

慢病毒介导 MCF-7 细胞中 FOXP2 基因沉默体系的建立*

谭拥军[†], 郭明月, 向勤, 李谕

(湖南大学 生物学院, 湖南 长沙 410082)

摘要:为了实现 FOXP2 基因在 MCF-7 细胞中稳定低表达,采用基因工程的方法构建 pMAGic7.1-shFOXP2 慢病毒干扰载体,并将其与辅助质粒共转染 HEK293T 细胞,包装 shFOXP2 干扰慢病毒,收取病毒上清加入到 MCF-7 细胞中,培养 48 h,荧光定量 PCR 检测 FOXP2 的基因 mRNA 表达水平,Western Blotting 检测 FOXP2 蛋白表达水平.获得了 pMAGic7.1-shFOXP2 干扰载体,从而成功建立 FOXP2 基因稳定干扰的 MCF-7 细胞株,为进一步研究 FOXP2 在乳腺癌发生发展中的功能提供了研究材料.

关键词:FOXP2;慢病毒载体;RNA 干扰;乳腺癌 MCF-7 细胞

中图分类号:U44

文献标志码:A

Construction of FOXP2 Gene Silencing System in MCF-7 Cells by Lentivirus Infection

TAN Yongjun[†], GUO Mingyue, XIANG Qin, LI Yu

(College of Biology, Hunan University, Changsha 410082, China)

Abstract: In order to establish a MCF-7 cell line with lentivirus-mediated FOXP2 gene silencing and confirm its interference effect, the lentiviral vector (pMAGic7.1-shFOXP2) was constructed by genetic engineering and cotransfected with pVSVG、 $\Delta 8.91$ into HEK293T cells, which generated the mature lentivirus, viral supernatant was collected and added to MCF-7 cells after 48 h, the mRNA and protein levels of FOXP2 were examined by qPCR and Western blot. Thus, we constructed and identified the lentiviral recombinant vector pMAGic7.1-FOXP2, successfully established a MCF-7 cell line with the interference of FOXP2 expression, as these findings imply a promising strategy for studying FOXP2 functions in breast cancer progression.

Key words: the forkhead box p2; lentivirus vector; RNA interference; breast cancer MCF-7 cells

FOXP2 基因位于 7 号染色体短臂 31 区域,属于 FOX 转录家族.叉头框蛋白(forkhead box)家族是一类具有广泛功能的转录因子家族,它的 DNA 结合区是一个特殊的翼状结构,即螺旋-转角-螺旋蛋白结构,并且在生物进化中高度保守,此结构由

100 个氨基酸组成,包含 3 个 α 螺旋、3 个 β 折叠以及 2 个大环结构^[1]. FOXP2 蛋白包含一个谷氨酸富集区、一个 FOX 叉头框 DNA 结合区和一个由 50 个氨基酸组成的高度保守的 N 端,在 N 端能够形成锌指或亮氨酸拉链结构,这种结构是 FOXP2 与

* 收稿日期:2017-09-24

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81472718),National Natural Science Foundation of China(81472718)

作者简介:谭拥军(1967-),男,湖南长沙人,湖南大学教授,博士生导师

[†] 通讯联系人, E-mail: yjtan@hnu.edu.cn

FOXP1 和 FOXP4 相互作用形成同源二聚化与异源二聚化所必需的^[2-3]. FOXP2 转录后可剪切形成 18 种转录本, 经过生物信息学和蛋白结构分析, 预测出 FOXP2 下游靶基因结合基序 5'-CAAATT-3'^[4]. FOXP2 主要在胚胎发育、细胞分化和肿瘤的上皮间质转化过程中发挥着重要的功能.

