

知識天地

生物體中的小分子定位系統——遺傳編碼的分子動態螢光生物感應偵測器

何承訓助研究員、陳慧宇研究助理（農業生物科技研究中心）

摘要

創新且具革命性的新科技與技術的研發，例如：基因編輯技術（如：CRISPR/Cas9）與次世代核酸定序方法（Next-Gen sequence, NGS），已超乎我們想像的方式一直劇烈衝擊與影響著新的科學發現與走向。過去幾十年因由不斷創新的技術我們已能夠對不同的代謝產物、蛋白質、DNA、酵素等，以及其在細胞或細胞間的位置、表現量與本質特性上有了更確切的了解與掌控。然而，對於小分子物質的在生物體或細胞體中的動態變化仍然所知甚少。如今，利用我們最新發表研發成功的生物化學方法-螢光分子動態感應偵測器（fluorescent biosensors）：NiTrac sensor-硝酸鹽¹與Matryoshka sensor-鉍鹽²，開啟了新的契機與領域來一探究竟。

引言

為了了解生物反應過程或作用系統，基本條件是需要知道有哪些成分的參與，並了解每個參與成分的角色、生理、化學特性，還有動態變化特性（dynamic features），例如流動性與酵素活性。歸功於過去的生物化學與物理方法，我們能更進一步的了解這些成分的組成與特質，但是關於他們在活體細胞中的動態變化的了解與知識，現今仍視為一大挑戰。為了能夠在自然生理狀況與零破壞性的條件下測量或偵測分子在生物體中的動態變化與過程，我們需要方法能夠將實際生物體中分子動態變化的過程用視覺化與具量化方式呈現，例如：能夠偵量其量的變化並同時看到分子的運輸與轉移、代謝物之間的轉換、或是訊息誘導現象的發生。而這個生物動態視覺化與具量化的方法可以藉由施放與偵測動態生物感應偵測器（Biosensors）來達成，進而偵測某物質成分的濃度變化、蛋白結構改變或組成變化。然而將sensors誘導至活體中並成功地使其表現出預期效果的過程中，最大的困難是往往容易產生人為的干擾因素，使得結果容易誤判。因此，如何研發出會不會干擾或是降低造成任何生物傷害至最極限的biosensors成為了不可或缺的必要條件。

生物分子動態感應偵測器的定義

生物分子動態感應偵測器- Biosensor廣義的定義可以視為在活體或甚至在某種環境中，能夠具體呈現某樣特定物質或反應過程的物質。Biosensor基本材料通常為小分子，例如典型的RNA-核糖核酸或protein-蛋白質或細胞。隨著科學與科技的進步，現今已發展出多種的biosensors可以讓我們即時偵測與定量微小的分子或離子的變化、訊息傳遞之間其質與代謝產物的轉變（表一）。本篇將針對多種遺傳編碼的螢光感應偵測器（genetically encoded fluorescent sensors）加以描述。

技術名稱	靈敏度	亞細胞級解析度	細胞級解析度	最小侵入性?	活細胞?	即時?
遺傳編碼奈米感應偵測器 (Genetically encoded nanosensors)	奈莫耳濃度~毫莫耳濃度	奈米~毫米	可	是	是	是
核磁共振成像 (MRI)	中等微莫耳濃度~毫莫耳濃度	否	可	是	是	是
正子電腦斷層掃描 (PET)	1-40 貝克/平方毫米	否	否	否	是	是
X射線同步輻射分析 (X-ray synchrotron)	<1毫克/公斤組織	否	可	否	否	否
二次離子質譜分析 (SIMS)	<1飛莫耳	可	可	否	否	否
基質輔助雷射脫附游離法或 飛行時間影像分析 (MALDI or TOF imaging)	<1百萬分之一	可	50-300微米(MALDI) 1-2微米(TOF)	否	否	否
奈米結構啟動質譜影像分析 (NIMS imaging)	攸莫耳濃度	否	50-300微米	否	否	否
質譜分析 (Mass Spectrometry)	攸莫耳濃度	否?	可	否	否	否
拉曼光譜 (Raman)	50微莫耳濃度	可	可	是	是	是

