综述

细胞内氧化还原状态荧光探针的原理与应用

刘　奥，祁　星，张颖超，徐天雪，易　静，杨　洁
上海交通大学 医学院生物化学与分子细胞生物学系，上海市肿瘤微环境与炎症重点实验室，上海 200025

[摘要] 细胞的氧化还原状态或活性氧水平是其基本的生理特征。它自身受到精细的调控，同时也调控细胞功能，在细胞、机体的生理和病理活动中扮演重要角色。检测细胞氧化还原状态及其变化是目前基础研究和临床研究中的重要内容。该文就目前检测方法中的荧光探针做一综述。通过介绍不同荧光探针的原理和特征，尤其是遗传编码荧光蛋白探针的原理和应用，理解荧光探针在基础研究和疾病相关研究中的应用，并展望其在细胞及动物整体水平新的应用前景。

[关键词] 氧化还原状态；活性氧；荧光探针；遗传编码荧光蛋白探针
[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2018.01.020　[中图分类号] R319　[文献标志码] A

Principle and applications of fluorescent probes for intracellular redox detection

LIU Ao, QI Xing, ZHANG Ying-chao, XU Tian-xue, YI Jing, YANG Jie
Department of Biochemistry and Molecular Cell Biology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine; Shanghai Key Laboratory for Tumor Microenvironment and Inflammation, Shanghai 200025, China

[Abstract] Redox state indicated by reactive oxygen species (ROS) level is a cellular physiological feature. Redox status is exactly controlled by conserved system. Its alterations consequently modulate various biological activities and play important roles in cells and organism under physiological and pathological conditions. Hence detection of redox state is deemed as an important technique both in basic and clinical researches. The present article reviews the principle and current applications of fluorescent probes or sensors for redox detection. With comparison of properties of various probes, especially genetic coding fluorescence probes, much understanding will be gained. And the review helps us to understand how to apply the redox probes on the biological and clinical researches and eventually look forward to new applications in the cell and whole animal level.

[Key words] redox; reactive oxygen species; fluorescent probe; genetic coding fluorescence probe

细胞的氧化还原状态（reduction-oxidation state，redox state）通常是指细胞内氧化还原反应的平衡状态，即电子在生物分子之间传递的平衡状态。当细胞内氧化活性或还原活性物质增多时，细胞的氧化还原状态改变。蛋白质、脂质、核酸等生物大分子的氧化还原状态会随之改变，进而引发自身活性改变，启动或调控细胞内信号转导，造成细胞凋亡、衰老、恶性转化等变化，最终与机体生理状态异常、病理状态乃至肿瘤、神经退行性疾病等疾病的发生相关 [1]。因而细胞内氧化还原状态成为评估细胞生理和病理状态的重要指标。

细胞内的氧化活性物质主要是活性氧（reactive oxygen species，ROS），是含氧自由基和易形成自由基的过氧化物的总称。常见的 ROS 有超氧阴离子（$O_2^{\cdot -}$）、羟自由基（· OH）、过氧化氢（H_2O_2）、单线态氧（$^1O_2$）、次氯酸（HClO）等 [2]。细胞内同时存在进化上保守的抗氧化体系，包括小分子谷胱甘肽（glutathione，GSH）、超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）、过氧化氢酶（catalase，CAT）、硫氧还蛋白（thioredoxin，Trx）系统、谷氧还蛋白（glutaredoxin，Grx）系统等 [3]。细胞的氧化还原状态主要依靠 ROS 的产生和抗氧化系统对其的清除来维持，因而 ROS 的水平在一定程度上反映细胞内氧化还原的状态。

正因 ROS 种类较多、性质活泼，且细胞内同时存在多种抗氧化物，故一直以来细胞内的 ROS 都较难检测 [4]。另外，因细胞内不同的亚细胞区室有特异的氧化还原改变，它们的基础氧化还原能力不同，线粒体最低，内质网最高；它们对氧化还原变化的感受能力不同，有的较为敏感，有的则较为耐受；同时它们对细胞的影响也不同。因而，检测亚细胞区室的氧化还原状态也有重要的意义。综上所述，

[基金项目] 国家自然科学基金（31230037）；上海市自然科学基金（16ZR1418400）（National Natural Science Foundation of China, 31230037；Natural Science Foundation of Shanghai, 16ZR1418400）。
[作者简介] 刘　奥（1995—），女，本科生；电子信箱：2724632122@qq.com。
[通信作者] 杨　洁，电子信箱：yangjieyj@shsmu.edu.cn。

理想的 ROS 探针需要具备以下特点：①对 ROS 含量变化高度敏感，检测数值变化范围大。②对某种 ROS 分子具有特异性。③可在活细胞中进行动态监测。④定位于亚细胞结构。⑤较细胞自身的氧化还原反应迅速。⑥不易受 pH 值、细胞色素 C 等干扰。因此，寻找理想的探针已成为自由基生物学领域的关键问题 [5]。目前，细胞中 ROS 的检测方法主要分为 4 大类：电子自旋共振法、分光光度法、化学发光法和荧光探针法。其中荧光探针法凭借高分辨率、高灵敏度、可提供细胞氧化还原实时的时间和空间信息等优点成为较为理想的探针，在研究中得到广泛应用。本文将综述各种荧光探针的特点、检测结果的解读及其应用。

