



基于 light-oxygen-voltage(LOV) 结构域 光敏剂的细胞毒性研究

许爽* 万奔* 沙娜 赵开弘**

(华中农业大学农业微生物资源发掘与利用实验室, 武汉 430070)

摘要 目的 光敏剂被特定波长的光激发后, 产生的活性氧类能破坏细胞组织, 介导细胞死亡, 对微生物感染、肿瘤等相关疾病的治疗具有重要意义。方法 基于梗稻类向光素 1B (*Oryza sativa japonica* phototropin-1B-like) 的 LOV (light-oxygen-voltage) 结构域, 设计得到光敏剂 LovPSO2 及其突变体 LovPRO2。在 445 nm、70 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 蓝光照射下, 每隔 2 min 测量 LovPSO2 和 LovPRO2 的单线态氧产量, 持续 10 min, 每隔 1 min 测量其超氧阴离子产量, 持续 5 min, 并研究温度、光照对其稳定性的影响, 最后将其转入 *E. coli* BL21 (DE3) 和 HeLa 细胞中表达并分析光毒性效果。结果 在 445 nm、70 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 蓝光照射下, LovPSO2 是一种能产生大量单线态氧的 II 型光敏剂 ($\Phi_{\Delta}=0.61$), LovPRO2 是一种能够同时产生单线态氧和超氧阴离子的光敏剂。蛋白质稳定性分析结果表明, LovPSO2 和 LovPRO2 具有较好的温度稳定性, 其中 LovPRO2 的光稳定性更好。蛋白质的光毒性分析结果表明, 445 nm、30 mW/cm² 蓝光照射 30 min 后, LovPSO2 和 LovPRO2 对 *E. coli* BL21 (DE3) 菌株有较好的光毒性, 致死率高达 90%。结论 LovPSO2 和 LovPRO2 可作为抗菌光敏剂, 在食品和医疗等方面均有较为广阔的应用前景。

关键词 光敏剂, 活性氧类, 单线态氧, 超氧阴离子

中图分类号 Q63

DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0175

CSTR: 32369.14.pibb.20240175

光动力治疗 (photodynamic therapy, PDT) 是在光敏剂、特定波长的光和氧气的协同作用下, 对目标组织进行选择性地破坏^[1], 是一种很有前途的治疗微生物感染的方法。在 PDT 中, 光敏剂被特定波长的光激发后, 从基态转变为单线态激发态, 这种单线态激发态非常不稳定, 可以通过光发射 (荧光) 或热产生 (内部转换) 衰变回基态, 也可以通过系间跃迁至三线态激发态。处于三线态激发态的光敏剂可以产生具有细胞毒性的活性氧类 (reactive oxygen species, ROS), 根据作用原理可将其划分为通过电荷转移反应产生氧自由基, 如超氧阴离子 ($\text{O}_2^{\cdot-}$)、羟基自由基 ($\text{HO}\cdot$) 和过氧化氢 (H_2O_2) 的 I 型光敏剂及直接光敏氧气产生单线态氧 ($^1\text{O}_2$) 的 II 型光敏剂 (图 1)^[2-5]。

PDT 作为一种创新的治疗方法, 不仅能用于治疗细菌生物膜感染^[6-7], 还能克服传统的耐药机制, 降低耐药的发生率^[8-9]。研究发现, 光敏剂产生的 ROS 对细菌^[10-11]、真菌^[12]、病毒^[13]、寄生

虫^[14]、甚至细菌孢子和包囊等休眠体^[15-16] 都有毒杀效果, 它们不仅可以结合并破坏细菌的细胞膜和细胞壁, 还可以破坏细胞的内部环境和生理活动^[17-18]。在临床上, PDT 已经被证实能有效地治疗由耐药微生物引起的疾病^[19], 且到目前为止还没有任何关于细菌对 PDT 产生耐药性的报道^[4]。

已开发的光敏剂主要有化学光敏剂和基因编码的光敏剂^[20]。在 PDT 中, 化学光敏剂需要使用抗体偶联^[21-22] 或使用与修饰的光敏配体有亲和力的转基因编码标签, 如 FlAsH^[23]、ReAsH^[24] 或 Halo Tag^[25], 才能特异性靶向细胞组织, 继而发挥作用。与化学光敏剂不同的是, 基因编码的光敏剂可以直接特异性地靶向到目标细胞区室或细胞器中^[2, 26-29]。然而, 目前开发的基因编码的光敏剂具

* 并列第一作者。

** 通讯联系人。

Tel: 15927097949, E-mail: 2019304110102@webmail.hzau.edu.cn

收稿日期: 2024-04-28, 接受日期: 2024-09-06

有ROS产量低和细胞光毒性低等问题。因此,需要进一步的开发并获得ROS产量更高的光敏剂,应用于微生物感染和肿瘤治疗等方面。

目前研究较多的基因编码光敏剂是基于LOV (light-oxygen-voltage) 结构域开发设计的光敏剂,如基于拟南芥向光素2 (*Arabidopsis thaliana* phototropin 2) 的LOV结构域开发而来的miniSOG (mini Singlet Oxygen Generator)^[30] 及其基础上设计得到的单线态氧光敏蛋白 (singlet oxygen photosensitizing protein, SOPP)^[31] 和 SOPP3^[32]。我们之前基于梗稻向光素2的LOV结构域设计了一种能光敏氧气产生 $^1\text{O}_2$ 的光敏剂LovPSO (LovP for singlet oxygen) 和一种产生ROS的光敏剂