FOXP2(forkhead box p2)最早发现与控制语言能力发展相关, 通过研究发现, FOXP2 第 553 位的精氨酸突变为组氨酸(R553H)能够引发严峻的先天性语言障碍疾病, 并且 FOXP2 的缺失或者突变可能引发语言障碍及运动神经元系统紊乱^[5-6]. 除此之外 FOXP2 在多种肿瘤细胞中表达与肿瘤的 EMT 发生发展有密切的关系, 大量研究数据已经表明在骨肉瘤^[7-9]、肝癌^[10-12]、胃癌^[13-14]可以抑制肿瘤转移的发生发展. Dung-Tsa^[15]等发现 FOXP2 基因及蛋白存在于人的正常组织和乳腺癌组织中, 并在具有侵袭性的乳腺中的表达被抑制, 但对于 FOXP2 如何调控乳腺癌发生发展的机制研究尚不清楚. 因此, 研究乳腺癌细胞中 FOXP2 转录因子调节 EMT 相关基因的分子机制, 对认识乳腺癌细胞的转移并确认抑制靶点具有重大价值.

对于细胞转染有多种方法, 包括脂质体转染、磷酸钙转染、腺病毒感染和慢病毒感染, 相比其它转染方法而言, 脂质体转染和磷酸钙转染最为常见, 但其转染效率会因细胞种类的不同而有所差异, 并且脂质体的成本较高. 生物实验中所用到的慢病毒载体大部分是以 HIV 为基础、人为改造的基因治疗载体, 它的感染能力与细胞种类关系不大, 感染的时候对细胞所处的生长时期没有特别的要求. 只需要将目的基因片段连接到慢病毒载体中, 目的基因会随着病毒基因的复制而复制, 包装成新的病毒感染宿主细胞, 被整合到宿主细胞的基因组上. 由于辅助质粒不能被包裹于新的病毒内, 所以病毒包装完成后, 只具有感染细胞的能力, 而不能在宿主细胞内再次

形成新病毒, 不会使宿主细胞裂解死亡, 提高了生物安全性, 大大节约成本^[16-17].

本文应用慢病毒的方法构建了 FOXP2 基因沉默的 MCF-7 稳定表达细胞株, 为以后乳腺癌的临床治疗提供良好的素材和工具.

1 材料和方法

1.1 细胞和材料

HEK293T 细胞、乳腺癌 MCF-7 细胞本实验室储存; DH5 α 感受态细胞购于 takara 公司; 慢病毒载体 pMAGic7.1、pVSVG、 Δ 8.91 均来自于上海生博医学生物工程科技有限公司.

1.2 主要试剂和仪器

1Kb DNA Ladder marker、marker2 均购自于广东东盛科技公司; 双色蛋白预染蛋白 marker 购自生工生物工程上海有限公司; 蛋白核酸分析仪来自于 Eppendorf 公司; 胰酶、DMEM 培养基来自于 GIBCO 公司; FBS 购自 Hyclone 公司; PVDF 购自 Millipore 公司; PBS 购自北京鼎国公司; 过硫酸铵 (APS)、十二烷基磺酸钠 (SDS) 购自 Sigma 公司; FOXP2 抗体购自 cell signaling technology (CST) 公司; Rabbit 二抗购自 GE 公司.

1.3 方法

1.3.1 细胞培养

HEK 293T 细胞和 MCF-7 细胞均用含 10% 的 FBS 和 1% 双抗 (含 100 mg/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素) 的 DMEM 完全培养基进行培养, 放置在 37 °C、5% 浓度 CO₂、90% 相对湿度的细胞培养箱中进行培养, 等细胞达到平台期后进行传代, 当 HEK293T 细胞密度达到 80% 可以进行磷酸钙转染.

1.3.2 干扰序列的获取

查询文献^[12]获得 FOXP2 干扰序列, 如表 1.

表 1 引物序列
Tab.1 Primer sequences

名称	引物序列(5'-3')
shControl	F5'-CCGGAACACCGTTTCGAGACACGACTCAAGAGATCGTGCTCGAACGGTGTTTTTTTTG R5'-AATTCAAAAAAAAAACACCGTTCGAGACACGATCTCTTGAGTCGTGTCTCGAACGGTGT
shFOXP2 #2	F5'-CCGGAACCTTGAAGAATGCAGTACTCAAGAGATACTGCATTCTTCCAAGTTTTTTTTTG R5'-AATTCAAAAAAAAAACTTGAAGAATGCAGTATCTCTTGAGTACTGCATTCTTCCAAGTT
shFOXP2 #4	F5'-CCGGAGCAAACAAGTGGATTGAACTCAAGAGATTCAATCCACTTGTGTTGCTTTTTTTTG R5'-AATTCAAAAAAAAAAGCAAACAAGTGGATTGAACTCTCTTGAGTTCAATCCACTTGTGTTGCT

5' 通用引物 5' - AGCGGATCTGACGGT-TCACT-3, 均在生工生物公司进行合成.

