



徐平勇, 中国科学院生物物理研究所研究员, 中国科学院大学岗位教授, 博士生导师。2004年获华中科技大学生物医学工程博士学位。2008年获国家自然科学基金二等奖。现任中国化学会生物物理化学专业委员会委员, 中科院青年创新会会员。徐平勇团队从事超高分辨显微成像新探针和新方法、蛋白质特异性标记和功能探针等方面的研究, 得到国际社会荧光成像领域的广泛关注和认可。以通讯作者身份发表24篇有影响力的论文, 包括*Nature Methods*、*Cell Metabolism*、*ACS Nano*、*PNAS*、*Autophagy*、*Cell Research*等。共发表44篇SCI收录论文, 总影响因子接近300, 总被引用接近2 300次(Google Scholar)。

针对蛋白质转运的研究方法进展

王哲¹ 徐平勇^{1,2*}

(¹中国科学院生物物理研究所, 北京 100101; ²中国科学院大学生命科学学院, 北京 100049)

摘要 蛋白质在核糖体被翻译出来后通过转运在细胞内的区室形成特殊定位和极化分布, 这对于蛋白质发挥正常功能至关重要。新型标记技术和成像策略的出现能够直接观察到细胞内蛋白质的转运过程, 以及用于研究转运调控的分子机制。该文着重于综述研究蛋白质转运的技术与方法策略。

关键词 蛋白质转运; 荧光蛋白标记; 脉冲追踪; 化学生物学

The Progress of Methods Studying Protein Trafficking

Wang Zhe¹, Xu Pingyong^{1,2*}

(¹Key Laboratory of RNA Biology, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

²College of Life Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract Special localization and polarization distribution of protein which are achieved by trafficking after translation in ribosome is essential to maintain normal function of proteins. The emergence of novel labeling techniques and imaging strategies can directly be used to observe the transport process of proteins in cells and study molecular mechanism of protein trafficking. This review focuses on techniques and methodological strategies for studying protein trafficking.

Keywords protein trafficking; fluorescent protein labeling; pulse chase; chemical biology

1 引言

细胞的功能承担者主要是蛋白质。大部分研究

者都关注蛋白质的功能、修饰以及在细胞生命活动中承担的角色。但是, 蛋白质在核糖体被翻译出来

国家重点研发计划(批准号: 2016YFA0501500)、国家自然科学基金(批准号: 31421002、21778069)和中国科学院项目(批准号: XDB08030203)资助的课题

*通讯作者。Tel: 010-64888808, E-mail: pyxu@ibp.ac.cn

This work was supported by the National Key R&D Program of China (Grant No.2016YFA0501500), National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31421002, 21778069) and Project of the Chinese Academy of Sciences (Grant No.XDB08030203)

*Corresponding author. Tel: +86-10-64888808, E-mail: pyxu@ibp.ac.cn

网络出版时间: 2018-12-28 17:07:26

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20181228.1707.012.html>

后通过转运过程在细胞内的特殊定位和极化分布来发挥功能,但是对蛋白质的转运过程和调控还了解的不多。分泌细胞又是如何调控蛋白在分泌系统中的成熟和释放,也一样亟待解决。有研究表明,细胞的囊泡转运系统有非常复杂的类型^[1]。而在神经细胞中,突触的可塑性和学习、记忆等多种现象相关,而这些现象的机制都涉及了受体蛋白和离子通道蛋白在膜上的分布改变,是蛋白质转运的一方面。因此,对这个过程的研究是对细胞生命活动理解的重要步骤。针对所研究的问题需要灵活选择什么样的研究方法。总体而言,蛋白质的转运是一个动态过程,对于这个动态过程的研究,最直观的就是用荧光显微镜观察。选用什么标记分子,怎么样做脉冲追踪,如何降低荧光背景,如何诱导转运过程的发生,以及化学生物学在此类实验的应用,都是实验设计需要考虑的方面。本文重点关注这几部分研究蛋白质转运的方法和策略。

2 目的蛋白的标记分子

研究目的蛋白的转运行为特性,要求研究者可以直接观察到目的蛋白。标记蛋白可视化通常都需要对蛋白实现荧光标记,现有的荧光标记一般是荧光蛋白、荧光染料和量子点。

2.1 荧光蛋白

二十世纪九十年代,绿色荧光蛋白(GFP)基因首次被克隆^[2]和表达^[3],很快就被用于活细胞内目的蛋白的标记和观察^[4-5]。随着之后的研究和发展,荧光蛋白成为实验室最常用的荧光标记手段。而且之后也逐渐获得了越来越多不同类型的GFP的突变体^[6]和以及来自其他海洋发光生物的荧光蛋白^[7-8],根据其不同的光学特性而适应于不同类型的实验。

2.2 荧光小分子

利用化学小分子染料通过各种方式对蛋白标记,从而使转运过程可视化。相比较荧光蛋白而言,小分子荧光染料具有多种显著的优势。(1)分子量小,对蛋白的功能和运动特性影响较小。(2)荧光染料的光稳定性更好,荧光强度也更高。但是小分子荧光染料的最大劣势在于对特定蛋白的标记较荧光蛋白复杂,除了通过化学生物学的方式将染料化学偶联到特定的序列肽段上,还可以使用两种染料FlAsH-EDT₂和ReAsH-EDT₂,这两种染料能够特异性结合含有四个半胱氨酸残基的肽段,并且从无荧光转变

