

· 专题论坛 ·

Halo-tag标记技术及其在植物细胞成像中的应用

钱虹萍^{1,2,3,4}, 罗鹏云^{1,2,3,4}, 刘帅⁵, 徐昌文^{1,2,3,4}, 殷金环^{1,2,3,4}, 崔亚宁^{1,2,3,4*}, 林金星^{1,2,3,4*}

¹林木育种与生态修复国家工程研究中心, 北京 100083; ²林木、花卉遗传育种教育部重点实验室, 北京 100083; ³树木花卉育种生物工程国家林业和草原局重点实验室, 北京 100083; ⁴北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083; ⁵中国林业科学研究院, 林木遗传育种全国重点实验室, 北京 100091

摘要 细胞是生物体的基本结构和功能单位, 其内部复杂的组织结构、相互作用及动力学过程等决定着整个生物体的生命形态和生命过程。开展活体状态下细胞结构和功能研究, 对于探索和掌握生命的本质具有重要意义。随着科学技术的不断进步, 一系列新的活细胞标记技术被不断革新。近年来, Halo-tag标记技术逐渐发展成为一种广泛应用的新型分子标记技术, 在活细胞成像和追踪研究领域取得了极大进展, 并逐渐在植物细胞成像中得到应用。该文首先系统介绍了Halo-tag标记技术的定义、分类和发展过程, 然后详细介绍了Halo-tag标记技术发生脱卤有机反应的机制及其荧光配基的种类, 最后从观察分子的精细定位、追踪分子的实时运动和检测分子间的相互作用3方面着重阐述了该技术在植物活细胞成像中的最新进展, 以期为后续Halo-tag标记技术在植物中的潜在应用奠定理论基础并提供技术支持。

关键词 新型标记技术, Halo-tag标签, Halo-tag配基, 活细胞成像

钱虹萍, 罗鹏云, 刘帅, 徐昌文, 殷金环, 崔亚宁, 林金星 (2023). Halo-tag标记技术及其在植物细胞成像中的应用. 植物学报 58, 475–485.

近年来, 随着显微技术的飞速发展, 单分子水平上的活细胞成像技术因其高时空分辨率、高灵敏度和高通量等优点, 成为研究生命科学强有力的工具 (Halstead et al., 2016; Shen et al., 2020; Guo et al., 2021), 但也因此对标记方法提出了更高的要求 (张娇等, 2021; Oveka et al., 2022)。只有将标记技术和成像系统统一起来, 才能更好地提升细胞观测的精度、维度和尺度 (Jing et al., 2020; 张原等, 2022)。目前, 常用的活细胞荧光标记方法主要包括有机染料标记 (Chen et al., 2021)、量子点标记 (Kashapov et al., 2018) 和荧光蛋白标记 (Liu and Cui, 2020) 三大类。其中, 有机荧光染料种类繁多, 多为含有荧光团的小分子化合物 (Li et al., 2017b; Rasheed et al., 2018), 但因其发射光谱较宽且特异性差而限制了其在单分子成像等领域的应用。与有机染料不同, 量子点是一种半导体纳米晶粒 (Marcel et al., 1998; 李晓娟等, 2009), 虽然其发射光谱窄, 几种不同发射波长的量

子点可同时用于不同物质的监测, 但由于其会对生物等活性物质产生一定的毒性, 导致它在活细胞检测中的应用十分受限 (Cao et al., 2018)。荧光蛋白通过基因编码与目标分子直接进行耦联标记, 是目前最常规的一种标记技术 (Shao et al., 2016), 并且随着颜色、光物理性能和亮度等方面的不断改善 (Feng et al., 2017), 发展出很多具有光转化特性的变体荧光蛋白, 如光激活、光切换和光转化荧光蛋白 (Grimm et al., 2016)。然而, 荧光蛋白因自身的亮度较低且非常容易漂白等缺点, 限制了其在超分辨成像领域中的应用。

为了克服有机染料标记、量子点标记和荧光蛋白标记这三大类标记技术的缺陷, 生物学家和化学家在这三类标记的基础上开发出一系列新的分子标记 (Li et al., 2017a; Banaz et al., 2019)。例如, 先将带有基因靶向的Tag序列/标签融合到目标分子上, 再添加配基 (有机染料) 使之与Tag序列/标签稳定结合, 这种混合标记方法既继承了有机染料的光亮度和稳定性, 又

收稿日期: 2022-09-29; 接受日期: 2023-01-28

基金项目: 国家自然科学基金 (No.32030010, No.32000483)

* 通讯作者。E-mail: cuiyaning@bjfu.edu.cn; linjx@bjfu.edu.cn

具有特异的靶向性。此方法的最大优势是可以通过调整荧光染料的浓度来实现目标分子的稀疏标记。因此,近几年Tag标签备受关注,也成为现今活细胞单分子成像领域中最常用的新型标记方法(Yagi et al., 2021)。而Halo-tag就是其中一种受研究者青睐的带有Tag标签的标记技术。Halo-tag技术克服了上述传统分子标记的局限性,研究人员使用单个遗传结构就能进行全面的蛋白质分析。将Halo-tag技术与不同的超分辨显微成像系统结合,以及与其它标记技术联合,广泛应用于生命科学研究领域,如蛋白质分离和纯化、蛋白质功能和调控、蛋白质-蛋白质和蛋白质-DNA相互作用、生物测定、体外细胞成像和体内活细胞成像(Deprey and Kritzer, 2021)。

近几年,Halo-tag标记技术在活细胞成像研究中的应用越来越多,并逐渐在植物细胞成像中得到尝试和应用。例如,利用该技术可精细地观察目标分子的定位和分布,可以通过调整标记的时间和空间实现脉冲追踪来观察目标分子的周转和运输过程,允许长时程追踪目标分子的结合和解离等动态行为,以及检测不同分子间的共定位和相互作用(Locatelli-Hoops et al., 2013)。因此,本文从Halo-tag多功能标记技术的基本原理和反应特点出发,对配基的种类和应用等方面的最新研究进展进行综述,并重点介绍了它们在植物活细胞成像中的应用,同时讨论了其在植物细胞中应用的限制,展示了Halo-tag多功能标记技术在植物细胞生物学领域更为广阔的应用前景和最新发展趋势。