1.3.3 pMAGic7.1-shFOXP2 慢病毒载体的构建
将合成的干扰序列用 1 \times TE buffer 溶解成 20 μ M, 互补的单链各取 30 μ l 混合, 混合后的产物放

入水浴锅中 95 °C 加热 5 min, 然后将水浴锅关闭, 开盖, 在室内自然冷却, 使干扰序列互补配对形成双链, 取 1 μ l 做后面连接使用, 剩余的一 20 °C 储存. 经 AgeI/EcoRI 双酶切后对线性化的载体 pMAGic 进行胶回收, 获取酶切产物, 取退火后双链 DNA 序列 1 μ l, 2.5 μ l 酶切后的干扰载体, 10 \times T4 DNA ligase buffer 2 μ l, T4 DNA ligase 1 μ l, ddH₂O 13.5 μ l, 21 °C 连接 40 min. 将 2 μ l 酶连产物加入到 20 μ l 的感受态细胞中, 冰上静置 30 min, 再将 EP 管迅速放入 42 °C 水浴锅中热激 90 s, 冰上冷却 2 min, 然后加入 500 μ l LB 培养基, 放入摇 37 °C, 220 r/min 活化细菌 1 h, 此后吸取适量的细菌转化液进行涂板(含有 Amp 的 LB 固体培养板), 在 37 °C 细菌培养箱中倒置培养 12~16 h.

1.3.4 shFOXP2 慢病毒载体的鉴定

每个培养板分别挑取 4 个单克隆菌落进行菌落 PCR 鉴定, 5' 通用引物 5' - AGCGGATCTGACG-GTTC ACT - 3, 3' 引物分别为 Control 3' AAT-TCAAAAAAAAAACACCGTTCGAGACACGATCTCTTGAGTCGTGTCTCGAACGGTGTT; shFOXP2 # 2 3' AATTCAAAAAAACTTG-GAAGAATGCAGTATCTCTTGAGTACTGCAT TCTTCCAAGTT; shFOXP2 # 4 3' AAT-TCAAAAAAAGCAAACAAGTGGATTGAATC TCTTGAGTTCAATCCACTTGTTTGCT; 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测菌落 PCR 扩增后的产物, 选取阳性克隆送入生工生物公司进行测序鉴定.

1.3.5 磷酸钙转染与 shControl、shFOXP2 慢病毒的包装和感染

当 HEK293T 的细胞密度达到 80% 左右, 就可以进行转染实验, 需加样体系如下 pMAGic-Control、pMAGic7.1-shFOXP2 # 2 和 pMAGic7.1-shFOXP2 # 4 质粒各 12 μ g, 分别加入 pVSVG 质粒 6 μ g, Δ 8.91 质粒 9 μ g, 2M CaCl₂ 132 μ l, 补水至 1 ml; 2 \times HBS 1 ml; 将上述物质进行混合, 吹打 70~100 次, 直到出现乳白色, 在室温静置 20 min 后缓慢加入 293T 细胞中, 8 h 后进行细胞换液, 换液前用 1 \times PBS 洗一遍, 然后加入含有 10% FBS 的 DMEM 新鲜培养基. 钙转 48 h 和 96 h 后分别收取培养皿中的培养基, 用 0.45 μ m 的过滤头进行过滤, 去除细胞碎片, 获得慢病毒溶液. 选取生长状态良好的 MCF-7 细胞, 将对照病毒和 shFOXP2 慢病

毒加入其中进行感染, 培养 48 h 后换取新鲜培养基, 观察感染效果, 进行扩大培养.