为发绿色和红色荧光^[9]。(3)由于存在非共价结合的荧光染料与目标蛋白动态结合的化学平衡问题,自由存在的未结合染料分子具有强的背景荧光,使得记录到的荧光信号不一定表征目标蛋白的定位。

2.3 量子点

量子点是一种半导体材料颗粒,尺寸仅为几个纳米。这种材料具有光致发光的特性,且其发光频率可以通过改变其尺寸和大小来调整。量子点具有高亮度和高稳定的优良特性。最近,已经有研究把量子点用于神经细胞中受体蛋白的转运追踪^[10-11]。量子点的高稳定性有利于长时间的荧光观察,而其发光波长的易调节使得方便与多色标记。但是,如何标记目的蛋白、如何使量子点进入细胞以及降低量子点的毒性是量子点能否广泛用于荧光标记的关键。通过对目的蛋白生物素标记,再以链霉亲和素偶联的量子点标记,研究突触后囊泡运输。例如,利用该方法揭示了可溶性淀粉样蛋白- β (sA β 1-42)如何抑制突触后囊泡运输,继而导致AD的新机制^[12]。利用DNA的互补配对也可以用来实现对特性蛋白质的标记^[13]。对甲型流感病毒进行标记,从而观察到病毒是怎么利用细胞的自噬元件入侵细胞内,使人们更好地理解病毒入侵和细胞自噬之间的关系^[14]。

3 基于化学生物学的标记方法

化学生物学的标记方法,常用的方式(如SNAP-tag等)是利用酶促反应,将带有荧光基团小分子的底物共价偶联到目的蛋白上。SNAP-tag来源于人的O-6-烷基鸟嘌呤DNA烷基转移酶(hAGT),能够结合O-6-苄基鸟嘌呤^[15]。将hAGT与目的蛋白融合表达,然后用膜通透的用荧光基团修饰的O-6-苄基鸟嘌呤孵育,使hAGT将底物偶联到酶的活性位点的半胱氨酸残基上^[16]。由于起初所使用的hAGT融合蛋白与内源的hAGT区分度不够,造成较高的背景信号。所以需要使用hAGT缺陷的细胞或者在标记前用针对内源hAGT的抑制剂处理细胞^[17]。后来,研究者获得了SNAP-tag来代替hAGT,SNAP-tag是基于噬菌体展示技术直接进化获得的hAGT的突变体^[18],比野生型的hAGT分子量更小,但是催化反应速度是原有的50倍^[19],大大降低了荧光背景。之后又获得另一种突变CLIP-tag^[20]。CLIP-tag优先使用苄基胞嘧啶作为底物,减少内源hAGT引来的背景。CLIP-tag和SNAP-tag可以共用,实现双色标记。

相比较其他的化学生物学方式标记, 由于SNAP-tag是对酶蛋白自身标记, 所以不需要额外表达酶蛋白, 只需要直接在目的蛋白末端直接融合SNAP-tag或者CLIP-tag。SNAP-tag标记技术被用于研究细胞核中的核糖体小亚基, 通过稀疏的染料底物孵育, 实现对单个核糖体小亚基的标记和追踪^[21], 之前对于核糖体亚基生物合成的生物化学和分子细节已经有了一定的了解, 这为之后对核糖体的运输和输出动力学的进一步了解提供了研究方法。用SNAP-tag和CLIP-tag双色标记E-钙黏素和Na、K-ATP酶观察转运行为, E-钙黏素比Na、K-ATP酶有更快的传递速度, 而且不能被通常阻滞大多数蛋白转运的19 °C所阻断。这表明, 细胞中存在的不同运输类型的运输囊泡^[22]。

细胞内的磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶可以将辅酶A上的磷酸泛酰巯基乙胺转移到酰基载体蛋白的保守丝氨酸残基上, 而且该酶耐受CoA末端硫醇的广泛修饰, 允许将广谱荧光团转移至标记蛋白质上, 且目的蛋白的识别序列可以缩小至12个甚至8个氨基酸残基^[23-24]。基于此也发展出另一种识别序列很短(相比于SNAP-tag)的标记方式。将12个氨基酸残基的A1 tag、EGFP和Smoothened(Smo)三者融合表达, 选择性标记细胞膜上的Smo蛋白, 研究其膜上的转运过程, 回答了初级纤毛上的Smo蛋白的来源问题^[25]。这种蛋白标记方式也同样可以用来研究其他类型的膜蛋白的内化, 比如GPCR。GPCR作为细胞间信息交流最重要的信号受体分子, 涉及多种细胞的生命过程, 而且大部分的药物都是以GPCR作为受体的。研究GPCR受体的内吞和上膜对于理解细胞GPCR的信号调控机制非常重要^[26], 对于药物的研发和机制研究也具有重要意义。