1 Halo-tag标记技术

目前,Tag标签通常包括三大类(Yan and Bruchez, 2015)。第1类是基于蛋白质结构域的化学标签,即将标签融合到目标蛋白上进行标记,一般为微生物来源并通过改造得来的酶,因此在真核细胞中均无内源表达,这些常用的标签包括Snap-tag、CLIP-tag、Halo-tag和TMP-tag (Erdmann et al., 2019; Charubin et al., 2020; Hoelzel and Zhang, 2020)。第2类是基于金属螯合的肽标签,这类标签本身可以与配基进行特异性互作。例如,双砷-四半胱氨酸标记和Ni-硝基三乙酸(NTA)均能实现对目标分子的特异性标记,但可能会由于电子转移等现象而导致荧光猝灭。第3类是酶介导的肽标签,这类标记需要在酶的

辅助下完成(如AMP-tag和ACP-tag),但这些标签仅限于细胞表面的标记。综合来看,第1类Tag标签是最受欢迎的标记方法,且目前均已商品化,可为荧光标记和成像研究提供更多的选择和便利。此外,基于Halo-tag多功能标记的优势,近些年在活细胞单分子研究中得到广泛应用(Grimm et al., 2017a)。

1.1 Halo-tag标记技术的概况

Halo-tag标记技术于2005年被首次提出,由专注于生物技术研究的美国Promega公司发明,该公司研究人员共同参与了这项新技术的开发(Los et al., 2008)。Halo-tag标记技术是指Halo-tag蛋白和Halo-tag配基之间发生脱卤有机化学反应,并形成共价键而结合在一起。研究者利用此化学反应原理,通过基因工程技术构建含有目标基因与Halo-tag序列的融合表达载体,并采用瞬时或稳定转染的方式进入目标细胞内表达,再根据不同的实验目的来添加含有不同功能基团的Halo-tag配基(Grimm et al., 2015) (图1A),包括用于细胞成像的荧光配基、用于蛋白检测(如生物素(biotin))的非荧光配基以及用于蛋白相互作用研究(pull-down)的表面配基等,从而实现1个载体发挥多重作用的目的。

1.2 Halo-tag标记技术的反应原理

Halo-tag标记技术的核心是Halo-tag蛋白,是来源于细菌卤代烷脱卤酶(haloalkane dehalogenase),并经过基因改造而得到的一种突变型脱卤酶,由293个氨基酸残基组成,是分子量约为33 kDa的单体蛋白(王锋等, 2014)。正是由于Halo-tag衍生于细菌原核生物,当Halo-tag作为报告基因进行遗传转化时,在真核生物和大多数细菌中几乎不存在类似的内源反应,因此保证了Halo-tag标记技术的高度特异性。

Halo-tag标记技术的本质是脱卤化氢反应,该反应属于有机反应类型中的消去反应。首先,野生型脱卤酶与另一反应物卤代烃之间可以进行正常的有机反应,脱卤酶的第106位天冬氨酸(Asp)和配基上的卤原子发生亲核反应,从而脱去配基上的卤原子,并形成中间产物酯,此时,中间产物酯在脱卤酶第272位组氨酸(His)的催化作用下发生水解。而Halo-tag标记在此反应的基础上,将脱卤酶第272位组氨酸突变

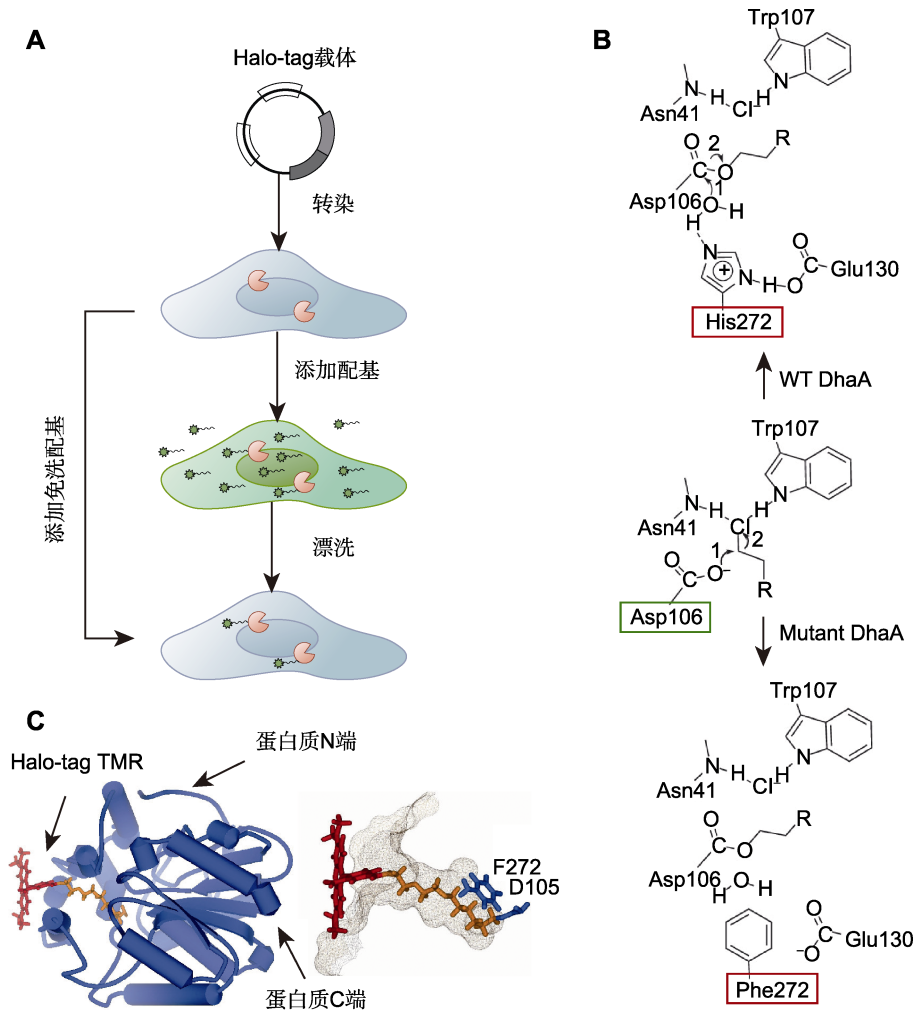


图1 Halo-tag标记技术

(A) 活体细胞Halo-tag标记流程图; (B) 野生型(WT)和突变型脱卤酶的化学结构式(绿框表示脱卤酶的第106位天冬氨酸(Asp), 是指发生脱卤并形成中间产物酯的位点; 红框表示野生型与突变型脱卤酶的区别, 其中野生型脱卤酶第272位是组氨酸(His), 而在突变型脱卤酶第272位突变成苯丙氨酸(Phe)); (C) Halo-tag蛋白与TMR配基共价结合的分子模型(改编自England et al., 2015)。

Figure 1 Halo-tag technology

(A) Schematic showing Halo-tag labeling in living cells; (B) Chemical structural formulae of wild-type (WT) and mutant dehalogenases (green box indicates that aspartic acid (Asp) at position 106 of dehalogenase, which is the site where dehalogenation occurs and the intermediate ester is formed; red box indicates the difference between the wild-type dehalogenase and the mutant dehalogenase, where the wild-type dehalogenase is histidine (His) at position 272, while the mutant dehalogenase mutates to phenylalanine (Phe) at position 272); (C) Molecular model of the Halo-tag protein with a covalently bound TMR ligand (modified from England et al., 2015).

