



基因编码神经调质荧光探针的研究进展与展望

冯杰思, 李毓龙*

北京大学生命科学学院, 膜生物学国家重点实验室, 北京 100871

* 联系人, E-mail: yulongli@pku.edu.cn

收稿日期: 2025-02-17; 接受日期: 2025-04-07; 网络版发表日期: 2025-04-17

国家自然科学基金(批准号: 31925017)和新基石科学基金会资助

摘要 随着神经科学研究的深入, 基因编码神经调质荧光探针因其高灵敏度和选择性、高时空分辨率、高细胞特异性及低侵入性, 成为实时监测神经调质动态变化的重要工具. 本文总结了近年来基因编码神经调质荧光探针的设计原理、优化策略及取得的显著进展, 并展望了未来探针的发展方向, 为神经调质荧光探针技术的发展提供新的思路.

关键词 基因编码, 神经调质, 荧光探针, 神经调控, 突触传递

人脑由数十亿个神经元组成, 其中大多数神经元通过化学突触释放不同种类的神经调质来相互通信, 从而控制感知、运动、学习和记忆等不同的生理功能. 神经调质是神经系统信息传递的核心分子, 其动态变化直接调控神经环路的功能. 然而, 传统的检测方法(如微透析、电化学检测)受限于时空分辨率, 难以实时监测神经调质的动态变化, 特别是在活体动物的复杂行为过程中. 近年来, 基因编码的神经调质荧光探针技术迅速发展, 因具有更高的时空分辨率、细胞特异性和较低的侵入性, 为神经科学研究提供了强大的工具. 这些探针能够在包括果蝇、斑马鱼和小鼠等活体动物中实时、高分辨率地精确监测神经调质在生理及病理条件下的释放和动态变化, 极大地推动了神经科学领域的研究进展. 本文综述了近十余年基因编码神经调质荧光探针的设计原理、最新进展及其应用, 并展望了神经调质检测技术领域未来的发展方向.

1 神经调质荧光探针的设计原理

基因编码的神经调质荧光探针通常由荧光报告模块和特定的配体识别单元构成, 能够选择性地与目标神经调质结合, 从而引发荧光信号的变化. 探针的原理主要依赖于荧光信号与神经调质浓度变化之间的关联, 根据荧光模块设计策略的不同, 探针可以分为非单一荧光分子和单一荧光分子两大类(图1).

1.1 非单一荧光分子

非单一荧光分子探针通常由两个荧光分子和配体识别单元构成. 通过配体结合导致两个荧光分子间偶极子距离或方向发生变化, 发生分子间能量共振转移效应, 实现配体分子的特异检测. 但由于非单一荧光分子构建的探针, 其荧光信号的动态变化受限于最大的荧光能量转移效率, 常常无法达到在体记录所需的信噪比^[1].

引用格式: 冯杰思, 李毓龙. 基因编码神经调质荧光探针的研究进展与展望. 中国科学: 生命科学

Feng J S, Li Y L. Research progress and prospects of genetically encoded neuromodulator sensors (in Chinese). Sci Sin Vitae, doi: [10.1360/SSV-2025-0038](https://doi.org/10.1360/SSV-2025-0038)

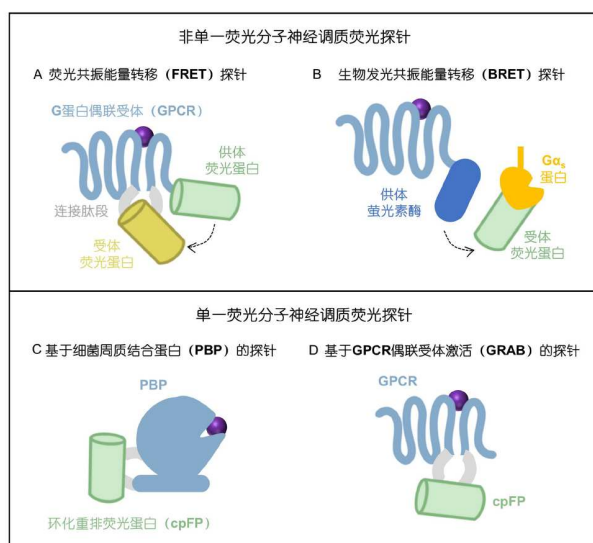


图 1 根据荧光模块设计策略不同的神经调质荧光探针示意图。A: 由荧光蛋白供体和受体与G蛋白偶联受体GPCR配体识别单元构成的FRET神经调质荧光探针, 此处展示的是在GPCR第三个胞内环插入受体荧光蛋白和在GPCR C端连接供体荧光蛋白的情况; B: 由萤光素酶供体、荧光蛋白受体和GPCR识别单元构成的BRET神经调质荧光探针, 此处展示的是在GPCR C端连接萤光素酶供体和G蛋白的 α 亚基($G\alpha_s$)连接荧光蛋白受体的情况。A和B中虚线箭头均表示荧光共振能量的转移方向。C: 由细菌周质结合蛋白(PBP)与环化重排荧光蛋白构建的探针; D: 由GPCR和第三个胞内环插入环化重排荧光蛋白构成的GPCR激活原理(GRAB)荧光探针。图中紫色圆球代表对应的配体分子

