

参赛学生姓名：_____赵子涵_____

中学：_____北京师范大学附属实验中学_____

省份：_____北京市_____

国家/地区：_____中国_____

指导老师 1 姓名：_____李毓龙_____

指导老师 1 单位：_____北京大学生命科学学院_____

指导老师 2 姓名：_____方 韡_____

指导老师 2 单位：_____北京师范大学附属实验中学_____

论文题目：_____基于定点突变策略优化遗传编码的神经激肽 A 荧光探针_____

基于定点突变策略优化遗传编码的 神经激肽 A 荧光探针

赵子涵

摘 要

神经激肽 A (NKA) 是速激肽家族的重要成员，主要通过激活神经激肽 2 受体 (NK2R) 调控疼痛感知、平滑肌收缩和血管舒张等多种生理过程。此外，NKA 功能异常与哮喘、炎症性肠病、神经退行性疾病等多种病理机制密切相关。要深入解析 NKA 的在体释放规律及其调控机制，亟需具备高时空分辨率和高特异性的实时监测工具。然而，NKA 具有释放瞬变、空间定位要求严格以及与同源神经肽交叉反应显著等特性，使得传统检测技术（如微透析、酶联免疫吸附试验 (ELISA)）因时空分辨率有限、特异性不足而受到明显限制。因此，开发高特异性和高灵敏度的 NKA 荧光探针，对于阐明其生理与病理作用具有重要科学价值。

为克服上述技术瓶颈，本研究借鉴北京大学李毓龙实验室开发的 GRAB (GPCR Activation-Based Sensor) 探针技术，探索并优化用于 NKA 检测的新型遗传编码荧光探针。GRAB 技术通过将环状排列增强型绿色荧光蛋白 (cpEGFP) 嵌入 G 蛋白偶联受体 (GPCR)，构建出能够实时报告配体结合状态的遗传编码荧光探针，已成功应用于多种神经递质及神经肽的动态监测。针对前期 GRAB-NKA0.1 版探针存在荧光响应幅度较低（相对荧光变化 $\Delta F/F_0 \approx 0.95$ ）、亲和力不足（亲和力指数 (Affinity Index) ≈ 0.30 ，半数效应浓度 (EC_{50}) ≈ 250 nM) 等缺陷，本研究旨在优化探针的整体性能，重点提升其荧光信号响应强度和结合亲和力，以更好地满足未来在体检测的应用需求。

基于 NK2R 的三维结构特征，作为七次跨膜 G 蛋白偶联受体 (GPCR)，其配体结合后会引发第五跨膜区 (TM5) 与第六跨膜区 (TM6) 的构象变化。这一

过程是胞内环信号传递的核心。A5.69 位点位于 TM5 胞内端，靠近 cpEGFP 插入区域，其残基侧链可直接影响受体与荧光蛋白的构象耦联。本研究聚焦于 NK2R 与 cpEGFP 之间的连接肽段，选择 TM5 的 A5.69 位点作为优化目标，采用结构导向的定点突变策略。结构模拟结果提示，非极性丙氨酸（Ala）在该位点可能难以与 cpEGFP 形成有效相互作用，若替换为其他氨基酸（如带电残基），可能增强构象信号的传递。据此，本研究构建了 19 种 GRAB-NKA 突变体质粒。

本实验以人胚肾 293T（HEK293T）细胞为模型，结合高内涵成像平台和激光共聚焦显微镜，从细胞膜定位效率、NKA 结合亲和力和荧光响应幅度三个方面，对突变探针进行系统筛选与性能评估。结果显示，所有突变探针均能实现稳定的细胞膜定位，并保持基础荧光稳定性。其中，A5.69 位点丙氨酸（Ala）突变为精氨酸（Arg）（A→R）的探针性能最佳。其荧光响应幅度 $\Delta F/F_0 \approx 1.4$ ，亲和力指数（Affinity Index） ≈ 0.47 ，综合性能显著优于 0.1 版探针，故将该探针命名为 GRAB-NKA0.2 版。

综上所述，本研究通过基于结构导向的定点突变策略，成功优化了 GRAB-NKA 探针的关键性能指标，为实现 NKA 的在体高时空分辨率监测提供了新的技术路径与工具基础，并展示了结构指导的突变优化策略在 GPCR 类探针开发中的普适价值。本研究尚未开展在体成像验证，但优化后的探针有望进一步应用于疼痛、炎症等疾病模型中，以深入探究 NKA 的病理调控机制；同时，基于本研究由结构导向的定点突变策略构建多类 GPCR 配体探针库，将为神经科学研究及 GPCR 靶向药物筛选提供坚实的技术支撑。

关键词：神经激肽 A；荧光探针；遗传编码；定点突变

Optimization of a Genetically Encoded Neurokinin A Fluorescent Sensor via Site-Directed Mutagenesis

Zihan Zhao

Abstract

Neurokinin A (NKA), an important member of the tachykinin family, primarily regulates pain perception, smooth muscle contraction, and vasodilation through activation of the neurokinin-2 receptor (NK2R). Dysregulation of NKA signaling is closely associated with the pathophysiology of asthma, inflammatory bowel disease, and neurodegenerative disorders. To elucidate the *in vivo* release dynamics and regulatory mechanisms of NKA, monitoring tools with high spatiotemporal resolution and specificity are urgently required. However, the transient release, stringent spatial localization, and substantial cross-reactivity with homologous neuropeptides limit the utility of conventional detection techniques such as microdialysis and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), which suffer from insufficient spatiotemporal resolution and specificity. Therefore, the development of highly specific and sensitive fluorescent probes for NKA holds considerable scientific value for clarifying its physiological and pathological functions.

To overcome these technical bottlenecks, we adopted the GRAB (GPCR Activation-Based Sensor) platform developed by Li Yulong's laboratory at Peking University to design and optimize a genetically encoded fluorescent probe for NKA detection. GRAB technology embeds a circularly permuted enhanced green fluorescent protein (cpEGFP) into a G protein - coupled receptor (GPCR), generating a genetically encoded probe capable of reporting ligand binding in real time. This approach has been successfully applied to dynamic monitoring of various neurotransmitters and neuropeptides. Building upon the preliminary GRAB-NKA0.1 sensor, which exhibited a limited fluorescence response ($\Delta F/F_0 \approx 0.95$), weak affinity (Affinity Index ≈ 0.30), and high half-maximal effective concentration ($EC_{50} \approx 250$ nM), this study aimed to improve overall sensor performance, with a focus on enhancing fluorescence responsiveness and ligand affinity to better meet the

requirements of in vivo applications.

Guided by the three-dimensional structure of NK2R, we focused on residue A5.69 in transmembrane domain 5 (TM5), located near the cpEGFP insertion site. This region is critical for transmitting conformational changes between NK2R and cpEGFP, as ligand binding to GPCRs typically induces structural rearrangements in TM5 and TM6 that propagate through intracellular loops. Structural simulations suggested that the small, nonpolar alanine (Ala) at A5.69 may be suboptimal for conformational coupling, and substitution with other residues (e.g., charged side chains) could strengthen signal transmission. Accordingly, we constructed 19 GRAB-NKA mutants by site-saturation mutagenesis at A5.69.

Using human embryonic kidney 293T (HEK293T) cells, we systematically evaluated these variants with high-content imaging and laser scanning confocal microscopy, focusing on membrane localization, NKA binding affinity, and fluorescence response amplitude. All mutants localized stably to the plasma membrane and retained basal fluorescence. Among them, the Ala-to-Arg (A $\rightarrow$ R) substitution at A5.69 yielded the best performance, with $\Delta F/F_0 \approx 1.4$ and Affinity Index ≈ 0.47 , representing a clear improvement over GRAB-NKA0.1. This optimized sensor was designated GRAB-NKA0.2.

In summary, we successfully improved the key performance parameters of the GRAB-NKA sensor through a structure-guided site-directed mutagenesis strategy. This work provides a new technical pathway and foundational tool for high-spatiotemporal-resolution monitoring of NKA in vivo, while also highlighting the general value of structure-based mutagenesis in GPCR-based probe engineering. Although in vivo imaging has not yet been performed, the optimized sensor holds promise for future applications in disease models of pain and inflammation to investigate NKA's pathological regulation. Furthermore, the strategy demonstrated here may be extended to generate a broader library of GPCR-based probes, supporting both neuroscience research and GPCR-targeted drug discovery.

Keywords: neurokinin A; fluorescent probe; genetically encoded; site-directed mutagenesis

目录

摘 要	2
Abstract	4
1 引言	7
1.1 研究背景及意义	7
1.2 研究目的与意义	8
1.3 研究框架与方法	9
2 文献综述及技术发展脉络	9
2.1 神经肽研究进展	9
2.2 神经肽检测技术演进	10
2.3 GRAB 技术及李毓龙实验室的贡献	12
2.4 GRAB-NKA0.1 版开发过程及优化方向	14
3 研究内容与实验方案	17
3.1 研究假设	17
3.2 核心优化策略设计	18
3.3 三阶段实验步骤设计	19
3.4 具体实验方案	20
4 实验结果	22
4.1 探针细胞膜定位效率的检测	22
4.2 GRAB-NKA0.2 版探针基础荧光特性的检测	24
4.3 GRAB-NKA0.2 版探针对 NKA 的亲合力检测	25
4.4 探针性能变化情况与最优突变方案	27
5 讨论与展望	28
5.1 结论	28
5.2 可能的创新点	29
5.3 研究局限	30
5.4 研究展望	30
附 录	31
参考文献	33
致 谢	36

1 引言

1.1 研究背景及意义

神经肽（Neuropeptides）是一类由神经元或内分泌细胞合成和分泌的多肽类信号分子，主要通过激活 G 蛋白偶联受体（G protein-coupled receptor, GPCR）调控多种生理功能，在神经调控、免疫反应、消化系统活动等过程中发挥重要作用（Alexander 等, 2019; Steinhoff 等, 2014）。神经肽家族包括速激肽（Tachykinins）、缓激肽（Bradykinins）、血管紧张素（Angiotensins）等（Conlon, 2004; Burbach, 2011），见图 1-1。



图 1-1: 神经肽家族

神经激肽 A（Neurokinin A, NKA）是速激肽家族的关键成员之一，由 *TAC1* 基因编码，广泛分布于中枢神经系统与外周组织（NCBI, 2023）。NKA 通过激活 NK2 受体（Neurokinin 2 receptor, NK2R），参与气道收缩、肠道蠕动、炎症反应及疼痛感知等过程，在哮喘、肠易激综合征、慢性阻塞性肺病、神经退行性疾病等病理状态中具有重要作用（Sass 等, 2024）。例如，在哮喘患者中，NKA 的过度释放可能导致气道过度收缩，加重哮喘症状（Joos 等, 1986）。NKA 与 P 物质（Substance P, 偏好 NK1R）和神经激肽 B（NKB, 偏好 NK3R）共同构成一个功能互补且协同调控的速激肽信号网络（Steinhoff 等, 2014）。例如，在炎症反应中，NKA、Substance P 和 NKB 可能共同参与调节炎症细胞的活化和炎症介质的释放，以维持炎症反应的平衡（Chavan 等, 2017; Engel 等, 2011）。因此，深入研究 NKA 在体释放的动态特征与调控机制，对理解相关疾病具有重要意义。

尽管药理和病理模型研究已初步揭示 NKA 的多种功能，但其在体释放的动态特征与调控机制仍待深入解析。由于 NKA 具有释放瞬变、半衰期短、分布区域局限且易与同源肽发生交叉反应等特点，传统检测方法如微透析和 ELISA 等技术在时空分辨率方面存在局限，难以实现在体的高时空分辨率实时监测。