LovPRO (LovP for reactive oxygen species)^[33]。本工作基于梗稻类向光素1B的LOV结构域开发了一种在445 nm蓝光激发下能产生大量 $^1\text{O}_2$ 的II型光敏剂LovPSO2 ($\Phi_{\Delta}=0.61$), 然后基于LovPSO2合理设计得到一种能同时产生 $^1\text{O}_2$ 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的光敏剂LovPRO2。进一步对光敏剂LovPSO2和LovPRO2的光稳定性和温度稳定性进行分析,发现LovPSO2和LovPRO2具有较好的温度稳定性,其中LovPRO2的光稳定性更好。此外,我们还分析了光敏剂LovPSO2和LovPRO2对*E. coli* BL21 (DE3) 及HeLa细胞的光毒性,发现LovPSO2和LovPRO2在蓝光激发下产生的ROS对*E. coli* BL21 (DE3) 菌株有较好的光毒性。

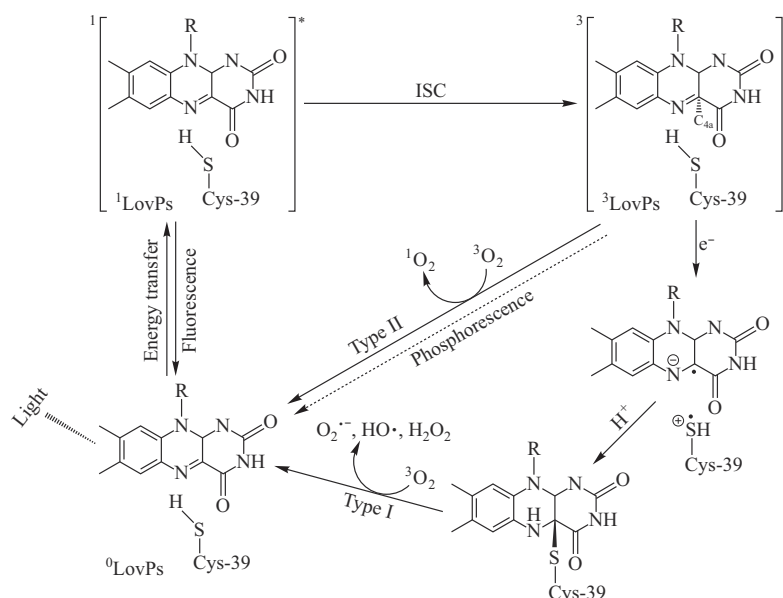


Fig. 1 Schematic illustration of photodynamic reactions

$^3\text{LovPs}$ return to the ground state by emitting phosphorescence, or directly photosensitize $^3\text{O}_2$ to produce $^1\text{O}_2$ (type II) and undergo charge transfer to produce $\text{O}_2^{\cdot-}$, $\text{HO}\cdot$, and H_2O_2 (type I)^[2-5].

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大肠杆菌菌株BL21 (DE3) 和哺乳动物细胞 (HeLa) 由本实验室保存; LB液体培养基: 1% (w/v) 蛋白胨、0.5% (w/v) 酵母粉和1% (w/v) NaCl; LB固体培养基: 1% (w/v) 蛋白胨、0.5% (w/v) 酵母粉、1% (w/v) NaCl和1.5% (w/v) 的琼脂粉; TB培养基: 1.2% (w/v) 蛋白胨、2.4% (w/v) 酵母粉和0.4% (w/v) 甘油; 30 g/L的卡那霉素 (kanamycin, Kana) 储备液; 50 g/L的氨苄青霉素 (ampicillin, Amp) 储备液; 200 g/L的异

丙基硫代-β-D-硫代半乳糖苷 (isopropylthio-β-D-galactoside, IPTG) 储备液; Tris-HCl缓冲液 (pH 8.0): 50 mmol/L Tris和500 mmol/L NaCl; 50 mmol/L咪唑和500 mmol/L咪唑 (pH 8.0); PBS缓冲液 (pH 7.4): 137 mmol/L NaCl、2.7 mmol/L KCl、10 mmol/L Na_2HPO_4 和2 mmol/L K_2HPO_4 。蛋白胨、酵母粉购自OXOID公司; Tris、Kana、Amp及IPTG均购自Amesco公司; 咪唑购自阿拉丁公司; NaCl、KCl、 Na_2HPO_4 、 K_2HPO_4 及其他无机盐和有机溶剂均购自上海实验试剂有限公司; Ni^{2+} 亲和层析柱购自Amersham Biosciences公司; 定点诱变试剂盒MutanBEST Kit购自Takara公司;

质粒提取试剂盒和DNA凝胶回收试剂盒购自康为世纪生物科技有限公司; 单线态氧荧光探针 (singlet oxygen sensor green, SOSG; Invitrogen)、DEME 培养基 (Gibco)、胎牛血清 (Gibco)、0.25% 胰蛋白酶/EDTA (Gibco)、Opti-MEM® (Gibco)、Lipofectamine® 3000 转染试剂 (Invitrogen) 均购自 Thermo Fisher 公司; 动物细胞培养瓶和培养板购自 Corning 公司; 二氢乙锭 (dihydroethidium, DHE, 超氧化物阴离子荧光探针) 和 Annexin V-Alexa Flour 647/PI 细胞凋亡检测试剂盒购自翌圣生物科技 (上海) 股份有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 质粒的构建

文中提到的质粒均由本实验室购买及构建保存, 引物由武汉天一华煜基因科技有限公司合成。

LovPSO2 基因源自梗稻的类向光素 1B (对应氨基酸 437~541), 由武汉天一华煜基因科技有限公司合成后, 用 *NcoI* 和 *XhoI* 酶切位点设计引物, 通过酶切连接法将其克隆到具有 Kana 抗性的 pET28a(+) 载体中, 得到 pET28a(+)-LovPSO2。

