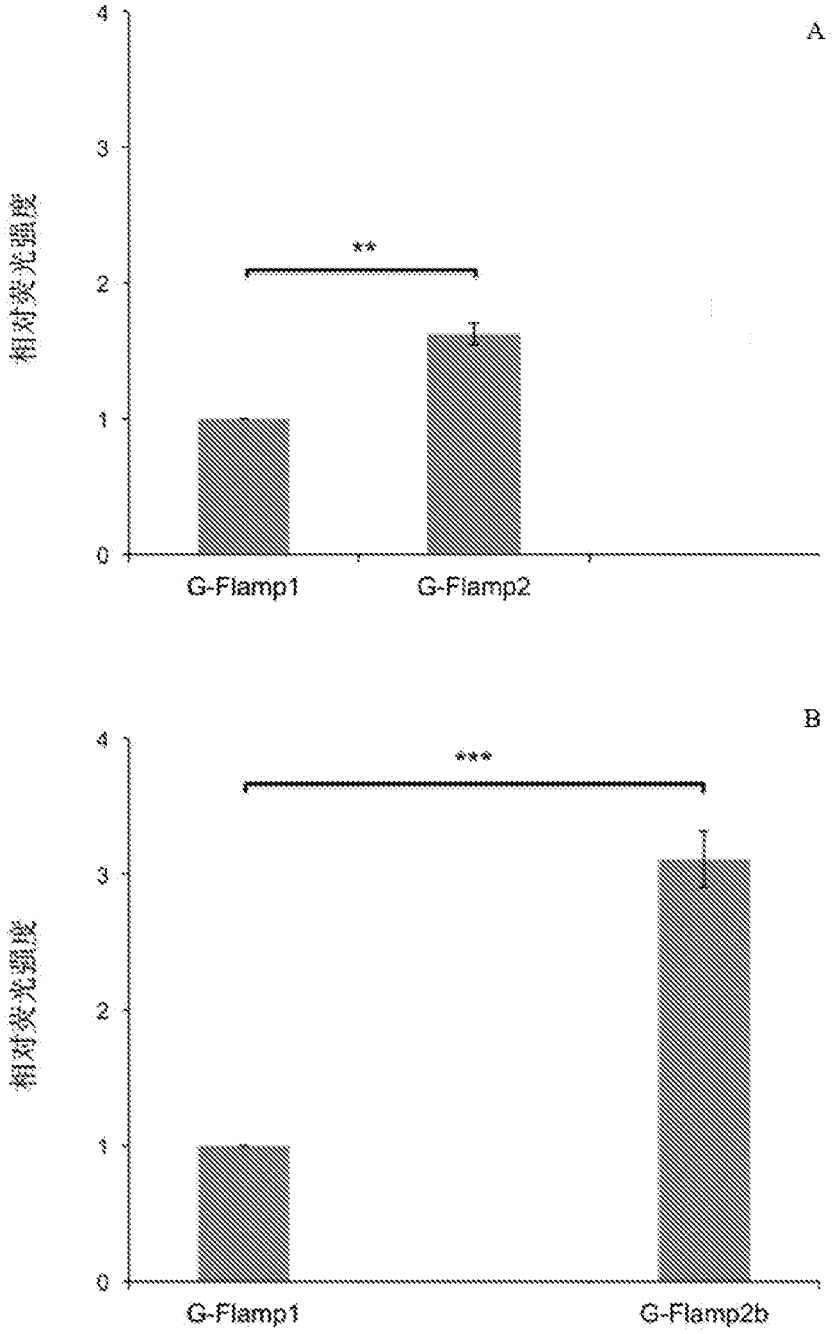
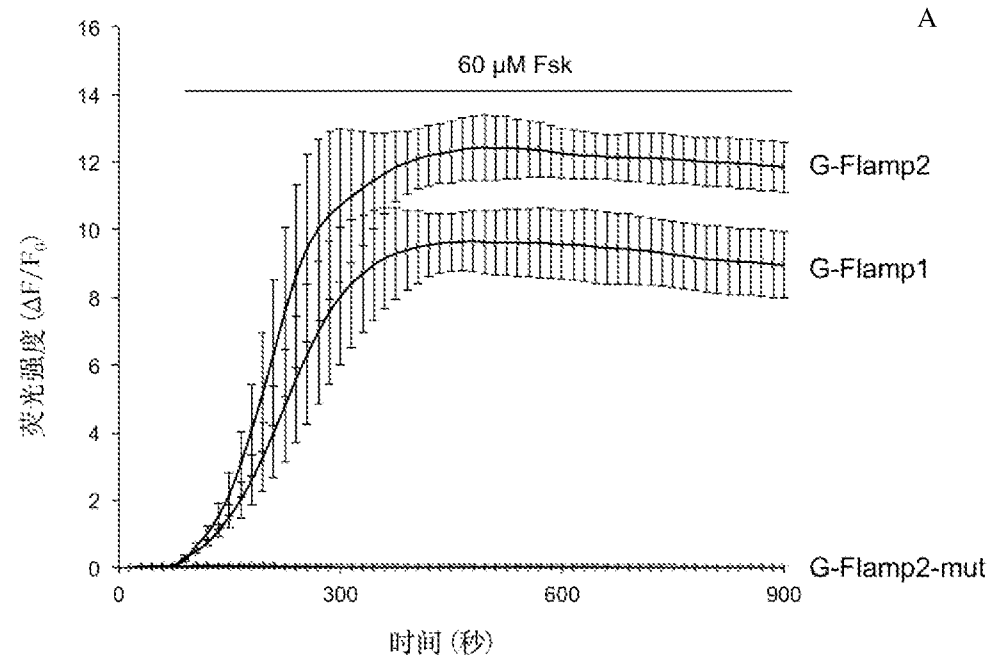