近年来，遗传编码荧光探针技术为解决这一难题提供了新途径。该类探针通过将配体结合与荧光信号变化相偶联，可实现对特定分子在细胞、组织及活体内的动态监测。李毓龙实验室开发的 GRAB (GPCR Activation Based) 探针，基于 GPCR 与环状排列增强型绿色荧光蛋白 (Circularly Permuted Enhanced Green Fluorescent Protein, cpEGFP) 构建，已成功应用于多种神经肽和神经递质的活体动态成像，揭示神经肽与神经递质释放的动态差异及分子调控机制，且展现出高灵敏度和特异性，为 NKA 的实时监测提供了技术借鉴 (Zheng 等, 2024; Xia 和 Li, 2025)。然而，当前基于神经激肽 2 受体 (NK2R) 构建的 NKA 荧光探针 (如实验室前期开发的 GRAB-NKA0.1 版)，在荧光响应幅度与配体结合亲和力上仍存在不足，难以适应复杂生理环境 (如活体脑区、炎症组织) 中 NKA 的动态监测需求，技术性能亟待进一步优化。

基于此，本研究旨在开发性能更优的高特异性、高灵敏度 NKA 遗传编码荧光探针，为深入解析 NKA 在神经环路调控、炎症反应及疼痛信号传导中的动态过程，以及阐明其在相关疾病中的病理机制提供关键工具。针对前期 GRAB-NKA0.1 版探针存在的荧光响应幅度低、NKA 结合亲和力弱等问题，本研究拟采用“结构导向的定点突变”策略，通过解析 NK2R 与 cpEGFP 的相互作用结构特征，对探针关键功能区域进行理性改造，以实现探针性能的针对性优化。

1.2 研究目的与意义

考虑到 GRAB-NKA0.1 版探针的不足，本研究进一步以 NK2R 与 cpEGFP 的连接肽段为优化靶点，结合 NK2R 的三维结构信息，采用结构导向的定点突变策略构建 GRAB-NKA 探针突变体文库，并通过高内涵成像平台与激光共聚焦显微镜，系统筛选出兼具优良发光性能、细胞膜定位效率及 NKA 响应灵敏度的新一代 NKA 荧光探针 (命名为 GRAB-NKA0.2 版)。

本研究具有以下意义：(1) 提出基于结构-功能导向的 GPCR 突变策略，为

神经肽探针设计提供理论参考；(2) 推动高时空分辨率 NKA 检测技术的发展，有望突破传统方法的局限；(3) 所开发的探针可广泛应用于 NKA 相关疾病研究，并为靶向 NK2R 的药物开发提供技术支持，具有重要应用前景。

1.3 研究框架与方法

本研究的核心目标是优化 GRAB-NKA0.1 版本探针的性能，提升探针亲和力与荧光响应。基于此，设计研究路线图见图 1-2，主要包括以下三个阶段：①理论奠基，基于 NKA 的结构与 NK2R 的结合特性，设计定点突变策略。②实验落地，通过基因工程、细胞转染、荧光成像等实验技术，筛选最优探针。③功能验证，通过高内涵成像技术，验证探针在细胞中的表现。

在方法上，本研究采用分子生物学、细胞生物学和生物信息学技术，通过基因工程构建、实验性能评估等手段确保实验的可操作性、可靠性和高效性。

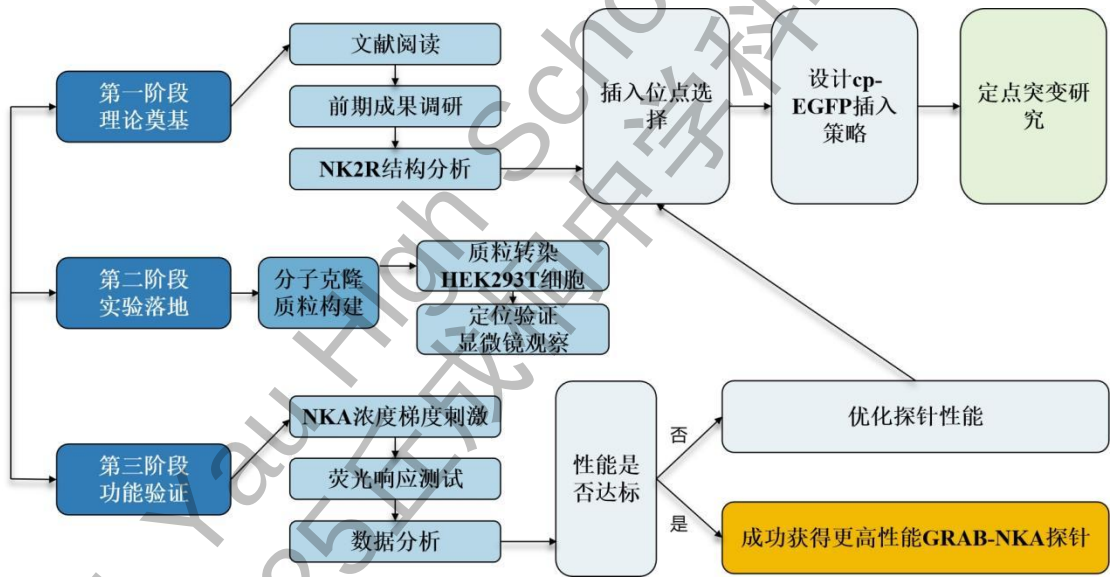


图 1-2：研究路线图

2 文献综述及技术发展脉络

2.1 神经肽研究进展

早在 1967 年，Guillemin 和 Schally 首次鉴定出具有激素功能的神经肽，自此开启神经肽研究新纪元。至今，神经肽研究主要经历三大阶段（见图 1-3）：

(1) 1960 年代 - 1980 年代，研究者主要研究神经肽分离纯化与结构解析。

20 世纪 60 年代，Roger Guillemin 与 Andrew Schally 各自开展研究，分别从小羊和猪的下丘脑组织中成功分离并鉴定出促甲状腺激素释放因子（TRF）以及促性腺激素释放激素（LH-RH），从而明确了下丘脑激素的存在及其化学结构（Boler 等，1969；Burgus 等，1970）。

（2）1980 年代 - 2010 年代，研究者加强了神经肽功能机制解析。研究者们深入探讨了神经肽的信号转导机制、受体识别特性以及在脑区的分布情况（Rivier J 等，1982；Gaus 等，2002）。例如，研究发现神经肽 Y（NPY）在下丘脑弓状核中表达，并通过调节食欲和应激反应发挥作用（Broberger 等，1998）。

（3）2010 年代 - 至今，加快药物开发与生物探针研究。近年来，随着分子生物学和成像技术的发展，研究者开始利用神经肽的生理特性进行药物开发（Hauser 等，2017；Luttrell 等，2015；Alexander 等，2019）和生物探针研究（冯杰思和李毓龙，2025）。

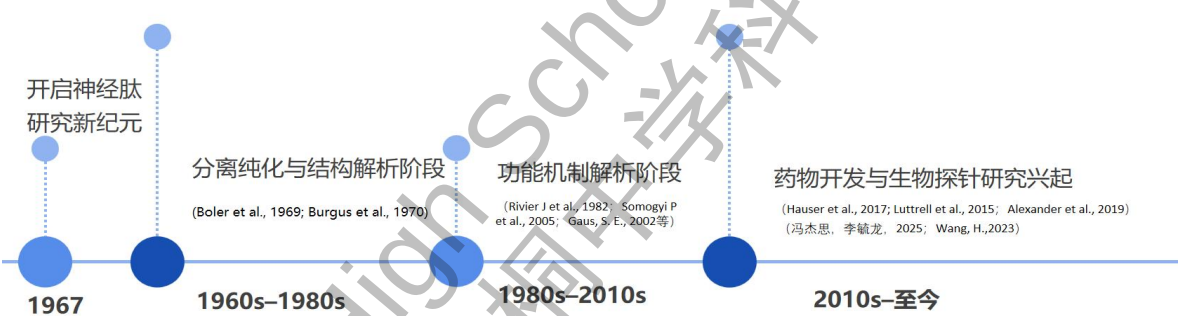


图 1-3：神经肽研究进展脉络图

2.2 神经肽检测技术演进

神经肽检测技术的发展经历了多轮演进，各检测方法的优点及局限性见表 1。早期主要依赖传统方法，如通过检测 mRNA 表达来间接反映神经肽分布的原位杂交技术（ISH），以及基于抗原-抗体反应、具有高灵敏度的放射免疫分析法（RIA）和酶联免疫吸附测定法（ELISA）。这些方法为神经肽的定性和定量分析奠定了基础，但仍存在明显局限，如无法实现活体动态监测或高度依赖抗体质量。

随后发展的微透析法和电化学方法初步实现了在体动态监测。微透析技术可长期监测活体脑区内神经肽的浓度变化，但其时空分辨率较低，难以捕捉快速释放过程；电化学方法（如快速扫描循环伏安法）虽具有毫秒级时间分辨率，却仅

适用于少数具有氧化还原活性的小分子神经递质，应用范围有限。

近年来，随着分子生物学和基因工程技术的进步，一系列基因编码探针工具逐渐兴起。例如报告基因法（如 TANGO）、报告荧光蛋白法及报告细胞法（CNiFERs），它们可在特定细胞类型中实现对神经肽活动的监测，显著提升了对神经肽功能研究的细胞特异性。然而，这些方法仍存在响应延迟长、分子特异性不足或侵入性强等问题。

当前，以 GRAB 为代表的基因编码荧光探针技术已成为该领域的重要发展方向。GRAB 探针有效整合了多种方法优势，克服了传统技术在特异性、分辨率和在体应用等方面的关键瓶颈，为深入解析神经肽在生理与病理过程中的动态功能提供了强大工具。

表 1：检测技术优劣势分析

检测方法	灵敏度	时间分辨率	空间分辨率	核心优势	核心局限与挑战	主要应用场景
原位杂交法 (ISH)	中 (mRNA 水平)	无 (固定样本)	细胞级	明确“哪些神经元”表达特定神经肽，用于神经元分型	间接检测 mRNA，与蛋白水平可能不一致；无法动态监测	神经肽表达图谱构建、神经元分型
RIA / ELISA	高 (pM 级)	低 (离线检测，小时级)	低 (样本匀浆)	灵敏度极高，可绝对定量	高度依赖高质量抗体（难获得）；需样本提取，无法原位或活体检测	体液或组织提取物中的神经肽精确定量
微透析法	中 (nM 级，回收率低)	低 (分钟至小时级)	低 (毫米级)	活体监测，可长期动态收集并检测多种分子	时空分辨率极低；透析回收率低，需校正；植入创伤大	活体脑区细胞外液中神经肽的长期（慢）动态变化监测
电化学检测法 (FSCV)	中 (nM 级)	极高 (毫秒级)	高 (微米级)	时间分辨率最高，可捕捉瞬时释放	绝大多数神经肽无氧化还原活性，适用性极窄	小分子神经递质（如多巴胺）的瞬时释放动力学研究
报告基因法 (e.g., TANGO)	中 (nM 级)	极低 (数小时)	细胞级	可实现细胞类型特异性的活体检测	响应延迟极长，是整合信号而非实时动态	神经肽受体激活的长期累积效应研究
报告荧光蛋白法	高	高 (亚秒级)	极高 (亚细胞级)	超高时空分辨率，可直接观察囊泡释放动力学	缺乏分子特异性；大标签可能干扰正常功能；难以用于深部活体成像	体外培养细胞中囊泡运输与融合的超微过程研究
报告细胞法 (CNiFERs)	中 (nM 级)	高 (秒级)	低 (细胞群体级)	响应速度较快，信号经放大	侵入性强（植入外源细胞）；可能产生假阳性；空间分辨率低	体外或浅表脑区神经肽浓度变化的快速检测
GRAB 神经肽探针 (新兴)	高 (nM 级)	高 (亚秒级)	细胞级	活体、实时、高特异、高时空分辨率、细胞类型特异	仍需基因导入；不同探针开发难度和性能有差异	活体动物中神经肽释放的实时、精准时空动态成像