ROS 荧光探针主要分为化学荧光探针和遗传编码的荧光探针。化学荧光探针有识别基团与特定 ROS 成分结合，而发光基团转化为荧光信号 [6]。有的化学荧光探针本身无色、稳定存在，但一旦与 ROS 结合，就生成强荧光性产物，产物的荧光强度即反映 ROS 水平。遗传编码的荧光蛋白探针具有不同的特点。首先，它们的构象因氧化还原变化而改变，出现可定量检测的荧光信号变化。因蛋白质的氧化通常发生于巯基，荧光蛋白探针也因巯基氧化发生发射光能量的改变，其强度与氧化程度成正比。另外，荧光蛋白探针也可以因本身拥有 2 种激发光波长优势峰，它们均随巯基氧化还原状态改变而改变；其中一种激发光激发后发射光强度下降，而另一种则相反，呈现出比值变化，可使探针更敏感。这类探针的另一个特点是它们的基因已知，可通过分子生物学方法构建其表达载体，并可实现特定氨基酸残基的定点突变以产生探针突变体。这些载体可被导入细胞内，使细胞表达活性荧光蛋白质，在活细胞水平实时检测其变化 [7-9]。

总的来说，化学荧光探针有相对较好的特异性和较强的荧光强度，但却难以实现 ROS 的亚细胞水平检测以及随时间变化的动态检测，而遗传编码的荧光蛋白探针实现了上述目标。遗传编码的荧光蛋白探针包括氧化还原敏感的绿色荧光蛋白家族（redox-sensitive green fluorescence protein，roGFPs）和环形黄色荧光蛋白（circularly permuted yellow fluorescent protein，cpYFP）改造的 HyPer 家族。本文通过综述探针的特点，期望能够更好地了解这些探针工具并拓展其应用范围，从而有助于解决生物学和生命科学中与 ROS 相关的重要问题。

1 化学荧光探针

1.1 氢化乙锭

氢化乙锭（hydroethidine，HE）在细胞内被 $O_2^{\cdot -}$ 氧化，氧化产物结合于 DNA 上，发出红色荧光，荧光强度指示了细胞内 $O_2^{\cdot -}$ 的水平 [10]。HE 具有细胞膜通透性，也是一种用于检测活细胞 $O_2^{\cdot -}$ 的探针。因线粒体膜带有强负电位，当利用 1 个己基连接器共价修饰 HE 后形成 1 个三苯基阳离子，使其带正电并且具有亲脂性，得到其定位于线粒体的衍生物 Mito-HE，能够在线粒体内优先积累高达 100 ～ 1 000 倍，商品名为 Mito-SOX Red（Invitrogen）。另外，线粒体内的 DNA 和 RNA 也能够增强氧化型 Mito-HE 的荧光。上述特点使 Mito-HE 更有益于监测线粒体内的超氧化物。Mito-HE 还具有细胞损伤小和动态检测的优点 [11]。目前 HE 因其操作简便，被广泛用于细胞的 $O_2^{\cdot -}$ 检测，考察生理、病理状态下生成 $O_2^{\cdot -}$ 的 NADPH 氧化酶的活性和对细胞的影响，如 miR-23a 调控 $CD4^+$ 细胞坏死的机制 [12]。但 HE 的缺点是当其与 $O_2^{\cdot -}$ 反应时，生成的中间产物可能被另一种 ROS 种类 H_2O_2 氧化，生成的产物不同于溴化乙锭（ethidium），而波长却与之相近，使 $O_2^{\cdot -}$ 检测的特异性降低。

1.2 2’，7’- 二氯二氢荧光素二乙酸酯和二氢罗丹明 123

2’，7’- 二氯二氢荧光素二乙酸酯（2’，7’-dichlorofluorescein diacetate，DCFH-DA）本身无荧光，可自由进入细胞，经胞内酯酶催化去除 DA 基团后，DCFH 可被细胞内的 ROS 氧化为荧光产物 2’，7’- 二氯荧光素（DCF）。DCF 荧光强度即反映 ROS 的量，目前已被广泛用于测量细胞 ROS 的水平 [13]。该探针对各种 ROS 都存在响应，虽然选择性较差，但可反映细胞内总体 ROS 水平，故应用也较为广泛。DCFH 探针的主要缺陷在于 DCF 的膜渗透性使其容易泄漏出细胞，因而不能用于检测缓慢产生的 H_2O_2，由此开发的氯衍生物 cm-DCFH-DA 则部分克服该缺陷 [14]。另外高浓度的 DCFH 对细胞有一定毒性，限制了其动态持续检测的应用。

二氢罗丹明 123（dihydrorhodamine 123，DHR123）的原理是其与 ROS 反应生成罗丹明 123。与 DCFH-DA 不同的是，罗丹明 123 为带正电的脂溶性分子，可在线粒体膜电位的作用下聚集于线粒体内而不漏出细胞，具有一定的稳定性。但 DHR123 受细胞色素 C、pH 值、抗氧化剂、自身氧化状态的影响，造成检测时的不稳定。DHR123 不具有膜通透性，不能在活细胞水平检测，是其另一缺陷 [15]。

目前 DCFH-DA、DHR123、HE 是细胞内 ROS 检测的常规方法。DCFH-DA 可检测 $O_2^{\cdot -}$、· OH、H_2O_2，DHR 123 可检测 H_2O_2、X−NH_2、HOCl，HE 可检测 $O_2^{\cdot -}$ [16]。这些探针应用于生物学研究，用于发现新的抗氧化功能蛋白