A
相对荧光强度
4
3
2
1
0
**
G-Flamp1
G-Flamp2
B
相对荧光强度
4
3
2
1
0
***
G-Flamp1
G-Flamp2b

图 4


A
60 μM Fsk
G-Flamp2
G-Flamp1
G-Flamp2-mut
荧光强度 (ΔF/F0)
时间 (秒)
0
2
4
6
8
10
12
14
16
0
300
600
900

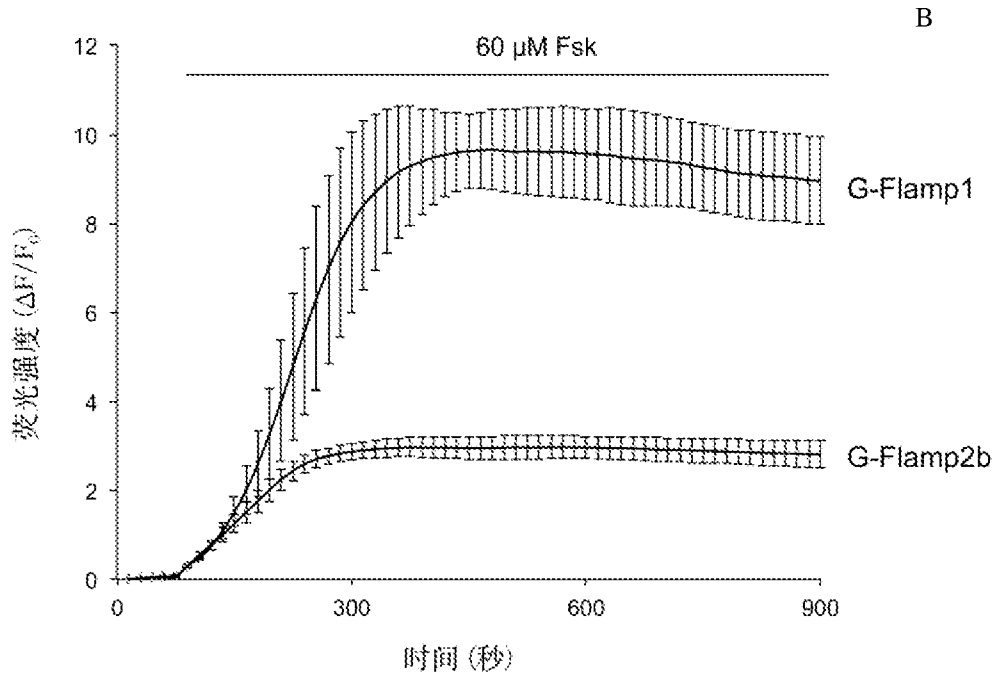

B
60 μM Fsk
G-Flamp1
G-Flamp2b
荧光强度 (ΔF/F0)
时间 (秒)
0
2
4
6
8
10
12
0
300
600
900

图 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2022/128591

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 19/00(2006.01)i; C12N 15/62(2006.01)i; G01N 21/64(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K,C12N,G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNTXT, VEN, VCN, WPABSC, EXTXT, WOTXT, USTXT, PATENTICS, CNKI, 万方, WANFANG, PUBMED, NCBI, EBI, 百度学术, BAIDU SCHOLAR, BING, STN: cAMP, 环腺苷酸, 绿色荧光, 探针, Green fluorescent, probe, G-Flamp, 序列1-2

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 113567402 A (SHENZHEN INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 29 October 2021 (2021-10-29) abstract, claim 10, and description, embodiment 1	5, 6, 8, 9
A	CN 113567402 A (SHENZHEN INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 29 October 2021 (2021-10-29) entire document	1-4, 7
X	CN 113024674 A (SHENZHEN INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 25 June 2021 (2021-06-25) abstract and claims 1-17	5, 6, 8, 9
A	CN 113024674 A (SHENZHEN INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 25 June 2021 (2021-06-25) entire document	1-4, 7
X	CN 109627344 A (SHENZHEN INSTITUTE OF ADVANCED TECHNOLOGY) 16 April 2019 (2019-04-16) abstract and claims 1-17	5, 6, 8, 9