4 针对内源蛋白质的标记方式

通常在细胞内标记某一蛋白质时, 都是通过外源表达融合蛋白的方式。对于某些蛋白质而言, 过表达会显著影响细胞的生存状态和生命过程, 出现相应的过表达表型^[27]。这种情况下实验结果则不能排除可能的未知影响因素, 而且不能表征细胞内该蛋白质的表达水平。因此, 采用胞内抗体的方式就能实现对内源蛋白质的标记和活细胞成像。通过噬菌体展示技术, 筛选出具有对GTP结合构象的GTP酶-Rab6有特定亲和力的胞内抗体。Rab6在高尔基体和转运中间体上使GTP结合构象。通过这个

方式实现对特定的Rab6转运追踪^[28]。但是对于通常的scFv, 需要形成二硫键稳定构象, 而细胞内表达的scFv获得正确构象相对困难^[29]。所以, 利用与免疫球蛋白相似的纤连蛋白III型结构域(FN3)代替, FN3的折叠不需要二硫键, 结构更稳定, 同样可以通过噬菌体展示技术筛选获得高亲和力的FN3片段。这表明, FN3可以代替scFv作为胞内抗体的选择^[30]。

当然对于内源性的蛋白质的标记并不局限于使用胞内抗体, 而且对某一特定蛋白质的胞内抗体不容易获得。从CRISPR技术出现之后, 研究者可以在实验室内方便得到各种类型的敲除、敲入细胞系。因此, 直接在目的蛋白的基因组序列中敲入荧光蛋白或者可以被识别的特定序列, 即可实现对内源蛋白质的成像观察。但是对于敲入完整的荧光蛋白序列, 效率相对较低。为此, 研究者又发展出能够荧光自补的荧光蛋白^[31]。通过在mNeonGreen(mNG)的第十到第十一个 β 折叠片之间插入32个柔性氨基酸, 然后通过随机突变, 筛出荧光强度明显增强的mNG2。通过这种方式获得的mNG2(1~10)和mNG2(11)具有这样的自行相互补充为完整荧光蛋白的特性(图1), 而且单独的mNG2(1~10)几乎无荧光。通过敲入16个氨基酸片段mNG2(11), 以及过表达mNG2(1~10)片段来实现细胞内的内源蛋白标记成像。这种标记方式敲入的片段很小(16个氨基酸残基), 相比较胞内抗体而言, 背景荧光很低, 在成像过程中只要转染过表达mNG2(1~10)片段, 操作方便。

5 脉冲追踪的方法

对于活细胞内、通常在任何时间内观察到的细胞内标记蛋白都处于动态合成、转运、降解等状态, 在细胞中的定位往往出现在整个转运途径, 会在细胞中的很多位置都观察到荧光。在细胞中直接动态监测蛋白质从合成后转运到亚细胞器的过程具有挑战性。因此, 对于蛋白质的转运追踪, 采取一个巧妙的脉冲追踪方式是非常重要的。在标记类型中, 我们知道可以直接利用染料FlAsH-EDT₂和ReAsH-EDT₂特异性标记四半胱氨酸基序, 有研究者通过对AMPA受体的羧基末端插入四半胱氨酸基序, 从而研究新合成的AMPA受体的转运^[32]。通过短暂添加荧光染料对蛋白质进行部分染色, 实现了一种简便易行的脉冲追踪方式。这种标记方式可以避免过强的荧光信号, 同时减少新生成的蛋白质对观察的影

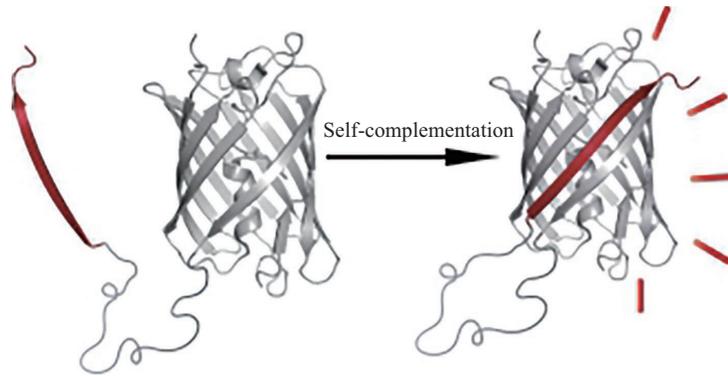


图1 mNG2(1~10)和mNG2(11)的荧光自补行为(根据参考文献[31]修改)

Fig.1 Self-complementation of mNG2 (1-10) and mNG2 (11) (modified from reference [31])

响,但是并不能排除完全成熟的蛋白质信号干扰。

除了上述所说的小分子荧光染料,人们还发展出其他的多种类似方式,比如TimeSTAMP系统^[33]。TimeSTAMP系统是依次在目的蛋白羧基端依次偶联YFP的氨基端片段,NS3蛋白酶识别位点,NS3蛋白酶结构域,NS3蛋白酶识别位点,YFP的羧基端片段。由于酶的识别和剪切,融合蛋白断裂为多个肽段碎片,并随后在细胞内降解。由于YFP不能组装成完整荧光蛋白,所以在通常情况下细胞内没有荧光信号。但是一旦使用膜通透的NS3蛋白酶抑制剂就会使融合蛋白保留,不被酶切,新合成的蛋白随着折叠和成熟,组装为完整YFP,产生荧光。相比较而言,特异性小分子荧光染料会对所有目的蛋白进行标记,包括成熟的静止蛋白,而这种标记方式只会使加入抑制剂后合成的新生蛋白产生荧光。