*注：根据北京大学王欢（2022）博士论文整理。

2.3 GRAB 技术及李毓龙实验室的贡献

李毓龙实验室以能够与神经递质结合的 GPCR 为基础，构建探针骨架，并创新性地分子水平上将 cpEGFP 与特异性的人源神经递质受体进行融合改造，最终开发出一系列新型、可遗传编码的神经递质荧光探针（GRAB 探针）。

（1）GRAB 探针基本原理

探针的基本原理是将 cpEGFP 嵌入特定的神经递质受体，受体与神经递质结合后会引发受体构象改变转换为荧光信号（万金霞和李毓龙，2020）。GPCR 作为配体包括气味分子、神经递质、激素等的真核细胞七次跨膜蛋白受体，因来源及结合特性优势成为构建可遗传编码探针的首选骨架，且基于其配体结合后第五与第六跨膜区构象保守改变的特性，可通过将 cpGFP 插入第三个胞内环构建荧光探针以监测配体结合，见表 2。

表 2：GPCR 相关核心信息整理表

信息类别	具体内容
GPCR 定义	一类在真核细胞中发挥重要信号传导作用、具有相对保守的七次跨膜结构的大类膜蛋白受体统称，其配体包括气味分子、神经递质、激素等。
作为可遗传编码探针首选骨架的原因	大多数已知的神经递质和神经肽均有相应 GPCR 作为受体，GPCR 是可与神经递质和神经肽结合的天然内源性受体。
核心优势	1. 来源优势：来自真核细胞，不存在因原核向真核细胞转移导致的蛋白表达和包装运输等问题。 2. 结合特性优势：保留了与神经递质之间的高选择性和亲和力，本身即是神经递质的内源受体。
关键结构特征（配体结合后）	结构生物学家基于已解析的 GPCR 结构发现，配体与 GPCR 结合后，主要引起 GPCR 第五与第六个跨膜区构象改变，且该构象改变在不同 GPCR 中较为保守。
基于 GPCR 的荧光探针构建原理	将 cpGFP 插入连接 GPCR 第五和第六个跨膜区的第三个胞内环（Intracellular Loop 3, ICL3）中，配体与 GPCR 结合引发 GPCR 构象改变，进而导致 cpGFP 构象变化，影响其发色团周围微环境，最终使 cpGFP 荧光强度改变。

cpGFP 插入 GPCR 的 ICL3 后，配体结合引发 GPCR 构象改变，进而导致 cpGFP 荧光强度变化，见图 2-1。

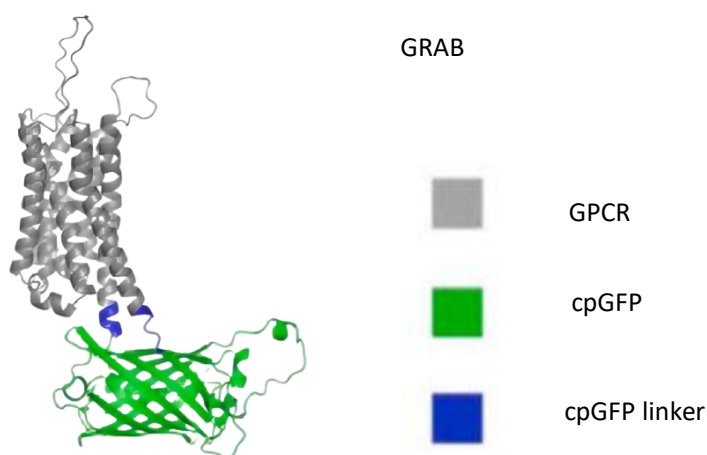


图 2-1: GRAB 探针构成

之后, 通过病毒注射、转染等技术手段, 可以将这种可遗传编码的探针表达在细胞或小鼠脑部, 借助成像技术, 观察神经递质浓度的实时变化。基于现有的荧光成像技术, 通常用光纤记录 (Fiber photometry) 和双光子成像 (Two-photon imaging) 的方法来实时检测大脑内的神经递质或神经肽(见图2-2)。



图 2-2: 检测 GRAB 探针信号的两种方式

其技术路线图如图 2-3 所示。

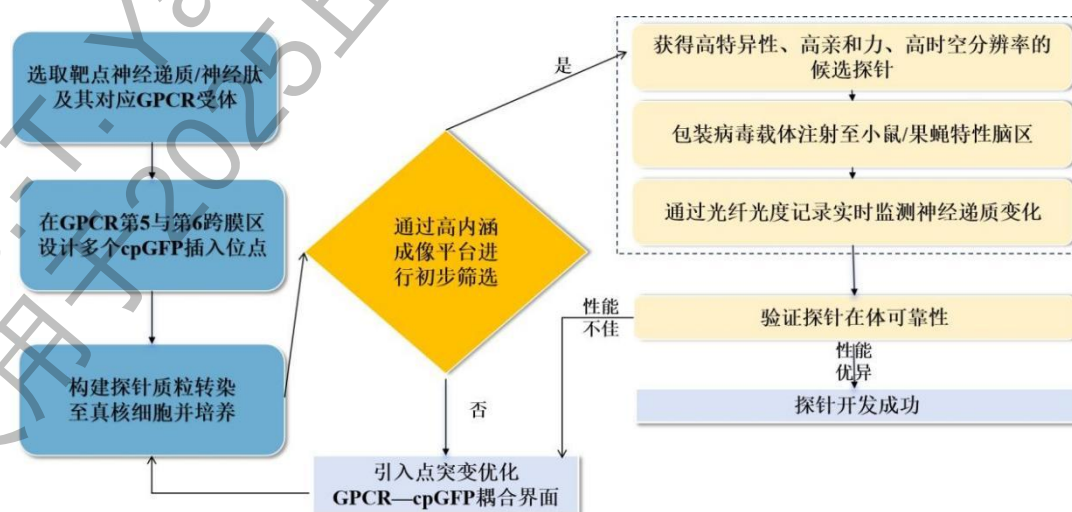


图 2-3: GRAB 探针开发技术路线图

(2) GRAB 探针的技术优势分析

李毓龙实验室在 GRAB 探针领域取得了多项关键技术突破，前期已开发了一系列的高灵敏度、高特异性以及时空分辨率高的 GRAB 探针，包括去甲肾上腺素探针 (GRAB-NE)、五羟色胺探针 (GRAB-5-HT)、多巴胺探针 (GRAB-DA)、乙酰胆碱探针 (GRAB-ACh) 等，团队取得的成果发表于《Cell》《Nature》《Science》等全球公认的国际顶尖学术期刊，体现了研究的前沿性与影响力 (Zheng 等, 2025; Touhara 等, 2025; sun 等, 2018; Yang 等, 2025; Deng 等, 2024; Wang 等, 2023)。其主要技术优势包括：

①高时空分辨率。GRAB 探针能够实时监测神经递质或神经肽在活体神经环路中的动态释放，时间分辨率可达秒级，空间分辨率可精确到单个神经元突触水平。这一特性弥补了传统检测方法（如微透析、ELISA）时空分辨率不足的局限。

②高度特异性。通过选择性工程化 GPCR 受体和 cpEGFP 融合，GRAB 探针能够区分高度相似的神经递质或肽类信号分子。例如，不同速激肽亚家族 (NKA、Substance P、NKB) 可通过各自偏好的受体实现选择性检测。

③灵敏度高。GRAB 探针能够在低浓度下检测神经递质释放，荧光信号变化与配体结合关系易被发现。

④可遗传编码与多样化表达。由于为遗传编码探针，可通过病毒载体或转基因方式在特定细胞类型或组织中表达，实现长期和可重复的监测。

⑤适用于多种实验模型。GRAB 探针可在细胞培养、脑切片以及活体动物模型（如小鼠）中应用，为神经肽或神经递质研究提供多层次验证平台。

从实际应用看，在果蝇、斑马鱼、小鼠脑等十几种实验模型的神经元上都验证了这类神经递质探针具有灵敏度极高、分子特异性高、空间分辨率精确、亚秒级响应速度快的特点，将为研究大脑功能和解析神经系统疾病机制提供重要工具。

2.4 GRAB-NKA0.1 版开发过程及优化方向

基于速激肽家族成员及受体的序列同源性，借鉴 GRAB-SP1.0 版的设计框架，开发出 GRAB-NKA0.1 版。

(1) GRAB-NKA0.1 版的开发原理

如前文所述，NKA 与 Substance P 同属于神经肽中的速激肽家族，不仅氨基酸序列相近，它们对应的受体 NK2R 和 NK1R 也有较高的序列相似性（见图 2-4，图 2-5）。目前李毓龙实验室已经基于 NK1R 开发出了响应 Substance P 的 GRAB 探针（简称 GRAB-SP1.0），特异性和灵敏度良好。因此，实验室前期借鉴该原理，将 GRAB-SP 探针的荧光报告结构域（包括 cpGFP 和附近的第五、六跨膜区的连接肽段）插入到 NK2R，开发 NKA 的 GRAB 探针是可行策略。

Substance P	<u>Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂</u>
Neurokinin A	His-Lys-Thr-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH ₂
Neurokinin B	Asp-Met-His-Asp-Phe-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH ₂

图 2-4：NKA 与 Substance P 氨基酸序列比较

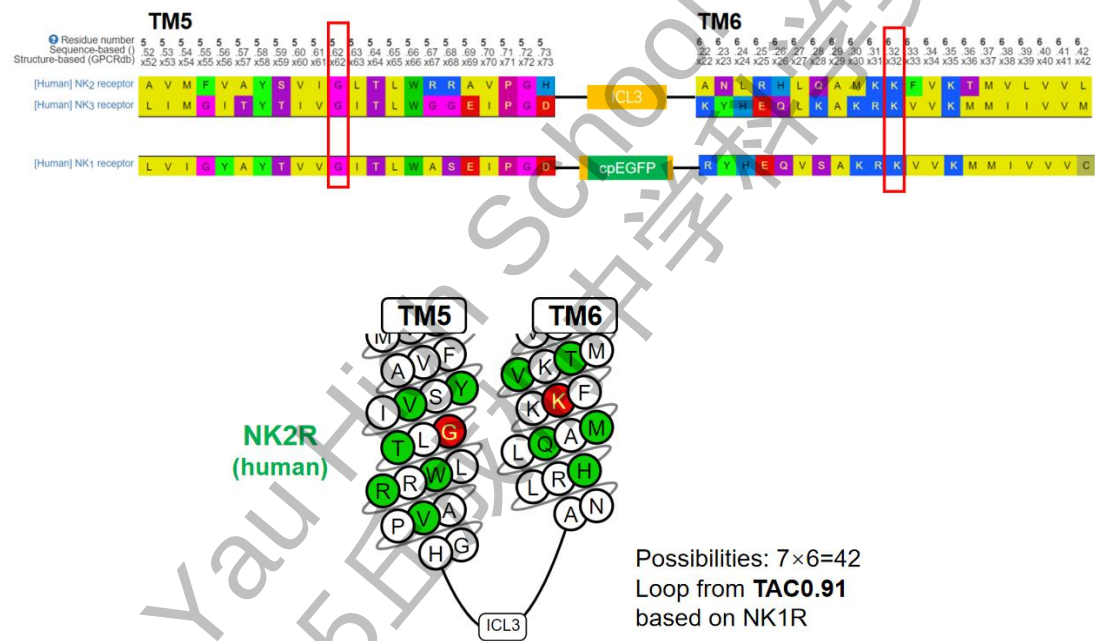


图 2-5：NK1R 和 NK2R 序列比对结果及 NK2R 插入荧光模块的位点选择

(2) GRAB-NKA0.1 版的开发过程

基于上述可行策略，李毓龙实验室前期已在 NK2R 的第五跨膜区（TM5）选定 7 个氨基酸位点作为 cpEGFP 氨基端的插入位点，在第六跨膜区（TM6）也选定 7 个氨基酸位点作为 cpEGFP 的羧基端插入位点，通过排列组合的方式依次进行了尝试，共构建了 49 个质粒，最后通过使用高内涵成像平台筛选出了潜力较大的部分插入位点。