成苯丙氨酸(Phe) (图1B), 突变后的脱卤酶不能将中间产物酯水解, 这样在脱卤酶与卤代烃之间就形成了稳定存在且不可逆的共价结合(England et al., 2015)。

2 Halo-tag标记技术的配基

Halo-tag配基是指上述脱卤有机化学反应中的卤代烷

烃, 它是带有卤素标签的功能基团。具体而言, Halo-tag配基由两部分组成, 一部分是通用的、具有活性的反应连接分子, 其作用是与Halo-tag蛋白进行共价连接。而Halo-tag配基的结合位置位于Halo-tag蛋白的第106位天冬氨酸(Asp), 处于距离蛋白质表面约1.5 nm的深口袋中(图1C), 因此Halo-tag配基连

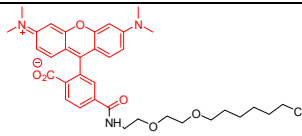
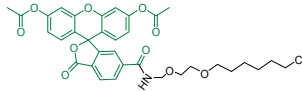
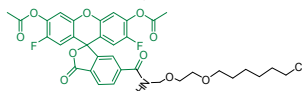
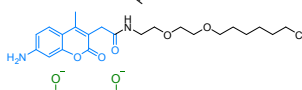
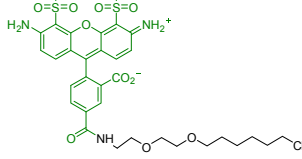
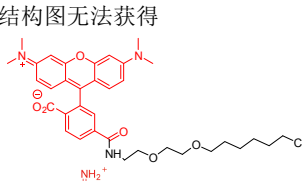
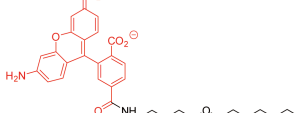
接分子的长度是决定能否形成共价键的关键(Verschuere et al., 1993)。研究人员通过大量的测试,发现当连接分子的长度为14个原子且在靠近末端卤素原子一侧为6个碳原子时,脱卤化氢反应的效率和特异性最佳,因此这样的结构也成为大多数Halo-tag配基连接分子的通用结构(Wilhelm et al., 2021)。Halo-tag配基的另一部分是特异的、具有功能的基团,正是由于多样化功能基团的存在,才赋予了Halo-tag技术应用方面的多功能性。目前Halo-tag配基已商业化,美国Promega公司推出了数十种不同功能的Halo-tag配基,包括用于细胞成像的荧光配基、用于亲和纯化的生物素以及用于固体表面研究的树脂等。本文重点关注Halo-tag配基在活细胞成像中的研究,并着重介绍用于细胞成像的荧光配基。

依据膜渗透性、光谱特性以及是否需要漂洗等特点,用于荧光成像研究的Halo-tag配基可简单分为4种类型(Benink and Urh, 2015) (表1)。第1类:具有

细胞渗透性的配基,能对细胞质内的分子进行标记成像,也是最经典和最常用的一类配基,包括红色荧光Halo-tag® TMR: $C_{35}H_{42}ClN_3O_6$, 相对分子质量为636, 最大激发波长/最大发射波长为555 nm/585 nm; 绿色荧光Halo-tag® diAcFAM: $C_{35}H_{36}ClNO_{10}$, 相对分子质量为666, 最大激发波长/最大发射波长为494 nm/526 nm; 以及Halo-tag® Oregon Green和Halo-tag® Coumarin等。第2类:非细胞渗透性的配基,此类配基主要用于对细胞膜上的分子进行标记成像,主要包括Halo-tag® Alexa Fluor® 488和Alexa Fluor® 660两种。第3类:具有细胞渗透性的配基,但与第1类不同的是此类配基最大的特点是快速,并且不需要进行漂洗即可直接进行后续成像观察。此类配基主要包括Halo-tag® TMRDirect™和R110Direct™两种。第4类:也是最新发展的一类,同样具有细胞渗透性的“快速、免洗”配基,通过调整经典的荧光团结构,使其亮度和光稳定性均显著提高,主要包括JF

表1 用于活细胞成像的Halo-tag配基种类(改编自Benink and Urh, 2015)

Table 1 Types of Halo-tag ligands for living cell imaging (modified from Benink and Urh, 2015)

配基类别	膜渗透性	激发/发射波长的峰值(nm)	是否需要清洗	化学结构式
TMR	细胞渗透性	555/585	是	
diAcFAM	细胞渗透性	494/526	是	
Oregon Green	细胞渗透性	496/516	是	
Coumarin	细胞渗透性	353/434	是	
Alexa Fluor® 488	非细胞渗透性	494/517	是	
Alexa Fluor® 660	非细胞渗透性	663/690	是	结构图无法获得
TMRDirect™	细胞渗透性	555/585	否	
R110Direct™	细胞渗透性	502/527	否	

(Janelia Fluor)系列的染料(Teng et al., 2019), 如 JF549、PA-JF549和JF646、PA-JF646。需要注意的是, 此类配基通常不能反复冻融, 并且仅供单次使用, 所以成本较高。此外, 为了满足科学研究的需要, 研究人员不断优化和改进这些Halo-tag配基, 甚至亲自研发和制备Halo-tag配基, 极大地推动了该技术在活细胞成像中的应用。

3 Halo-tag标记技术在植物细胞成像中的应用

近年来, 各类标记技术飞速发展(夏鹏等, 2015; 钱虹萍等, 2021; Zhang et al., 2021)。其中, Halo-tag标记技术在单分子成像过程中发挥重要作用, 在植物细胞成像中的应用包括观察分子的精细定位、实时追踪分子的动态特征和检测分子间的相互作用3类。