传统的用于研究蛋白质转运和分泌途径的可视化脉冲追踪方式,利用的是温度敏感性VSVG蛋白突变体(VSVG-ts045)。VSVG-ts045在较高的温度下(40 °C)是单体形式,而到了32 °C又变为三聚体^[34]。单体的VSVG不能离开内质网,而三聚体的VSVG可以自由地从内质网转运到高尔基体^[35]。利用这种特性,当细胞在40 °C培养12 h后,VSVG-ts045-GFP几乎都定位于内质网,而降到32 °C后使其从内质网中迅速释放出来,囊泡中相对大量的转运蛋白质使得转运囊泡清晰可见。分泌系统具有一种特性,就是在低温(15 °C)条件下,转运囊泡被限制进入高尔基体,从而在内质网-高尔基体中间区(ER-Golgi intermediate compartment, ERGIC)积累,而当在20 °C条件下孵育又会使蛋白质滞留于反式高尔基体网络^[36]。因此,通过调整培养细胞的温度,就可

以实现细胞内转运蛋白在分泌途径上的精细调控,从而方便完成脉冲追踪试验^[37]。

研究者开发出与利用使VSVG-ts045蛋白质滞留在内质网上的脉冲追踪方式相似的系统,通过将目的蛋白束缚在某一细胞器或者区域上,然后突然释放。这样的系统有RUSH和CUTE。RUSH系统利用了链霉亲和素结合蛋白(SBP)与链霉亲和素的亲和性小于生物素与链霉亲和素的亲和性。细胞表达一个锚定在内质网膜上的链霉亲和素,比如通过添加跨膜结构域和KDEL序列使其稳定置于内质网上,同时表达带荧光的目的蛋白融合有SBP基序。在正常培养条件下,目的蛋白的SBP基序与链霉亲和素的锚定蛋白结合,从而在内质网上积聚,当在培养条件下外加生物素,生物素与SBP基序竞争结合链霉亲和素,从而使目的蛋白从内质网上释放出来^[38](图2)。这与VSVG-ts045所达到的效果类似,但是比VSVG-ts045更好的地方在于,生物素不具有细胞毒性,同时不需要对培养温度进行调整,避免了因此带来的对细胞生命活动的潜在影响。

CUTE系统和RUSH一样是利用SBP和生物素与链霉亲和素的竞争性结合。与RUSH系统不同的是,报告蛋白后融合表达多拷贝SBP,而且其信号定位序列(NLS等)位于SBP内部或者紧跟SBP,当细胞共表达可溶性的链霉亲和素时,两者相互结合形成多聚体,从而掩盖定位信号序列。一旦在细胞培养液外加生物素,就会使多聚体解离,暴露定位信号,即可观察蛋白向某个特定的细胞器或者细胞结构的转运过程^[39]。相比RUSH系统,CUTE系统使用可溶性的链霉亲和素,不需要锚定在某个结构上,操作起来更加方便。这个系统还扩大了其对蛋白质转运过

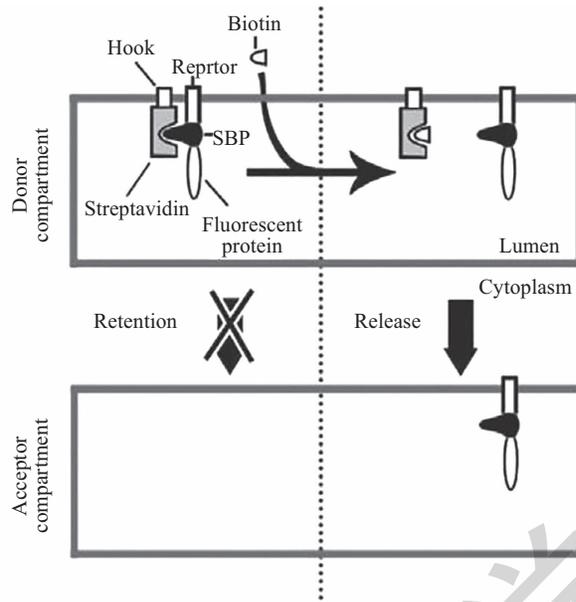


图2 RUSH系统原理示意图(根据参考文献[38]修改)

Fig.2 Schematic representation of RUSH system (modified from reference [38])