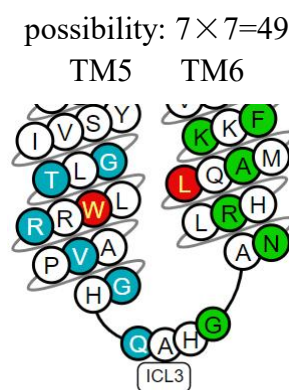


图 2-6: TM5 与 TM6 插入位点组合示意图

随后，为筛选出更优的插入位点，实验室研究人员将这 49 种 NKA 探针构建体转染至 HEK293T 细胞，并利用双光子显微镜进行成像分析。初步筛选结果显示，第五跨膜区中的 R5.68 和 V5.70，以及第六跨膜区中的 L6.27、K6.31 和 F6.33 是响应较强、亲和性较高的候选位点（见下图 2-7：双光子成像结果，注：左图为 49 个候选探针的荧光信号变化，右图为选取的荧光信号变化最明显的 11 组探针）。

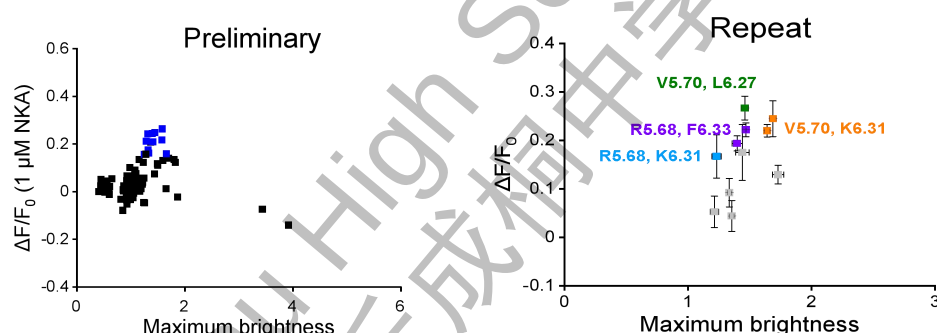


图 2-7: 双光子成像结果

注：左图，49 个候选探针的荧光信号变化。右图，选取了荧光信号变化最明显的 11 组探针

基于以上筛选结果，实验室研究人员最终选择第五跨膜区的 V5.70 与第六跨膜区的 K6.31 作为 cpEGFP 的插入位点，构建出 GRAB-NKA0.1 版探针。之后，测试了该探针在不同浓度神经肽刺激下的选择性，通过 $\Delta F/F_0$ 所表示的荧光变化可见，GRAB-NKA0.1 版探针对 NKA 已具备初步响应特性和选择性（见图 2-8：NKA0.1 对不同浓度 NKA 的响应曲线）。

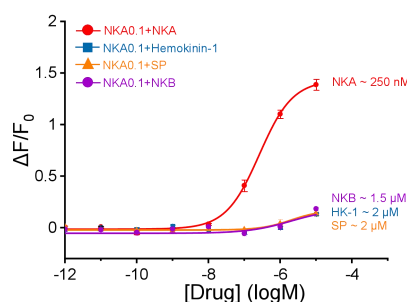


图 2-8: GRAB-NKA0.1 版对不同浓度 NKA 的响应曲线

(3) GRAB-NKA0.1 版探针的改进方向

尽管初步获得可响应 NKA 的 GRAB-NKA0.1 版探针，但该版本仍存在明显局限：其荧光响应幅度较低 ($\Delta F/F_0 \approx 0.95$)、亲和力较弱 (Affinity Index ≈ 0.30)，难以满足在体环境中 NKA 释放量低、动力学快等检测要求；此外，该探针还表现出荧光亮度不足、特异性有待提高等问题。因此，亟需在 GRAB-NKA0.1 版基础上开展理性设计与系统优化，进一步提升其响应幅度及亲和力，以增强其在复杂生理环境中应用的可信度与适用性。

3 研究内容与实验方案

3.1 研究假设

前期开发的 GRAB-NKA0.1 版探针存在荧光响应幅度低 ($\Delta F/F_0 \approx 0.95$)、NKA 结合亲和力弱 (Affinity Index ≈ 0.30 , $EC_{50} \approx 250$ nM) 的核心局限，难以满足在体环境中低浓度 NKA (生理浓度通常为纳摩尔级) 对高灵敏度、高特异性监测的需求。因此，本研究以“突破现有探针性能瓶颈，定向提升探针与 NKA 的结合亲和力及荧光响应幅度”为核心目标，期望通过理性设计获得新一代 GRAB-NKA 探针，使其具备适配在体低浓度 NKA 动态监测的能力。

已有研究证实，神经激肽 2 受体 (NK2R) 作为典型的七次跨膜 G 蛋白偶联受体 (GPCR)，其与配体 (NKA) 结合后会触发特征性构象变化，其中第五跨膜区 (TM5) 与第六跨膜区 (TM6) 的相对位移是构象信号传递的核心环节，且该变化会通过胞内环 3 (ICL3) 及相邻连接肽段进一步传递。这一结构特征对 GRAB 类探针的功能至关重要——由于 cpEGFP 需嵌入 NK2R 的 ICL3 区域，探针的荧光信号变化完全依赖于配体结合后受体构象变化向 cpEGFP 的高效传

递，即“配体结合→TM5-TM6 构象变化→ICL3 带动 cpEGFP 构象改变→荧光信号波动”的链式反应。

结合 NK2R 的三维结构模型 (Xia 和 Li, 2025) 进一步分析发现，TM5 作为构象变化的关键传递区域，其胞内端的 A5.69 位点具有特殊空间定位：该位点紧邻 cpEGFP 的插入边界，残基侧链直接面向 cpEGFP 的 β 折叠结构，是受体构象变化向荧光蛋白传递的“直接接触点”，因此被判定为信号传递的核心节点。从氨基酸理化性质来看，A5.69 位点天然残基为丙氨酸 (Ala)，其侧链仅为甲基 (体积小、无电荷)，与 cpEGFP 之间缺乏有效相互作用 (如氢键、静电作用)，可能导致 TM5 的构象变化无法高效带动 cpEGFP 构象改变，进而限制荧光响应幅度；而若将该位点替换为带电 (如精氨酸 Arg、天冬氨酸 Asp) 或较大体积 (如苯丙氨酸 Phe) 的氨基酸，理论上可通过增强与 cpEGFP 的相互作用或改变局部空间微环境，优化构象信号的传递效率。

基于上述结构-功能关联分析，本研究提出核心假设：NK2R 与 cpEGFP 之间的连接肽段 (尤其是 TM5 的 A5.69 位点) 是“NKA 配体结合-荧光信号转换”的关键调控节点；通过对 A5.69 位点进行系统性定点突变，优化该位点与 cpEGFP 的相互作用模式，可提升受体构象变化向荧光信号的传递效率，最终实现探针亲和力与荧光响应幅度的协同改善。

3.2 核心优化策略设计

为验证上述假设，本研究选择结构导向的定点突变策略作为核心优化策略，主要依据如下：(1) 前期研究表明，在 NK2R 的第五跨膜区 (TM5) A5.69 与第六跨膜区 (TM6) K6.32 之间插入 cpEGFP 时，探针可产生基础的 NKA 响应，提示该区域可能与信号响应相关；(2) 结构分析显示，A5.69 所在连接肽段的残基可能参与 NK2R 构象变化向 cpEGFP 的传递，从而影响探针的信号转换效率。

基于此，本研究在 A5.69 位点设计饱和和定点突变，将该残基分别替换为其他 19 种氨基酸 (涵盖非极性、极性及带电等不同类型)，以系统评估侧链理化性质对探针性能的影响 (见图 3-1)。随后，利用荧光成像技术检测这些突变体的膜定位及在 NKA 刺激下的亮度变化，从而筛选性能更优的探针作为新一代 GRAB-NKA 版本。

基于 NK2R 的结构特征，本研究选择 A5.69 位点作为优化的关键对象。该残基位于 TM5 的胞内端，紧邻 cpEGFP 插入区域，是“配体结合—构象变化—荧光信号”传递的潜在核心节点。结构分析提示，Ala 残基体积小且无电荷，可能限制构象能量的有效传递，因此通过饱和和定点突变系统性评估其取代效应，有望提升探针信号的灵敏度与亲和力。

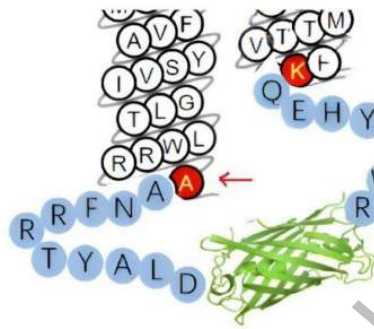


图 3-1：本研究拟选择的突变位点

3.3 三阶段实验步骤设计

为实现探针的优化目标，本研究设计了“构建—筛选—验证”三个阶段的实验方案。见图 3-2。

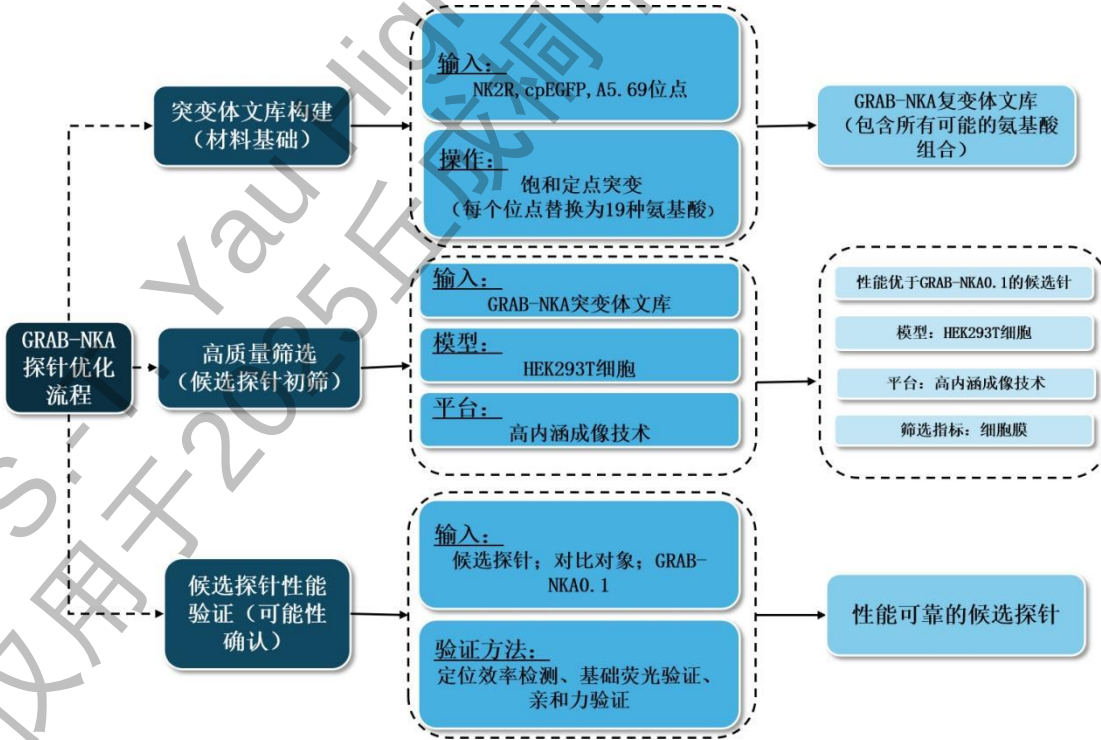


图 3-2：GRAB-NKA 探针优化实验步骤

3.4 具体实验方案

实验具体操作如下：

第一阶段，突变体文库构建。

该阶段主要是以 GRAB-NKA0.1 版为模板，选取 A5.69 进行饱和定点突变，共获得 19 种变体。然后，通过聚合酶链式反应（Polymerase Chain Reaction, PCR）扩增与吉布森组装（Gibson assembly）构建质粒。接着，转化至感受态细胞当中，37 摄氏度培养箱培养 16 小时，之后提取质粒。