1.3.6 MCF-7 中 shFOXP2 干扰效果的鉴定

获取 MCF-7 细胞, 1 \times PBS 洗两遍, 刮取细胞进入 2 ml EP 管中, 4 °C 离心 1 000 r/min, 5 min, 加入合适体积的 RIPA 裂解液, 按 1:100 的比例加入蛋白酶抑制剂, 冰上放置 1 h, 再 12 000 r/min, 4 °C 离心, 15 min, 上清即为所需的蛋白溶液, 用蛋白核酸分析仪测量蛋白浓度, 此后用 Western Blotting 实验进行检测.

2 结果

2.1 pMAGic7.1-control、pMAGic7.1-shFOXP2 # 2 和 4 慢病毒干扰载体的构建和鉴定

插入干扰序列的片段较短, 酶切结果不明显, 我们根据 pMAGic7.1 载体的基因序列, 在 5' 端位置设计引物, 预测 PCR 结果为 700 bp 大小. 首先挑选 12 个单菌落, 进行菌落 PCR 后经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 结果见图 1, 除了 11 号其余长度大小均为 700 bp, 无杂带, 从每组干扰转化菌液中分别挑取两对送去生工生物公司进行测序, 经对比测序结果表明目的基因已成功插入慢病毒载体.

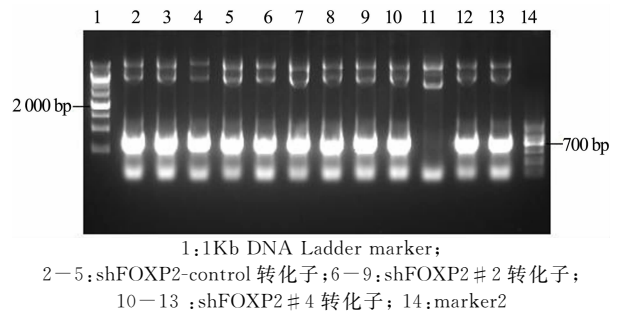


图 1 pMAGic7.1-control 和 pMAGic7.1-shFOXP2 载体菌落 PCR 的鉴定
Fig. 1 Identification of pMAGic7.1-control and pMAGic7.1-shFOXP2 vector by colony PCR

2.2 慢病毒载体的包装和感染

在慢病毒包装和转染之前, 首先观察 HEK293T(图 2A)和 MCF-7(图 2B)的细胞形态和生长状态. 选取生长密度约 80% 左右的 HEK293T 细胞, 再将 pMAGic7.1-control、pMAGic7.1-shFOXP2 # 2 和 4 载体分别和辅助质粒 pVSVG 和 Δ 8.91 共同转染 HEK293T 细胞, 48 h 后在荧光倒置显微镜下观察发现有绿色荧光, 见图 3, 说明所构

建的质粒转染成功并正常表达. 选取生长状态良好的 MCF-7 细胞,细胞形态如图 2B,将上述慢病毒溶液用 0.45 μm 的过滤头进行过滤,除去细胞碎片,分别感染正常的 MCF-7 细胞,培养 48h 后换取新鲜的培养基,并在显微镜下观察有绿色荧光的出现,见图 4,说明慢病毒感染成功.

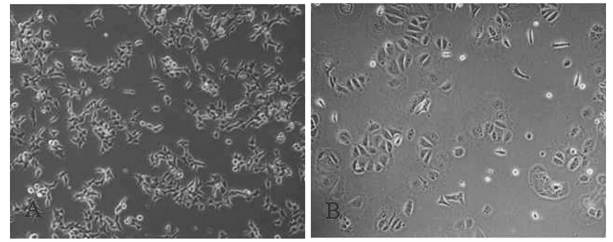
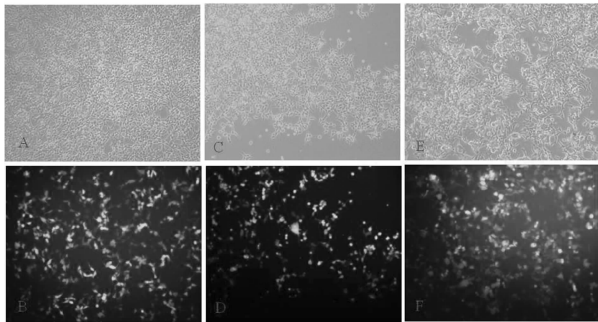