程的研究范围, 因此可以实现对分泌途径之外的蛋白质转运活动的观察。

6 通过FRAP或者光激活光转换降低荧光背景

直接表达GFP的融合蛋白, 由于细胞中大量存在固定的成熟蛋白, 往往背景荧光比较高。这种情况可以通过使用FRAP得以改善。FRAP利用能量较高的激光照射细胞的某一区域, 使其发生不可逆的光漂白, 然后用低能量激光观察该区域的荧光恢复情况。FRAP实验可以获得关于蛋白质转运的两个参数: 运动分数 M_f 和扩散常数 D 。从而不仅仅是观察蛋白质转运, 同时还可以定量分析蛋白质转运。这种技术从1998年开始在神经细胞中被用于研究蛋白质的转运过程^[40], 尽管最初这项技术是为了研究蛋白质在膜上的扩散, 用于说明膜的流动性^[41]。在2000年的一项研究中, 通过联合应用FRAP和VSVG-ts045方法, 一定程度上揭示了VSVG-ts045在40 °C条件下积聚在内质网中的原因^[42]。这表明, 这个积聚过程不是通过被固定或者回收的机制实现的。

FRAP技术的光漂白过程会产生活性自由基, 对细胞产生伤害, 这就让FRAP技术的使用受到了一定的限制。如果采用光激活荧光蛋白就可以避免这个问题。第一个被分离鉴定的光转换荧光蛋白是Kaede^[43], 之后又发现了多种不同类型的光激活荧光

蛋白。这些光激活荧光蛋白可以分为两类, 一种是在光激活条件下发生荧光强度的增强, 另一种则是发生荧光波长改变(可逆或者不可逆), 即光转换^[44]。这项技术被很好地应用在了蛋白质的转运机制研究中。淀粉样蛋白前体蛋白(APP)羧基末端融合了paGFP, paGFP具有比较低的基础荧光, 但可以用413 nm光刺激它以产生强烈且稳定的绿色荧光。同时, 表达与青色荧光蛋白(GalT-CFP)融合的高尔基的标志蛋白——半乳糖基转移酶, 青色荧光蛋白的荧光被用来激活paGFP, 就使得可以在反式高尔基体中准确地光活化APP。研究发现, 大部分的APP快速移动到溶酶体而没有出现在细胞表面, 然后通过分泌酶样的切割从溶酶体中被清除^[45]。

7 诱导蛋白质相互作用

7.1 小分子诱导相互作用蛋白

诱导蛋白质相互作用常用的经典方法是FKBP/FRP系统。FKBP蛋白可以特异性识别mTORC1并抑制其功能。FRP是mTOR上与FKBP发生相互作用的功能结构域。通常FKBP和FRP不发生相互作用, 当雷帕霉素加入后, 两者就形成异源二聚体^[46]。这种在化学小分子诱导下的相互作用可以被用来人为调控两个分子或者复合物的偶联, 特别是当其中一个为标记的某个蛋白或者亚细胞结构, 而另一个为分子马达时。这就使得人们可以在诱导条件下可

视化标记物的定向运输。由于这个系统是从哺乳动物细胞中被筛选出来的, 因此为了避免对内源性的FKBP/FRP产生影响, 通常都是使用雷帕霉素类似物作为诱导分子。通过化学诱导异源二聚化, 可以控制特定蛋白质的位置与转运^[47]。细胞内微管的取向已经被了解得比较清楚, 但是还没有很好的方式鉴定微丝的取向, 通过FKBP/FRP系统诱导肌球蛋白和过氧化物酶体之间的相互作用, 观察过氧化物酶体的定向转运来确定微丝的取向。近端轴突中的肌动蛋白丝主要以其正端面向细胞体, 而在树突中则有相同数量的肌动蛋白丝指向任一方向^[48]。

FKBP蛋白还具有这样的一种特性, 就是在添加细胞渗透的FK1012-A下, FKBP相互之间可以形成多聚体。因为FK1012-A可以和两分子的FKBP蛋白结合, 所以当细胞表达FKBP和网格蛋白轻链的融合蛋白时, 就会影响网格蛋白高度有序的三维结构装配, 从而显著抑制网格蛋白依赖的内吞过程^[49]。另外对FKBP的36位氨基酸进行突变, 使其从苯丙氨酸突变为甲硫氨酸, 获得的突变体FKBP_{F36M}可以形成同源二聚体, 且可以在雷帕霉素的衍生物AP21998作用下解离^[50]。根据这种突变的FKBP蛋白的特性, 设计四个重复的FKBP融合蛋白; 融合蛋白在内质网中形成多聚蛋白, 这样的聚合蛋白不能被转运至高尔基体, 从而在内质网中滞留; 添加AP21998可以使多聚物解离, 蛋白单体向高尔基体转运^[51]。

7.2 光诱导相互作用蛋白

对于FKBP/FRP系统, 由于是从哺乳动物细胞获得的, 因此通过突变及采用雷帕霉素的类似物来避免对细胞的内源蛋白产生反应, 从而影响细胞的生理状态。尽管如此, 仍然不能排除可能的化学小分子对细胞生命活动的影响。于是, 有研究者采用光诱导的相互作用方式来研究蛋白质的转运。已有的光诱导相互作用或者光诱导解离的系统有PhyB/PIF^[52]、CRY2/CIB1^[53]、UVR8。CRY2/CIB1是光诱导的相互作用, 可以用来代替FKBP/FRP系统实现对细胞蛋白质转运到调控, 而且, CRY2/CIB1还可以采取类似于FKBP的方式破坏网格蛋白依赖的内吞过程以及影响微丝的聚合^[54]。UVR8是一种对UV-B光辐射敏感的二聚体蛋白, 在该光照条件下, 会诱导二聚体的解聚^[55]。UVR8光致解聚的特性可以同样用来设计光控的蛋白质分泌系统, 代替小分子诱导^[56]。类似于FKBP_{F36M}, 使用两个重复的UVR8结构域就可以设计光调控分