Figure 1 Schematic representation of neuromodulator fluorescent sensors based on different design strategies. A: FRET-based neuromodulator fluorescent sensors composed of a fluorescent protein donor, an acceptor, and a G protein-coupled receptor (GPCR) ligand recognition module. The diagram illustrates an example where the acceptor fluorescent protein is inserted into the third intracellular loop of the GPCR, while the donor fluorescent protein is fused to the GPCR C-terminus; B: BRET-based neuromodulator fluorescent sensors composed of a luciferase donor, a fluorescent protein acceptor, and a GPCR recognition module. The diagram shows an example where the luciferase donor is fused to the GPCR C-terminus, and the $G\alpha_s$ subunit of the G protein is fused to the fluorescent protein acceptor. Dashed arrows in (A) and (B) indicate the direction of FRET. C: Periplasmic binding protein (PBP)-based sensors composed of a bacterial PBP and a circularly permuted fluorescent protein; D: GPCR activation (GRAB)-based sensors composed of a GPCR with a circularly permuted fluorescent protein inserted into its third intracellular loop. The purple spheres in the figure represent the corresponding ligand molecules

荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)探针是利用两个具有光谱重叠性质的FRET荧光蛋白对之间的能量转移效应而构建的探针。FRET荧光蛋白对包括一个荧光蛋白供体和一个荧光蛋白受体, 当荧光蛋白供体受激发光激发后, 供体荧光蛋白的激发态能量可以通过非辐射弛豫过程转移到受

体荧光蛋白上, 导致受体发出荧光。神经调质结合到与荧光蛋白对相连的配体结合口袋时, 配体识别单元的构象变化可通过改变荧光蛋白供体和受体之间的距离或排列方式, 从而导致FRET信号的变化。例如, 基于蓝色荧光蛋白-黄色荧光蛋白对发展的FLIPE^[2]和 α -1-pha2AR-cam^[3]等探针, 能够在活细胞中检测谷氨酸和去甲肾上腺素等神经调质。

与FRET不同, 生物发光共振能量转移(bioluminescence resonance energy transfer, BRET)探针是使用生物发光分子作为供体, 荧光蛋白作为受体。当探针与目标分子结合并发生构象变化时, 生物发光供体的发光能量部分传递给荧光受体, 产生特定的荧光信号。BRET的优势在于它不依赖于外部光源, 可适用于高通量药物筛选、小型化或便捷化检测仪器的制造及复杂生物环境中的活体成像。Galés等人^[4]基于 β 2肾上腺素受体与BRET供体-受体对萤光素酶Rluc和绿色荧光蛋白(green fluorescence protein, GFP)构建了首个利用BRET原理检测受体与下游G蛋白互作(同时可用于检测去甲肾上腺素释放)的探针。然而, 由于BRET探针的信号依赖于大量萤光素酶底物的催化, 其应用场景受到一定限制, 例如不适合长时间的信号稳定性和不同个体间信号的可重复性。

1.2 单一荧光分子

单一荧光分子探针通常采用环化重排的荧光蛋白(circularly permuted fluorescent protein, cpFP)作为荧光报告模块, 具有分子小、适用配体种类多和荧光变化动态范围大等优势。通过将其与配体识别模块相连, 配体结合时的构象变化引起荧光分子的荧光强度发生改变, 从而实现配体浓度变化的报告。另外, 不同于非单一荧光分子探针, 构建单一荧光分子探针可以通过选择不同光谱特性的荧光分子(如具有光谱不重叠特性的一系列荧光蛋白), 构建多色荧光探针, 从而实现复杂神经系统中多种神经调质的多通道检测。根据配体识别模块的不同, 单一荧光分子的神经调质荧光探针通常可分为基于细菌周质结合蛋白(periplasmic binding protein, PBP)和基于G蛋白偶联受体激活(G-protein coupled receptor activation based, GRAB)原理构建的两类。

PBP类探针通常由细菌来源的结合蛋白和一类对环境敏感的cpFP构成。细菌周质结合蛋白能够特异性

识别和结合特定的目标神经调质, 在结合目标分子后发生构象变化, 从而引发与其相连的cpFP荧光信号的变化。由于细菌来源的结合蛋白可通过细菌体系进行探针信号的高通量筛选, 这类探针通常可达到较高的亮度和灵敏度, 适用于精确监测特定神经递质的释放^[5,6]。然而, 在一些情况下, 细菌来源探针在哺乳动物细胞中的表达、转运和折叠可能受到限制^[7]。另一方面, 由于神经调质释放检测的特殊性, 需要相应的探针以正确的结构表达在细胞膜上才能检测细胞外的调质浓度变化, 而细菌来源的神经调质探针实现较好的细胞膜定位和行使功能具有一定的难度。近年来, 也有研究者通过添加不同膜定位序列来提升细菌来源神经调质探针在哺乳动物细胞中的上膜情况^[8]。此外, 由于原核生物与真核生物的进化距离较远, 细菌周质结合蛋白对配体的亲和力和响应速率可能不能真实反映哺乳动物中内源神经调质的动力学^[9]; 更重要的是, 人们无法在细菌等原核生物中对哺乳动物的所有神经调质, 特别是神经肽类, 都找到一一对应的结合蛋白。通过机器学习等方法改造周质结合蛋白的配体结合口袋, 虽然可以调整配体亲和力, 或使其响应其他神经调质分子, 但这样同时会导致探针分子特异性的下降^[8], 极大影响其在体应用的精准性。

GRAB探针由结合特定神经调质的G蛋白偶联受体(G-protein coupled receptor, GPCR)和cpFP组成, 通过将神经调质与GPCR结合后引发的构象变化转化为cpFP的荧光亮度变化来检测神经调质浓度的变化。这种设计方法已被广泛应用于监测多种神经调质分子, 如乙酰胆碱^[10,11]、单胺类神经调质^[12~20]、嘌呤类^[21~24]、脂类^[25,26]和神经肽^[27~33]等。