质、探讨细胞氧化还原调控的机制及其在炎症反应等生物学过程中的意义 [12]。同时，它们也应用于医学基础研究，探究抗氧化药物影响的 ROS 在肿瘤发生和治疗敏感性中的作用以及 DNA 修复异常造成造血干细胞功能异常的 ROS 机制，也用于探讨心血管疾病、肺损伤、神经退行性疾病中 ROS 的致病机制或干预 ROS 的治疗策略开发 [17-18]。值得一提的是，DHR123 也用于临床肉芽肿患者血中性粒细胞和单核细胞 ROS 水平检测，并发现适中的 ROS 水平患者比低水平者病情更轻，长期生存率可能也更高，对于临床治疗和预后评估有高度的借鉴意义 [19]。

1.3 其他

氨基苯基荧光素（aminophenyl fluorescein，HPF）与羟苯基荧光素（hydroxyphenyl fluorescein，APF）是 2 种新开发的荧光探针。前者特异检测 · OH，后者则同时对 HClO 和 · OH 产生响应；当二者联用时，可用于选择性检测 HClO[20]。因 HPF 与 APF 的特异性和抵抗自动氧化的能力均优于 DCFH，可能提示其在某些领域的应用价值 [21]。在化学发光性荧光探针的开发探索中，主要目标是寻找新的探针，或改进原有探针以提高敏感性和特异性，如 · OH 检测探针 Spy-OH（swallow-tailed perylene derivative for detecting OH）、检测 $^1O_2$ 的单态氧荧光探针（singlet oxygen sensor green）、$O_2^{\cdot -}$ 检测探针 3’，6’-双（二苯基膦）荧光素[3’，6’-bis（diphenylphosphiny）fluorescein][22-24]。

2 遗传编码的荧光蛋白探针

遗传编码的荧光蛋白探针是以荧光蛋白为基础，经突变改造为对氧化还原敏感的结构，且通过荧光强度的测量反映氧化还原程度，指示细胞氧化还原状态。其中应用较多的是 roGFPs 和 cpYFP 改造的 HyPer 家族 [8-9]。

2.1 roGFPs

2.1.1 roGFP1 和 roGFP2 探针的特点 roGFPs 是氧化还原探针中具有代表性的庞大家族，常用的探针 roGFP1 和 roGFP2 分别通过在野生型 GFP 和增强型 GFP（enhanced GFP，EGFP）中进行突变而成 [25]。GFP 的发色基团由 3 个氨基酸 S65、Y66、G67 的内部环化构成，并且具有 2 个激发光峰值，分别是 395 ～ 405 nm 和 470 ～ 490 nm，由 Y66 的质子化状态和去质子化状态决定，而发射光波长均为 505 nm[26]。EGFP 为 GFP 的 S65 突变体，因荧光强度增强而得名。探针将 GFP 的 β 链 S147 和 Q204 突变为氧化还原敏感的半胱氨酸残基（Cysteine，Cys）。当 Cys147 与 Cys204 因氧化形成二硫键时，可能引起 Y66 质子化状态的改变，395 nm 激发后 505 nm 处荧光强度下降，而 475 nm 激发后 505 nm 处荧光强度增强，用这样的荧光强度比值（表示为 395 nm/475 nm）改变代表氧化还原的变化，成为比率型探针（ratiomeric），也大大提高了检测的敏感性 [27]。roGFP2 与 roGFP1 相比，在荧光强度比值的动态变化范围上，roGFP2 更大，提示其可能更敏感 [28]。

roGFPs 的检测反应时间较长，需要数分钟，适合于检测稳定、持久的氧化还原状态改变 [29]。此外，roGFPs 也更适用于氧化势能低的亚细胞结构，如细胞质、线粒体等。若被定位在内体、溶酶体和内质网等结构，roGFPs 则被完全氧化而失去检测功能 [30]。目前针对这些不足，对 roGFPs 进行了改造。roGFP1-R12 和 roTurbo 是反应速率增加的变体，roGFP1-iL 为可检测氧化势能高的亚细胞结构的变体，ERroGFP-iL 为检测内质网定位的变体 [31-36]。

roGFP2 的改造，主要是实现了检测 H_2O_2 的特异性。Gutscher 等 [37] 在 roGFP2 融合了酵母过氧化物酶 Orp1。Orp1 是 GSH 过氧化物酶家族的一员，与 H_2O_2 特异性反应，并促进 roGFP2 的巯基－二硫键转换，使 roGFP2-Orp1 能够特异性检测细胞内的 H_2O_2。roGFP2-Orp1 与 roGFP2 的光谱性质相似，并具有 pH 值稳定性，对 H_2O_2 也更敏感 [37]。另外，Grx1-roGFP2 探针也由上述研究团队开发。利用 Grx1 催化 GSH 与氧化型底物反应的原理，将 Grx1 与 roGFP2 融合，能够反映细胞内 GSH 氧化还原电势，可检测到 nmol/L 的氧化型 GSH（GSSG）和 μmol/L 的还原型 GSH，同时也具有更快的反应速度；该探针已应用于探索细胞在环境生长因子、免疫受体刺激、不同细胞生长密度等条件下的氧化还原调控，成为目前有效的检测 GSH 氧化还原电势的工具 [38-39]。将 Grx1-roGFP2 与 roGFP2-Orp1 同时应用，可分别考察同一细胞、组织或动物中 GSH 和 H_2O_2 的不同变化，区分氧化和抗氧化体系变化的时空动力学 [40]。roGFP2- PTS1 则为过氧化物酶体相对特异的探针，用来发现亚细胞结构之间的影响 [41]。