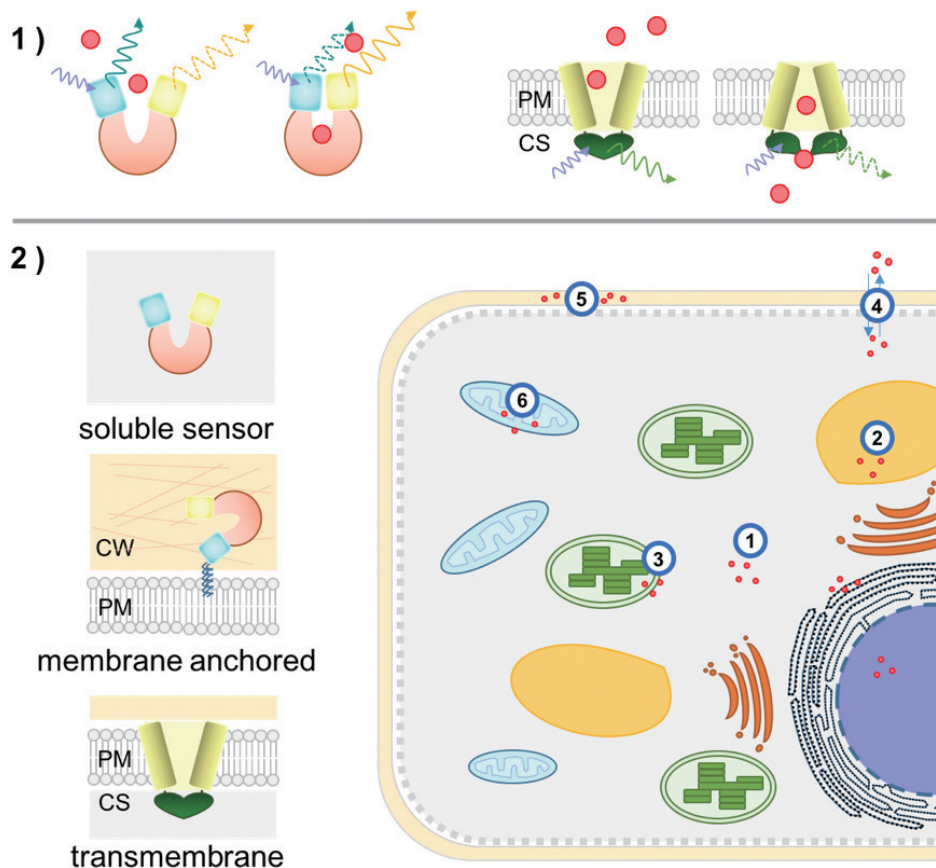
英文縮寫：MALDI, matrix-assisted laser desorption ionization; MRI, magnetic resonance imaging; NIMS, nanostructure initiator mass spectrometry; PET, positron emission tomography; SIMS, secondary ion mass spectrometry; TOF, time-of flight mass spectrometry。

綠色螢光蛋白 (Green Fluorescent Protein, GFP)

綠色螢光蛋白的發現與特性以及其相關的生物工程研究，對於活體觀察並降低生物物理傷害的研究開啟了一扇大門。GFP由11個 β 片層組成桶狀構成疏水中心，由 α 螺旋包含著的發光基團位於其中。這個發光基團 (chromophore) 是由3個氨基酸 (Ser65、Tyr66、Gly67) 經過環化、氧化後形成的環，在鈣離子激發下產生綠色螢光³。野生型GFP吸收紫外光和藍光，發射綠光。通過更換GFP生色團氨基酸、插入內含子、改變鹼基組成等基因工程操作，實現對GFP的改造，如增強其螢光強度和熱穩定性、促進生色團的摺疊、改善螢光特性等，例如：circularly permuted GFPs。近年來GFP發展出了多種突變體，藉由通過人工引入各種點突變使發光基團的激發光譜和發射光譜均發生變化而發出不同顏色的螢光，有藍色螢光蛋白 (Blue fluorescent protein, BFP)、黃色螢光蛋白 (yellow fluorescent protein, YFP)、青色螢光蛋白 (cyan fluorescent protein, CFP) 等。這些突變體使得綠色螢光蛋白應用於螢光能量共振轉移 (Förster resonance energy transfer, FRET)⁴成為真實可能，也為螢光能量共振轉移技術用於活體檢測蛋白質相互作用與分子偵測提供了良好的支持。