3.1 蛋白的精细定位分析

与其它荧光蛋白一样, Halo-tag蛋白可以融合到目标蛋白的N端或C端, 但不同的是Halo-tag蛋白可以与光稳定荧光配基快速结合形成不可逆的共价键(Yazaki et al., 2020)。因此, Halo-tag技术具有稳定性好、特异性强和量子产量高的特性, 更适用于先进的显微成像技术, 如3D成像模式以及各种超分辨显微成像系统, 能够对分子的精细定位和结构进行更详细的观察。例如, Liu等(2014)应用Halo-tag标记技术, 基于JF系列荧光配基(Janelia Fluor 549)探测活体胚胎干细胞中的转录因子Sox2的高精度3D定位。结果在单个细胞核内观察到许多局部聚集的亮点, 这表明Sox2分子并非均匀分布于整个细胞核, 而是以高密度团簇的形式局部富集。与此类似, 美国麻省理工学院Cisse团队(Cho et al., 2018)将JF系列荧光配基(Janelia Fluor 646)与光转化荧光蛋白(Dendra2)标记方法相结合, 通过超分辨光片显微技术观察了JF646标记的中介体(Mediator)和Dendra2标记的RNA聚合酶II (Pol II)分子的定位情况, 结果显示, Mediator和Pol II都不均匀地分布于活体胚胎干细胞核内, 并形成分子量较大且稳定的团簇结构。上述研究表明, 通过Halo-tag技术可观察到细胞核内更多精细结构和分子定位信息, 这对于理解真核基因表达调控等过程至关重要。

除了使用到上述经典Halo-tag配基以外, 为了满足更多的实验需求研究者改进和开发了许多新的荧光团(Knight et al., 2015; Wang et al., 2021)。Grimm等(2017b)通过对经典罗丹明染料的结构进行调整, 获得了Janelia Fluor 585和Janelia Fluor 635两种新的荧光配基, 它们的分子量更小, 可快速渗透进入细胞, 并通过对果蝇幼虫的脑组织活体标记和成像进一步验证了这种新型荧光配基的实用性。Liu等(2017)开发了另一种新型、快速、免洗的Halo-P9荧光配基, 利用该配基对DNA结合蛋白TDP43进行染色标记, 通过显微观察发现, 在未漂洗配基的情况下, 就清晰可见TDP43分子不均匀地分布于细胞核内, 并与普通TMR配基的定位结果一致, 但其荧光信号却增强了1 000倍。综上所述, 越来越多的研究者致力于探索Halo-tag荧光配基在活细胞成像中的应用, 使其性能越来越好, 更加适用于组织、亚细胞和单分子水平上的精细定位研究。

Halo-tag标记技术除了在动物细胞中得到广泛应用之外, 在植物细胞的成像研究中也得到了首次尝试和应用。Lang等(2006)最初构建了带有Halo-tag标签的表达载体, 并在花椰菜花叶病毒启动子(35S)驱动下进行强表达, 通过瞬时转化的方式转入烟草(*Nicotiana tabacum*)原生质体以及烟草和杨树(*Populus*)叶片中。转化后, 将植物材料与特异性TMR配基共同孵育, 并运用激光共聚焦显微镜对其细胞进行成像观察。结果表明, 在不同植物材料的细胞质中均能检测到强烈的有效荧光, 证明Halo-tag特异性配基可以透过植物细胞壁进入细胞中。上述研究表明, Halo-tag标记技术可以对植物的不同组织、不同部位和不同定位的分子进行特异性标记和观察, 进而从多角度成像并分析植物活体细胞内单分子的定位特征、精细结构特点和荧光强度分布等, 为深入研究复杂结构、功能与机理奠定基础。

3.2 追踪分子的实时动态

利用Halo-tag标记技术不仅可以精细地观察到分子的结构和定位细节, 还可以利用其与荧光配基的快速结合特点来实时追踪分子的运动状态和特征。由于Halo-tag荧光配基的光谱性质和渗透性存在较大差异, 可供研究者选择的范围较大, 因此可以对实验的标记时间或空间进行控制, 从而直接观测分子随时间

的合成或转运等动力学特征。例如,英国牛津大学 Neil Brockdorff 研究组利用荧光配基光谱性质不同的特点,来区分标记不同成像时间合成的非编码 Xist (X-inactive specific transcript) RNA 分子 (Rodermund et al., 2021)。首先将 Halo-tag 引入 Xist RNA 标记系统中,然后在细胞培养的不同时间点,分别加入不同光谱属性的 Halo-tag 荧光配基,这样先后合成的 Xist RNA 被标记成不同的颜色,最后利用结构光照明显微镜(structured illumination microscopy, SIM)追踪,发现已合成与新合成的 Xist RNA 之间存在显著偶联(coupling)关系。Los 等(2008)利用 2 种不同的配基 (TMRDirect 和 R110Direct) 在不同时间段与 U2OS 细胞中的 Halo-tag 蛋白进行共孵育,通过显微成像观察到不同时间段合成的蛋白分别标记不同的荧光配基,进而实现 Halo-tag 对蛋白合成顺序的区分标记,这有利于研究者后续探索分子的具体功能和调控机制。此外,利用 Halo-tag 配基膜渗透性的不同,可以同时细胞膜内外分子进行区室化标记。例如, Ai 等(2012)利用不透膜的 Alexa Fluor 488 荧光配基标记带有 Halo-tag 标签的膜蛋白 PCSK9,而用可透膜的 TMR 荧光配基标记带有 Halo-tag 标签的胞内 PCSK9 蛋白,通过显微观察发现膜蛋白 PCSK9 可通过胞吞作用等进入细胞内,而胞内的 PCSK9 蛋白可通过内质网和高尔基体等细胞器逐渐转运或降解,进而利用配基膜渗透性的不同实现对细胞膜内外分子的动态转运和降解行为的观察。综合上述研究表明, Halo-tag 技术既可以区分标记不同时间合成的分子,也可以区分标记不同位置的分子,进一步展示了该技术在实时动态追踪研究中的优势,这对研究者揭示活细胞内分子的动态转运以及调控过程至关重要 (Zhang et al., 2022)。