需要注意的是，一些 roGFPs 在双激发波长下的发射波长均受 pH 值的影响。虽可被发射光强度的比值纠正，但 roGFP2 仍被证实受 pH 值影响较大，所以在酸性或碱性细胞器中使用时要特别注意。roGFPs 的另一缺点是合成过程中会伴随 H_2O_2 的产生，影响检测的准确性，同时会对细胞产生损害 [8]。

2.1.2 探针的应用 已广泛应用 roGFPs 探索细胞生物学和自由基生物学的基本问题，包括调控细胞质、线粒体、

内质网氧化还原状态的分子机制[42-43]。同时探针也应用于体外传代细胞或小鼠原代培养细胞上，探索 ROS 和氧化还原信号转导在各种病理因素导致的疾病中的作用。这些研究将探针应用于神经胶质细胞、神经元等，检测 ROS 对线粒体基质腔、膜间腔、细胞质等的影响[44]；同时应用于特定基因敲除的果蝇，用以解释类人类帕金森病的致病机制[45-46]。研究也应用探针揭示氧化应激在烟草、低氧等造成的肺成纤维细胞、肺动脉平滑肌细胞的病理改变中的重要角色[47-49]；其中在完整的小鼠肺切片上应用腺病毒载体将探针导入肺上皮细胞，考察缺氧对不同年龄小鼠的肺损伤和氧化还原机制，也拓展了在模拟在体的离体新鲜组织中应用探针的方式[50]。Grx1-roGFP2 被用于检测巨噬细胞的 GSH 在 HIV 感染潜伏期和活动期中的变化[51]。较接近机体生理模型的是同时应用探针 Grx1-roGFP2 和 roGFP2-Orp1 制作转基因果蝇，探讨发育和衰老 2 个重要生物过程中，H_2O_2 和 GSH 偶联相关、不同亚细胞区室水平和组织特异的氧化还原改变相关的分子机制[52]。

氧化还原探针转基因小鼠模型的建立，再次大大推进了探针的应用。研究首先成功构建红细胞特异表达 roGFP2 的转基因小鼠，并用于探讨红细胞衰老的机制[53]。皮肤特异性 *roGFP1* 转基因小鼠则用于考察不同紫外线通过 ROS 影响皮肤衰老的机制[54]。最近，roGFP1 特异表达于神经细胞的细胞质和线粒体的转基因小鼠，同样实现了整体动物水平上特异细胞类型、特定亚细胞定位和实时检测，有效地用于神经病理学研究[44]。

2.2 Hyper 家族

2.2.1 HyPer、HyPer-2 和 HyPer-3 的特点 HyPer 是由 Belousov 等[55]利用 cpYFP 融合细菌的 OxyR 改造的探针，是高度特异的 H_2O_2 检测探针。在总的构建原理上，利用 cpYFP 的构象对环境变化高度敏感的特点，在其末端融合 1 个多肽连接段，再在这个新的末端融合 1 个氧化还原敏感的感受结构域。当氧化还原状态发生改变，感受结构域构象改变、连接段及 cpYFP 的继发构象改变使荧光蛋白信号改变。HyPer 探针融合的氧化还原敏感结构域为大肠埃希菌蛋白 OxyR 的调节结构域（regulatory domain，OxyR-RD），其上 Cys199 和 Cys208 被 H_2O_2 氧化形成二硫键，这个构象的改变使 cpYFP 荧光性质发生变化；在双优势峰值 420 nm 和 500 nm 激发时，发射波长 516 nm 的荧光强度分别降低和升高，荧光强度的比值（表示为 500 nm/420 nm）因氧化而增加，因此 HyPer 是特异检测 H_2O_2 的高灵敏度的比率型探针[56]。与 roGFP 的反应性半胱氨酸对相比，OxyR-RD 半胱氨酸对（Cys199 和 Csy208）的氧化还原能力居中，因此适用于不同的亚细胞结构，如细胞质、细胞核、线粒体以及过氧化物酶体和内质网[57]。但是，HyPer 探针在活细胞内的检测比率范围较小，同时 pH 值对探针有较大影响[58-59]。另外，未融合 OxyR 的 cpYFP 也被发现与超氧阴离子发生反应而出现荧光强度的变化，影响了检测特异性。

HyPer-2 和 HyPer-3 是通过突变 OxyR-RD 得到的。HyPer2 为 A406V 随机突变产物，HyPer3 是 H34Y 突变体[60-61]，突变后动态检测范围增加到原来的 2 倍。但因 OxyR 以二聚体形式与 H_2O_2 反应，而 HyPer2 或 HyPer3 突变体均影响二聚体形成，故这 2 个探针的反应速度发生了改变，氧化速率 HyPer2> HyPer3>HyPer，还原速率 HyPer2> HyPer>HyPer3[61]。在 3 种探针中，HyPer3 因较 HyPer 扩展了动态检测范围，又较 HyPer2 有更适中的反应速率，故可能有较强的应用潜力。

HyPer-tau 探针是通过在探针上结合微管相关蛋白 tau 实现对 H_2O_2 空间分布变化的检测，同时也检测到在脂多糖（LPS）刺激后巨噬细胞伪足等区域的 H_2O_2 变化。另外该探针也可指示 H_2O_2 沿微管在细胞质扩散的方向，增加了 H_2O_2 检测的空间性[62]。