螢光共振能量轉移技術 (Förster resonance energy transfer, FRET) -概述

所謂的螢光能量共振轉移 (Förster resonance energy transfer, FRET) 是早先發展起來的一門技術，GFP應用技術的發展，具FRET的特性的 biosensor 已經成為檢測活體中生物大分子納米級距離和納米級距離變化的有力工具；從生物大分子相互作用分析、細胞生理研究、免疫分析等，進一步衍生到用來偵測小分子例如糖、離子、訊息傳導物質甚至生物賀爾蒙等方面有著廣泛的應用 (圖一)。這類的biosensor所具有的特性包含：1. 廣泛性與通用性：可以應用或表現在任一活體中；2. 穩定性：能持續且穩定的偵測離子或代謝產物；3. 具有能呈現立體空間的高解析分析能力；4. 能提供細胞間或細胞內的詳細相關訊息。儘管現在已有一些生理現象採用低解析度的sensor進行研究並成功發表研究成果，但對動植物科學與其他大部分生命科學研究來說，採用同時具有時間與空間高解析能力且兼顧動態的即時偵測 FRET biosensors，是目前最佳工具選擇。



圖一 Biosensor 基本設計理念與作用位置：1)左：結合蛋白（橘色）連結兩個對應螢光蛋白，CFP（藍色）與YFP（黃色）。作用物（紅色）與結合蛋白結合造成蛋白結構變化伴隨著兩個螢光蛋白的距離或立體空間轉變，形成FRET現象。右：單一螢光蛋白-GFP（綠色）連結結合蛋白-轉運蛋白（黃色）。因轉運蛋白活性改變而造成的結構變化伴隨著單一螢光強度的改變。2）左：不同種類的biosensor舉例；可溶性（soluble）、連結膜（membrane anchored）與膜穿透蛋白（transmembrane protein）。右：Genetically encoded fluorescent biosensors可置放於偵測於不同細胞位置與離子。（1）細胞質或核質；（2）液泡；（3）葉綠體或內質網；（4）質外體；（5）膜相關蛋白質；（6）粒腺體。英文縮寫：CW—Cell wall；PM—Plasma Membrane；CS—Cell Cytosol。

FRET技術原理

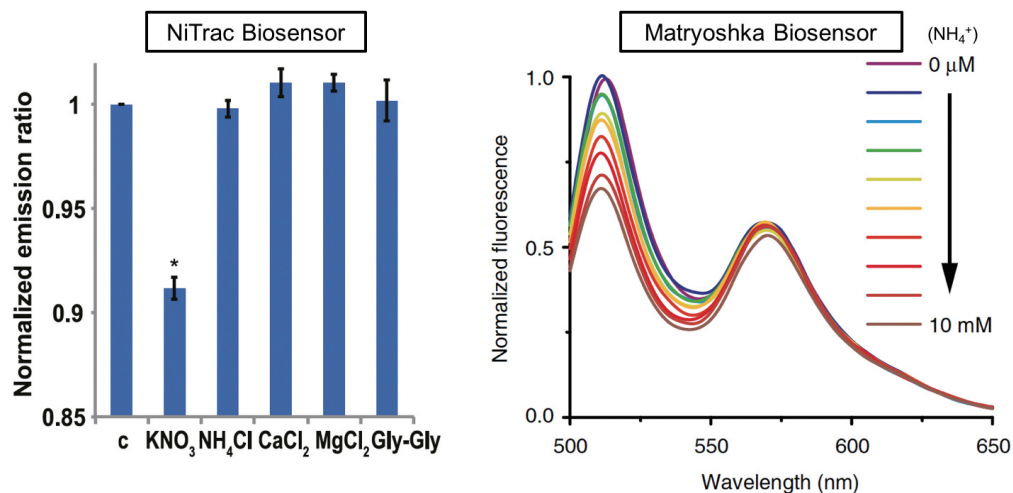
螢光能量共振轉移是距離很近的兩個螢光分子間產生的一種能量轉移現象。當供體螢光分子的發射光譜與受體螢光分子的吸收光譜重疊，並且兩個分子的距離在10nm範圍以內時，就會發生一種非放射性的能量轉移，即FRET現象，使得供體的螢光強度比它單獨存在時要低的多（螢光猝滅），而受體發射的螢光卻大大增強（敏化螢光）。在生命科學領域，FRET技術是檢測活體中生物大分子納米級距離和納米級距離變化的有力工具，可用於檢測某一細胞中兩個蛋白質分子是否存在直接的相互作用。正如前述，當供體發射的螢光與受體發色團分子的吸收光譜重疊，並且兩個探針的距離在10nm範圍以內時，就會產生FRET現象。而在生物體內，如果兩個蛋白質分子的距離在10nm之內，一般認為這兩個蛋白質分子存在直接相互作用。青色螢光蛋白（cyan fluorescent protein, CFP）、黃色螢光蛋白（yellow fluorescent protein, YFP）為目前研究中最廣泛應用的FRET對組。CFP的發射光譜與YFP的吸收光譜相重疊。將供體蛋白CFP和受體蛋白YFP分別與兩種目的蛋白融合表達。當兩個融合蛋白之間的距離在10nm的範圍內，則供體CFP發出的螢光可被YFP吸收，並激發YFP發出黃色螢光，此時通過測量CFP螢光強度的損失量來確定這兩個蛋白是否相互作用。兩個蛋白距離越近，CFP所發出的螢光被YFP接收的量就越多，檢測器所接收到的螢光就越少。諾貝爾得主 Dr. Roger Tsien 採用FRET技術檢測細胞內Ca²⁺的濃度變