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
23 June 2023	**28 June 2023**
Name and mailing address of the ISA/CN **China National Intellectual Property Administration (ISA/CN)** **China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088**	Authorized officer Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 109627344 A (SHENZHEN INSTITUTE OF ADVANCED TECHNOLOGY) 16 April 2019 (2019-04-16) entire document	1-4, 7
X	US 2007111270 A1 (THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY) 17 May 2007 (2007-05-17) abstract and claims 1-37	5, 6, 8, 9
A	US 2007111270 A1 (THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY) 17 May 2007 (2007-05-17) entire document	1-4, 7
X	ZHANG, Jiayuan et al. "A Novel Fluorescent Sensor for cAMP Based on E. Coli CAP Protein" *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences,* 31 December 2019 (2019-12-31), pages 556-560	5, 6, 8, 9
A	ZHANG, Jiayuan et al. "A Novel Fluorescent Sensor for cAMP Based on E. Coli CAP Protein" *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences,* 31 December 2019 (2019-12-31), pages 556-560	1-4, 7
X	KAWATAA, S., et al. "Green Fluorescent cAMP Indicator of High Speed and Specificity Suitable for Neuronal Live-cell Imaging" *PNAS,* 06 July 2022 (2022-07-06), pages 1-8	5, 6, 8, 9
A	KAWATAA, S., et al. "Green Fluorescent cAMP Indicator of High Speed and Specificity Suitable for Neuronal Live-cell Imaging" *PNAS,* 06 July 2022 (2022-07-06), pages 1-8	1-4, 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2022/128591

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed.
   b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)),
      ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2022/128591

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN 113567402 A	29 October 2021	None	
CN 113024674 A	25 June 2021	None	
CN 109627344 A	16 April 2019	None	
US 2007111270 A1	17 May 2007	US 8236523 B2	07 August 2012

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2022/128591

A. 主题的分类

C07K 19/00(2006.01)i; C12N 15/62(2006.01)i; G01N 21/64(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07K, C12N, G01N

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用））

CNTXT, VEN, VCN, WPABSC, EXTXT, WOTXT, USTXT, PATENTICS, CNKI, 万方, PUBMED, NCBI, EBI, 百度学术, BING, STN：cAMP，环腺苷酸，绿色荧光，探针, Green fluorescent，probe，G-Flamp，序列1-2

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 113567402 A (中国科学院深圳先进技术研究院) 2021年10月29日 (2021-10-29) 摘要、权利要求10以及说明书实施例1	5, 6, 8, 9
A	CN 113567402 A (中国科学院深圳先进技术研究院) 2021年10月29日 (2021-10-29) 全文	1-4, 7
X	CN 113024674 A (中国科学院深圳先进技术研究院) 2021年6月25日 (2021-06-25) 摘要及权利要求1-17	5, 6, 8, 9
A	CN 113024674 A (中国科学院深圳先进技术研究院) 2021年6月25日 (2021-06-25) 全文	1-4, 7
X	CN 109627344 A (深圳先进技术研究院) 2019年4月16日 (2019-04-16) 摘要及权利要求1-17	5, 6, 8, 9
A	CN 109627344 A (深圳先进技术研究院) 2019年4月16日 (2019-04-16) 全文	1-4, 7
X	US 2007111270 A1 (THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY) 2007年5月17日 (2007-05-17) 摘要及权利要求1-37	5, 6, 8, 9

☑ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"D" 申请人在国际申请中引证的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

"X" 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

"Y" 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2023年6月23日	2023年6月28日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	受权官员 管冰 电话号码 (+86) 010-53961945

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	US 2007111270 A1 (THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY) 2007年5月17日 (2007-05-17) 全文	1-4,7
X	ZHANG,J.Y.,等. "A novel fluorescent sensor for cAMP based on E. coli CAP protein" Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences, 2019年12月31日 (2019-12-31), 第556-560页	5,6,8,9
A	ZHANG,J.Y.,等. "A novel fluorescent sensor for cAMP based on E. coli CAP protein" Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences, 2019年12月31日 (2019-12-31), 第556-560页	1-4,7
X	KAWATAA,S.，等. "Green fluorescent cAMP indicator of high speed and specificity suitable for neuronal live-cell imaging" PNAS, 2022年7月6日 (2022-07-06), 第1-8页	5,6,8,9
A	KAWATAA,S.，等. "Green fluorescent cAMP indicator of high speed and specificity suitable for neuronal live-cell imaging" PNAS, 2022年7月6日 (2022-07-06), 第1-8页	1-4,7

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2022/128591

第I栏　核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列表进行的：

a. ☑ 作为国际申请的一部分提交的：

b. ☐ 为国际检索的目的在国际申请日之后提交（细则13之三.1(a)），

☐ 附有说明序列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。

2. ☐ 本报告是在没有收到符合WIPO ST.26标准的序列表的情况下，考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列，在可进行有意义检索的范围内做出的。

3. 补充意见：

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2022/128591

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	113567402	A	2021年10月29日	无			
CN	113024674	A	2021年6月25日	无			
CN	109627344	A	2019年4月16日	无			
US	2007111270	A1	2007年5月17日	US	8236523	B2	2012年8月7日