HyPerRed 探针是由 Ermakova 等[63]在 2014 年开发的第 1 个红色荧光探针，在敏感性上已经证明与绿色荧光的 HyPer 相似。同时，当抑制内质网吸收 Ca^{2+} 时，利用该探针监测到在线粒体基质中局部的短暂 H_2O_2 产生，提示可能具有更快的反应速度和更强的灵敏度。

2.2.2 探针的应用 HyPer 探针首先应用于培养细胞，探究各种生理、病理状态下 H_2O_2 的变化和对其的调控，也检测亚细胞区室如内质网中 H_2O_2 的生成[64]。更进一步的研究应用于模式生物，在生物整体水平观察 H_2O_2 的水平，实现实时和可视化的优点。在斑马鱼中导入探针，观察创伤局部炎症细胞 H_2O_2 的产生和旁分泌，探讨其对表皮细胞的影响[65-66]。HyPer 也被应用于秀丽隐杆线虫的整体水平，探讨 H_2O_2 在发育和衰老中的作用[67]。虽然目前仍无该探针的转基因小鼠模型，但上述研究也对解决高等生物的重要科学问题提供了线索。

2.3 其他遗传编码荧光蛋白探针

2.3.1 mt-cpYFP 人们发现在构建 Ca^{2+} 探针时，荧光蛋白 cpYFP 却因氧化而增加荧光强度，且证明氧化物主要为线粒体来源的 $O_2^{\cdot -}$。当融合了线粒体基质信号肽后，探针成为具有空间定位的 $O_2^{\cdot -}$ 探针（mt-cpYFP），且荧光强度会因氧化而快速增加，称为荧光闪烁[68-70]。此后探针转基因小鼠成功构建，在该动物模型上发现骨骼肌细胞线

粒体 $O_2^{\cdot -}$ 的产生与糖代谢的偶联[71]。探针也在线虫整体水平上观察骨骼肌线粒体中荧光闪烁的频率，探讨可能的 $O_2^{\cdot -}$ 或自由基与衰老和生命期的关系[72]。但近年来也有研究指出，mt-cpYFP 荧光变化可能是由于 pH 值的变化引起，因此，将 mt-cpYFP 作为监测线粒体内的 $O_2^{\cdot -}$ 探针仍需进一步探索[68, 73]。

2.3.2 NAD^+ 探针　除 ROS 以外，NAD^+、NADH 也是反映细胞能量代谢状态的重要物质。它们是活细胞中重要的辅酶，参与能量代谢、生物合成等生物学过程。NADH 的体外分析已经有很多方法，但这些方法敏感性低并且容易造成细胞损伤，且特异性欠佳。将 cpYFP 插入到细菌蛋白 Rex 的二聚体间，利用 Rex 与 NADH 特异结合的特性，同时构象的改变可使 cpYFP 荧光发生变化，探针命名为 Frex，具有敏感性高、扰动小、可融合亚细胞定位信号，并且能够在单个活细胞甚至细胞器中进行动态检测的优点[74]。之后研究者再次改造，荧光比率提高了 3 倍，将其命名为 SoNar，并应用于细胞代谢的研究；同时将其应用于活细胞水平高通量的靶向药物筛选，发现化合物 KP372-1 可在低浓度下广泛杀伤不同人体组织来源的癌细胞[75-77]。

综上所述，总结上述 2 类探针的特点和改造过程，详见表 1。

表 1 遗传编码的荧光蛋白探针的特点
Tab 1 Properties of genetically encoded redox sensors

探针	检测特异性	激发波长 /nm	发射波长 /nm	适合检测的亚细胞区域
roGFP1	GSH/GSSG	405/475	505	细胞质、线粒体、细胞核[25]
roGFP1-iL	GSH/GSSG	395/465	505	内质网[31-34]
roGFP2	GSH/GSSG	400/490	505	细胞质、线粒体、细胞核[25, 28]
roGFP2-Orp1	H_2O_2	400/490	505	细胞质、线粒体[37]
Grx1-roGFP2	GSH/GSSG	408/488	500 ～ 530	细胞质[38]
HyPer	H_2O_2	420/500	516	细胞质、线粒体、过氧化物酶体、细胞核、内质网[55]
HyPer2	H_2O_2	420/500	516	细胞质[60]
HyPer3	H_2O_2	420/500	516	细胞质[61]
SoNar	NAD^+/NADH	420/485	528	细胞质、线粒体[76-77]

3 展望

遗传编码的荧光探针具有高度的反应性和选择性，能够检测细胞内的氧化还原事件，在细胞水平、组织水平及整体模式生物水平提供敏感的比率检测、亚细胞定位和实时检测，是细胞生物学、自由基生物学、医学研究的重要工具。然而，探针的动力学、pH 值和特异性仍然是限制其发展的原因[39]。提高现有探针的亮度、光稳定性等会大大增加应用潜力。此外，现有的探针大多为绿色荧光成像，而红色探针能够解决组织自发荧光的干扰问题并且可能形成多色成像，成为探针开发的重要方向。在检测种类上，由于细胞内过氧化物水平在自由基代谢和信号转导中的重要作用也成为需要检测的物质，因而目前本领域也以过氧化物氧还蛋白（peroxiredoxin，Prx）为氧化还原感受结构域开发检测探针[78]。在探针的应用上，研究者也在探索多种探针的小鼠在体应用，并在组织切片上检测氧化还原状态，从而绘制各组织的氧化还原图谱，探讨其在肿瘤生长、炎症、营养缺乏等特定条件下的变化[79]。