Halo-tag 标记技术的另一个特点是能够与稳定的荧光配基共价结合,从而极大地提高量子产量,并延长成像时间,因此,利用该技术能够长时间地追踪分子的结合、转运和解离等运动行为。Cho 等(2018)为了在活细胞核内观察 Pol II 分子的动力学,用 Halo-tag 技术的 JF 系列荧光配基 (Janelia Fluor 646) 来标记 Pol II,并通过晶格光片成像技术进行长时程的观测(成像观察时间约 700 秒),成像结果显示,2 个不同的 Pol II 分子在 369 秒时相互接触,进而相互融合,这种现象为后续揭示活细胞内的 Pol II 相分离的

特性奠定了基础。Pulsipher 等(2015)利用 Halo-tag 蛋白作为锚点,通过共价键的稳定结合,使糖胺聚糖 (glycosaminoglycan) 在细胞膜表面长时间呈现,结果显示 Halo-tag 配基的这种强烈荧光信号至少可持续 8 天,这种长时程的观测时间以及稳定的荧光信号,为后续探索糖胺聚糖的功能和信号转导事件提供了一种强大且通用的手段。此外, Grimm 等(2017b)将改造的荧光配基 Janelia Fluor 585 静脉注射到活体小鼠尾部,通过显微观察发现,该荧光标记可持续近 2 周,这一荧光配基为长时间追踪活细胞内分子的动态行为提供了可靠的方法。此外,研究者设计了一个通用的遗传系统来精确控制荧光标记分子的拷贝数,并结合 Halo-tag 标记技术的优势,将观察的持续时间延长了 2 个数量级 (Shao et al., 2018)。美国霍华德·休斯医学研究所 (HHMI) 的 Liu 等(2018)就应用 Halo-tag 标记技术研究了神经元传递的动态极性,并结合稀疏标记策略观察了神经元内单个分子的运动轨迹,利用该方法观察到的分子运动轨迹比传统标记方法提高了 100 倍。Liu 等(2018)还利用 Halo-tag 结合稀疏标记方法,标记了细胞核内的单个 H2B 分子,并与 Janelia Fluor 549 荧光配基进行孵育,使得成像时间达 10–20 分钟,比之前利用传统标记方法的测量时长高 2 个数量级。总之,这种结合 Halo-tag 技术的单分子稀疏标记方法,更适用于分析密集的活细胞核内转录因子的结合和解离动力学,以及长时间的成像和追踪单分子的运动轨迹。

3.3 检测蛋白之间的相互作用

Halo-tag 标记技术除用于观察单个分子的定位和动力学行为以外,还可以与其它标记方法联合应用来检测和追踪不同分子间的相互作用 (Cui et al., 2019)。例如, Liu 等(2014)应用光敏定位显微镜(photoactivated localization microscopy, PALM)对 Halo-tag 标记转录因子的 Sox2 和光转化荧光蛋白 Dendra2 标记的 Pol II 分子进行共定位成像,并利用皮尔森和互相关系数等手段对图像进行分析,发现在活细胞核内转录因子 Sox2 与 Pol II 分子富集区域相互重叠,推测二者存在共定位。类似地, Cho 等(2018)在活体胚胎干细胞中也观察到 Mediator 分子 (Halo-tag 标记) 和 Pol II 分子 (Dendra2 标记) 的共定位,结果显示 90% 以上的 Mediator 分子与 Pol II 分子集群重叠,表明 Mediator 和 Pol II 分子在活体细胞核中共定位。这种利用

Halo-tag和光转化荧光蛋白Dendra2实现双标记的方法,可以清晰地重建目标蛋白互作的超分辨图像,从而更直观地获取蛋白互作的细节信息。然而,普通荧光蛋白不适合于进行高精度的超分辨率成像和精细蛋白互作的观察。总之,Halo-tag与其它标记技术的联合应用,可以检测分子间的相互作用,进而为细胞内蛋白互作研究提供参考。

基于Halo-tag标记技术,研究者开发了新的双分子荧光互补系统(bimolecular fluorescent complementary, BiFC),从而实现活体检测和追踪蛋白质之间的相互作用。具体原理为:将Halo-tag蛋白分裂成N和C端两个部分,这样单独的任何一部分均无酶活性,再将N和C端分别融合2个待测蛋白质,当2个待测蛋白质之间有相互作用时,这2个部分在空间上拉近进而形成完整且有功能的Halo-tag蛋白,这时加入荧光配基就可以检测到荧光;相反,若两者之间无相互作用,则不能检测到荧光信号。北京大学孙育杰课题组就应用该系统检测了小分子雷帕霉素介导的FKBP和FRB蛋白之间的相互作用(Shao et al., 2021)。首先将这2个蛋白分别融合到N端Halo-tag和C端Halo-tag,当加入雷帕霉素试剂时,诱导FKBP和FRB相互作用进而形成一个完整的Halo-tag标签,再加入Halo-tag配基后就可可在细胞内检测到荧光信号,进而证明雷帕霉素可诱导FKBP和FRB相互作用。上述结果表明,可以通过在合适的位置分裂Halo-tag(Split-Halo-tag),从而形成2个可以互补的片段,实现检测和追踪蛋白质之间的相互作用。

近年来,已开发出利用Halo-tag技术检测植物体内分子间相互作用与超分辨成像相结合的方法。例如,德国布伦瑞克工业大学的Robert Hänsch实验室首次将Split-Halo-tag系统应用于活体植物高精度的超分辨成像中(Minner-Meinen et al., 2021)。研究发现,连接在Halo-tag标签N端和C端的钼辅因子和肌动蛋白之间存在相互作用,并通过与普通BiFC标签相比,Halo-tag荧光配基的信噪比更佳。更重要的是该研究验证了Split-Halo-tag系统可用于超分辨率成像,填补了分裂绿色荧光蛋白(split-green fluorescent protein, Split-GFP)的空白,具有重要应用前景。

4 展望

作为一种新型分子标记方法,Halo-tag标记技术已经

在活细胞成像研究中得到了广泛应用,并在观察分子的精细定位,追踪分子的实时动态以及结合、转运和解离运动行为等方面取得了显著进展。关于Halo-tag技术的创新和延伸也在不断探索,基于Halo-tag标签的双分子荧光互补系统是其中典型的代表,其在检测分子间的相互作用方面体现出巨大的优越性。同时,Halo-tag标记作为一种多功能的分子标记系统,目前已广泛应用于生物科学的多方面研究。Halo-tag可用于定量蛋白质的表达、诱导蛋白降解、研究不同分子间的相互作用、精确检测pH值、检测疾病等临床应用以及在体外标记和成像等(Blackstock and Chen, 2014; Simpson et al., 2020; Fischer et al., 2021)。然而,目前Halo-tag标记技术在植物学领域的应用发展较缓慢,仍不断有研究者在植物体系中建立并验证该方法的实用性,可以预见其在生命科学研究中具有广阔的发展前景。