LovPSO2 的蛋白质结构是以拟南芥的 AtPhot2LOV2 (PDB: 6QQH) [34] 为模板, 先用 SWISS-MODEL 进行建模 [35-36], 再用 PyMOL (<https://pymol.org>) 进行创建和分析。然后以 pET28a(+)-LovPSO2 为模板, 在突变位点处设计引物, 使用 MutantBEST Kit 试剂盒构建相应的突变体质粒。

以 pET28a(+)-LovPSO2 和 pET28a(+)-LovPRO2 为模板, 用 *HindIII* 和 *XhoI* 酶切位点设计引物, 通过酶切连接法将其克隆到具有 Amp 抗性的 pcDNA3.1 载体中, 得到 pcDNA3.1-LovPSO2 和 pcDNA3.1-LovPRO2。引物序列和相关反应体系分别见表 S1~S5。

1.2.2 蛋白质的表达与纯化

将表达质粒的目的蛋白菌液接种至含有 Kana (30 mg/L) 的 TB 培养基中培养, 加入终浓度为 120 mg/L 的 IPTG 后避光诱导表达 16~18 h。收集细胞, 置于 -20°C 储存备用 [37]。

将收集的细胞用 Tris-HCl 缓冲液重悬, 破碎细胞, 4°C、12 000 r/min 离心。将蛋白质上清液加样至 Ni²⁺ 亲和层析柱中。先用含有 50 mmol/L 咪唑的 Tris-HCl 缓冲液洗涤 5 遍, 再用含有 500 mmol/L 咪唑的 Tris-HCl 缓冲液将 Ni²⁺ 亲和层析柱上的目的蛋白质洗脱下来并收集。

1.2.3 蛋白质的光谱分析

使用 UV-9000S 分光光度计 (上海元析仪器有限公司) 记录蛋白质的吸收光谱, F-320 型荧光光谱仪 (天津港东发展科技股份有限公司) 记录蛋白质的荧光光谱。将纯化的蛋白质样品进行酸性尿素变性 (8 mol/L, pH 1.5), 使黄素单核苷酸 (flavin mononucleotide, FMN) 从蛋白质中游离出来。测量蛋白质变性前后的吸收和荧光光谱 ($\lambda_{\text{ex}}=420 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=440 \text{ nm}$), 并以 SOPP3 ($\Phi_F=0.41$ [32]) 为对照, 根据吸收值、荧光值和 FMN 的摩尔消光系数 ($\varepsilon=12.3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ [31]) 得到 LovPSO2 和 LovPRO2 的荧光量子产率及摩尔消光系数 [32]。

蛋白质的光稳定性分析: 将纯化的蛋白质样品用 Tris-HCl 缓冲液稀释后, 在 445 nm、30 mW/cm² 的蓝光下照射 20 min, 分别记录蛋白质的吸收和荧光光谱。使用 OriginPro 2021 将蛋白质的最大荧光强度值拟合为 $F = A \cdot 2^{-x/t}$, 其中, F 表示荧光强度, x 表示持续光激发时间 (min), t 表示半衰期, A 为常数, $A=1$ 。

蛋白质的温度稳定性分析: 将纯化的蛋白质样品用 Tris-HCl 缓冲液稀释后, 分别置于 37°C 和 45°C 恒温金属浴 (上海培清科技有限公司) 中 20 min, 每隔 2 min 分别记录蛋白质的吸收和荧光光谱, 并使用 OriginPro 2021 对最大吸光度值和荧光强度值进行分析。

1.2.4 单线态氧和超氧阴离子的分析

将纯化的蛋白质样品定至 $A_{445}=0.063\pm0.003$ 后, 加入 3 $\mu\text{mol/L}$ 的单线态氧探针 SOSG, 充分混匀后, 在 445 nm、70 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 的蓝光下分别照射 10 min, 每隔 2 min 记录其在 500~800 nm 范围内 SOSG 氧化产物的荧光光谱 ($\lambda_{\text{ex}}=490 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}}=500 \text{ nm}$);

将纯化的蛋白质样品定至 $A_{445}=0.063\pm0.003$ 后, 加入 5 $\mu\text{mol/L}$ 的超氧阴离子探针 DHE, 在 445 nm、70 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 的蓝光下照射 5 min, 每隔 1 min 记录其在 550~800 nm 范围内 DHE 氧化产物的荧光光谱 ($\lambda_{\text{ex}}=525 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}}=550 \text{ nm}$)。

将纯化的蛋白质样品稀释至一定浓度后, 每隔 2 min 测量其在 445 nm、70 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 蓝光照下的吸收光谱, 并记录其在 445 nm 处的吸光度值。将数据归一化为光照前的吸光度。数据拟合为 $y = a e^{-bt}$, 其中 a 和 b 是拟合系数, t 是持续光激发时间。光敏剂的实际吸光度为 $A = A_0 \int_0^{t_d} a e^{-bt} d(t)$, 其

中 A_0 是光照前的吸光度, t_d 是持续光激发时间。以 SOPP 的 $^1\text{O}_2$ 量子产率 ($\Phi_{\Delta}=0.19$)^[31] 作为对照, 计算 LovP 的 $^1\text{O}_2$ 量子产率: $\Phi_L = \frac{r_L/A_L}{r_s/A_s} \Phi_s$, 其中, r_L 和 r_s 是蓝光照射下光敏剂的正SOSG氧化速率, A_L 和 A_s 是光敏剂的实际吸光度, Φ_s 是 SOPP 的 $^1\text{O}_2$ 量子产率。所有的拟合和计算均在 OriginPro 2021 中执行。