综上所述，理解遗传编码的荧光探针的原理及总结其应用，均有助于探索氧化还原状态及其改变在细胞活动中的作用。

参·考·文·献

[1] Wang Y, Yang J, Yi J. Redox sensing by proteins: oxidative modifications on cysteines and the consequent events[J]. Antioxid Redox Signal, 2012, 16(7): 649-657.
[2] Lo Conte M, Lin J, Wilson MA, et al. A chemical approach for the detection of protein sulfinylation[J]. ACS Chem Biol, 2015, 10(8): 1825-1830.
[3] Panieri E, Santoro MM. ROS homeostasis and metabolism: a dangerous liason in cancer cells[J]. Cell Death Dis, 2016, 7(6): e2253.
[4] Dikalov SI, Harrison DG. Methods for detection of mitochondrial and cellular reactive oxygen species[J]. Antioxid Redox Signal, 2014, 20(2): 372-382.
[5] Pouvreau S. Genetically encoded reactive oxygen species (ROS) and redox indicators[J]. Biotechnol J, 2014, 9(2): 282-293.
[6] Wardman P. Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: progress, pitfalls, and prospects[J]. Free Radic Biol Med, 2007, 43(7): 995-1022.
[7] Groitl B, Jakob U. Thiol-based redox switches[J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1844(8): 1335-1343.
[8] Meyer AJ, Dick TP. Fluorescent protein-based redox probes[J]. Antioxid Redox Signal, 2010, 13(5): 621-650.
[9] Ren W, Ai HW. Genetically encoded fluorescent redox probes[J]. Sensors (Basel), 2013, 13(11): 15422-15433.
[10] Robinson KM, Janes MS, Pehar M, et al. Selective fluorescent imaging of superoxide *in vivo* using ethidium-based probes[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(41): 15038-15043.
[11] Robinson KM, Janes MS, Beckman JS. The selective detection of mitochondrial superoxide by live cell imaging[J]. Nat Protoc, 2008, 3(6): 941-947.
[12] Zhang B, Liu SQ, Li C, et al. MicroRNA-23a curbs necrosis during early T cell activation by enforcing intracellular reactive oxygen species equilibrium[J]. Immunity, 2016, 44(3): 568-581.
[13] Chen X, Zhong Z, Xu Z, et al. 2’, 7’-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: forty years of application and controversy[J]. Free Radical Res, 2010, 44(6): 587-604.
[14] Kristiansen KA, Jensen PE, Moller IM, et al. Monitoring reactive oxygen species formation and localisation in living cells by use of the fluorescent probe CM-H_2DCFDA and confocal laser microscopy[J]. Physiol Plant, 2009, 136(4): 369-383.
[15] Rhee SG, Chang TS, Jeong W, et al. Methods for detection and measurement of hydrogen peroxide inside and outside of cells[J]. Mol Cell, 2010, 29(6): 539-549.
[16] Zielonka J, Zielonka M, Sikora A, et al. Global profiling of reactive oxygen and nitrogen species in biological systems: high-throughput real-time analyses[J]. J Biol Chem, 2012, 287(5): 2984-2995.
[17] Tasdogan A, Kumar S, Allies G, et al. DNA damage-induced HSPC malfunction depends on ROS accumulation downstream of IFN-1 signaling and bid mobilization[J]. Stem Cell, 2016, 19(6): 752-767.
[18] Karamanlidis G, Lee CF, Garcia-Menendez L, et al. Mitochondrial complex I deficiency increases protein acetylation and accelerates heart failure[J]. Cell Metab, 2013, 18(2): 239-250.
[19] Kuhns DB, Alvord WG, Heller T, et al. Residual NADPH oxidase and survival in chronic granulomatous disease[J]. New Engl J Med, 2010, 363(27): 2600-2610.
[20] Setsukinai K, Urano Y, Kakinuma K, et al. Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species[J]. J Biol Chem, 2003, 278(5): 3170-3175.
[21] Choung YH, Taura A, Pak K, et al. Generation of highly-reactive oxygen species is closely related to hair cell damage in rat organ of Corti treated with gentamicin[J]. Neuroscience, 2009, 161(1): 214-226.
[22] Maki T, Soh N, Fukaminato T, et al. Perylenebisimide-linked nitroxide for the detection of hydroxyl radicals[J]. Anal Chim Acta, 2009, 639(1/2): 78-82.
[23] Garcia-Diaz M, Huang YY, Hamblin MR. Use of fluorescent probes for ROS to tease apart Type Ⅰ and Type Ⅱ photochemical pathways in photodynamic therapy[J]. Methods, 2016, 109: 158-166.
[24] Xu K, Liu X, Tang B, et al. Design of a phosphinate-based fluorescent probe for superoxide detection in mouse peritoneal macrophages[J]. Chemistry, 2007, 13(5): 1411-1416.
[25] Dooley CT, Dore TM, Hanson GT, et al. Imaging dynamic redox changes in mammalian cells with green fluorescent protein indicators[J]. J Biol Chem, 2004, 279(21): 22284-22293.