泌的融合蛋白。虽然光诱导型蛋白聚合或者解聚技术比起化学小分子诱导更方便简洁, 也较少影响细胞的生命活动, 但同样也有其劣势。在实际研究过程中, 对细胞的光毒性、照射波长与荧光分子的激发光和发射光之间的重叠等, 这些因素一定程度上限制了光诱导型蛋白聚合或者解聚技术的使用^[57]。

8 展望

尽管已经有多种方法被用于蛋白质转运的成像过程中, 但是这些方法依然都有相应的缺陷。总体上说, 对于现行的转运研究而言, 灵活地组合使用上述技术作为实验设计的思路, 能获得更好的实验结果。随着对很多生命活动生物学机制的阐明, 也会因此而获得更多的分子操纵工具, 类似于FKBP、SNAPtag等。研究者可以在分子水平上非常精细地操控生物活动进程, 方便蛋白质转运的观察。相比较其他标记方式而言, 荧光蛋白具有独特的方便操作, 因此受到研究者的青睐。但是, 其光漂白仍然是限制其使用的最大因素, 特别是在研究蛋白质转运的实验中, 要求对目的蛋白的连续观察, 即长时间的激发。因此, 获得更稳定的荧光蛋白依然是最大的需求。除此之外便是获得不同于传统荧光蛋白激发和发射波长且更优良的光学性质的荧光蛋白。

其次, 多数研究蛋白质转运的实验室以细胞系为研究对象, 但是由于机体是复杂的三维结构, 而蛋白质转运极为重要的神经细胞其结构更为复杂。通过挑选相对透明的线虫作为模型, 有研究者已实现了在体观察囊泡转运^[58]。而在2004年开发出了选择性平面照明显微镜(SPIM), 使整个样品实现高分辨率、光学切片成像, 并用其观察到了相对不透明的果蝇的胚胎发生^[59]。因此, 怎么构建模拟三维结构的神经网络模型作为实验或者在组织水平上进行成像观察, 也将是这一领域最大的一个挑战。

参考文献 (References)

- 1 Rodriguez-Boulant E, Kreitzer G, Musch A. Organization of vesicular trafficking in epithelia. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6(3): 233-47.
- 2 Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 1992; 111(2): 229-33.
- 3 Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*