化：將CFP和YFP分別於鈣調蛋白和鈣調蛋白結合肽融合表達於同一個細胞內。當細胞內具有高的 Ca^{2+} 濃度時，鈣調蛋白和鈣調蛋白結合肽結合，可誘發FRET，使受體蛋白YFP發出黃色螢光，因此細胞呈黃色。當細胞內 Ca^{2+} 濃度低時，FRET幾乎不發生，因此檢測時CFP被激發，發出綠色螢光，細胞呈綠色⁵。

小分子FRET Sensor的設計理念

小分子的螢光FRET-biosensor是進一步利用分析物與其結合蛋白的結合動作所伴隨的蛋白結構變化 (conformational changes) 所設計的。一般在設計新的biosensor初期，最關鍵的第一步為分析物結合蛋白的選擇。最常見的選擇方式是選擇分析物已知的直接結合蛋白或是受分析物直接調控的調控蛋白。Sensor產生的基本方式為將兩個螢光蛋白分別連結到分析物結合蛋白適當的位置上，當分析物與結合蛋白結合的同時並伴隨著結構性的轉變，使得兩個連結的螢光蛋白距離拉近、遠離或產生相對立體空間的轉動而產生FRET的現象，形成所謂的FRET biosensor (FRET原理詳細如上述)。此結合作用的反應發生前後或是分析物濃度的變化所造成兩個螢光蛋白能量轉移的相對應變化，形成了一個FRET的螢光比值前後變化的測量方式 (radiometric)。硝酸鹽運送活性感應器 (NiTrac activity sensor) 就是利用一對螢光蛋白結合硝酸轉運蛋白，當轉運蛋白運送硝酸鹽時所造成的conformational changes，使得兩螢光蛋白產生FRET ratio 前後改變的現象。因為是利用硝酸鹽轉運蛋白所製造的sensor，具有對硝酸鹽的相當高的專一性反應¹ (圖二)。

另一方面，單一的螢光蛋白也可用來設計成異位感應或強度感應的biosensor：其利用結合分析物反應的前後所造成的蛋白結構變化並伴隨其螢光能量變化。單一螢光的biosensor相對於radiometric FRET biosensor雖然相較容易偵測，但是因為缺乏radiometric FRET biosensor所具有的內部參考參數的特性，無法進行如環境因素等造成螢光強度校正以避免數據誤判。鉍鹽Matryoshka biosensor就是一個引進第二個校正螢光蛋白至單一螢光biosensor的成功案例² (圖二)。原單一螢光sensor螢光強度隨鉍鹽濃度增高而降低，新引進的校正蛋白不受鉍鹽的影響，因此可利用其特性計算比值變化而形成radiometric biosensor。Biosensors 的發明與應用對存在已久其他物理與化學性的生物科技技術形成重要的互補。近期多個國際科學研究報告發表，利用新研發的植物 biosensors 可以偵測植物中細胞間與細胞內離子與植物賀爾蒙的變化與生理現象，這項發明與知識對植物的生長、發育以及植物面對環境逆境下的反應提供了重要的參考資訊與深遠的影響。