图 2 HEK293T 和 MCF-7 的细胞形态
Fig. 2 The cellular morphology of HEK293 and MCF-7

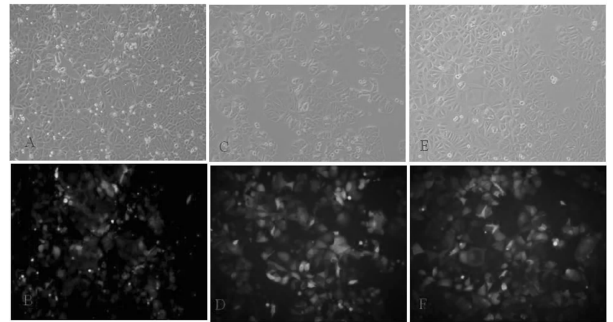


A: pMAGic7.1-control 白光;
B: pMAGic7.1-control 绿色荧光
C: pMAGic7.1-shFOXP2 #2 白光;
D: pMAGic7.1-shFOXP2 #2 绿色荧光;
E: pMAGic7.1-shFOXP2 #4 白光;
F: pMAGic7.1-shFOXP2 #4 绿色荧光

图 3 pMAGic7.1-control and shFOXP2

载体转染 293T 细胞的荧光显微镜观察($\times 100$)

Fig. 3 Fluorescent microscopy of 293T cells transfected with pMAGic7.1-control and shFOXP2 vector($\times 100$)



A: pMAGic7.1-control 白光;
B: pMAGic7.1-control 绿色荧光
C: pMAGic7.1-shFOXP2 #2 白光;
D: pMAGic7.1-shFOXP2 #2 绿色荧光;
E: pMAGic7.1-shFOXP2 #4 白光;
F: pMAGic7.1-shFOXP2 #4 绿色荧光

图 4 pMAGic7.1-control 和 pMAGic7.1-shFOXP2 病毒感染 MCF-7 细胞的荧光显微镜观察($\times 100$)

Fig. 4 Fluorescent microscopy of MCF-7 cells infected with pMAGic7.1-control and pMAGic7.1-shFOXP2 Virus($\times 100$)

2.3 shFOXP2 慢病毒干扰载体表达产物的鉴定

收集上面三种 MCF-7 细胞株进行 qPCR 分析和 Western blot 检测,见图 5,结果表明,FOXP2 基

因在 mRNA 水平较对照组显著下降,在蛋白表达水平发现 FOXP2 的表达也有明显下降,由此说明我们已成功得到了低表达 FOXP2 的 MCF-7 细胞株.

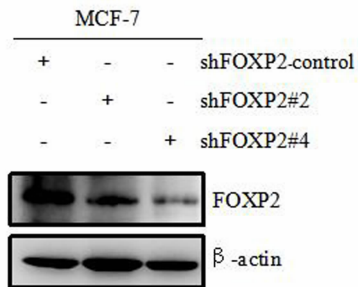
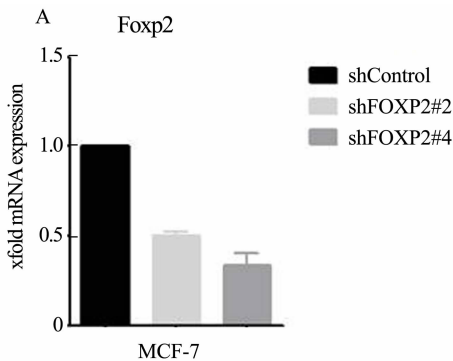


图 5 干扰 FOXP2 后定量 PCR 分析和 Western blot 检测

Fig. 5 The mRNA and protein level of FOXP2 were examined by qPCR and Western blot

3 讨论

目前,在基因治疗方面慢病毒的应用比较广泛,它相对于腺病毒而言,无论细胞是否处在分裂期都

对其具有感染能力^[18-19],对一些不分化的细胞、干细胞和癌细胞与脂质体转染相比可以大大提高转染效率,节约成本.普通质粒介导的 shRNA 持续时间比较短,不能整合到宿主的基因组中,不利于后续实验的进行,本实验运用目的载体和辅助质粒共同转