[26] Cannon MB, Remington SJ. Re-engineering redox-sensitive green fluorescent protein for improved response rate[J]. Protein Sci, 2006, 15(1): 45-57.
[27] Hanson GT, Aggeler R, Oglesbee D, et al. Investigating mitochondrial redox potential with redox-sensitive green fluorescent protein indicators[J]. J Biol Chem, 2004, 279(13): 13044-13053.
[28] Lukyanov KA, Belousov VV. Genetically encoded fluorescent redox sensors[J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1840(2): 745-756.
[29] Ezerina D, Morgan B, Dick TP. Imaging dynamic redox processes with genetically encoded probes[J]. J Mol Cell Cardiol, 2014, 73: 43-49.
[30] Austin CD, Wen X, Gazzard L, et al. Oxidizing potential of endosomes and lysosomes limits intracellular cleavage of disulfide-based antibody-drug conjugates[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(50): 17987-17992.
[31] Lohman JR, Remington SJ. Development of a family of redox-sensitive green fluorescent protein indicators for use in relatively oxidizing subcellular environments[J]. Biochemistry, 2008, 47(33): 8678-8688.
[32] van Lith M, Tiwari S, Pediani J, et al. Real-time monitoring of redox changes in the mammalian endoplasmic reticulum[J]. J Cell Sci, 2011, 124(14): 2349-2356.
[33] Avezov E, Cross BC, Kaminski Schierle GS, et al. Lifetime imaging of a fluorescent protein sensor reveals surprising stability of ER thiol redox[J]. J Cell Biol, 2013, 201(2): 337-349.
[34] Birk J, Meyer M, Aller I, et al. Endoplasmic reticulum: reduced and oxidized glutathione revisited[J]. J Cell Sci, 2013, 126(7): 1604-1617.
[35] Hoseki J, Oishi A, Fujimura T, et al. Development of a stable ERroGFP variant suitable for monitoring redox dynamics in the ER[J]. Biosci Rep, 2016, 36(2): e00316.
[36] Dooley CT, Li L, Misler JA, et al. Toxicity of 6-hydroxydopamine: live cell imaging of cytoplasmic redox flux[J]. Cell Biol Toxicol, 2012, 28(2): 89-101.
[37] Gutscher M, Sobotta MC, Wabnitz GH, et al. Proximity-based protein thiol oxidation by H_2O_2-scavenging peroxidases[J]. J Biol Chem, 2009, 284(46): 31532-31540.
[38] Gutscher M, Pauleau AL, Marty L, et al. Real-time imaging of the intracellular glutathione redox potential[J]. Nat Methods, 2008, 5(6): 553-559.
[39] Schwarzlander M, Dick TP, Meyer AJ, et al. Dissecting redox biology using fluorescent protein sensors[J]. Antioxid Redox Signal, 2016, 24(13): 680-712.
[40] Morgan B, Sobotta MC, Dick TP. Measuring E_{GSH} and H_2O_2 with roGFP2-based redox probes[J]. Free Radical Bio Med, 2011, 51(11): 1943-1951.
[41] Ivashchenko O, van Veldhoven PP, Brees C, et al. Intraperoxisomal redox balance in mammalian cells: oxidative stress and interorganellar cross-talk[J]. Mol Biol Cell, 2011, 22(9): 1440-1451.
[42] Bilan DS, Belousov VV. New tools for redox biology: from imaging to manipulation[J]. Free Radic Biol Med, 2017, 109: 167-188.
[43] Zhang H, Limphong P, Pieper J, et al. Glutathione-dependent reductive stress triggers mitochondrial oxidation and cytotoxicity[J]. FASEB J, 2012, 26(4): 1442-1451.
[44] Wagener KC, Kolbrink B, Dietrich K, et al. Redox indicator mice stably expressing genetically encoded neuronal roGFP: versatile tools to decipher subcellular redox dynamics in neuropathophysiology[J]. Antioxid Redox Sign, 2016, 25(1): 41-58.
[45] Anandhan A, Rodriguez-Rocha H, Bohovych I, et al. Overexpression of α-synuclein at non-toxic levels increases dopaminergic cell death induced by copper exposure *via* modulation of protein degradation pathways[J]. Neurobiol Dis, 2015, 81: 76-92.
[46] Wang B, Liu Q, Shan H, et al. Nrf2 inducer and cncC overexpression attenuates neurodegeneration due to α-synuclein in *Drosophila*[J]. Biochem Cell Biol, 2015, 93(4): 351-358.
[47] Waypa GB, Marks JD, Guzy R, et al. Hypoxia triggers subcellular compartmental redox signaling in vascular smooth muscle cells[J]. Circ Res, 2010, 106(3): 526-535.
[48] Waypa GB, Osborne SW, Marks JD, et al. Sirtuin 3 deficiency does not augment hypoxia-induced pulmonary hypertension[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2013, 49(6): 885- 891.