1.2.5 大肠杆菌菌株中光毒性实验

将等量的表达 pET28a(+), pET28a(+)-LovPSO2、pET28a(+)-LovPRO2 质粒的 *E. coli* BL21 (DE3) 菌液接种至 100 ml 含有 Kana (30 mg/L) 的 TB 培养基中培养, 加入终浓度为 120 mg/L 的 IPTG 后避光诱导表达 16~18 h。分别取 100 μl 过夜表达的细胞悬液与无抗生素的 LB 液体培养基混匀, 梯度稀释至合适浓度。设置两组平行实验, 一组置于黑暗, 另一组置于 445 nm、30 mW/cm^2 的蓝光下分别照射 10 min 和 30 min, 取光照前后稀释液各 40 μl 涂布于含有 Kana 的 LB 固体培养基上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养, 观察细胞在 LB 固体培养基上的菌落生长情况, 进行菌落计数。根据光照前后菌落的数量判断蛋白对 *E. coli* BL21 (DE3) 的光毒性效应, 并根据公式计算光毒性致死率。光毒性致死率 = (光照前细胞数 - 光照后细胞数) / (光照前细胞数)。

1.2.6 哺乳动物细胞中光毒性实验

本实验使用 Cytoflex-LX 流式细胞仪 (Beckman Coulter, USA) 分析光敏剂 LovPSO2 和 LovPRO2 对 HeLa 细胞的光毒性^[38-40]。首先将 HeLa 细胞在含有 DME 培养基 (含 10% 胎牛血清) 的 12 孔细胞培养皿中培养 (设置两组平行实验)。当细胞密度达到 80% 左右时, 使用 Lipofectamine[®] 3000 转染试剂与 DNA 以 2 : 1 (v : m) 的比例进行转染, 在 Opti-MEM[®] 中混匀, 室温孵育 10 min 后直接添加到细胞中并孵育 5~6 h。用新鲜的 DME 培养基 (含 10% 胎牛血清) 换液, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 含量的细胞培养箱 (Thermo Fisher Scientific) 中培养 24~36 h, 将光照组置于 445 nm、30 mW/cm^2 的蓝光下照射 60 min 后继续培养 24 h。之后, 用 0.25% 胰蛋白酶/EDTA 溶液消化并收集贴壁细胞, PBS 缓冲液 (pH 7.4) 洗涤细胞 3 遍, 1 $\times$ Binding Buffer 溶液重悬细胞后, 使用 Annexin V-Alexa Fluor 647/PI 染色并置于黑暗中室温孵育 15 min。最后, 在样品中加入 400 μl PBS 缓冲液 (pH 7.4),

混匀, 流式细胞仪检测细胞样品 (分别用 488 nm 和 638 nm 的激光激发, 每个样品收集 10 000 个细胞)。使用 FlowJo 软件 (LLC) 对数据进行分析。

2 结 果

2.1 LovPSO2 突变体的筛选

研究发现, LovPSO2 在蓝光激发下能光敏氧气产生大量的 $^1\text{O}_2$, 但其 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 产量较低 (表 1)。为了提高 LovPSO2 的 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 产量, 将与其发色团 FMN 直接相连的弱电子效应氨基酸, 如 Gln (Q) 和 Arg (R), 突变为具有供电子或供质子效应的氨基酸, 如 Ala (A)、Val (V)、Leu (L)、Ile (I)、Phe (F)、Tyr (Y)、Trp (W)、Asp (D)、Glu (E)、Ser (S)、Thr (T)、Asn (N) 和 His (H)^[41], 以减少三线态激发态光敏剂的浪费, 使更多的处于三线态激发态的光敏剂用于产生 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 。首先, 我们突变了 Q43 位点和 R56 位点。对这些突变体进行表达与纯化分析, 发现 Q43 位点的突变会导致色素 FMN 的丢失, 说明 Q43 位点是使 FMN 与蛋白质保持结合的关键位点, 它与 FMN 的 C(2) = O 形成氢键 (图 2), 突变该位点后, 蛋白质与 FMN 的结合被破坏。在 R56 位点的突变体中, 只有突变体 R56H 不会破坏色素 FMN 与蛋白质的结合, 且在 445 nm、70 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 蓝光下照射 5 min 后, 突变体 LovPSO2-R56H 的 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 产量有所提高 (图 S1),

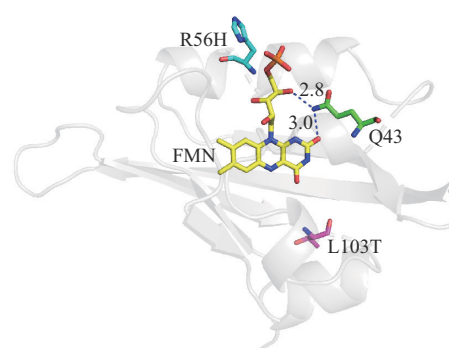


Fig. 2 Structure model of LovPRO2 and site-directed mutagenesis targeting amino acids based on the phototropin-1B-like from *Oryza sativa japonica*

The LovP structure was simulated based on the crystal structure of AtPhot2LOV2 (PDB: 6QQH) using SWISS-MODEL, created and analyzed using PyMOL (<https://pymol.org>): FMN (yellow), proton donor residues (green), residues that may be involved in the formation of water channel residues (magenta), dashed lines indicate possible HBs.