染形成完整的病毒,此病毒在成功感染宿主细胞后,就会丧失感染其他的细胞的能力,促使目的基因在宿主细胞中能够稳定表达。Pfeifer 等^[20]利用慢病毒与 RNAi 相结合的技术,将 shRNA 导入小鼠的受精卵中,获得特定基因敲出的转基因小鼠,应用于某种基因的功能性研究。

绿色荧光蛋白(GFP)最早是由下村修等人于1962年在水母中发现的,分子量为26 KD,含有238个氨基酸^[21-22],其基因所表达的蛋白质,在蓝色波长范围的激发下,发出绿色荧光,可与目的基因构于同一表达载体,在细胞内进行合成时无需复杂的翻译修饰就能成功表达。慢病毒干扰载体中的 GFP 基因在细胞中能够随着目的基因的表达而稳定表达,易于在荧光显微镜下观察,并且不影响目的基因的表达和功能,可以作为一种标记基因,示踪肿瘤细胞中某种基因的位置及量的变化,Hoffman^[23]曾经利用 GFP 导入肿瘤细胞建立多种动物移植瘤模型,可以动态、直观的观察药物对肿瘤的影响,为药物评价和肿瘤基础治疗提供良好的肿瘤模型。本文中通过建立 FOXP2 基因沉默稳定表达细胞株,使此细胞株在药物筛选和肿瘤转移示踪中发挥重要作用,为探讨 FOXP2 基因沉默后对肿瘤发生发展的分子机制提供理论基础,因此,利用稳定的 MCF-7 细胞株进行小动物活体实验,并通过小动物成像系统持续、直观的观察乳腺癌的生长和转移情况,为乳腺癌后期的个体化治疗提供更为科学的依据和精确的预后评估。

综上所述,我们运用基因工程的方法成功构建了 FOXP2 基因沉默的慢病毒质粒 pMAGic7.1-shFOXP2,并将其分别与辅助质粒 pVSVG 和 $\Delta 8.91$ 共转染 HEK293T 细胞,取病毒上清成功感染了 MCF-7 细胞株,成功获得了能稳定干扰 FOXP2 表达的乳腺癌 MCF-7 细胞株,为后期研究 FOXP2 在乳腺癌发生发展中的功能提供了很好的研究材料。

参考文献

[1] GAJIWALA K S, BURLEY S K. Winged helix proteins[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2000, 10(1):110-116.

[2] 谭拥军, 陈含笑. 转录因子 FOXM1 剪接异构体在乳腺癌 EMT 过程中的初步研究 [J]. *湖南大学学报(自然科学版)*, 2015, 42(12):100-106.

TAN Y J, CHEN H X. A preliminary study of transcription factor FOXM1 isoforms in breast cancer EMT process[J]. *Journal of Hunan University (Natural Sciences)*, 2015, 42(12):100-106. (In Chinese)

[3] LI S, WEIDENFELD J, MORRISEY E E. Transcriptional and DNA binding activity of the Foxp1/2/4 family is modulated by heterotypic and homotypic protein interactions [J]. *Molecular & Cellular Biology*, 2004, 24(2):809-822.

[4] STROUD J C, WU Y, BATES D L, *et al.* Structure of the forkhead domain of FOXP2 bound to DNA [J]. *Structure*, 2006, 14(1):159.

[5] TOLOSA A, SANJUÁN J, DAGNALL A M, *et al.* FOXP2, gene

and language impairment in schizophrenia: association and epigenetic studies [J]. *BMC Medical Genetics*, 2010, 11(1):1-8.

[6] LAI C, FISHER S J, LEVY E, *et al.* The SPCH1 region on human 7q31: genomic characterization of the critical interval and localization of translocations associated with speech and language disorder [J]. *American Journal of Human Genetics*, 2000, 67(2):357-368.

[7] LIU S, BISHOP W R, LIU M. Differential effects of cell cycle regulatory protein p21(WAF1/Cip1) on apoptosis and sensitivity to cancer chemotherapy [J]. *Drug Resist Updat*, 2003, 6(4):183-195.