圖二 Radiometric Biosensor。左，硝酸鹽 Biosensor-NiTrac：對硝酸鹽具有度專一性FRET ratio change 反應。右，鉍鹽Biosensor-Matryoshka：因引進不受鉍鹽濃度影響的校正螢光蛋白（放射光波長在570nm），而原單一螢光蛋白受到鉍鹽濃度影響螢光強度（放射光波長在520 nm），鉍鹽濃度越高放射光螢光強度越弱。藉由比較兩個螢光蛋白放射光螢光強度的比值，得到鉍鹽Radiometric Matryoshka Biosensor。

了解細胞間、細胞內或細胞內胞器中的離子與代謝產物的變化，對於釐清現有已知與開發未知的生理反應過程極為重要。尤其離子與代謝產物被層層的組織或細胞給包圍，添增了檢測的困難度。Genetically encoded fluorescent sensors可以針對細胞特特地點與位置施放，已達到偵測的目的（如圖一）。如今biosensors已經廣泛的被應用在生物層面，如鈣離子的濃度變化與角色對花粉管的生長、多個植物賀爾蒙對植物保衛細胞的調控、植物根部對遇到重金屬的反應與變化、糖在動植物中的運輸與儲存、氧化還原反應的過程與狀態、酸鹼值的偵測等。但是還有大部分的biosensors如今都還沒有實際誘導在與應用在活體動植物中。隨著未來這biosensors技術的發展與成熟，更多的活體偵測與大量的知識獲取預期成長中。

Biosensors未來與相對應的發展

如今biosensors不只可以用來偵測細胞內基因的表現、尋找未知調控蛋白^{1,6}、蛋白質量的多寡與表現位置及小分子與代謝產物在細胞內的動態變化與分佈；還可以用來偵測蛋白質的本質動態變化，如磷酸化與去磷酸化動態變化、受器活性、離子轉運蛋白活性。未來，我們可以期待biosensors將能提供更細微更小級距的細胞包器或單一分子的時間與空間變化。為了能夠使biosensors能夠得到更好與更廣泛的應用，相對應與整合性的儀器設備研發與發展，如高通量偵測或篩選系統、高時間與空間解析度影像系統，如層光螢光影像系統（light-sheet imaging system），更好的biosensors誘導方式或誘導到尚未詳細研究的動、植物物種，也將會是外來研究發展的重點項目。

參考文獻

1. Ho C-H, Frommer WB: Fluorescent sensors for activity and regulation of the nitrate transceptor CHL1/NRT1.1 and oligopeptide transporters. *Elife* 2014, **13**: e01917.
2. Ast C, Foret J, Oltrogge LM, De Michele R, Kleist TJ, Ho C-H, Frommer WB: Ratiometric Matryoshka biosensors from a nested cassette of green- and orange-emitting fluorescent proteins. *Nature Commun* 2017, **8**(1):431.
3. Okumoto S: Quantitative imaging using genetically encoded sensors for small molecules in plants. *Plant J* 2012, **70**:108-117.
4. Miyawaki A: Development of probes for cellular functions using fluorescent proteins and fluorescence resonance energy transfer. *Annu Rev Biochem* 2011, **80**:357-373.
5. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY: A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985, **260**:3340-3450.
6. Jones AM, Xuan Y, Xu M, Wang RS, Ho C-H, Lalonde S, You CH, Sardi MI, Parsa SA, Smith-Valle E, Su T, Frazer KA, Pilot G, Pratelli R, Grossmann G, Acharya BR, Hu HC, Engineer C, Villiers F, Ju C, Takeda K, Su Z, Dong Q, Assmann SM, Chen J, Kwak JM, Schroeder JI, Albert R, Rhee SY, Frommer WB: Border control--a membrane-linked interactome of Arabidopsis. *Science* 2014, **344**:711-716.