今后,应进一步加强Halo-tag与其它标记技术的结合,如与光激活荧光蛋白、量子点标记、SuperNova(Sun-tag)标记技术的联合应用,从而扩展Halo-tag标记技术在植物活细胞荧光标记研究中的作用,为推进生物体细胞结构、定位和动力学特征研究提供更多契机。同时,还应重点关注新型Halo-tag配基的研发,只有不断推陈出新,才能获得性能更加优越的配基,以促进其在分子的囊泡转运、拓扑学分析和蛋白相互作用中的应用(钱前等, 2019; 邝嘉怡等, 2021; 吴凡等, 2022),并进一步延伸和扩展到细胞器和细胞组分间相互作用的研究中。展望未来,伴随着新型Halo-tag相应配基的不断研发,该标记技术在生命科学多个领域中的应用也会越来越成熟。

参考文献

- 邝嘉怡,李洪清,沈文锦,高彩吉(2021).基于TurboID的植物蛋白邻近标记实验方法.植物学报 56, 584–593.
- 李晓娟,王钦丽,苏月,林金星(2009).量子点标记及其在植物细胞生物学中的应用.电子显微学报 28, 495–504.
- 钱虹萍,陈博,林金星,崔亚宁(2021).RNA聚合酶II动态调控及其成像技术的研究进展.生物技术通报 37, 293–302.
- 钱前,漆小泉,林荣呈,杨淑华,董爱武,左建儒,陈凡,萧浪涛,顾红雅,陈之端,白永飞,王小菁,王雷,姜里文,种康,王台(2019).2018年中国植物科学若干领域重要研究进展.植物学报 54, 405–440.

- 王锋, 高婧, 王宏达 (2014). HaloTag多功能标记系统及其在生物学中的应用. 电子显微学报 **33**, 147–155.
- 吴凡, 沈锦波, 胡帅 (2022). 植物ESCRT复合体的功能研究进展. 植物学报 **57**, 697–712.
- 夏鹏, 寒震, 姚雪彪 (2015). 超高分辨率显微技术研究进展. 生命的化学 **35**, 430–437.
- 张娇, 何勤, 武泽凯, 于斌, 屈军乐, 林丹樱 (2021). 超分辨显微成像技术在活细胞成像中的应用与发展. 生物化学与生物物理进展 **48**, 1301–1315.
- 张原, 张雪萍, 张月倩, 李晓娟 (2022). 单分子荧光检测技术的发展及其在植物生物学研究中的应用. 生物技术通报 **38**, 33–43.
- Ai X, Fischer P, Palyha OC, Wisniewski D, Hubbard B, Akinsanya K, Strack AM, Ehrhardt AG** (2012). Utilizing HaloTag technology to track the fate of PCSK9 from intracellular vs. extracellular sources. *Curr Chem Genomics* **6**, 38–47.
- Banaz N, Mäkelä J, Uphoff S** (2019). Choosing the right label for single-molecule tracking in live bacteria: side-by-side comparison of photoactivatable fluorescent protein and Halo tag dyes. *J Phys D Appl Phys* **52**, 064002.
- Benink HA, Urh M** (2015). HaloTag technology for specific and covalent labeling of fusion proteins. In: Gautier A, Hinner MJ, eds. Site-Specific Protein Labeling: Methods and Protocols. New York: Humana. pp. 119–128.
- Blackstock D, Chen W** (2014). Halo-tag mediated self-labeling of fluorescent proteins to molecular beacons for nucleic acid detection. *Chem Commun* **50**, 13735–13738.
- Bruchez M Jr, Moronne M, Gin P, Weiss S, Alivisatos AP** (1998). Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science* **281**, 2013–2016.
- Cao Y, Dong HF, Pu ST, Zhang XJ** (2018). Photoluminescent two-dimensional SiC quantum dots for cellular imaging and transport. *Nano Res* **11**, 4074–4081.
- Charubin K, Streett H, Papoutsakis ET** (2020). Development of strong anaerobic fluorescent reporters for *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium ljungdahlii* using HaloTag and SNAP-tag proteins. *Appl Environ Microbiol* **86**, e01271–20.
- Chen H, Zhou Z, Li ZY, He XJ, Shen JL** (2021). Highly sensitive fluorescent sensor based on coumarin organic dye for pyrophosphate ion turn-on biosensing in synovial fluid. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **257**, 119792.
- Cho WK, Spille JH, Hecht M, Lee C, Li C, Grube V, Cisse II** (2018). Mediator and RNA polymerase II clusters associate in transcription-dependent condensates. *Science* **361**, 412–415.
- Cui YN, Zhang X, Yu M, Zhu YF, Xing JJ, Lin JX** (2019). Techniques for detecting protein-protein interactions in living cells: principles, limitations, and recent progress. *Sci China Life Sci* **62**, 619–632.
- Deprey K, Kritzer JA** (2021). HaloTag forms an intramolecular disulfide. *Bioconjugate Chem* **32**, 964–970.
- England CG, Luo HM, Cai WB** (2015). HaloTag technology: a versatile platform for biomedical applications. *Bioconjugate Chem* **26**, 975–986.
- Erdmann RS, Baguley SW, Richens JH, Wissner RF, Xi ZQ, Allgeyer ES, Zhong S, Thompson AD, Lowe N, Butler R, Bewersdorf J, Rothman JE, St Johnston D, Schepartz A, Toomre D** (2019). Labeling strategies matter for super-resolution microscopy: a comparison between HaloTags and SNAP-tags. *Cell Chem Biol* **26**, 584–592.
- Feng SY, Sekine S, Pessino V, Li H, Leonetti MD, Huang B** (2017). Improved split fluorescent proteins for endogenous protein labeling. *Nat Commun* **8**, 370.
- Fischer S, Ward TR, Liang AD** (2021). Engineering a methathesis-catalyzing artificial metalloenzyme based on HaloTag. *ACS Catal* **11**, 6343–6347.
- Grimm JB, Brown TA, English BP, Lionnet T, Lavis LD** (2017a). Synthesis of Janelia Fluor HaloTag and SNAP-tag ligands and their use in cellular imaging experiments. In: Erfle H, ed. Super-Resolution Microscopy: Methods and Protocols. New York: Humana. pp. 179–188.
- Grimm JB, English BP, Chen JJ, Slaughter JP, Zhang ZJ, Revyakin A, Patel R, Macklin JJ, Normanno D, Singer RH, Lionnet T, Lavis LD** (2015). A general method to improve fluorophores for live-cell and single-molecule microscopy. *Nat Methods* **12**, 244–250.
- Grimm JB, English BP, Choi H, Muthusamy AK, Mehl BP, Dong P, Brown TA, Lippincott-Schwartz J, Liu Z, Lionnet T, Lavis LD** (2016). Bright photoactivatable fluorophores for single-molecule imaging. *Nat Methods* **13**, 985–988.
- Grimm JB, Muthusamy AK, Liang YJ, Brown TA, Lemon WC, Patel R, Lu RW, Macklin JJ, Keller PJ, Ji N, Lavis LD** (2017b). A general method to fine-tune fluorophores for live-cell and *in vivo* imaging. *Nat Methods* **14**, 987–994.
- Guo AY, Zhang YM, Wang L, Bai D, Xu YP, Wu WQ** (2021). Single-molecule imaging in living plant cells: a methodological review. *Int J Mol Sci* **22**, 5071.
- Halstead JM, Wilbertz JH, Wippich F, Lionnet T, Ephrussi A, Chao JA** (2016). TRICK: a single-molecule