GPCR是最大的膜蛋白家族, 作为天然的神经调质传感器进化而来, 可用于检测包括神经递质和神经调质在内的多种细胞外信号分子, 具有适用于哺乳动物在体的高灵敏度、特异性和时间分辨率。目前已发现许多神经调质具有多种GPCR受体亚型, 它们对配体的结合具有多样的亲和力和响应速率。例如, 人类中已鉴定出五种亚型的乙酰胆碱GPCR, 每种亚型具有不同的乙酰胆碱亲和力和/或药理学特性^[34]。此外, 从原核生物到真核生物的不同物种中GPCR的保守性较好, 这种跨物种GPCR天然的多样性为GRAB探针的设计和优化提供了广泛的选择。

在配体结合后, GPCR会迅速发生构象变化, 其中

构象变化最大的部分位于第五和第六个跨膜区之间的第三个胞内环^[35]。构建基于单个荧光分子的神经调质探针时, 通常将cpFP插入这一区域, 并表达在培养的哺乳动物细胞中, 通过以下五步进行筛选和优化。(i) 筛选GPCR受体种源和亚型: 将cpFP插入每个种源或亚型GPCR的第三个胞内环中, 评估嵌合体的表现, 包括膜运输、动态范围、亲和力和特异性等, 从而确定受体骨架蛋白。(ii) 优化cpFP在GPCR上的插入位置: 以步进的方式(例如从5, 2到1个氨基酸为步进)迭代筛选cpFP的插入位置。(iii) 第三个胞内环的截短: 系统性地截短第三个胞内环, 也就是cpFP两侧的连接肽段, 从而增加配体结合诱导的构象变化与荧光信号变化之间的耦合程度, 确定cpFP插入的最佳位置。(iv) 连接肽段重要位点的饱和突变: 对连接区域的重要位点进行饱和突变, 获得具有最高信噪比的探针。(v) 调整探针亲和力: 为了适应不同脑区或条件下释放的神经调质浓度, 针对GPCR的配体结合口袋或其他影响配体结合的位点进行饱和突变, 获得具有不同亲和力的探针变体。同时, 还可以获得对配体不敏感的突变体探针, 作为实验对照。

GRAB探针的优化过程具有重复性和迭代性, 通过在原代神经细胞、急性脑切片、果蝇、斑马鱼和活体小鼠等体系中检测探针的表达、上膜以及对外源和不同生理及病理条件下内源神经调质释放的检测, 可为下一轮在培养哺乳动物细胞中探针的优化提供方向。

在对一系列GRAB探针的刻画中, 研究者们发现, 它们均不会通过偶联GPCR内源的下游信号通路(包括G蛋白通路和 β -Arrestin通路)而引起内源信号传递的改变^[10~20,26]。另外, 研究者还发现, 过量表达GRAB探针也不会影响内源性调质受体在配体结合后引起下游信号的浓度依赖曲线^[14,26]。同时, 在体过量表达GRAB探针与不表达探针时, 内源钙信号没有显著区别^[17,19]。这一系列结果显示, GRAB探针并不会影响内源神经调质信号的传递, 也不会与内源性的调质受体产生竞争效应。

2 神经调质及其荧光探针的应用

2.1 单胺类神经调质及探针应用

单胺类神经调质是一类重要的神经调质, 包括多

巴胺(dopamine, DA)、去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)、5-羟色胺(serotonin, 5-HT)和组胺(histamine, HA)。它们在神经系统中广泛分布,参与调控多种生理过程,如运动控制、情绪调节、睡眠-觉醒周期、学习与记忆等。DA主要与奖赏、动机和运动功能相关,其异常与帕金森病、成瘾和精神分裂症等疾病密切相关。NE在应激反应、注意力和心血管功能中起关键作用。5-HT则调控情绪、食欲和睡眠,其功能异常与抑郁症、焦虑症等精神疾病相关。HA参与免疫反应、睡眠-觉醒周期和认知功能。单胺类神经调质之间化学结构相似,功能上有共同协同、也有相互独立。为更好地研究单胺类神经调质在生理和病理过程中的作用,人们需要一类能够实时、灵敏、特异地检测不同单胺类神经调质的工具,以研究在活体模式生物中、复杂行为模式下单胺类神经调质信号的动态变化情况。

2018年, Sun等人^[20]和Patriarchi等人^[36]基于不同多巴胺受体亚型与环化重排的绿色荧光蛋白(circular permuted enhanced green fluorescent protein, cpEGFP)融合,分别开发了初代绿色荧光DA探针GRAB_{DA}和dLight,首次实现在活体动物中,包括果蝇、斑马鱼和小鼠,对内源释放DA精准、特异地动态检测。2020年,研究团队^[18,37]进一步拓展了DA探针的光谱性质,利用环化重排的绿色荧光蛋白(cpmApple)开发了红色荧光DA探针,其中Sun等人^[18]开发的具有不同DA亲和力的rDA1m(m代表medium,中DA亲和力版本)和rDA1h(h代表high,高DA亲和力版本)可与其他绿色荧光探针(如钙离子探针、神经递质探针等)共同使用,实现两种神经信号的同时记录,优化的第二代绿色荧光DA探针(DA2m和DA2h),较第一代探针在反应幅度上提升了2~3倍。2024年, Zhuo等人^[15]再次优化红绿双色DA探针,获得第三代绿色荧光(DA3m和DA3h)以及红色荧光(rDA3m和rDA3h)探针。应用新一代超灵敏的GRAB_{DA}探针,研究者在小鼠执行多种行为时,具有空间分辨地监测到皮层中空间异质性的多巴胺释放。这些多样化DA探针的开发和在体的应用大大增强了对DA在奖励、学习和运动等过程中发挥作用的解释。