导致这一结果的原因可能是, 将R突变为H后, 可能促进了FMN的光还原过程, 从而促进了其光加合物的形成。已有研究表明, L103 残基能调节O₂猝灭三线态激发态FMN的双分子速率常数 k_q , 从而影响氧气通过蛋白质的扩散速率^[32, 42], 因此, 我们在LovPSO2-R56H的基础上, 将L103 位点突变为含醇羟基的氨基酸 (S和T), 以探索突变体在蛋白质内部水通道的形成中引起的结构发生微妙变

化的可能性^[32-33]。结果表明, 突变体LovPSO2-R56H-L103T容易纯化且不会丢失FMN, 此外, 与LovPSO2相比, 突变体LovPSO2-R56H-L103T的O₂^{•-}产量相对较高 (图3b)。我们将该突变体 (LovPSO2-R56H-L103T) 命名为LovPRO2, 与之前基于梗稻向光素2开发而来的LovPRO ($\Phi_\Delta=0.44$, $\Phi(O_2^{\bullet-})=0.22$) 相比^[33], LovPRO2的¹O₂和O₂^{•-}产量及量子产率更高 (图3, 表1)。

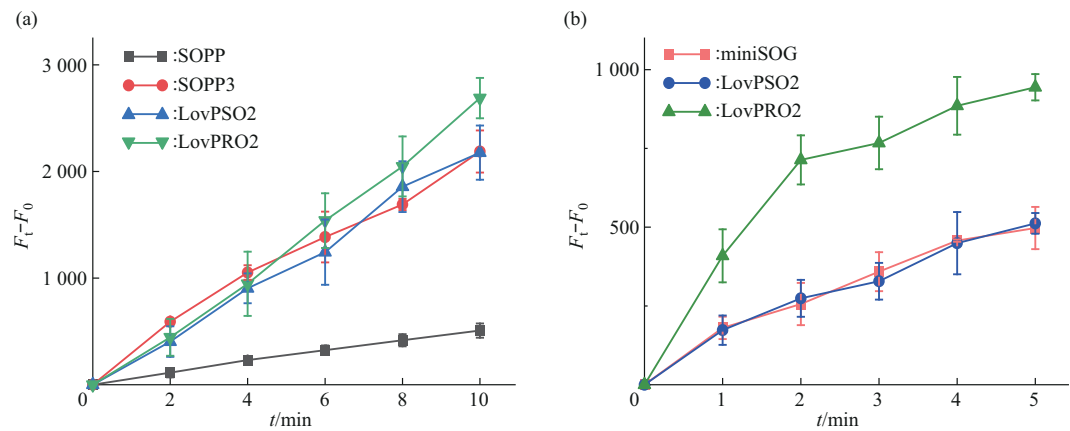


Fig. 3 Singlet oxygen and superoxide anion yields of the proteins

The changes of fluorescence intensity of SOSG oxidation products of SOPP, SOPP3, LovPSO2, LovPRO2 (a) and DHE oxidation products of miniSOG, LovPSO2, LovPRO2 (b) under blue light irradiation (445 nm, 70 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). The error bars show the SDs ($n=3$).

Table 1 Comparison of biochemical and biophysical characteristics of LovPs¹⁾

Protein	Absorption		Emission		$\Phi_\Delta^{6)}$	$\Phi(^1\text{O}_2)$ (vs SOPP3)	$\Phi(\text{O}_2^{\bullet-})$ (vs LovPSO2)	$\Phi(\text{O}_2^{\bullet-})$	$t_{1/2}/\text{min}^{7)}$
	$\lambda_{\text{max}}/\text{nm}^{2)}$	$\varepsilon/(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1})^{3)}$	$\lambda_{\text{max}}/\text{nm}^{4)}$	$\Phi_{\text{F}}^{5)}$					
LovPSO2	446	16.6	503	0.15	0.61	1.22	1.00	0.24	2.4
LovPRO2	447	16.7	504	0.16	0.49	0.98	1.46	0.35	7.1
SOPP3	440	17.6	495	0.41	0.50	1.00	—	—	2.7
miniSOG	448	16.9	504	0.38	0.05 ⁸⁾	—	—	—	22.2
SOPP ⁸⁾	440	14.5	487	0.45	0.19	—	—	—	—

¹⁾All data were measured in H₂O-based Tris-HCl buffer (50 mmol/L Tris, 500 mmol/L NaCl; pH 8.0). ²⁾Estimated accuracy of ± 1 nm. ³⁾The molar extinction coefficients of FMN ($\varepsilon=12.3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) was used as a reference to calculate the molar extinction coefficient of LovPSO2 and LovPRO2. ⁴⁾Estimated accuracy of ± 2 nm. ⁵⁾The fluorescence quantum yield of SOPP3 ($\Phi_\Delta=0.41$) was used as a reference to calculate the fluorescence quantum yields of LovPSO2 and LovPRO2, for an estimated accuracy of ± 0.02 . ⁶⁾Estimated accuracy of ± 0.02 . ⁷⁾The fluorescence half-life of proteins under blue light irradiation (445 nm, 30 mW/cm²). ⁸⁾Data from Westberg *et al.*^[31].

2.2 蛋白质光谱分析

我们对 miniSOG、SOPP3、LovPSO2、LovPRO2 的吸收和荧光光谱进行分析, 发现 miniSOG、LovPSO2、LovPRO2 的吸收和荧光光谱相似, 与 SOPP3 相比, 它们的吸收光谱均红移了约 6 nm, 荧光光谱均红移了约 8 nm (图4)。

2.3 光敏剂单线态氧和超氧阴离子的产量及量子产率

我们分别使用 SOSG 探针和 DHE 探针分析了光敏剂在 445 nm、70 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 蓝光照射下的¹O₂和O₂^{•-}产量 (图3)。结果显示, 持续光照 10 min 后, LovPRO2 的¹O₂产量分别是 LovPSO2 的 1.24 倍、SOPP3 的 1.23 倍和 SOPP 的 5.29 倍 (图3a),

