

光敏蛋白选择指南

光遗传学技术的关键步骤

需要寻找合适的光敏蛋白：

例如起兴奋神经元作用的 Channelrhodopsin-2 (ChR2)，起抑制神经元作用的 Halorhodopsin (NpHR) 和 Archaeorhodopsin (Arch) 等，这类蛋白质具有天然的光敏性，或经过修饰后具有光敏性。

将遗传信息传递给靶细胞：

一般通过病毒转导、转染、转基因动物等方式将光敏蛋白的遗传信息传递给靶细胞。

可控性演示：

即通过导入光纤、控制激光来实现对神经元活动的精确控制。

实验方法的有效性验证：

一般采用电极记录神经元细胞膜内外电压变化，以此来验证光遗传的有效性。

表型检测：

通过行为学测试来评估神经元活动对动物行为的影响。

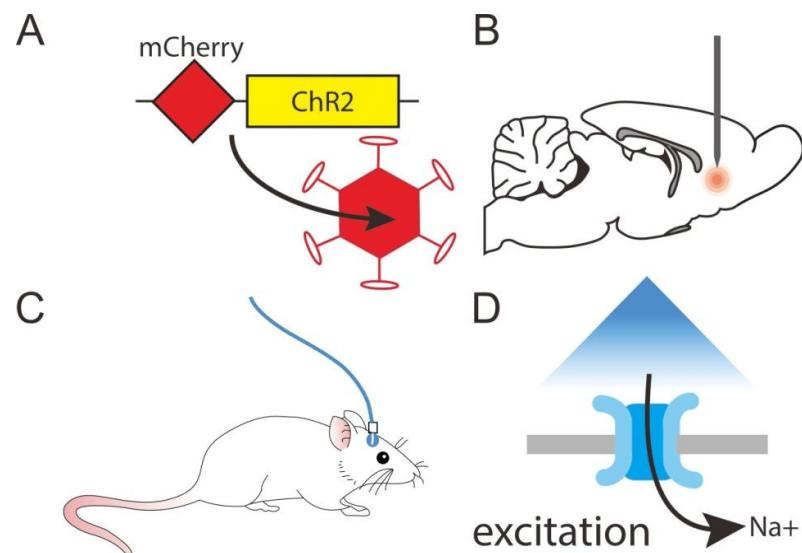


图 1 光遗传学实验基本步骤（以 ChR2 为例）

几种激活神经元的通道蛋白

ChR2(H134R)

ChR2 的突变体，将第 134 个氨基酸由组胺酸突变为精胺酸，该蛋白质可以产生两倍的光电流，但通道开关速度也比野生的 ChR2 慢了一倍。

ChR2(C128S/D156A)

ChR2 的突变体，超灵敏光敏感通道，用蓝色激光打开通道，然后用绿色或黄色激光关闭通道，可以打开其离子通道长达 30 分钟。

ChR2(E123T/T159C)

ChR2 的突变体，更大的光电流和更快的动力学变化。

ChETA

ChR2 的突变体，使得神经元在激光刺激下可以发放 200Hz 的 spike，而其他的 ChR2 通道蛋白只能达到 40Hz。

C1V1

由 ChR1 及由团藻发现的 VChR1 组合在一起的通道蛋白，在红色激光刺激下打开通道。

几种抑制神经元活动的通道蛋白

NpHR

即 Halorhodopsin，第一个有效抑制神经元活动的光遗传学工具，在黄绿激光照射下会将氯离子打进神经元内，而抑制神经元活动。当把 NpHR 表达在哺乳动物脑内时，会聚集在内质网上，而如果将内质网输出元件加在 NpHR 基因序列后面，这样可以使得 NpHR 在胞内高量表达，而且不会聚集在内质网上，这样修改过的 NpHR 被称为 eNpHR2.0。但是 eNpHR2.0 在细胞膜的聚集仍然不够，而将一个高尔基体输出元件和来自于钾离子通道 Kir2.1 的上膜元件加在 eNpHR2.0 基因序列后面，这样就能实现在神经元细胞膜上的高量聚集，这样修改过的 NpHR 被称为 eNpHR3.0。

Arch

即 archaerhodopsin，是一种黄色激光激活的外向整流质子泵，能够将带正电的质子从神经元内移动到细胞外环境中，使神经元处于超极化状态，从而保证神经元处于静息状态。在特定条件下，可用于增加细胞内 pH 或减少细胞外基质 pH。和 NpHR 相比，当激光关闭的时候，Arch 立即从通道打开状态恢复到关闭状态。

Mac

即 Leptosphaeria maculans fungal opsins，蓝色激光激活的质子泵，能够将带正电的质子从神经元内移动到细胞外环境中，使神经元保持超极化状态，从而保证神经元处于静息状态。

常见光敏通道蛋白及特点，见下表：

名称	类别	说明
hChR2(H134R)	光激活	使用最普遍的 ChR2，激发波长 470 nm
hChR2(E123T/T159C)	光激活	hChR2(E123T/T159C)即 ChETA(TC)是突变的 ChR2，适合高频激活，激活波长 470 nm
oChIEF(E163A/T199C)	光激活	CHIEF 是 ChR1 和 ChR2 的杂合体，可用于高频刺激，激活波长 470 nm
C1V1 (t/t)	光激活	C1V1 (t/t)由 ChR1 和 VChR1(ChR 的突变体)组成的杂合体，激发光波长 560 nm
hChR2(C128S/D156A)	光激活	激活状态的显著稳定性，即使在 30 分钟后也几乎没有检测到返回到黑暗状态，蓝光激活
ChETA	光激活	E123T 突变；产生更快的动力学，但降低光电流振幅，激发光波长 490 nm
CheRiff	光激活	激发光波长 460 nm，改进的光灵敏度、动力学和光谱正交性
ChrimsonR	光激活	天然存在的 CnChR1(Chrimson)的 K176R 点突变，激发波长 590 nm
Chronos	光激活	天然存在的 ShChR(Chronos)，激发波长 530 nm
eNpHR3.0	光抑制	eNpHR3.0 是第三代光驱动内向氯泵，属于 halorhodopsin 家族，NpHR 的光活化光谱为 525~650nm(中心波长为 578nm)；
Arch/ArchT	光抑制	Arch 是来自红皮嗜盐菌 Halorubrum sodomense, ArchT 来自红皮嗜盐菌 Halorubrum strain TP009，都是黄光激活的外向氢离子泵，属于 bacteriorhodopsin 家族，激发波长主要在 566nm，Arch3.0 和 ArchT3.0 是经过基因改造的第三代产品，激发波长不变，改善了光敏感工具的细胞膜定位和均匀分布；
QuasAr2	光抑制	激发光波长 640 nm，提高亮度和电压灵敏度，微秒响应时间，并且不产生光电流。
SwiChRca	光抑制	C1C2 嵌合体突变 C128A(SwiChRCA)可以减缓通道的关闭，被单次蓝光持续激活氯离子通道，使细胞持续保持抑制状态，并在红光照射后关闭氯离子通道，激发光波长 475 nm

ReaChR	红移光激活	ReaChR 由 ChEF/ChIEF,VChR1,VChR2 外加 L171I 突变组成, 激发波长 590-630 nm
Jaws	红移光抑制	Jaws 是经过改造红移的氯离子泵, 来自 Haloarcula (Halobacterium) salinarum (strain Shark), 属于 cruxhalordoposin 家族, 最大的特点是在 632 nm 光照下, 引起的超极化电流比 eHphR3.0 或者 ArchT 显著大,主要应用在使用红外激光抑制目标位点, 甚至可以使用非侵入式给光方式抑制 Jaws 感染的位点