[49] Hernandez-Saavedra D, Sanders L, Perez MJ, et al. RTP801 amplifies Nox-4-dependent oxidative stress induced by cigarette smoke[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2017, 56(1): 62-73.
[50] Berkelhamer SK, Kim GA, Radder JE, et al. Developmental differences in hyperoxia-induced oxidative stress and cellular responses in the murine lung[J]. Free Radic Biol Med, 2013, 61: 51-60.
[51] Bhaskar A, Munshi M, Khan SZ, et al. Measuring glutathione redox potential of HIV-1-infected macrophages[J]. J Biol Chem, 2015, 290(2): 1020-1038.
[52] Albrecht SC, Barata AG, Grosshans J, et al. *In vivo* mapping of hydrogen peroxide and oxidized glutathione reveals chemical and regional specificity of redox homeostasis[J]. Cell Metab, 2011, 14(6): 819-829.
[53] Xu X, von Lohneysen K, Soldau K, et al. A novel approach for *in vivo* measurement of mouse red cell redox status[J]. Blood, 2011, 118(13): 3694-3697.
[54] Wolf AM, Nishimaki K, Kamimura N, et al. Real-time monitoring of oxidative stress in live mouse skin[J]. J Invest Dermatol, 2014, 134(6): 1701-1709.
[55] Belousov VV, Fradkov AF, Lukyanov KA, et al. Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide[J]. Nat Methods, 2006, 3(4): 281-286.
[56] Kim SO, Merchant K, Nudelman R, et al. OxyR: a molecular code for redox-related signaling[J]. Cell, 2002, 109(3): 383-396.
[57] Malinouski M, Zhou Y, Belousov VV, et al. Hydrogen peroxide probes directed to different cellular compartments[J]. PLoS One, 2011, 6(1): e14564.
[58] Roma LP, Duprez J, Takahashi HK, et al. Dynamic measurements of mitochondrial hydrogen peroxide concentration and glutathione redox state in rat pancreatic β-cells using ratiometric fluorescent proteins: confounding effects of pH with HyPer but not roGFP1[J]. Biochem J, 2012, 441(3): 971-978.
[59] Weller J, Kizina KM, Can K, et al. Response properties of the genetically encoded optical H_2O_2 sensor HyPer[J]. Free Radic Biol Med, 2014, 76: 227-241.
[60] Markvicheva KN, Bilan DS, Mishina NM, et al. A genetically encoded sensor for H_2O_2 with expanded dynamic range[J]. Bioorg Med Chem, 2011, 19(3): 1079-1084.
[61] Bilan DS, Pase L, Joosen L, et al. HyPer-3: a genetically encoded H_2O_2 probe with improved performance for ratiometric and fluorescence lifetime imaging[J]. ACS Chem Biol, 2013, 8(3): 535-542.
[62] Warren EA, Netterfield TS, Sarkar S, et al. Spatially-resolved intracellular sensing of hydrogen peroxide in living cells[J]. Sci Rep, 2015, 5: 16929.
[63] Ermakova YG, Bilan DS, Matlashov ME, et al. Red fluorescent genetically encoded indicator for intracellular hydrogen peroxide[J]. Nat Commun, 2014, 5: 5222.
[64] Mehmeti I, Lortz S, Lenzen S. The H_2O_2-sensitive HyPer protein targeted to the endoplasmic reticulum as a mirror of the oxidizing thiol-disulfide milieu[J]. Free Radic Biol Med, 2012, 53(7): 1451-1458.
[65] Niethammer P, Grabher C, Look AT, et al. A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish[J]. Nature, 2009, 459(7249): 996-999.
[66] Pase L, Layton JE, Wittmann C, et al. Neutrophil-delivered myeloperoxidase dampens the hydrogen peroxide burst after tissue wounding in zebrafish[J]. Curr Biol, 2012, 22(19): 1818-1824.
[67] Back P, De Vos WH, Depuydt GG, et al. Exploring real-time *in vivo* redox biology of developing and aging *Caenorhabditis elegans*[J]. Free Radic Biol Med, 2012, 52(5): 850-859.
[68] Wei-LaPierre L, Gong G, Gerstner BJ, et al. Respective contribution of mitochondrial superoxide and pH to mitochondria-targeted circularly permuted yellow fluorescent protein (mt-cpYFP) flash activity[J]. J Biol Chem, 2013, 288(15): 10567-10577.
[69] Zhang X, Huang Z, Hou T, et al. Superoxide constitutes a major signal of mitochondrial superoxide flash[J]. Life Sci, 2013, 93(4): 178-186.
[70] Wang W, Fang H, Groom L, et al. Superoxide flashes in single mitochondria[J]. Cell, 2008, 134(2): 279-290.
[71] Fang H, Chen M, Ding Y, et al. Imaging superoxide flash and metabolism-coupled mitochondrial permeability transition in living animals[J]. Cell Res, 2011, 21(9): 1295-1304.
[72] Shen EZ, Song CQ, Lin Y, et al. Mitoflash frequency in early adulthood predicts lifespan in *Caenorhabditis elegans*[J]. Nature, 2014, 508(7494): 128-132.
[73] Wang W, Gong G, Wang X, et al. Mitochondrial flash: integrative reactive oxygen species and pH signals in cell and organelle biology[J]. Antioxid Redox Signal, 2016, 25(9): 534-549.
[74] Zhao Y, Yang Y. Frex and FrexH: indicators of metabolic states in living cells[J]. Bioeng Bugs, 2012, 3(3): 181-188.
[75] Zhao Y, Jin J, Hu Q, et al. Genetically encoded fluorescent sensors for intracellular NADH detection[J]. Cell Metab, 2011, 14(4): 555-566.
[76] Zhao Y, Wang A, Zou Y, et al. *In vivo* monitoring of cellular energy metabolism using SoNar, a highly responsive sensor for NAD^+/NADH redox state[J]. Nat Protoc, 2016, 11(8): 1345-1359.
[77] Zhao Y, Hu Q, Cheng F, et al. SoNar, a highly responsive NAD^+/NADH sensor, allows high-throughput metabolic screening of anti-tumor agents[J]. Cell Metab, 2015, 21(5): 777-789.
[78] Van Laer K, Dick TP. Utilizing natural and engineered peroxiredoxins as intracellular peroxide reporters[J]. Mol Cells, 2016, 39(1): 46-52.
[79] Fujikawa Y, Roma LP, Sobotta MC, et al. Mouse redox histology using genetically encoded probes[J]. Sci Signal, 2016, 9(419): rs1.

［收稿日期］2017-03-12 ［本文编辑］崔黎明