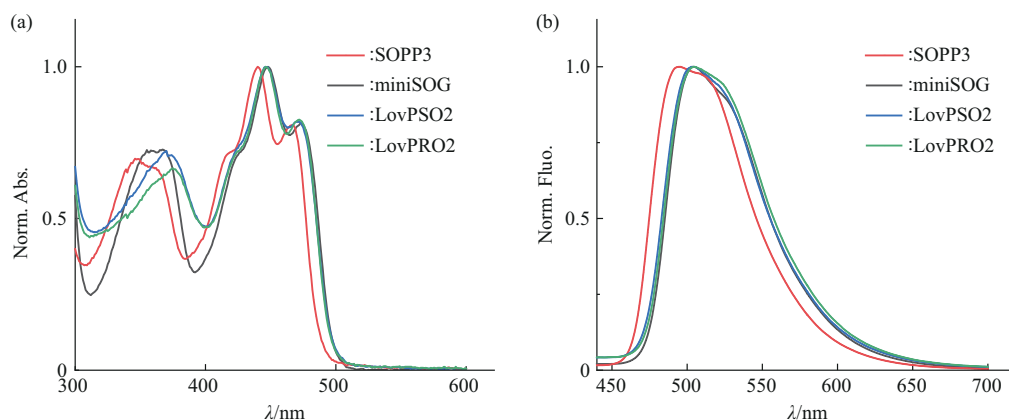


Fig. 4 Spectral analysis of the proteins

Normalized absorption (a) and fluorescence spectra (b) of SOPP3, miniSOG, LovPSO2, and LovPRO2.

持续光照 5 min 后, LovPRO2 的 $O_2^{\cdot -}$ 产量分别是 LovPSO2 的 1.84 倍和 miniSOG 的 1.90 倍 (图 3b)。这表明, 在 445 nm、 $70 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 蓝光照射下, LovPRO2 有较高的 1O_2 和 $O_2^{\cdot -}$ 产量。

先前的研究表明, 随着光照时间的延长, 光漂白会影响光敏剂的 1O_2 产量^[31, 43]。为了避免光漂白对光敏剂随光照时间的 1O_2 产量的影响, 我们对

SOPP、SOPP3、LovPSO2 和 LovPRO2 在 445 nm、 $70 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 蓝光照射下的光稳定性进行分析, 发现它们在 400~500 nm 范围内显示出较小程度的光漂白 (图 5)。结合光敏剂在 445 nm 处吸光度值的变化 (图 6a) 及蓝光照射下 SOSG 氧化产物的速率 (图 6b), 并以 SOPP 在 H_2O 基缓冲液中测得的 1O_2 量子产率 ($\Phi_{\Delta}=0.19$ ^[31]) 为对照来计算

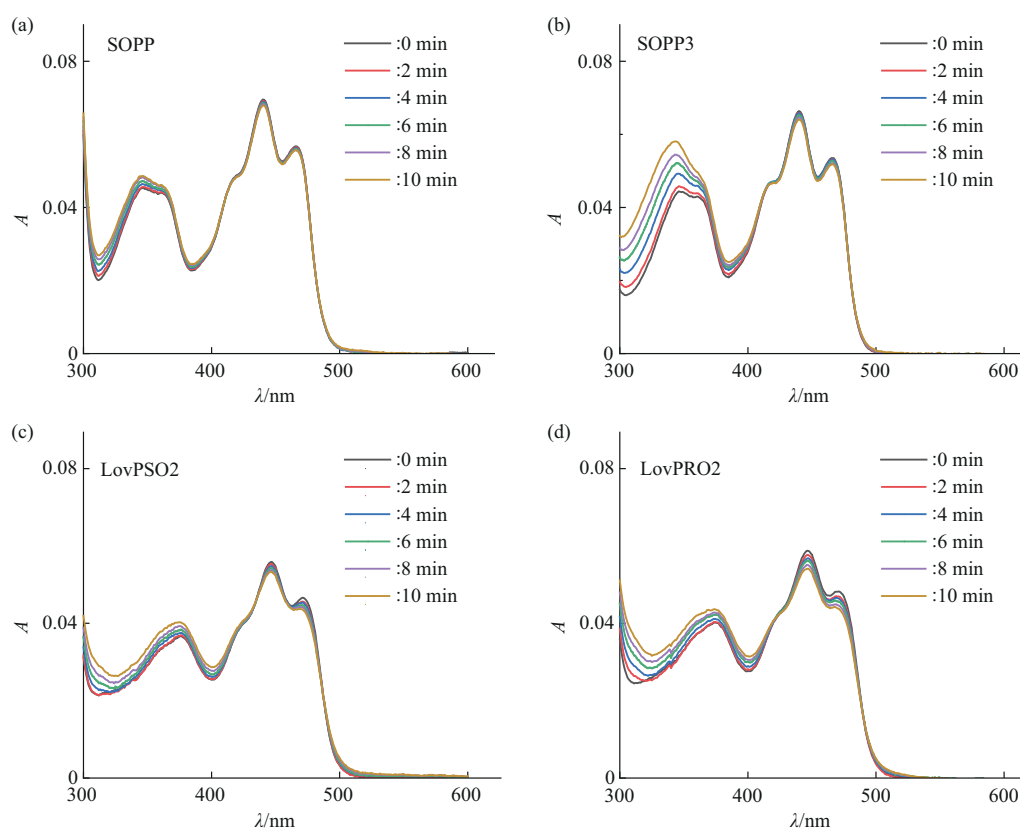


Fig. 5 Photostability analysis of the proteins

The changes in the absorption spectra of SOPP (a), SOPP3 (b), LovPSO2 (c), and LovPRO2 (d) were recorded under blue light irradiation (445 nm, $70 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) for 10 min.