2019年, Feng等人^[19]开发了第一代绿色荧光GRAB_{NE}探针,并首次实现斑马鱼和小鼠体内光遗传和行为刺激引起的内源去甲肾上腺素释放的检测。

2024年, Feng等人^[13]继续优化得到了第二代具有不同NE亲和力的NE2m和NE2h探针,与第一代GRAB_{NE}探针和2023年Kagiampaki等人^[38]开发的nLight探针相比,在体内外均表现出优越的亮度、灵敏度和响应能力。利用NE2m和NE2h,研究人员在自由运动的小鼠蓝斑和下丘脑等关键脑区中精确地监测到特异性去甲肾上腺素的动态变化。为了便于使用并进一步提升多通道成像的能力,研究团队还开发了Cre依赖性转基因小鼠,这些小鼠能够同时表达绿色荧光的NE2m和红色荧光的钙离子指示剂jRGECO1a。利用该转基因小鼠表达NE和钙离子的指示剂,成功在小鼠的睡眠-觉醒周期、感知处理和运动行为中同步监测NE和钙离子的动态变化。章鱼胺(octopamine, OA)是一种在无脊椎动物中类似于脊椎动物NE的重要单胺类神经递质,在包括嗅觉联想学习等多种生物功能中发挥关键作用, Lv等人^[12]开发GRAB_{OA}绿色荧光探针OA1.0,成功监测果蝇厌恶学习模型中OA在学习中枢蘑菇体中的释放。

2021年,利用GRAB策略, Wan等人^[17]基于内源5-HT受体与cpEGFP融合,通过一系列蛋白质工程优化,成功开发了初代5-HT绿色荧光探针5-HT1.0。同期开发的例如iSeroSnFR^[8], PsychLight^[39]和sDarken^[40]等5-HT探针在荧光变化幅度、灵敏度或分子特异性上仍有所限制。2024年, Deng等人^[14]基于GRAB探针策略,加入不同物种骨架蛋白的筛选,进一步优化得到新一代绿色荧光5-HT探针5-HT3.0,并拓展其光谱范围至红色荧光的r5-HT1.0探针,这些探针在灵敏度、特异性和时空分辨率上具有显著优势。特别地,绿色荧光探针g5-HT3.0能够在体外实现高达1300%的荧光增幅,而红色荧光探针r5-HT1.0则更适用于多色成像,并能提供超过300%的荧光响应。这些探针不仅能够捕捉到皮层下5-HT的释放,还能够自由活动的小鼠中监测到5-HT在不同脑区的释放模式,并通过大尺度成像揭示不同生理及病理条件下5-HT的分布和变化。此外,红色荧光探针因其较长的激发波长,具有在体内成像中更好的光学特性,如更深的组织穿透性、更低的自发荧光和较低的光毒性,适合用于多通道成像。

2023年, Dong等人^[16]开发了两种具有不同亲和力的基因编码的绿色荧光GRAB_{HA}探针HA1m和HA1h。这些探针具有优异的光稳定性、亚秒级响应动力学、

纳摩尔亲和力和高特异性,能够实时监测组胺的释放。在小鼠的急性脑切片中,使用这些探针成功地监测了电刺激诱导的组胺释放;在自由活动的小鼠中,研究者也能记录到下丘脑前视区和前额叶皮层在睡眠-觉醒周期中的组胺释放,发现不同脑区的组胺动态表现出显著差异。这些新型的GRAB_{HA}探针,可以帮助人们深入揭示组胺在健康与疾病中的作用,具有广泛的应用前景。

2.2 其他小分子神经调质及探针

乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)参与如肌肉收缩、心血管功能、神经可塑性、注意力和记忆等功能的调控。通过将人源M3型ACh受体(M3R)与cpEGFP结合, Jing等人^[10]率先开发了GACH2.0(简称ACh2.0)绿色荧光探针,该探针能够将ACh诱导的M3R构象变化转化为敏感的荧光响应。ACh2.0对生理浓度的ACh具有选择性响应,亲和力(EC₅₀)为2 μmol/L,并已被应用于多种模式生物中检测胆碱能信号的内源性释放和调控。Jing等人^[11]通过定点突变和细胞高通量筛选技术,进一步优化了GRAB_{ACh}的性能,使用优化的ACh3.0绿色荧光探针,研究者在转基因果蝇的嗅觉中枢中揭示了ACh信号的区域性响应,尤其是在气味和身体电击等外部刺激下的反应。此外,通过光纤光度测量和双光子成像技术,还成功检测了小鼠在执行各种行为时多个脑区中的单次实验ACh动态变化。这些新型GRAB_{ACh}探针为研究胆碱能信号在复杂神经系统中的时空动态提供了强有力的工具。Borden等人^[7]曾在2020年报道了一种基于PBP构建的ACh荧光探针iAChSnFR,但其对内源ACh的检测灵敏度和信噪比较为受限。

谷氨酸和γ-氨基丁酸(gamma-aminobutyric acid, GABA)通过激活离子型受体(如谷氨酸受体、GABA受体)引发膜电位变化,从而启动快速且空间限制的突触通信。它们是中枢神经系统最为重要的兴奋性和抑制性的小分子神经递质。Marvin等人^[5]基于PBP策略,将cpEGFP插入谷氨酸转运蛋白Glt1中,开发了iGluSnFR。为了提高探针的灵敏度和响应速度,iGluSnFR系列经过多次改进,成功优化为iGluSnFR3探针^[41],它在双光子激发下的灵敏度提高了约20倍,且响应速度约为前代版本的两倍。另外,Marvin等人^[42]还利用PBP原理开发了首个遗传编码的GABA荧