- method for imaging the first round of translation in living cells and animals. *Methods Enzymol* **572**, 123–157.
- Hoelzel CA, Zhang X** (2020). Visualizing and manipulating biological processes by using HaloTag and SNAP-Tag technologies. *ChemBioChem* **21**, 1935–1946.
- Jing YY, Zhou LL, Chen JL, Xu HJ, Sun JY, Cai MJ, Jiang JG, Gao J, Wang HD** (2020). Quantitatively mapping the assembly pattern of EpCAM on cell membranes with peptide probes. *Anal Chem* **92**, 1865–1873.
- Kashapov RR, Bekmukhametova AM, Petrov KA, Nizameev IR, Kadirov MK, Zakharova LY** (2018). Supramolecular strategy to construct quantum dot-based sensors for detection of paraoxon. *Sens Actuators B Chem* **273**, 592–599.
- Knight SC, Xie LQ, Deng WL, Guglielmi B, Witkowsky LB, Bosanac L, Zhang ET, El Beheiry M, Masson JB, Dahan M, Liu Z, Doudna JA, Tjian R** (2015). Dynamics of CRISPR-Cas9 genome interrogation in living cells. *Science* **350**, 823–826.
- Lang C, Schulze J, Mendel RR, Hänsch R** (2006). Halo-tagTM: a new versatile reporter gene system in plant cells. *J Exp Bot* **57**, 2985–2992.
- Li CG, Tebo AG, Gautier A** (2017a). Fluorogenic labeling strategies for biological imaging. *Int J Mol Sci* **18**, 1473.
- Li K, Hou JT, Yang J, Yu XQ** (2017b). A tumor-specific and mitochondria-targeted fluorescent probe for real-time sensing of hypochlorite in living cells. *Chem Commun (Camb)* **53**, 5539–5541.
- Liu H, Dong P, Ioannou MS, Li L, Shea J, Pasolli HA, Grimm JB, Rivlin PK, Lavis LD, Koyama M, Liu Z** (2018). Visualizing long-term single-molecule dynamics *in vivo* by stochastic protein labeling. *Proc Natl Acad Sci USA* **115**, 343–348.
- Liu J, Cui ZQ** (2020). Fluorescent labeling of proteins of interest in live cells: beyond fluorescent proteins. *Bioconjugate Chem* **31**, 1587–1595.
- Liu Y, Miao K, Dunham NP, Liu HB, Fares M, Boal AK, Li XS, Zhang X** (2017). The cation- π interaction enables a Halo-tag fluorogenic probe for fast no-wash live cell imaging and gel-free protein quantification. *Biochemistry* **56**, 1585–1595.
- Liu Z, Legant WR, Chen BC, Li L, Grimm JB, Lavis LD, Betzig E, Tjian R** (2014). 3D imaging of Sox2 enhancer clusters in embryonic stem cells. *eLife* **3**, e04236.
- Locatelli-Hoops S, Sheen FC, Zoubak L, Gawrisch K, Yeliseev AA** (2013). Application of HaloTag technology to expression and purification of cannabinoid receptor CB₂. *Protein Expr Purif* **89**, 62–72.
- Los GV, Encell LP, McDougall MG, Hartzell DD, Karasina N, Zimprich C, Wood MG, Learish R, Ohana RF, Urh M, Simpson D, Mendez J, Zimmerman K, Otto P, Vidugiris G, Zhu J, Darzins A, Klaubert DH, Bulleit RF, Wood KV** (2008). HaloTag: a novel protein labeling technology for cell imaging and protein analysis. *ACS Chem Biol* **3**, 373–382.
- Minner-Meinen R, Weber JN, Albrecht A, Matis R, Behnecke M, Tietge C, Frank S, Schulze J, Buschmann H, Walla PJ, Mendel RR, Hänsch R, Kaufholdt D** (2021). Split-HaloTag imaging assay for sophisticated microscopy of protein-protein interactions in planta. *Plant Commun* **2**, 100212.
- Ovečka M, Sojka J, Tichá M, Komis G, Basheer J, Marchetti C, Šamajová O, Kuběnová L, Šamaj J** (2022). Imaging plant cells and organs with light-sheet and super-resolution microscopy. *Plant Physiol* **188**, 683–702.
- Pulsipher A, Griffin ME, Stone SE, Hsieh-Wilson LC** (2015). Long-lived engineering of glycans to direct stem cell fate. *Angew Chem Int Ed* **54**, 1466–1470.
- Rasheed T, Li CL, Zhang YL, Nabeel F, Peng JX, Qi J, Gong LD, Yu CY** (2018). Rhodamine-based multianalyte colorimetric probe with potentialities as on-site assay kit and in biological systems. *Sens Actuators B Chem* **258**, 115–124.
- Rodermund L, Coker H, Oldenkamp R, Wei GF, Bowness J, Rajkumar B, Nesterova T, Susano Pinto DM, Schermelleh L, Brockdorff N** (2021). Time-resolved structured illumination microscopy reveals key principles of Xist RNA spreading. *Science* **372**, eabe7500.
- Shao SP, Xue BX, Sun YJ** (2018). Intracellular single-molecule imaging in living cells. *Biophys J* **115**, 181–189.
- Shao SP, Zhang HC, Zeng Y, Li YL, Sun CY, Sun YJ** (2021). TagBiFC technique allows long-term single-molecule tracking of protein-protein interactions in living cells. *Commun Biol* **4**, 378.
- Shao SP, Zhang WW, Hu H, Xue BX, Qin JS, Sun CY, Sun YA, Wei WS, Sun YJ** (2016). Long-term dual-color tracking of genomic loci by modified sgRNAs of the CRISPR/Cas9 system. *Nucleic Acids Res* **44**, e86.
- Shen WW, Ma LY, Zhang X, Li XX, Zhao YY, Jing YP, Feng Y, Tan XK, Sun F, Lin JX** (2020). Three-dimensional reconstruction of *Picea wilsonii* Mast. pollen grains using automated electron microscopy. *Sci China Life Sci* **63**, 171–179.
- Simpson LM, Macartney TJ, Nardin A, Fulcher LJ, Röth**