SOPP3 和 LovP 光敏剂的 $^1\text{O}_2$ 量子产率, 根据公式 $\Phi_L = \frac{r_L/A_L}{r_S/A_S} \Phi_S$, 得出 SOPP3 的 $^1\text{O}_2$ 量子产率为 0.50, LovPSO2 的 $^1\text{O}_2$ 量子产率为 0.61, LovPRO2 的 $^1\text{O}_2$ 量子产率为 0.49 (表 1)。此外, 为了确定 LovPSO2 和 LovPRO2 的 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 量子产率, 我们假设 LovPSO2 和 LovPRO2 的 ^3FMN 只用于生成 $^1\text{O}_2$ 和

$\text{O}_2^{\cdot-}$, 根据公式 $\Phi(\text{O}_2^{\cdot-}) = 1 - \Phi_F - \Phi_{\Delta}$ [33], 得出 LovPSO2 的 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 量子产率为 0.24, LovPRO2 的 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 量子产率为 0.35 (表 1)。以上结果表明, LovPSO2 是一种 $^1\text{O}_2$ 量子产率较高的 II 型 LOV 光敏剂, 其 $^1\text{O}_2$ 量子产率分别是 LovPRO2 的 1.24 倍和 SOPP3 的 1.22 倍; LovPRO2 是一种 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 量子产率相对较高的光敏剂, 其 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 量子产率是 LovPSO2 的 1.46 倍。

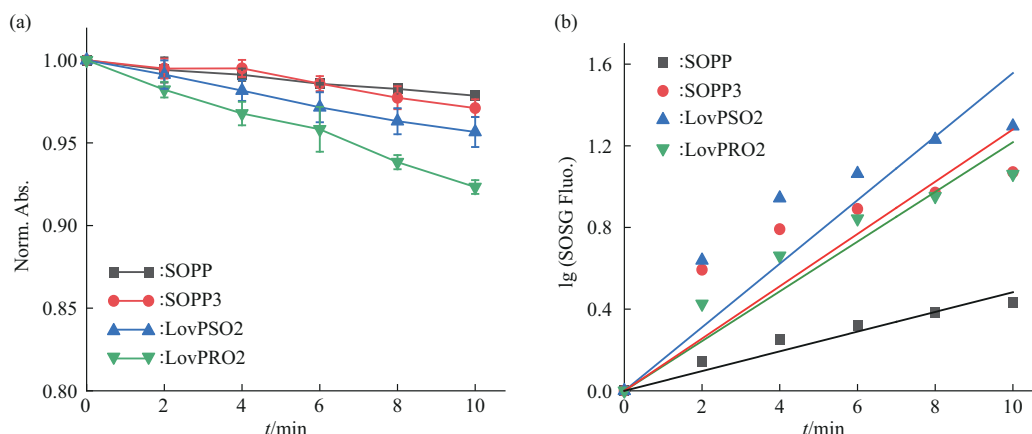


Fig. 6 Quantum yield of singlet oxygen of the proteins

The changes in absorption intensity at 445 nm, all data were normalized to the initial absorbance (a), and SOSG oxidation rates (b) of SOPP, SOPP3, LovPSO2, LovPRO2 under blue light irradiation (445 nm, 70 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) for 10 min. The error bars show the SDs ($n=3$).

2.4 蛋白质稳定性分析

蛋白质的稳定性对于药物开发和药物递送等方面的研究都至关重要 [44]。温度、光照是影响光敏蛋白产生 ROS 及其稳定性的关键因素, 而细胞培养和哺乳动物体内的温度约在 37°C, 肿瘤细胞内部的温度约在 42~45°C。因此, 我们进一步分析了 miniSOG、SOPP3、LovPSO2、LovPRO2 的光稳定性及在 37°C 和 45°C 条件下的温度稳定性。

为了探究蛋白质的光稳定性, 我们分别对 miniSOG、SOPP3、LovPSO2、LovPRO2 在 445 nm、30 mW/cm² 蓝光照射下的吸收光谱和最大荧光强度值进行了分析。吸收光谱分析结果显示, 蛋白质在 400~500 nm 范围内的特征峰随着光照时间的延长逐渐降低 (图 7)。其中, SOPP3 在 400~500 nm 范围内的吸收光谱在蓝光照射 10 min 后消失 (图 7b), LovPSO2 在 400~500 nm 范围内的吸收光谱在蓝光照射 4 min 后消失 (图 7c), LovPRO2 在 400~500 nm 范围内的吸收光谱在蓝光照射 15 min 后消失 (图 7d)。最大荧光强度值分析结果显示, miniSOG、SOPP3、LovPSO2 和 LovPRO2 的荧光半衰期 ($t_{1/2}$) 分别为 22.2、2.7、2.4 和 7.1 min

(图 8, 表 1)。以上结果表明, 在 445 nm、30 mW/cm² 的蓝光照下, 与 SOPP3 和 LovPSO2 相比, LovPRO2 的光稳定性更好, 其 $t_{1/2}$ 分别是 LovPSO2 的 3.0 倍和 SOPP3 的 2.6 倍, 说明在持续高强度光照下, SOPP3 和 LovPSO2 中的发色团 FMN 更容易被破坏, 即更容易发生光漂白 [45]。

为了探究蛋白质的温度稳定性, 我们分别对 miniSOG、SOPP3、LovPSO2、LovPRO2 在 37°C 和 45°C 条件下的吸收和荧光强度进行了分析。结果显示, 光敏剂 miniSOG、SOPP3、LovPSO2 和 LovPRO2 具有较好的温度稳定性 (图 9), 说明在 37°C 和 45°C 条件下, 蛋白质与发色团 FMN 结合较好。

2.5 LovPSO2 和 LovPRO2 的光毒性分析

为了确定光敏剂 LovPSO2 和 LovPRO2 的光毒性效应, 我们分析了 LovPSO2 和 LovPRO2 在 445 nm、30 mW/cm² 的蓝光照下分别对 *E. coli* BL21 (DE3) 和 HeLa 细胞的光毒性。大肠杆菌菌株的光毒性分析结果显示, 与对照组相比, 在蓝光分别照射 10 min 和 30 min 后, 表达了 LovPSO2 和 LovPRO2 的 *E. coli* BL21 (DE3) 数量明显减少