光探针, iGABASnFR。2023年Magloire等^[43]利用优化的iGABASnFR2与膜片钳技术,发现周期性的癫痫样放电前会出现瞬时的、区域范围内的GABA波动。但由于iGABASnFR系列的探针由PBP策略构建,其来源于细菌的结合蛋白在哺乳动物细胞中的表达和折叠受限,其在活体内的信噪比较低,仍较难广泛用于自由移动动物中递质释放机制的研究。

嘌呤类神经调质,包括三磷酸腺苷(adenosine 5'-triphosphate, ATP)和腺苷(adenosine, Ado)等,在神经系统中扮演着重要角色。ATP不仅是细胞内的能量分子,还作为细胞外信号分子(嘌呤类调质)参与疼痛感知、机械感觉传递等多种生理过程。ATP通过激活离子型P2X受体和代谢型P2Y受体发挥作用,其异常信号传导与多种病理过程相关。Ado则参与睡眠-觉醒周期、学习与记忆、心血管功能和免疫反应等生理过程,其信号异常与疼痛、癫痫、中风和神经退行性疾病等疾病密切相关。基于PBP优化的iATPSnFR^[9]可成功用于检测胞内ATP的变化,提供了较高的时空分辨率,但其灵敏度和信噪比限制了其在活体中作为神经调质荧光探针检测胞外ATP的应用。Wu等基于GRAB策略开发了用于实时监测胞外ATP和Ado动态变化的绿色荧光探针ATP1.0^[23]和Ado1.0^[24]。其中ATP1.0成功在海马原代培养细胞检测到刺激诱导和自发的ATP释放,在斑马鱼模型中观察到损伤诱导的ATP释放以及小鼠皮层中脂多糖诱导的星形胶质细胞ATP释放。而利用Ado1.0的研究发现在小鼠控制睡眠和觉醒的关键脑区基底前脑中胞外Ado浓度在神经元活动依赖下迅速增加。

另外, Umpierre等人^[21]利用GRAB系列UDP1.0绿色荧光探针,发现尿苷二磷酸(uridine diphosphate, UDP)释放可能是大脑不同区域对癫痫和兴奋性毒性的保守反应。这一发现揭示了UDP在神经系统病理过程中的潜在作用,为进一步研究其功能提供了新的视角。

2.3 脂类分子及探针

内源性大麻素(endocannabinoids, eCBs)是一类重要的逆行神经调质,参与突触可塑性、情绪调节、疼痛感知、睡眠-觉醒周期等多种生理过程。Dong等人^[26]基于人内源大麻素1型受体开发了GRAB_{eCB}, eCB2.0能够以高时空分辨率检测在体eCB的动态变

化。特别是在癫痫模型中, 研究者观察到eCB释放波与钙离子波在海马中的传播过程, 揭示了eCB在病理状态下的动态特征。Sang等人^[25]利用全新开发的基于前列腺素D₂受体1型构建的GRAB_{PGD2}(PGD2-1.0)绿色荧光探针检测到睡眠剥夺时大量升高的大脑中的前列腺素D₂(PGD₂)及引起炎症反应的机制。中枢和外周系统中重要的脂质分子还有很多, 仅前列腺素就有D₂, E₂, F₂ α 等多种不同的分子结构, 因此在开发脂类分子探针时, 高分子特异性及选择性将是一个需要十分关注的优化目标。

2.4 神经肽类及探针

神经肽自近70年前首次被发现作为内分泌系统的激素调节因子以来, 逐渐被认为是中枢和外周组织中重要的信号分子。在大脑中, 神经肽调节诸如消化、代谢、睡眠、昼夜节律、生殖和高级认知等多种生理功能。由于神经肽信号主要通过GPCRs介导, 因此利用GRAB策略开发神经肽类的荧光探针具有极大的优势。2023年, Wang等人^[28]利用GRAB探针结合嫁接策略, 系统性地开发了一系列神经肽类绿色荧光探针, 用于检测体内多种神经肽, 包括生长抑素(somatostatin, SST)、促肾上腺皮质激素释放因子(corticotropin-releasing factor, CRF)、胆囊收缩素(cholecystokinin, CCK)、神经肽Y(neuropeptide Y, NPY)、神经降压素(neurotensin, NTS)和血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide, VIP)等, 并成功实现在体检测内源SST、CRF和催产素(oxytocin, OT)^[29]的动态变化。这些荧光探针能够在纳摩尔浓度下检测特定神经肽的结合, 为研究神经肽的释放、功能及其在生理和病理条件下的调节提供了强有力的工具。

基于类似GRAB探针的策略, Duffet等人^[33]基于人源的2型食欲素受体开发了OxLight1, 报道了在不同脑区自发跑步行为、急性应激以及睡眠-清醒转换相关的食欲素释放。2023年, Duffet等人^[32]基于人源胰高血糖素样肽-1(GLP-1)受体开发了GLPLight1, 可用于GLP-1和衍生物的检测, 然而这一探针是否可用于内源GLP-1释放的监测还有待研究。

阿片类神经肽通过激活 κ 、 δ 和 μ 阿片受体(κ OR, δ OR和 μ OR)调控疼痛、奖赏、厌恶等生理过程, 具有重要的临床意义。Dong等人^[31]基于不同的阿片受体开

发了一类基因编码荧光探针, 分别称为 κ Light, δ Light和 μ Light。在小鼠实验中, 研究者成功利用这些探针检测了伏隔核中阿片肽在恐惧和奖赏条件下的快速释放, 揭示了阿片肽在不同行为状态下的亚区域特异性释放动态。此外, 痛敏肽/孤啡肽(nociceptin/orphanin-FQ, N/OFQ)是近年来备受关注的另一种关键阿片肽, 在动机、应激、摄食和睡眠等多种中枢行为过程中具有重要的调控功能。Zhou等人^[30]开发了NOPLight, 能够灵敏地检测组织和自由行为动物中N/OFQ阿片肽信号的动态变化。这些工具为研究阿片类神经肽的功能及其在行为调控中的作用提供了新的可能性。