具体而言，本研究的构建的质粒表达载体使用吉布森组装（Gibson assembly）的方法进行分子克隆（Gibson 等，2009）。首先通过限制性核酸内切酶得到线性化的真核表达载体。之后利用初步开发的 NKA0.1 探针中通过 PCR，使用经过突变的 PCR 引物使原有探针的 A5.69 位点产生饱和定点突变，共获得 19 种变体。随后用琼脂糖凝胶电泳的方式鉴定 PCR 产物的正确性。通过切胶和凝胶回收得到纯化的 DNA 片段。得到的目标 DNA 片段与线性化后的质粒在吉布森组装反应试剂中混合并进行组装，组装产物加入感受态细胞中并进行转化，之后将感受态细胞涂在对应的抗性 LB 平板上进行细菌培养，37℃ 过夜之后得到单克隆菌株。随后在 LB 液体培养基中 37℃ 震荡培养过夜以扩增菌株，小提质粒以便进行质粒的测序工作。详细操作如下：

①引物设计：在 NKA 探针的连接肽段附件的序列中设计 4 条引物，处于 5' 和 3' 端的引物（用于吉布森组装）与线性化的质粒载体末端有重叠区域，位于中间的两段引物中的正向引物在 A5.69 上引入突变，另一个反向引物与引入突变的正向引物的 5' 端有重叠部分，以进行后续吉布森组装。具体引物设计的方式如图 3-3。

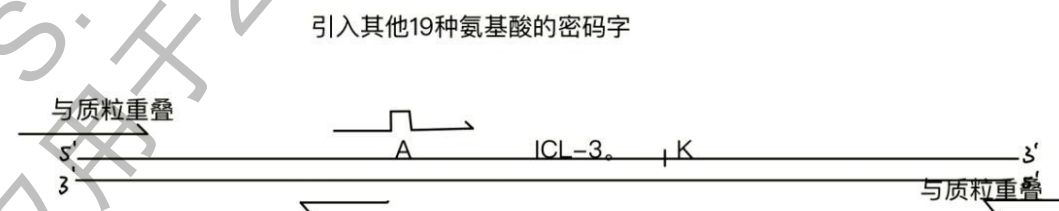


图 3-3：引物设计图

②目的片段 PCR：在冰上配置 PCR 反应混合液，混合均匀后在 PCR 仪上进行反应。

③DNA 凝胶电泳：PCR、酶切产物和 DNA Marker 加入 1%琼脂糖凝胶加样槽中，150V 恒压电泳 20 分钟。

④DNA 胶回收：在蓝光照胶仪下找到目标 DNA 条带，切下凝胶。使用实验室自备胶回收试剂盒进行凝胶回收。

⑤吉布森组装连接：配置反应混合液，混匀后 50℃反应 1 小时，80℃处理 5 min 终止反应。见图 3-4。

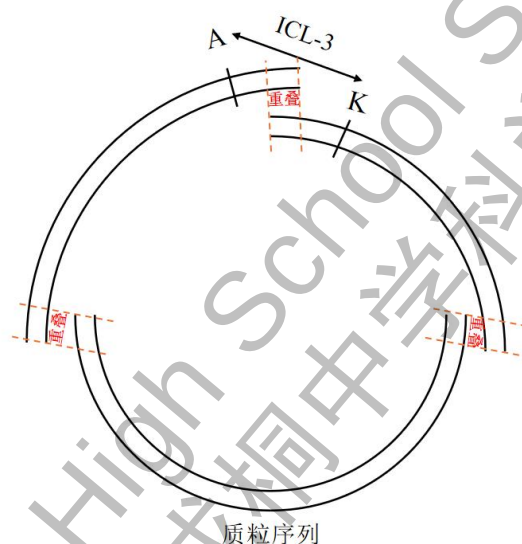


图 3-4：吉布森组装的示意图

⑥转化：将吉布森组装之后的产物加入感受态细胞当中，冰浴 30 min 后，通过 42℃热激 1 min 进行转化。随后再冰浴 3 min，将感受态细胞涂在含氨苄青霉素抗性的 LB 平板上，37℃培养过夜。利用质粒中的抗性对成功转化入目标质粒的细菌进行筛选。

⑦对质粒进行测序：挑单克隆菌株后转入 LB 液体培养基进行细菌扩增。随后通过小提质粒的方式提取质粒并移交给公司进行测序。

第二阶段，细胞培养与转染。

用 PEI（聚乙烯亚胺，即 Polyethylenimine）对 HEK293T 细胞进行转染。在 DMEM 完全培养基（DMEM + 双抗 + 胎牛血清）中培养 HEK 细胞。然后在

DMEM 完全培养基中将 PEI 与 DNA 按照 3:1 的比例混合，静置之后加入 HEK 细胞培养基中转染。

第三阶段，高内涵成像平台对探针进行成像。

该步骤主要是测试探针的膜定位能力、亮度和在 NKA 刺激前后的荧光变化 ($\Delta F/F_0$)。

本研究使用的高内涵成像平台 (high-content imaging, HCI) 是一种结合自动化显微镜、多通道荧光标记和图像分析技术的系统，它具有：多参数（如细胞形态、数量、荧光信号强度等）分析、高通量处理、细胞分辨率高等特点，可以满足本实验要测定大量细胞的细胞形态、荧光强度变化的要求。

本研究将原先 96 孔板中的 DPF 培养基换为无色的台氏生理溶液 (Tyrode's Solution)，再对细胞进行成像。使用高内涵成像平台配备的 20 倍水浸物镜进行成像。红、绿通道分别用波长不同的激发光和发射光滤光片，每孔中选取 9 个视野进行观察。最后，细胞上荧光信号强度的变化情况由高内涵成像平台提供的程序进行分析。。

最后，经对比，筛选出膜定位良好、亮度高、响应幅度大的探针。

4 实验结果

探针的功能性与稳定性是其用于活体分子检测的核心前提。本研究针对 19 种 GRAB-NKA 突变探针，按“基础特性验证→功能特性检测→最优方案筛选”的顺序展开评价，逐步排除干扰并聚焦核心性能，为探针优化提供数据支撑。

4.1 探针细胞膜定位效率的检测

本研究构建融合表达载体，在 GRAB-NKA 突变探针的质粒中插入红色荧光蛋白 (mCherry) 编码序列，使 mCherry 与探针共表达。利用激光共聚焦显微镜进行双通道成像(绿色通道:GRAB-NKA 探针 488nm 激发光;红色通道:mCherry, 568nm 激发光)，通过两通道荧光信号的空间匹配度判断探针上膜情况。同时，通过比较突变探针与未突变探针 (GRAB-NKA0.1 版) 的绿色荧光强度，评估突变操作对探针初始发光性能的影响。

该方法基于 mCherry 具有明确的细胞膜靶向性，能够在细胞膜上稳定发光

并形成清晰轮廓的原理（图 4-1）；若 GRAB-NKA 探针未正确定位于细胞膜，则绿色通道的荧光信号区域将与红色通道的细胞膜轮廓出现明显错位（图 4-2）。

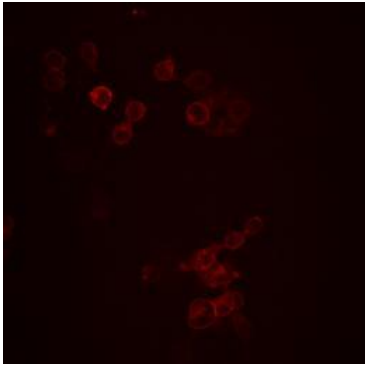


图 4-1：红色荧光探针

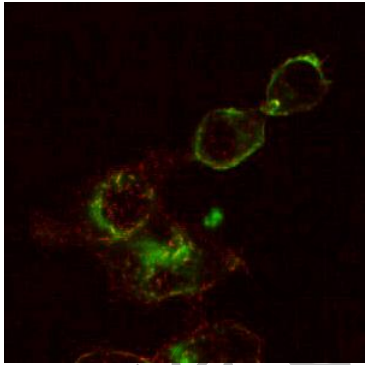
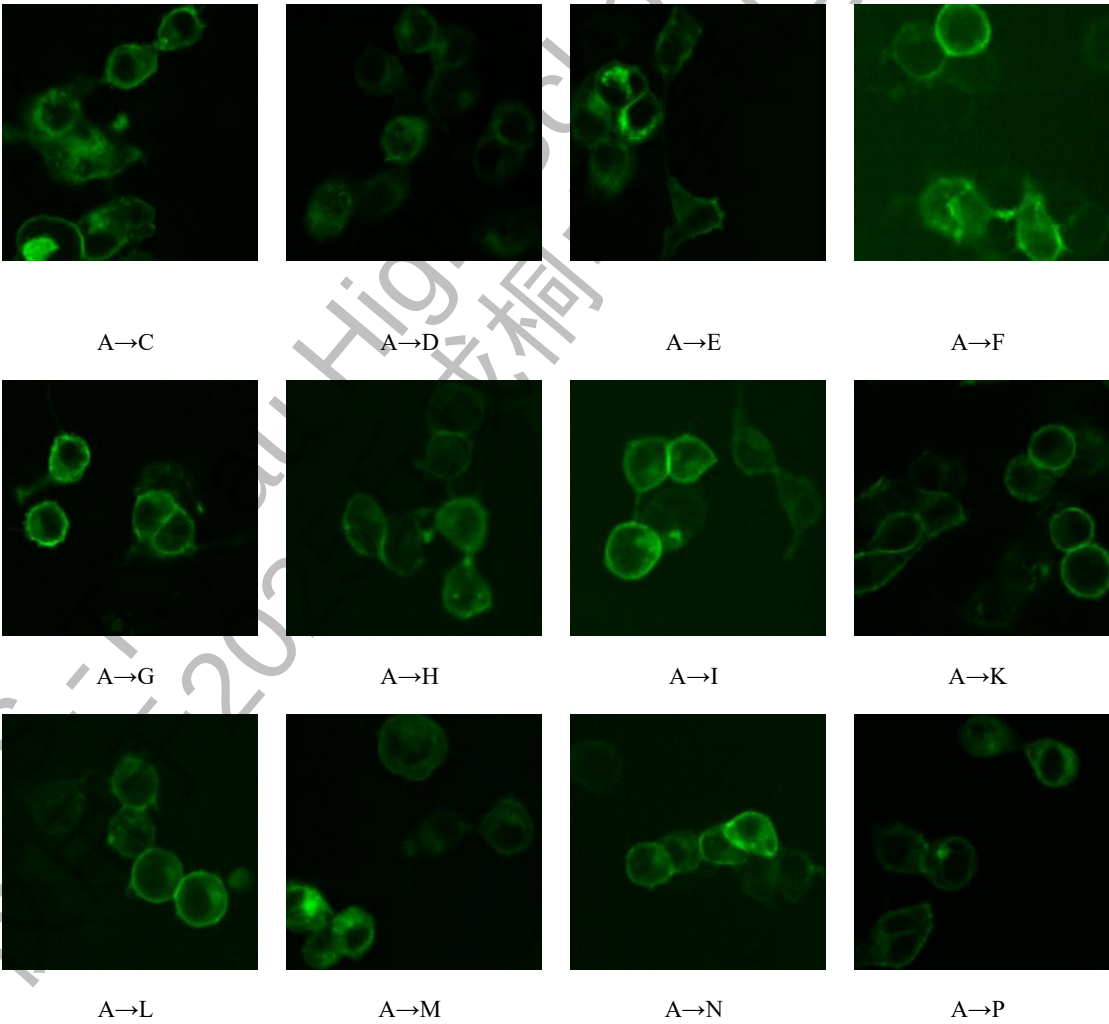