- 1994; 263(5148): 802-5.
- 4 Marshall J, Molloy R, Moss GW, Howe JR, Hughes TE. The jellyfish green fluorescent protein: a new tool for studying ion channel expression and function. *Neuron* 1995; 14(2): 211-5.
 - 5 Phillips GJ. Green fluorescent protein--a bright idea for the study of bacterial protein localization. *FEMS Microbiol Lett* 2001; 204(1): 9-18.
 - 6 Sinkeldam RW, Greco NJ, Tor Y. Fluorescent analogs of biomolecular building blocks: design, properties, and applications. *Chem Rev* 2010; 110(5): 2579-619.
 - 7 Rodriguez EA, Tran GN, Gross LA, Crisp JL, Shu X, Lin JY, *et al.* A far-red fluorescent protein evolved from a cyanobacterial phycobiliprotein. *Nat Methods* 2016; 13(9): 763-9.
 - 8 Tsien RY. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 509-44.
 - 9 Zhang J, Campbell RE, Ting AY, Tsien RY. Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3(12): 906-18.
 - 10 Lee SH, Jin C, Cai E, Ge P, Ishitsuka Y, Teng KW, *et al.* Super-resolution imaging of synaptic and Extra-synaptic AMPA receptors with different-sized fluorescent probes. *Elife* 2017; 6: pii: e27744.
 - 11 Dahan M, Levi S, Luccardini C, Rostaing P, Riveau B, Triller A. Diffusion dynamics of glycine receptors revealed by single-quantum dot tracking. *Science* 2003; 302(5644): 442-5.
 - 12 Park D, Na M, Kim JA, Lee U, Cho E, Jang M, *et al.* Activation of CaMKIV by soluble amyloid-beta1-42 impedes trafficking of axonal vesicles and impairs activity-dependent synaptogenesis. *Sci Signal* 2017; 10(487): pii: eaam8661.
 - 13 Banerjee A, Grazon C, Pons T, Bhatia D, Valades-Cruz CA, Johannes L, *et al.* A novel type of quantum dot-transferrin conjugate using DNA hybridization mimics intracellular recycling of endogenous transferrin. *Nanoscale* 2017; 9(40): 15453-60.
 - 14 Wu QM, Liu SL, Chen G, Zhang W, Sun EZ, Xiao GF, *et al.* Uncovering the Rab5-independent autophagic trafficking of influenza A virus by quantum-dot-based single-virus tracking. *Small* 2018; 14(12): e1702841.
 - 15 Keppler A, Gendreizig S, Gronemeyer T, Pick H, Vogel H, Johnsson K. A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules *in vivo*. *Nat Biotechnol* 2003; 21(1): 86-9.
 - 16 Pegg AE. Repair of O(6)-alkylguanine by alkyltransferases. *Mutat Res* 2000; 462(2/3): 83-100.
 - 17 Juillerat A, Heinis C, Sielaff I, Barnikow J, Jaccard H, Kunz B, *et al.* Engineering substrate specificity of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase for specific protein labeling in living cells. *Chembiochem* 2005; 6(7): 1263-9.
 - 18 Juillerat A, Gronemeyer T, Keppler A, Gendreizig S, Pick H, Vogel H, *et al.* Directed evolution of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase for efficient labeling of fusion proteins with small molecules *in vivo*. *Chem Biol* 2003; 10(4): 313-7.
 - 19 Komatsu T, Johnsson K, Okuno H, Bito H, Inoue T, Nagano T, *et al.* Real-time measurements of protein dynamics using fluorescence activation-coupled protein labeling method. *J Am Chem Soc* 2011; 133(17): 6745-51.
 - 20 Gautier A, Juillerat A, Heinis C, Correa IR Jr, Kindermann M, Beaufils F, *et al.* An engineered protein tag for multiprotein labeling in living cells. *Chem Biol* 2008; 15(2): 128-36.
 - 21 Landvogt L, Ruland JA, Montellese C, Siebrasse JP, Kutay U, Kubitscheck U. Observing and tracking single small ribosomal subunits *in vivo*. *Methods* 2018; 6: pii: S1046-2023(18)30085-9.
 - 22 Farr GA, Hull M, Stoops EH, Bateson R, Caplan MJ. Dual pulse-chase microscopy reveals early divergence in the biosynthetic trafficking of the Na,K-ATPase and E-cadherin. *Mol Biol Cell* 2015; 26(24): 4401-11.
 - 23 Zhou Z, Cironi P, Lin AJ, Xu Y, Hrvatin S, Golan DE, *et al.* Genetically encoded short peptide tags for orthogonal protein labeling by Sfp and AcpS phosphopantetheinyl transferases. *ACS Chem Biol* 2007; 2(5): 337-46.
 - 24 Zhou Z, Koglin A, Wang Y, McMahon AP, Walsh CT. An eight residue fragment of an acyl carrier protein suffices for post-translational introduction of fluorescent pantetheinyl arms in protein modification *in vitro* and *in vivo*. *J Am Chem Soc* 2008; 130(30): 9925-30.
 - 25 Wang Y, Zhou Z, Walsh CT, McMahon AP. Selective translocation of intracellular Smoothed to the primary cilium in response to Hedgehog pathway modulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(8): 2623-8.
 - 26 Foster SR, Brauner-Osborne H. Investigating internalization and intracellular trafficking of GPCRs: new techniques and real-time experimental approaches. *Handb Exp Pharmacol* 2018; 245: 41-61.
 - 27 El-Husseini AE, Schnell E, Chetkovich DM, Nicoll RA, Brecht DS. PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses. *Science* 2000; 290(5495): 1364-8.
 - 28 Nizak C, Monier S, del Nery E, Moutel S, Goud B, Perez F. Recombinant antibodies to the small GTPase Rab6 as conformation sensors. *Science* 2003; 300(5621): 984-7.
 - 29 Gross GG, Junge JA, Mora RJ, Kwon HB, Olson CA, Takahashi TT, *et al.* Recombinant probes for visualizing endogenous synaptic proteins in living neurons. *Neuron* 2013; 78(6): 971-85.
 - 30 Koide A, Bailey CW, Huang X, Koide S. The fibronectin type III domain as a scaffold for novel binding proteins. *J Mol Biol* 1998; 284(4): 1141-51.
 - 31 Feng S, Sekine S, Pessino V, Li H, Leonetti MD, Huang B. Improved split fluorescent proteins for endogenous protein labeling. *Nat Commun* 2017; 8(1): 370.
 - 32 Ju W, Morishita W, Tsui J, Gaietta G, Deerinck TJ, Adams SR, *et al.* Activity-dependent regulation of dendritic synthesis and trafficking of AMPA receptors. *Nat Neurosci* 2004; 7(3): 244-53.
 - 33 Butko MT, Yang J, Geng Y, Kim HJ, Jeon NL, Shu X, *et al.* Fluorescent and photo-oxidizing TimeSTAMP tags track protein fates in light and electron microscopy. *Nat Neurosci* 2012; 15(12): 1742-51.
 - 34 Doms RW, Keller DS, Helenius A, Balch WE. Role for adenosine triphosphate in regulating the assembly and transport of vesicular stomatitis virus G protein trimers. *J Cell Biol* 1987; 105(5): 1957-69.
 - 35 Kreis TE, Lodish HF. Oligomerization is essential for transport of vesicular stomatitis viral glycoprotein to the cell surface. *Cell* 1986; 46(6): 929-37.
 - 36 Gilbert CE, Sztul E, Machamer CE. Commonly used trafficking blocks disrupt ARF1 activation and the localization and function