神经肽与小分子神经调质在单个神经元中的共存和共传递是跨物种观察到的基本特征。Xia和Li^[27]利用GRAB策略, 基于果蝇的短神经肽F(sNPF)受体蛋白开发了sNPF1.0绿色荧光探针, 并研究揭示了sNPF和ACh在释放过程中具有不同的时空动态和分子调控方面的独特机制。

3 总结与展望

基因编码的神经调质荧光探针技术在复杂神经科学研究中提供了革命性的工具, 使得我们能够在活体动物中实时、动态地监测各种神经调质的释放和变化。在选取特定神经调质荧光探针时, 除应选择最新发表的版本外, 还应综合考虑不同版本的荧光反应强度、亲和力和骨架蛋白的药理学特性等特征(表1)。随着神经调质荧光探针信噪比的不断提升和检测物种类的不断扩展, 未来我们能够实现对更广泛神经调质分子和更复杂生物体系的解析。这将为神经科学的基础研究、疾病机制的探索以及神经药物的开发提供强有力的支持。

未来的发展可能会集中在以下几个方面: 一是发展更高通量的方法进一步优化提高探针的灵敏度和选择性, 以便能够特异地检测更低浓度的神经调质和更少的释放; 二是逐渐完善神经调质荧光探针库, 开发更多类型的探针以满足不同的研究需求, 包括针对新检测物和新光谱特性; 三是提升探针的多重性, 拓展可同时监测多种神经调质的通道数量; 四是从“定性”到“定量”探针的开发, 将这些探针用于疾病模型中, 为精神类疾病的早期诊断和治疗提供新的思路。

表 1 神经调质荧光探针汇总

Table 1 Summary of neuromodulator fluorescent sensors

荧光	检测物种类	神经调质	最新版本探针名称	骨架蛋白	最大荧光反应 (%)	亲和力 (EC ₅₀)	参考文献		
单胺类	5-Hydroxytryptamine (5-HT)		5-HT3.0		1300	150 nmol/L			
			5-HT2m	Mouse 5-hydroxytryptamine receptor 4 (HTR4)	1400	1.1 μmol/L	[14]		
			5-HT2h		600	80 nmol/L			
	Dopamine (DA)		gDA3m	Human dopamine receptor D1 (D1R)	1000	89 nmol/L	[15]		
			gDA3h	Bovine dopamine receptor D1 (D1R)	1240	22 nmol/L			
	Norepinephrine (NE)		NE2m	Human alpha-2 adrenergic receptor (α2AR)	381	380 nmol/L	[13]		
			NE2h		415	190 nmol/L			
	Histamine (HA)		HA1h	Human histamine receptor H4 (H4R)	180	17 nmol/L	[16]		
			HA1m	Water bear histamine receptor H1 (H1R)	320	380 nmol/L			
		Octopamine (OA)		OA1.0	Drosophila octopamine receptor beta 2 (Octβ2R)	660	200 nmol/L	[12]	
乙酰胆碱	Acetylcholine (ACh)		gACh3.0	Human muscarinic acetylcholine receptor M3 (M3R)	280	2.2 μmol/L	[11]		
谷氨酸	Glutamate		iGluSnFR3 v857	Escherichia coli glutamate transporter (Glt1)	1750	8.2 μmol/L	[41]		
			iGluSnFR3 v82		700	4.5 μmol/L			
γ-氨基丁酸	Gamma-aminobutyric acid (GABA)		iGABASnFR2	Pseudomonas fluorescens Pf622	500	6.4 μmol/L	[43]		
嘌呤类	Adenosine (Ado)		Ado1.0	Human adenosine A2A Receptor (A2AR)	110	30 nmol/L	[22]		
			Ado1.0m		350	3200 nmol/L			
	Adenosine 5'-triphosphate (ATP)		ATP1.0	Human purinergic P2Y1 receptor (P2Y1R)	500	80 nmol/L	[23]		
			ATP1.0-L	Human P2Y1R	1000	32 μmol/L			
	Uridine diphosphate (UDP)		UDP1.0	Chicken purinergic P2Y6 receptor (P2Y6R)	600	91 nmol/L	[21]		
绿色	脂类	Endocannabinoid (eCB)		eCB2.0	Human cannabinoid receptor 1 (CB1R)	300	3.1 μmol/L (2-AG); 0.2 μmol/L (AEA)	[26]	
				PGD2-1.0	Bat prostaglandin D2 receptor 1 (DP1R)	200	10 nmol/L	[25]	
		Vasoactive Intestinal Peptide (VIP)		VIP1.0	Human vasoactive intestinal peptide receptor 2 (VIPR2)	360	19 nmol/L		
		Cholecystokinin (CCK)		CCK1.0	Human cholecystokinin B receptor (CCKBR)	840	4 nmol/L (CCK-8s); 2.9 nmol/L (CCK-4)		
		Neuropeptide Y (NPY)		NPY1.0	Human neuropeptide Y receptor 1 (NPY1R)	490	43 nmol/L	[28]	
		Corticotropin-Releasing Factor (CRF)		CRF1.0	Human corticotropin-releasing factor receptor 1 (CRF1R)	1200	33 nmol/L		
		Somatostatin (SST)		SST1.0	Human somatostatin receptor 5 (SSTR5)	430	13 nmol/L (SST-28); 69 nmol/L (SST-14)		
	多肽类	Neurotensin (NTS)		NTS1.0	Human neurotensin receptor 1 (NTSR1)	250	6 nmol/L		
				Oxytocin (OT)		OT1.0	Bovine oxytocin receptor (OTR)	410	3 nmol/L
		Short Neuropeptide F (sNPF)		sNPF1.0	Culex quinquefasciatus short neuropeptide F receptor (sNPF1R)	300	64 nmol/L	[27]	
				Orexin		OxLight1	Human orexin 2 receptor (OX2R)	906 (Orexin-A); 859 (Orexin-B)	75 nmol/L (Orexin-A); 47 nmol/L (Orexin-B)
			Glucagon-like Peptide 1 (GLP-1)		GLPLight1	Human glucagon-like peptide 1 receptor (GLP1R)	528	27.6 nmol/L	[32]
		Opioids			κLight	Human kappa opioid receptor (κOR)	113	10.5 nmol/L (DynA8)	
					δLight	Human delta opioid receptor (δOR)	246	6.5 nmol/L (ME)	[31]
				μLight	Human mu opioid receptor (μOR)	55	1.61 μmol/L (β-endorphin)		
	Nociceptin/orphanin FQ (N/OFQ)		NOPLight	Human nociceptin/orphanin FQ receptor (NOPR)	388	28.65 nmol/L	[30]		
红色	单胺类	Dopamine (DA)		rDA2m (D2)	Red fire ant dopamine receptor D2 (D2R)	530	210 nmol/L	[18]	
				rDA2h (D2)	red fire ant D2R	240	9.8 nmol/L		
			rDA3m (D1)	Human dopamine receptor D1 (D1R)	1460	140 nmol/L	[15]		
			rDA3h (D1)	human D1R	1420	22 nmol/L			
		5-hydroxytryptamine (5-HT)		r5-HT1.0	Mouse 5-hydroxytryptamine receptor 4 (HTR4)	330	790 nmol/L	[14]	