图 4-2：红色通道与绿色通道重叠图

结果显示，所有 19 种突变探针的绿色通道荧光信号均与红色通道的细胞膜轮廓基本重合（见图 4-3），且未观察到细胞质内异常荧光聚集或信号缺失现象。



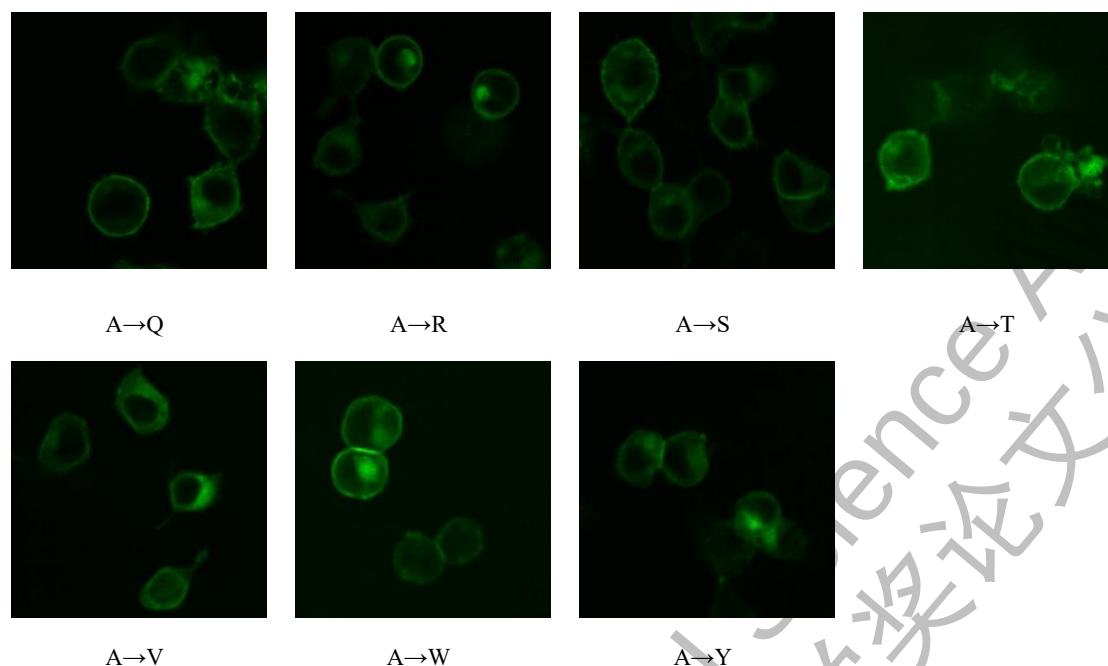


图 4-3: 19 个突变体系的绿色通道成像图

同时，各突变探针的初始发光强度与 NKA0.1 版探针基本一致（图 4-3 和图 4-4），表明这些突变操作未对 GRAB-NKA 探针的初始发光性能产生显著影响。以上结果表明，所有 GRAB-NKA 突变探针均能实现高效的细胞膜定位，无明显表达异常或靶向性缺陷，且保留了良好的初始发光性能，可用于后续功能检测。

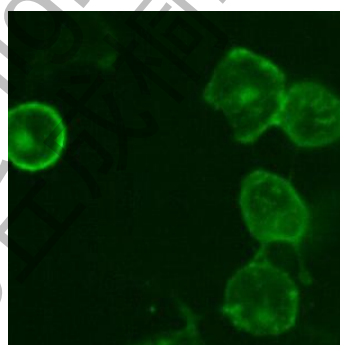


图 4-4: GRAB-NKA0.1 版（未突变）对照组成像图

4.2 GRAB-NKA0.2 版探针基础荧光特性的检测

探针在未与配体（NKA）结合时的基础荧光强度，直接影响其对 NKA 浓度变化的检测灵敏度——若基础荧光波动过大或强度异常，将导致后续信号变化难以量化。为此，本研究以未突变的原始 GRAB-NKA0.1 版探针为对照，采用相同的细胞转染效率与成像参数，对 19 种突变探针的基础荧光强度进行定量比较。

结果显示：假定突变探针和原始探针的基础荧光强度服从方差相等的独立正态分布，双样本均值 t 检验的结果显示，19 种突变探针的基础荧光强度均值（ 3.1 ± 0.1 a.u.）与原始探针（ 3.8 ± 0.2 a.u.）在 5% 的显著性水平上无统计学差异。这一结果表明，本研究设计的定点饱和突变未破坏绿色荧光蛋白的核心发光结构，19 种突变探针均保留了稳定的基础荧光特性，可满足后续对 NKA 浓度变化的荧光信号响应需求。

通过上述两项性能评价验证：19 种 GRAB-NKA 突变探针均具备高效的细胞膜定位能力与稳定的基础荧光特性，排除了因表达异常或荧光缺陷导致的检测误差，为后续基于该系列探针的 NKA 结合亲和力与信号响应灵敏度筛选奠定了基础。

4.3 GRAB-NKA0.2 版探针对 NKA 的亲和力检测

在完成 4.1 与 4.2 节的基础性能验证后，本研究进一步围绕“探针亲和力与荧光响应”这一核心目标开展检测，旨在筛选出对 NKA 响应灵敏且亲和力适配的最优突变探针。具体实验设计与结果分析如下：

（1）荧光响应幅度（ $\Delta F/F_0$ ）的量化指标定义

为客观、准确地评估探针结合 NKA 后的荧光响应强度，本研究采用行业通用的荧光响应幅度（ $\Delta F/F_0$ ）作为量化指标。该指标可消除初始荧光强度差异对结果的干扰，直接反映探针与配体结合后产生的特异性荧光变化，其计算公式如下：

$$\Delta F/F_0 = \frac{\text{Max Brightness} - \text{Basal Brightness}}{\text{Basal Brightness}} \quad \text{公式（1）}$$

其中，Basal Brightness 为探针未结合 NKA 时的初始荧光强度（即 4.2 节中检测的基础荧光强度），Max Brightness 为探针与 $1 \mu\text{mol/L}$ NKA 充分结合后达到的最大荧光强度。两者均通过高内涵成像平台的荧光信号采集模块定量获取。

（2）探针 Max Brightness 的检测方法

为获取 19 种突变探针的 Max Brightness，本研究设计了配体刺激实验：

第一步，实验体系构建。将表达各突变探针的 HEK293T 细胞接种于 96 孔成像板，加入台氏液构建基础检测体系。

第二步，配体刺激处理。向成像液中分别加入终浓度为 100 nmol/L 和 1 μ mol/L 的 NKA 溶液（两种浓度均覆盖生理条件下 NKA 的潜在浓度范围），确保探针与 NKA 充分发生特异性结合。

第三步，信号采集。结合后立即使用高内涵成像平台（配备 40 $\times$ 物镜）采集绿色通道荧光信号，连续扫描 8 个视野，取荧光强度峰值作为该探针的 Max Brightness，每个实验组设置 8 个技术重复以保证数据可靠性。

（3）探针对 NKA 亲和力的比较分析

为系统比较 19 种突变探针对 NKA 的亲和力，本研究定义亲和力指数（Affinity Index），这是为了比较不同突变体在限定浓度范围下的相对亲和力而设计的归一化指标：

$$\begin{aligned} \text{Affinity index} &= \frac{\Delta F_1}{F_0} \div \frac{\Delta F_2}{F_0} = \frac{\Delta F_1}{\Delta F_2} \\ &= \frac{\text{Brightness1} - \text{Basal Brightness}}{\text{Max Brightness} - \text{Basal Brightness}} \end{aligned} \quad \text{公式（2）}$$

其中，Brightness1 是 NKA 浓度为 100 nmol/L 时的探针荧光强度；Max Brightness 是 NKA 浓度为 1 μ mol/L 时的探针荧光强度；Basal Brightness 为探针在无 NKA 时的初始荧光亮度。

本研究对 19 种突变探针 $\Delta F/F_0$ 与 Affinity Index 的关系进行统计学分析。首先绘制了二者的散点图，并在此基础上拟合了线性回归方程。如图 4-5 和图 4-6 所示，在 100 nmol/L、1 μ mol/L 的 NKA 浓度下， $\Delta F/F_0$ 均与 Affinity Index 正相关。其中，图 4-5 中的散点较为分散，且 R^2 取值较低，而图 4-6 中的散点围绕拟合直线分布较为集中， R^2 也高达 0.7788，说明 $\Delta F_2/F_0$ 与 Affinity Index 的线性相关性要强于与 $\Delta F_1/F_0$ 。这一差异可能与 NKA 浓度有关：在 1 μ mol/L 时，探针被更充分激活，特异性响应更强，从而降低了低浓度条件下信号波动的干扰，更清晰地揭示了 $\Delta F/F_0$ 与 Affinity Index 之间的关联规律。

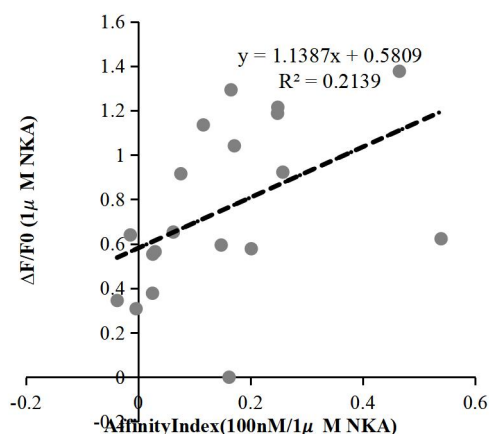


图 4-5: $\Delta F_1/F_0$ 散点图

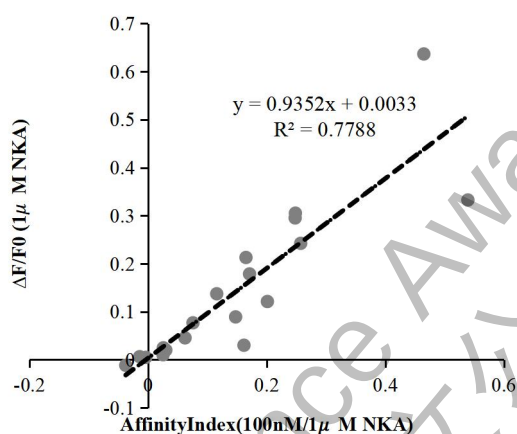


图 4-6: $\Delta F_2/F_0$ 散点图

接着，本研究利用 Stata 软件计算了 $\Delta F/F_0$ 与 Affinity Index 的 Pearson 线性相关系数及其显著性，表 3 的结果显示：在 100 nmol/L、1 μ mol/L 的 NKA 浓度下， $\Delta F_1/F_0$ 与 Affinity Index 的相关系数取值为 0.474，且在 5% 的显著性水平上显著；而 $\Delta F_2/F_0$ 与 Affinity Index 的相关系数取值为 0.8872，在 0.1% 的显著性水平上显著，进一步验证了上述描述性统计的结论。虽然 $\Delta F/F_0$ 均与 Affinity Index 显著正相关，但不同突变探针的 $\Delta F/F_0$ 也存在明显差异（两种 NKA 浓度下，变异系数分别为 0.51、1.13）。上述结果表明，本研究建立的检测体系可有效区分不同突变探针对 NKA 的亲和力差异，为后续筛选高亲和力探针提供了量化依据。

表 3: $\Delta F/F_0$ 与 Affinity Index 的 Pearson 相关分析

变量	Pearson 相关系数 (R)	P 值	显著性	样本量
$\Delta F_1/F_0$ vs Affinity index	$r=0.474$	$P=0.0348$	*	19
$\Delta F_2/F_0$ vs Affinity index	$r=0.8872$	$P=0.0000$	***	19