- S, Testa A, Maniaci C, Ciulli A, Ganley IG, Sapkota GP** (2020). Inducible degradation of target proteins through a tractable affinity-directed protein missile system. *Cell Chem Biol* **27**, 1164–1180.
- Teng IT, Bu XN, Chung I** (2019). Conjugation of fab' fragments with fluorescent dyes for single-molecule tracking on live cells. *Bio Protoc* **9**, e3375.
- Verschueren KHG, Seljée F, Rozeboom HJ, Kalk KH, Dijkstra BW** (1993). Crystallographic analysis of the catalytic mechanism of haloalkane dehalogenase. *Nature* **363**, 693–698.
- Wang ZM, Detomasi TC, Chang CJ** (2021). A dual-fluorophore sensor approach for ratiometric fluorescence imaging of potassium in living cells. *Chem Sci* **12**, 1720–1729.
- Wilhelm J, Kühn S, Tarnawski M, Gotthard G, Tünnermann J, Tänzer T, Karpenko J, Mertes N, Xue L, Uhrig U, Reinstein J, Hiblot J, Johnsson K** (2021). Kinetic and structural characterization of the self-labeling protein tags HaloTag7, SNAP-tag, and CLIP-tag. *Biochemistry* **60**, 2560–2575.
- Yagi N, Yoshinari A, Iwatate RJ, Isoda R, Frommer WB, Nakamura M** (2021). Advances in synthetic fluorescent probe labeling for live-cell imaging in plants. *Plant Cell Physiol* **62**, 1259–1268.
- Yan Q, Bruchez MP** (2015). Advances in chemical labeling of proteins in living cells. *Cell Tissue Res* **360**, 179–194.
- Yazaki J, Kawashima Y, Ogawa T, Kobayashi A, Okoshi M, Watanabe T, Yoshida S, Kii I, Egami S, Amagai M, Hosoya T, Shiroguchi K, Ohara O** (2020). HaloTag-based conjugation of proteins to barcoding-oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* **48**, e8.
- Zhang X, Man Y, Zhuang XH, Shen JB, Zhang Y, Cui YN, Yu M, Xing JJ, Wang GC, Lian N, Hu ZJ, Ma LY, Shen WW, Yang SY, Xu HM, Bian JH, Jing YP, Li XJ, Li RL, Mao TL, Jiao YL, Sodmergen, Ren HY, Lin JX** (2021). Plant multiscale networks: charting plant connectivity by multi-level analysis and imaging techniques. *Sci China Life Sci* **64**, 1392–1422.
- Zhang Y, Lu YQ, El Sayyed H, Bian JH, Lin JX, Li XJ** (2022). Transcription factor dynamics in plants: insights and technologies for *in vivo* imaging. *Plant Physiol* **189**, 23–36.

Halo-tag Labeling Technology and It's Application in Plant Living Cell Imaging

Hongping Qian^{1, 2, 3, 4}, Pengyun Luo^{1, 2, 3, 4}, Shuai Liu⁵, Changwen Xu^{1, 2, 3, 4}, Jinhuan Yin^{1, 2, 3, 4}, Yaning Cui^{1, 2, 3, 4*}, Jinxing Lin^{1, 2, 3, 4*}

¹Forest Tree Breeding and Ecological Restoration, National Engineering Research Center, Beijing 100083, China; ²Key Laboratory of Genetics and Breeding in Forest Trees and Ornamental Plants, Ministry of Education, Beijing 100083, China
³The Tree and Ornamental Plant Breeding and Biotechnology Laboratory of National Forestry and Grassland Administration, Beijing 100083, China; ⁴College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; ⁵State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China

Abstract The cell is the basic structural and functional unit of living organisms, its complex internal organizational structure, interaction and process dynamics determine the life form and life process of the entire organism. The study of cell structure and function in the living state is of great significance for exploring and grasping the essence of life. With the continuous advances in science and technology, a series of new live cell labeling technologies have been innovated. In recent years, the Halo-tag labeling technology has gradually been developed into a widely used new molecular labeling technology, playing an increasingly important role in the field of living cell imaging analysis and tracking research. It has been gradually applied in plant cell imaging. In this review, we focus on the definition, classification and development process of Halo-tag technology, and introduce the reaction mechanism of the dehydrohalogenation of Halo-tag labeling technology and the types of fluorescent ligands in detail. Finally, we introduce the latest progress of this technology in the application of living cell imaging in plants is emphatically expounded from three aspects: observing the fine localization of molecules, tracking the real-time motion of molecules and detecting the interactions between molecules. Taken together, this study provides theoretical foundation and technical support for the potential application of the subsequent Halo-tag labeling technology in plants.

Key words new labeling technology, Halo-tag label, Halo-tag ligand, living cell imaging

Qian HP, Luo PY, Liu S, Xu CW, Yin JH, Cui YN, Lin JX (2023). Halo-tag labeling technology and it's application in plant living cell imaging. *Chin Bull Bot* **58**, 475–485.

* Authors for correspondence. E-mail: cuiyaning@bjfu.edu.cn; linjx@bjfu.edu.cn

(责任编辑: 朱亚娜)