参考文献

- 1 Dürst C D, Wiegert J S, Helassa N, et al. High-speed imaging of glutamate release with genetically encoded sensors. *Nat Protoc*, 2019, 14: 1401–1424
- 2 Okumoto S, Looger L L, Micheva K D, et al. Detection of glutamate release from neurons by genetically encoded surface-displayed FRET nanosensors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 8740–8745
- 3 Vilaradaga J P, Bünemann M, Krasel C, et al. Measurement of the millisecond activation switch of G protein-coupled receptors in living cells. *Nat Biotechnol*, 2003, 21: 807–812
- 4 Galés C, Rebois R V, Hogue M, et al. Real-time monitoring of receptor and G-protein interactions in living cells. *Nat Methods*, 2005, 2: 177–184
- 5 Marvin J S, Borghuis B G, Tian L, et al. An optimized fluorescent probe for visualizing glutamate neurotransmission. *Nat Methods*, 2013, 10: 162–170
- 6 Marvin J S, Scholl B, Wilson D E, et al. Stability, affinity, and chromatic variants of the glutamate sensor iGluSnFR. *Nat Methods*, 2018, 15: 936–939
- 7 Borden P M, Zhang P, Shivange A V, et al. A fast genetically encoded fluorescent sensor for faithful *in vivo* acetylcholine detection in mice, fish, worms and flies. *bioRxiv*, 2020, 939504
- 8 Unger E K, Keller J P, Altermatt M, et al. Directed evolution of a selective and sensitive serotonin sensor via machine learning. *Cell*, 2020, 183: 1986–2002.e26
- 9 Lobas M A, Tao R, Nagai J, et al. A genetically encoded single-wavelength sensor for imaging cytosolic and cell surface ATP. *Nat Commun*, 2019, 10: 711
- 10 Jing M, Zhang P, Wang G, et al. A genetically encoded fluorescent acetylcholine indicator for *in vitro* and *in vivo* studies. *Nat Biotechnol*, 2018, 36: 726–737
- 11 Jing M, Li Y, Zeng J, et al. An optimized acetylcholine sensor for monitoring *in vivo* cholinergic activity. *Nat Methods*, 2020, 17: 1139–1146
- 12 Lv M, Cai R, Zhang R, et al. An octopamine-specific GRAB sensor reveals a monoamine relay circuitry that boosts aversive learning. *Natl Sci Rev*, 2024, 11: nwae112
- 13 Feng J, Dong H, Lischinsky J E, et al. Monitoring norepinephrine release *in vivo* using next-generation GRABNE sensors. *Neuron*, 2024, 112: 1930–1942.e6
- 14 Deng F, Wan J, Li G, et al. Improved green and red GRAB sensors for monitoring spatiotemporal serotonin release *in vivo*. *Nat Methods*, 2024, 21: 692–702
- 15 Zhuo Y, Luo B, Yi X, et al. Improved green and red GRAB sensors for monitoring dopaminergic activity *in vivo*. *Nat Methods*, 2023, 21: 680–691
- 16 Dong H, Li M, Yan Y, et al. Genetically encoded sensors for measuring histamine release both *in vitro* and *in vivo*. *Neuron*, 2023, 111: 1564–1576.e6
- 17 Wan J, Peng W, Li X, et al. A genetically encoded sensor for measuring serotonin dynamics. *Nat Neurosci*, 2021, 24: 746–752
- 18 Sun F, Zhou J, Dai B, et al. Next-generation GRAB sensors for monitoring dopaminergic activity *in vivo*. *Nat Methods*, 2020, 17: 1156–1166
- 19 Feng J, Zhang C, Lischinsky J E, et al. A genetically encoded fluorescent sensor for rapid and specific *in vivo* detection of norepinephrine. *Neuron*, 2019, 102: 745–761.e8
- 20 Sun F, Zeng J, Jing M, et al. A genetically encoded fluorescent sensor enables rapid and specific detection of dopamine in flies, fish, and mice. *Cell*, 2018, 174: 481–496.e19
- 21 Umpierre A D, Li B, Ayasoufi K, et al. Microglial P2Y6 calcium signaling promotes phagocytosis and shapes neuroimmune responses in epileptogenesis. *Neuron*, 2024, 112: 1959–1977.e10
- 22 Wu Z, Cui Y, Wang H, et al. Neuronal activity-induced, equilibrative nucleoside transporter-dependent, somatodendritic adenosine release revealed by a GRAB sensor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2023, 120: e2212387120
- 23 Wu Z, He K, Chen Y, et al. A sensitive GRAB sensor for detecting extracellular ATP *in vitro* and *in vivo*. *Neuron*, 2022, 110: 770–782.e5
- 24 Peng W, Wu Z, Song K, et al. Regulation of sleep homeostasis mediator adenosine by basal forebrain glutamatergic neurons. *Science*, 2020, 369: eabb0556
- 25 Sang D, Lin K, Yang Y, et al. Prolonged sleep deprivation induces a cytokine-storm-like syndrome in mammals. *Cell*, 2023, 186: 5500–5516.e21