- of specific Golgi proteins. *Mol Biol Cell* 2018; 29(8): 937-47.
- 37 Presley JF, Cole NB, Schroer TA, Hirschberg K, Zaal KJ, Lippincott-Schwartz J. ER-to-Golgi transport visualized in living cells. *Nature* 1997; 389(6646): 81-5.
- 38 Boncompain G, Divoux S, Gareil N, de Forges H, Lescure A, Latreche L, *et al.* Synchronization of secretory protein traffic in populations of cells. *Nat Methods* 2012; 9(5): 493-8.
- 39 Abraham O, Gotliv K, Parnis A, Boncompain G, Perez F, Cassel D. Control of protein trafficking by reversible masking of transport signals. *Mol Biol Cell* 2016; 27(8): 1310-9.
- 40 Nakata T, Terada S, Hirokawa N. Visualization of the dynamics of synaptic vesicle and plasma membrane proteins in living axons. *J Cell Biol* 1998; 140(3): 659-74.
- 41 Damjanovich S, Edidin M, Szollosi J, Tron L. Mobility and proximity in biological membranes. Boca Raton: CRC Press, 1994.
- 42 Nehls S, Snapp EL, Cole NB, Zaal KJ, Kenworthy AK, Roberts TH, *et al.* Dynamics and retention of misfolded proteins in native ER membranes. *Nat Cell Biol* 2000; 2(5): 288-95.
- 43 Ando R, Hama H, Yamamoto-Hino M, Mizuno H, Miyawaki A. An optical marker based on the UV-induced green-to-red photoconversion of a fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(20): 12651-6.
- 44 Shcherbakova DM, Sengupta P, Lippincott-Schwartz J, Verkhusha VV. Photocontrollable fluorescent proteins for superresolution imaging. *Annu Rev Biophys* 2014; 43: 303-29.
- 45 Tam JH, Pasternak SH. Imaging the intracellular trafficking of APP with photoactivatable GFP. *J Vis Exp* 2015; 17(105): e53153.
- 46 Fegan A, White B, Carlson JC, Wagner CR. Chemically controlled protein assembly: techniques and applications. *Chem Rev* 2010; 110(6): 3315-36.
- 47 Esteves da Silva M, Adrian M, Schatzle P, Lipka J, Watanabe T, Cho S, *et al.* Positioning of AMPA receptor-containing endosomes regulates synapse architecture. *Cell Rep* 2015; 13(5): 933-43.
- 48 Watanabe K, Al-Bassam S, Miyazaki Y, Wandless TJ, Webster P, Arnold DB. Networks of polarized actin filaments in the axon initial segment provide a mechanism for sorting axonal and dendritic proteins. *Cell Rep* 2012; 2(6): 1546-53.
- 49 Moskowitz HS, Heuser J, McGraw TE, Ryan TA. Targeted chemical disruption of clathrin function in living cells. *Mol Biol Cell* 2003; 14(11): 4437-47.
- 50 Rollins CT, Rivera VM, Woolfson DN, Keenan T, Hatada M, Adams SE, *et al.* A ligand-reversible dimerization system for controlling protein-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(13): 7096-101.
- 51 Rivera VM, Wang X, Wardwell S, Courage NL, Volchuk A, Keenan T, *et al.* Regulation of protein secretion through controlled aggregation in the endoplasmic reticulum. *Science (New York, NY)* 2000; 287(5454): 826-30.
- 52 Levskaya A, Weiner OD, Lim WA, Voigt CA. Spatiotemporal control of cell signalling using a light-switchable protein interaction. *Nature* 2009; 461(7266): 997-1001.
- 53 Kennedy MJ, Hughes RM, Peteya LA, Schwartz JW, Ehlers MD, Tucker CL. Rapid blue-light-mediated induction of protein interactions in living cells. *Nat Methods* 2010; 7(12): 973-5.
- 54 Taslimi A, Vrana JD, Chen D, Borinskaya S, Mayer BJ, Kennedy MJ, *et al.* An optimized optogenetic clustering tool for probing protein interaction and function. *Nat Commun* 2014; 5: 4925.
- 55 Christie JM, Arvai AS, Baxter KJ, Heilmann M, Pratt AJ, O'Hara A, *et al.* Plant UVR8 photoreceptor senses UV-B by tryptophan-mediated disruption of cross-dimer salt bridges. *Science* 2012; 335(6075): 1492-6.
- 56 Chen D, Gibson ES, Kennedy MJ. A light-triggered protein secretion system. *J Cell Biol* 2013; 201(4): 631-40.
- 57 Tucker CL, Vrana JD, Kennedy MJ. Tools for controlling protein interactions using light. *Curr Protoc Cell Biol* 2014; 64: 17.6.1-20.
- 58 Maeder CI, San-Miguel A, Wu EY, Lu H, Shen K. *In vivo* neuron-wide analysis of synaptic vesicle precursor trafficking. *Traffic* 2014; 15(3): 273-91.
- 59 Huisken J, Swoger J, Del Bene F, Wittbrodt J, Stelzer EH. Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy. *Science* 2004; 305(5686): 1007-9.