注：* $P < 0.05$ ；** $P < 0.01$ ；*** $P < 0.001$ 。

4.4 探针性能变化情况与最优突变方案

基于 4.3 节的亲和力与荧光响应数据，进一步比较 19 种突变探针的整体性能，本研究采用 GraphPad Prism 9.0 绘制 $\Delta F/F_0$ 与 Affinity Index 的散点图（图 4-7）。结果显示，大多数突变体在 Affinity Index 或 Max Brightness 上出现一定

下降，但少部分突变体表现出显著提升，且在“高亲和力+高荧光响应”区域形成聚集，表明其在 $\Delta F/F_0$ 与亲和力两方面均优于 0.1 版本。

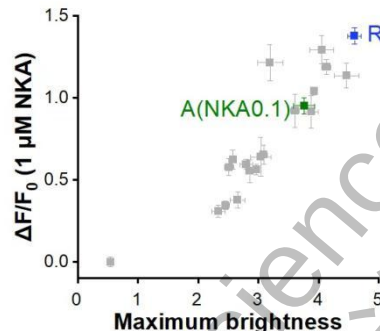
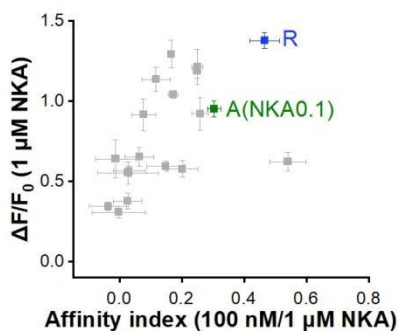


图 4-7：探针对 NKA 的亲和力情况

其中，性能提升最明显的组别为“A5.69 位点丙氨酸突变为精氨酸(A→R)”：其 $\Delta F/F_0$ 从原始 NKA0.1 版的 0.95 提升至 1.4，亲和力指数从 0.30 提升至 0.47。图 4-7 中，该组别以蓝色标注，未突变的对照组 (NKA0.1) 以绿色标注；该图横坐标为 Affinity Index，纵坐标为 $\Delta F/F_0$ ，右上角代表“高亲和力 + 高荧光响应”的双优性能，可见 A→R 突变组显著优于其他组别。这是因为，Ala→Arg 突变引入正电荷和更大侧链，可能增强 TM5 与 cpEGFP 的构象耦联，从而提升信号传递效率。

该突变探针被命名为 GRAB-NKA0.2 版，其 $\Delta F/F_0$ (约提升 0.45) 与 Affinity Index (约提升 0.17) 均满足“高灵敏度、高亲和力”目标。更明显的荧光信号变化为后续在原代神经元及动物活体成像中的应用奠定基础，同时为研究 NKA 在脑内的作用机制与代谢通路提供了关键工具。本研究尚未覆盖更宽浓度范围的剂量曲线及受体特异性验证，这将在后续实验中补充。

5 讨论与展望

5.1 结论

本研究围绕 GRAB-NKA 探针的性能优化，建立“基础特性验证→功能特性检测→最优方案筛选”的三级评价体系，对 19 种 A5.69 位点突变探针展开系统评估，核心结论如下：

第一，基础功能保持稳定。所有突变探针均实现高效细胞膜定位（绿色通道荧光与 mCherry 红色通道细胞膜轮廓重合度较高），且基础荧光强度（均值 3.1 ± 0.1 a.u.）与原始 GRAB-NKA0.1 版（ 3.8 ± 0.2 a.u.）无统计学差异（ $P > 0.05$ ），排除了突变导致的蛋白表达异常、定位缺陷或荧光核心结构破坏等干扰；

第二，性能区分度良好。在 $1 \mu\text{mol/L}$ NKA 刺激下，突变探针的荧光响应幅度（ $\Delta F/F_0$ ）与亲和力指数（Affinity Index）呈显著正相关（Pearson 相关系数 $r=0.8872$ ， $P < 0.001$ ），且变异系数较大，证明该检测体系可有效区分不同突变体的性能差异。

第三，部分探针成功实现性能突破。A5.69 位点丙氨酸→精氨酸（A→R）突变探针表现最优，其荧光响应幅度从 NKA0.1 版的 0.95 提升至 1.4（增幅约 47%），亲和力指数从 0.30 提升至 0.47（增幅约 57%），综合性能显著优于其他突变体，故将其命名为 GRAB-NKA0.2 版。

综上，本研究通过结构导向的定点突变策略，成功实现了 GRAB-NKA 探针关键性能的定向优化，完成实验核心目标，为 NKA 的高灵敏度监测提供了新一代工具。

5.2 可能的创新点

本研究围绕 GRAB-NKA 探针的结构优化与性能提升开展工作，创新努力主要体现在以下三个方面：

（1）方法学上，尝试建立“结构-功能关联”的理性设计思路。不同于传统 GRAB 探针依赖经验筛选或随机突变的策略，本研究结合 NK2R 三维结构特征（Xia 和 Li, 2025），锁定 TM5 的 A5.69 位点优化，通过引入不同性质氨基酸，初步观察到“带电残基或通过增强静电相互作用提升信号传递效率”的趋势。该思路减少了盲目筛选工作量（仅针对 1 个位点构建 19 种突变体，远少于传统文库规模），初步形成“结构预测→靶点聚焦→功能验证”的 GPCR 类探针优化思路，为同类研究提供参考方向。

（2）对技术性能进行改进，助力探针核心指标协同提升。对 A5.69 位点定点突变后，GRAB-NKA0.2 版的荧光响应幅度（ $\Delta F/F_0$ 提升约 47%）与亲和力（指数提升约 57%）呈协同改善趋势，理论上更易捕捉低浓度 NKA 荧光波动，

或更适配生理级 NKA 监测。优化未出现“单一指标提升伴随另一指标下降”的常见问题，一定程度验证了结构导向突变策略的可行性，为探针性能提升提供参考案例。

(3) 拓展应用潜力，为 NKA 动态监测场景延伸创造可能。 GRAB-NKA0.2 版保留遗传编码探针优势（如病毒载体介导特异性表达），并实现性能改善，助力场景拓展：结合光纤记录或降低活体脑区信号采集信噪比，依托双光子成像或更精准捕捉神经环路中 NKA 瞬时释放。此外，该探针或为解析“NKA 与神经环路耦联机制”提供新工具，若后续在体验证成功，有望支持 NKA 相关生理病理机制研究深化。

5.3 研究局限

受时间限制，本研究在体外验证方面仍需进一步拓展：一是缺失 10^{-11} ~ 10^{-5} mol/L NKA 的剂量效应曲线；二是缺少拮抗剂（GR159897）及同源神经肽（SP、NKB）的干扰实验数据。与此同时，本研究尚未开展在体验证，如，未开展小鼠在体成像与行为学关联实验，探针实际应用价值仍需在活体中得到充分证实。未来需补充 10^{-11} ~ 10^{-5} mol/L 的 NKA 剂量曲线以确定 EC_{50} 、开展 GR159897 拮抗实验验证特异性、在小鼠疼痛/炎症模型中进行在体成像。

5.4 研究展望

在 GRAB-NKA0.2 版已实现的细胞水平优化基础上，未来研究可从以下三方面系统性拓展：

（1）多模态整合：联合双光子成像、电生理记录与行为学实验，构建多分子同步成像体系，解析 NKA 信号与神经环路活动的耦联机制。

（2）临床转化：在哮喘与神经退行性疾病模型中应用探针，探索其在药物高通量筛选和临床前疗效评估中的潜在价值。

（3）平台建设：推广“结构预测—靶点聚焦—功能验证”的策略，建立多类 GPCR 配体探针库，并推动跨学科合作，从而加速工具开发向机制解析和临床应用的转化。

附录

附表 1：19 组变体实验的统计数据

label	Mean ROI	Basal brightness	SEM-Basal brightness	Max brightness	SEM-Max brightness	ΔF1/F0	SEM-ΔF1/F0	ΔF2/F0	SEM-ΔF2/F0	AffinityIndex	SEM-affinity
A-C	319	1.870184277	0.063080991	3.084761862	0.059827837	0.045500873	0.035267163	0.652897199	0.059310721	0.06231958	0.046474661
A-D	312	1.857580136	0.041206203	3.037653367	0.170467752	0.006319911	0.033499087	0.639889734	0.119540491	-0.014217168	0.064798439
A-E	230	1.896286846	0.037205806	2.964706213	0.015154202	0.020135959	0.029805315	0.564667019	0.032630648	0.02990384	0.051360693
A-F	77	0.546011524	0.014786311	0.545356801	0.014645734	0.030146439	0.019683707	-0.000347096	0.029689152	0.161641637	0.508975064
A-G	198	1.443405767	0.090894608	3.191299935	0.210974793	0.305158279	0.049869958	1.214557056	0.10901914	0.24838123	0.01863884
A-N	268	2.09720651	0.143812677	4.461015434	0.202735266	0.137298367	0.06011566	1.135050628	0.074171665	0.115740915	0.045702534
A-Q	296	1.925488268	0.030269153	3.928676399	0.034677284	0.17859786	0.01849936	1.040962463	0.023424552	0.171044388	0.014935609
A-R	267	1.933198136	0.011670065	4.59488246	0.112444331	0.636657083	0.050723848	1.376536472	0.049760312	0.464884152	0.04734983
A-H	329	1.883106818	0.08832878	3.603980492	0.072072538	0.242348982	0.051108776	0.922482007	0.101160493	0.257309154	0.025887266
A-I	259	1.781645477	0.032919042	2.332757397	0.109116821	0.004868819	0.026145759	0.307939409	0.037588182	-0.00398852	0.086352634
A-W	241	1.591334788	0.06087634	2.57596425	0.041923804	0.33257503	0.031561038	0.622764493	0.058738375	0.539192313	0.0575857
A-S	359	1.888144642	0.019496418	4.129007884	0.077051923	0.295220921	0.023299908	1.187228786	0.04591642	0.247940221	0.011072998
A-T	228	2.029089674	0.057644705	3.876045328	0.117457113	0.076857106	0.040951368	0.915309337	0.099172669	0.075701623	0.038922884
A-K	223	1.765750327	0.030127906	4.051731454	0.198151755	0.212875093	0.013938219	1.292933881	0.086545899	0.165051105	0.007584788
A-Y	274	1.591574119	0.013693152	2.510294366	0.071914028	0.121218095	0.041090097	0.577780212	0.052217519	0.201158031	0.048820061
A-P	318	1.755411189	0.083907534	2.795092493	0.101897838	0.089119606	0.039381476	0.594426882	0.030886684	0.147587646	0.061097338
A-V	267	1.925685927	0.034787447	2.654475694	0.123170295	0.01032793	0.019636271	0.377511969	0.047699089	0.025220434	0.046305375
A-L	182	1.826851536	0.073749749	2.453968098	0.066801482	-0.011727097	0.020517339	0.344961898	0.026346106	-0.037623182	0.060041419
A-M	171	1.843379646	0.058798994	2.856021937	0.059459132	0.024786405	0.049967306	0.553277024	0.068488341	0.025754228	0.098349632
-A contro	262	1.923973787	0.041076871	3.758336653	0.173553947	0.286219378	0.012045746	0.951326483	0.050018175	0.302602431	0.020357184

注：本研究原始数据包含 19 种目标变体，为确保结果可靠性，每种变体均设置 3 组平行实验以减少随机误差；表格中呈现的数值，为每种变体对应的 3 组平行实验数据经算术平均后的结果。