[8] KOLI K, WEMPE F, STERNER-KOCK A, *et al.* Disruption of LTBP-4 function reduces TGF-beta activation and enhances BMP-4 signaling in the lung [J]. *Journal of Cell Biology*, 2004, 167(1):123.

[9] GASCOYNE D M, SPEARMAN H, LYNE L, *et al.* The forkhead transcription factor FOXP2 is required for regulation of p21WAF1/CIP1 in 143B osteosarcoma cell growth arrest [J]. *Plos One*, 2015, 10(6):e0128513.

[10] ZHANG Y, ZHANG S, WANG X, *et al.* Prognostic significance of FOXP1 as an oncogene in hepatocellular carcinoma [J]. *Journal of Clinical Pathology*, 2012, 65(6):528.

[11] SCHRADER J, GORDONWALKER T T, AUCOTT R L, *et al.* Matrix stiffness modulates proliferation, chemotherapeutic response and dormancy in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Hepatology*, 2011, 53(4):1192-1205.

[12] XIA Y, ZHOU H, ZHANG T, *et al.* Down regulation of FOXP2 promoter human hepatocellular carcinoma cell invasion [J]. *Tumor Biology*, 2015, 36(12):9611-9619.

[13] URA S, HONDA M, YAMASHITA T, *et al.* Differential microRNA expression between hepatitis B and hepatitis C leading disease progression to hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2009, 49(4):1098-1112.

[14] SUNG J J, CHONG W S, JIN H, *et al.* Differential expression of MicroRNAs in plasma of colorectal cancer patients: A potential marker for colorectal cancer screening [J]. *Gastroenterology*, 2009, 136(5):A-165-A-165.

[15] CHEN D T, NASIR A, CULHANE A, *et al.* Proliferative genes dominate malignancy-risk gene signature in histologically-normal breast tissue [J]. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2010, 119(2):335-346.

[16] 程联胜, 查昭, 席甲甲, 等. 慢病毒介导的 RNA 干扰对乳腺癌 SK-BR3 细胞 HER2 受体的下调及生长抑制 [J]. *中国生物工程杂志*, 2007, 27(2):1-8.

CHENG L S, CHA Z, XI J J, *et al.* Lentivirus-mediated RNA interference down-regulates and inhibits HER2 receptor in breast cancer SK-BR3 cells[J]. *Chinese Engineering Magazine*, 2007, 27(2):1-8. (In Chinese)

[17] TARAPORE R S, YANG Y, KATZ J P. Restoring KLF5 in esophageal squamous cell cancer cells activates the JNK pathway leading to apoptosis and reduced cell survival [J]. *Neoplasia*, 2013, 15(5):472-480.

[18] SUMIMOTO H, KAWAKAMI Y. Lentiviral vector-mediated RNAi and its use for cancer research [J]. *Future Oncology*, 2007, 3(6):655-664.

[19] 谭拥军, 谢骊, 杨潮, 等. 表达大鼠 FoxA1 的慢病毒制备和鉴定 [J]. *湖南大学学报(自然科学版)*, 2012, 39(3):58-61.

TAN Y J, XIE L, YANG C, *et al.* Preparation and identification of lentivirus expressing rat FOXA1 [J]. *Journal of Hunan University (Natural Sciences)*, 2012, 39(3):58-61. (In Chinese)

[20] NAKAGAWA T, HOOGENRAAD C C. Lentiviral transgenesis transgenic mouse methods and protocols [J]. *Humana Press*, 2011:117-142.

[21] NIEDENTHAL R K, RILES L, JOHNSTON M, *et al.* Green fluorescent protein as a marker for gene expression and subcellular localization in budding yeast [J]. *Yeast*, 1996, 12(8):773-786.

[22] KITAMURA A, NAKAYAMA Y, KINJO M. Efficient and dynamic nuclear localization of green fluorescent protein via RNA binding [J]. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 2015, 463(3):401-406.

[23] HOFFMAN R M. Fluorescent proteins as visible in vivo sensors [J]. *Progress in Molecular Biology & Translational Science*, 2013, 113:389-402.