- 26 Dong A, He K, Dudok B, et al. A fluorescent sensor for spatiotemporally resolved imaging of endocannabinoid dynamics *in vivo*. [Nat Biotechnol](#), 2021, 40: 787–798
- 27 Xia X, Li Y. A high-performance GRAB sensor reveals differences in the dynamics and molecular regulation between neuropeptide and neurotransmitter release. [Nat Commun](#), 2025, 16: 819
- 28 Wang H, Qian T, Zhao Y, et al. A tool kit of highly selective and sensitive genetically encoded neuropeptide sensors. [Science](#), 2023, 382: eabq8173
- 29 Qian T, Wang H, Wang P, et al. A genetically encoded sensor measures temporal oxytocin release from different neuronal compartments. [Nat Biotechnol](#), 2023, 41: 944–957
- 30 Zhou X, Stine C, Prada P O, et al. Development of a genetically encoded sensor for probing endogenous nociceptin opioid peptide release. [Nat Commun](#), 2024, 15: 5353
- 31 Dong C, Gowrishankar R, Jin Y, et al. Unlocking opioid neuropeptide dynamics with genetically encoded biosensors. [Nat Neurosci](#), 2024, 27: 1844–1857
- 32 Duffét L, Williams E T, Gresch A, et al. Optical tools for visualizing and controlling human GLP-1 receptor activation with high spatiotemporal resolution. [eLife](#), 2023, 12: RP86628
- 33 Duffét L, Kosar S, Panniello M, et al. A genetically encoded sensor for *in vivo* imaging of orexin neuropeptides. [Nat Methods](#), 2022, 19: 231–241
- 34 Kruse A C, Kobilka B K, Gautam D, et al. Muscarinic acetylcholine receptors: Novel opportunities for drug development. [Nat Rev Drug Discov](#), 2014, 13: 549–560
- 35 Cherezov V, Rosenbaum D M, Hanson M A, et al. High-resolution crystal structure of an engineered human β_2 -adrenergic G protein-coupled receptor. [Science](#), 2007, 318: 1258–1265
- 36 Patriarchi T, Cho J R, Merten K, et al. Ultrafast neuronal imaging of dopamine dynamics with designed genetically encoded sensors. [Science](#), 2018, 360: eaat4422
- 37 Patriarchi T, Mohebi A, Sun J, et al. An expanded palette of dopamine sensors for multiplex imaging *in vivo*. [Nat Methods](#), 2020, 17: 1147–1155
- 38 Kagiampaki Z, Rohner V, Kiss C, et al. Sensitive multicolor indicators for monitoring norepinephrine *in vivo*. [Nat Methods](#), 2023, 20: 1426–1436
- 39 Dong C, Ly C, Dunlap L E, et al. Psychedelic-inspired drug discovery using an engineered biosensor. [Cell](#), 2021, 184: 2779–2792.e18
- 40 Kubitschke M, Müller M, Wallhorn L, et al. Next generation genetically encoded fluorescent sensors for serotonin. [Nat Commun](#), 2022, 13: 7525
- 41 Aggarwal A, Liu R, Chen Y, et al. Glutamate indicators with improved activation kinetics and localization for imaging synaptic transmission. [Nat Methods](#), 2023, 20: 925–934
- 42 Marvin J S, Shimoda Y, Magloire V, et al. A genetically encoded fluorescent sensor for *in vivo* imaging of GABA. [Nat Methods](#), 2019, 16: 763–770
- 43 Magloire V, Savtchenko L P, Jensen T P, et al. Volume-transmitted GABA waves pace epileptiform rhythms in the hippocampal network. [Curr Biol](#), 2023, 33: 1249–1264.e7

Research progress and prospects of genetically encoded neuromodulator sensors

FENG JieSi & LI YuLong*

State Key Laboratory of Membrane Biology, School of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China

** Corresponding author; E-mail: yulongli@pku.edu.cn*

With the advancement of neuroscience research, genetically encoded neuromodulator sensors have become essential tools for monitoring the dynamic changes of neuromodulators because of their high sensitivity and selectivity, high spatiotemporal resolution, high cell specificity, and low invasiveness. This review summarizes the recent design principles, optimization strategies, and significant progress of genetically encoded neuromodulator sensors, and discusses the future directions for neuromodulator sensor development. The article aims to provide new insights for the advancement of neuromodulator sensor technology.

genetically encoded, neuromodulator, fluorescent sensor, neuromodulation, synaptic transmission

doi: [10.1360/SSV-2025-0038](https://doi.org/10.1360/SSV-2025-0038)