附表 2: $\Delta F/F_0$ 与 Affinity index 的描述性统计

统计量	$\Delta F_1/F_0$	$\Delta F_2/F_0$	Affinity index
样本数	57	57	57
平均值	0.122	0.773	0.144
中位数	0.074	0.747	0.128
标准差	0.152	0.372	0.199
最小值	-0.075	-0.033	-0.375
最大值	0.738	1.476	1.179
第一四分位数	0.014	0.504	0.026
第三四分位数	0.214	1.077	0.226
偏度	1.78 (右偏)	-0.12 (近似对称)	1.92 (右偏)
峰度	3.62 (尖峰)	-0.85 (平峰)	5.23 (尖峰)

注：样本数=19*3=57 个。

参考文献

- 冯杰思,李毓龙. (2025). 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 (Scientia Sinica Vitae), 2025. <https://doi.org/10.1360/SSV-2025-0038>
- 万金霞,李毓龙. (2020). 神经递质检测方法的研究进展. 分析化学, (3). <https://doi.org/10.19756/j.issn.0253-3820.191548>
- 王欢. (2022). 基因编码的神经肽类荧光探针的开发和应用 (博士学位论文). 北京大学.
- Alexander, S. P. H., Christopoulos, A., Davenport, A. P., Kelly, E., Mathie, A., Peters, J. A., Veale, E. L., Armstrong, J. F., Faccenda, E., Harding, S. D., et al. (2019). The concise guide to pharmacology 2019/20: G protein-coupled receptors. *British Journal of Pharmacology*, 176(Suppl 1), S21 – S141. <https://doi.org/10.1111/bph.14748>
- Boler, J., Enzmann, F., Folkers, K., et al. (1969). The identity of chemical and hormonal properties of the thyrotropin releasing hormone and pyroglutamyl-histidyl-proline amide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 37(5), 705 – 710.
- Broberger, C., Johansen, J., Johansson, C., Schalling, M., & Hökfelt, T. (1998). The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(25), 15043 – 15048.
- Burbach, J. P. (2011). What are neuropeptides? In A. Merighi (Ed.), *Neuropeptides* (pp. 1 – 36). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-310-3_1
- Burgus, R., Dunn, T. F., Desiderio, D., et al. (1970). Characterization of ovine hypothalamic hypophysiotropic TSH-releasing factor. *Nature*, 226(5243), 321 – 325. <https://doi.org/10.1038/226321a0>
- Chavan, S. S., Pavlov, V. A., & Tracey, K. J. (2017). Mechanisms and Therapeutic Relevance of Neuro-immune Communication. *Immunity*, 46(6), 927 – 942. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.008>
- Conlon, J. M. (2004). Neurokinins. In *Encyclopedia of Endocrine Diseases* (pp. 330 – 333). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-475570-4/01246-4>
- Deng, F., Wan, J., Li, G., Dong, H., Xia, X., Wang, Y., Li, X., Zhuang, C., Zheng, Y., Liu, L., Yan, Y., Feng, J., Zhao, Y., Xie, H., & Li, Y. (2024). Improved green and red GRAB sensors for monitoring spatiotemporal serotonin release in vivo. *Nature Methods*, 21(4), 692 – 702. <https://doi.org/10.1038/s41592-024-02188-8>
- Engel, M. A., Becker, C., Reeh, P. W., & Neurath, M. F. (2011). Role of sensory neurons in colitis: increasing evidence for a neuroimmune link in the gut. *Inflammatory Bowel Diseases*, 17(4), 1030 – 1033. <https://doi.org/10.1002/ibd.21422>

- Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R. Y., Venter, J. C., Hutchison, C. A., & Smith, H. O. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*, 6(5), 343 – 345. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1318>
- Hauser, A. S., Attwood, M. M., Rask-Andersen, M., Schiöth, H. B., & Gloriam, D. E. (2017). Trends in GPCR drug discovery: New agents, targets and indications. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16, 829 – 842. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.178>
- Joos, G., Kips, J., Pauwels, R., & Van Der Straeten, M. (1986). The effect of tachykinins on the conducting airways of the rat. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie*, 280(2 Suppl), 176 – 190. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2425760/>
- Luttrell, L. M., Maudsley, S., & Bohn, L. M. (2015). Fulfilling the promise of “biased” G protein – coupled receptor agonism. *Molecular Pharmacology*, 88(3), 579 – 588. <https://doi.org/10.1124/mol.115.099630>
- Mains, R. E., Cullen, E. I., May, V., & Eipper, B. A. (1987). The role of secretory granules in peptide biosynthesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 493, 278 – 291. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1987.tb27213.x>
- National Center for Biotechnology Information (NCBI). (2023). TAC1 tachykinin precursor 1 [Homo sapiens] - Gene. National Library of Medicine (US). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6863>
- Noda, M., Teranishi, Y., Takahashi, H., Toyosato, M., Notake, M., Nakanishi, S., & Numa, S. (1982). Isolation and structural organization of the human preproenkephalin gene. *Nature*, 297, 431 – 434. <https://doi.org/10.1038/297431a0>
- Rivier, J., Spiess, J., Thorner, M., & Vale, W. (1982). Characterization of a growth hormone-releasing factor from a human pancreatic islet tumour. *Nature*, 300, 276 – 278. <https://doi.org/10.1038/300276a0>
- Sass, F., Ma, T., Ekberg, J. H., et al. (2024). NK2R control of energy expenditure and feeding to treat metabolic diseases. *Nature*, 635, 987 – 1000. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-08207-0>
- Steinhoff, M. S., von Mentzer, B., Geppetti, P., Pothoulakis, C., & Bunnett, N. W. (2014). Tachykinins and their receptors: contributions to physiological control and the mechanisms of disease. *Physiological Reviews*, 94(1), 265 – 301. <https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2013>
- Sun, F., Zeng, J., Jing, M., Zhou, J., Feng, J., Owen, S. F., Luo, Y., Li, F., Wang, H., Yamaguchi, T., Yong, Z., Gao, Y., Peng, W., Wang, L., Zhang, S., Du, J., Lin, D., Xu, M., Kreitzer, A. C., Cui, G., & Li, Y. (2018). A genetically encoded fluorescent sensor enables rapid and specific detection of dopamine in flies, fish, and mice. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.06.042>

- Touhara, K. K., Rossen, N. D., Deng, F., Castro, J., Harrington, A. M., Chu, T., Garcia-Caraballo, S., Brizuela, M., O'Donnell, T., Xu, J., Cil, O., Brierley, S. M., Li, Y., & Julius, D. (2025). Topological segregation of stress sensors along the gut crypt-villus axis. *Nature*, 640, 732 – 742. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-08581-9>
- Wang, H., Qian, T., Zhao, Y., Zhuo, Y., Wu, C., Osakada, T., Chen, P., Chen, Z., Ren, H., Yan, Y., Geng, L., Fu, S., Mei, L., Li, G., Wu, L., Jiang, Y., Qian, W., Zhang, L., Peng, W., Xu, M., Hu, J., Jiang, M., Chen, L., Tang, C., Zhu, Y., Lin, D., Zhou, J.-N., & Li, Y. (2023). A tool kit of highly selective and sensitive genetically encoded neuropeptide sensors. *Science*, 382(6672), eabq8173. <https://doi.org/10.1101/2022.03.26.485911>
- Xia, X., & Li, Y. (2025). A high-performance GRAB sensor reveals differences in the dynamics and molecular regulation between neuropeptide and neurotransmitter release. *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/s41467-025-56129-w>
- Yang, J., Zhao, T., Fan, J., Zou, H., Lan, G., Guo, F., Shi, Y., Ke, H., Yu, H., Yue, Z., Wang, X., Bai, Y., Li, S., Liu, Y., Wang, X., Chen, Y., Li, Y., & Lei, X. (2024). Structure-guided discovery of bile acid derivatives for treating liver diseases without causing itch. *Cell*, 187(25), 7164-7182.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2024.10.001>
- Zheng, Y., Cai, R., Wang, K., Zhang, W., Zhuo, Y., Dong, H., Zhang, Y., Wang, Y., Deng, F., Ji, E., Cui, Y., Fang, S., Zhang, X., Huang, H., Zhang, K., Wang, J., Li, G., Miao, X., Wang, Z., Yang, Y., Li, S., Grimm, J., Johnsson, K., Schreiter, E., Lavis, L., Chen, Z., Mu, Y., & Li, Y. (2025). In vivo multiplex imaging of dynamic neurochemical networks with designed far-red dopamine sensors. *Science*. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2024.12.22.629999v1>

致 谢

“我们不必害怕未知，因为正是未知推动着我们不断前行。”
——摘自《We Have No Idea: A Guide to the Unknown Universe》

2024 年 12 月，历经多轮选拔与面试，我有幸加入北京青少年科技俱乐部，并获准进入北京大学生命科学学院李毓龙教授领衔的实验室，开启了至今已九个月的科研实践。这是我首次真正站在科学探索前沿，直面未知挑战，也第一次切身感受到科研所需的严谨、耐心与热忱。在此，我衷心感谢李毓龙教授，是他为我敞开科学圣殿的大门，让我初窥其中的庄严与美妙。

课题研究全程，李毓龙教授始终以极大耐心给予我细致指导，且这份指导纯粹出于呵护青少年科研兴趣，未收取任何报酬。他特意允许我参与博士生组会，让我近距离感受北大在生物前沿领域的探索氛围与思辨活力。从选题、开题报告、答辩准备到论文写作，每个关键环节都有他的悉心点拨；从实验目标设定、方案设计、技术路线规划，到结果分析与科学解读，他循循善诱，教我以更科学的思维思考、更系统的方法探索。更令我感动的是，我发给李教授的求教邮件总能当天收到回复，这份高效与负责的背后，是令人敬佩的师长担当。

实验室的杨越奇博士生即便自身研究繁忙，仍抽时间为我提供支持与鼓励，且未获取任何回报。在实验操作规范、问题排查技巧及科研思维培养上，他给予我关键性助力，还不时提醒我保持科研的严谨与认真。他曾手把手示范标准操作流程，耐心纠正我操作中的细节偏差。实验室其他学长学姐也有问必答，尽显北大学子风范。正是在李毓龙实验室团队的引领下，我顺利完成了《基于定点突变策略优化遗传编码的神经激肽 A 荧光探针》课题。

这段科研经历，不仅让我熟练掌握基因克隆、荧光探针构建与功能验证等核心技能，更让我深刻体会到科学探索的乐趣与科学精神的内涵——这份精神既包含对未知的敬畏与好奇，更有前辈对后辈毫无保留的提携与传承。实验从非一帆风顺，常遇意外难题，但每当我陷入困境，总有导师和学长的陪伴与指导。每一次实验的成败、每一组数据的获取与讨论，都在强化我的信念：科研是需要热爱与坚守的道路，更是因无私相助而温暖的成长旅程。

我还要特别感谢高中生物教师方韡老师。他为我打下坚实的生物学科基础，推开了通往生命科学的大门。在我撰写论文过程中，他还提出宝贵指导意见，教我更好地运用生物学科语言，他并未因为此次指导行为而获得任何报酬。同时，我要衷心感谢学校科技辅导员刚永运老师。从前期科研计划的统筹组织、中期研究进度的跟踪督促，到过程中各类问题的沟通协调，他始终投入大量心血提供支持，让我们倍感温暖。

本论文是我独立完成实验设计、操作、数据处理、成像分析及撰写全过程。从曾有的困惑迷茫，到最终的突破进展，每一步都凝聚着导师们的指导、学长学姐们的帮扶，以及我自身的坚持与好奇。

最后，我再次向北京青少年科技俱乐部致以诚挚谢意。这个俱乐部是全程无偿为青少年提供科研实践机会的公益平台，打破了青少年接触前沿科研的壁垒，为我创造了“走近科学”、体验研究者生活的宝贵机会，更让我懂得科学精神中“传承”与“分享”的重量。未来，我将带着这份感动与力量，以更坚定的步伐继续迈向科学探索之路，奔赴充满无限可能的未知之旅。

2025 S.-T. Yau High School Science Award
仅用于2025丘成桐中学科学奖论文公示