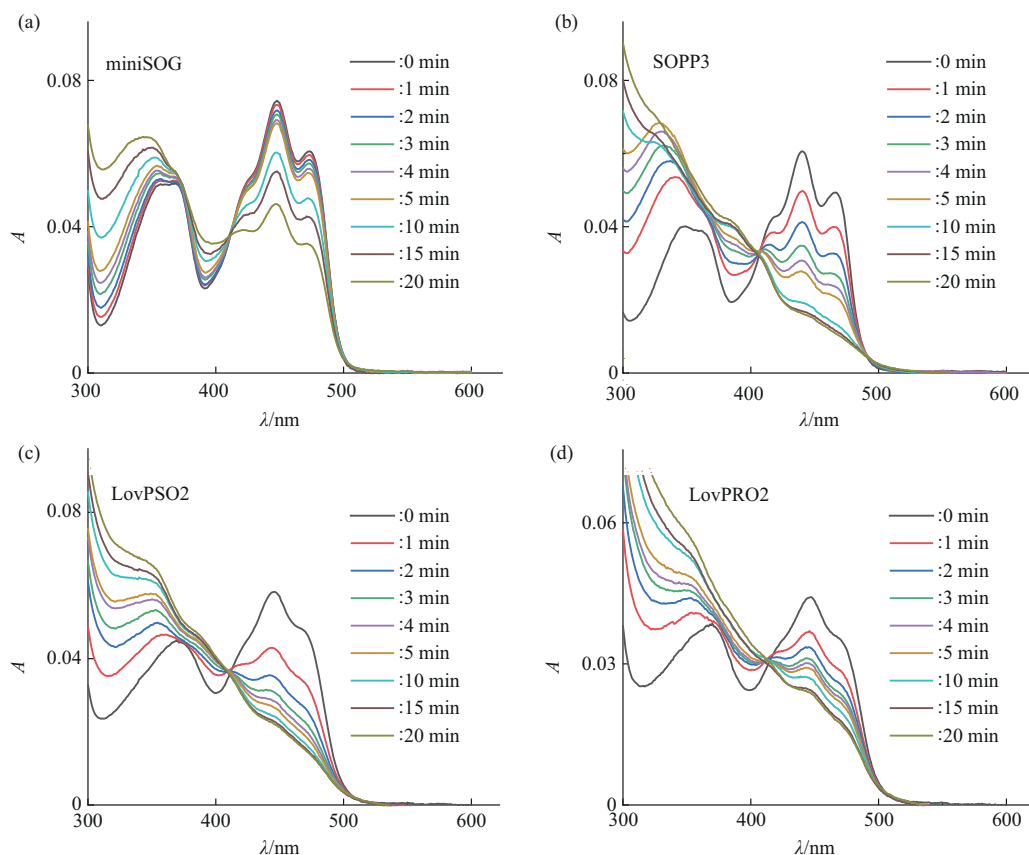


Fig. 7 Absorption spectral analysis of the proteins

The changes in the absorption spectra of miniSOG (a), SOPP3 (b), LovPSO2 (c), and LovPRO2 (d) were recorded under blue light irradiation (445 nm, 30 mW/cm²) for 20 min.

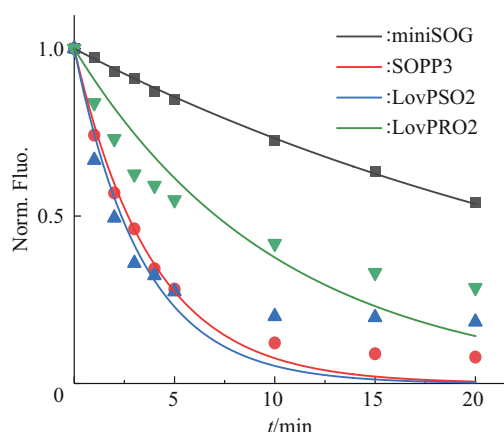


Fig. 8 Fluorescence half-life of the proteins

Normalized maximum fluorescence values of miniSOG, SOPP3, LovPSO2, and LovPRO2 under blue light irradiation (445 nm, 30 mW/cm²) for 20 min.

(图 10a)。光照 10 min 后, LovPSO2 对 *E. coli* BL21 (DE3) 的光毒性致死率为 91.3%, LovPRO2 对

E. coli BL21 (DE3) 的光毒性致死率为 82.2%; 光照 30 min 后, LovPSO2 对 *E. coli* BL21 (DE3) 的光毒性致死率为 96.2%, LovPRO2 对 *E. coli* BL21 (DE3) 的光毒性致死率为 90.0% (图 10b)。以上结果表明, 在蓝光照射下, LovPSO2 和 LovPRO2 产生的 ROS 对大肠杆菌菌株有较好的光毒性, 致死率高达 90%。因此, LovPSO2 和 LovPRO2 可作为抗菌光敏剂, 有可能为食品消毒和治疗由细菌感染引起的疾病等方面提供新的研究工具。

使用流式细胞仪分析光敏剂 LovPSO2 和 LovPRO2 对 HeLa 细胞的光毒性, 结果显示, 在黑暗和蓝光持续照射 60 min 的条件下, 表达了 LovPSO2 和 LovPRO2 的 HeLa 细胞的死亡率均较低 (图 11)。这表明, 在 445 nm、30 mW/cm² 的蓝光照射下, LovPSO2 和 LovPRO2 对 HeLa 细胞的光毒性较弱, 导致这一结果的原因可能是细胞内环境分别加剧了 LovPSO2 和 LovPRO2 包裹的 FMN 的光漂白, 减轻了 ROS 对细胞组织的破坏^[45]。

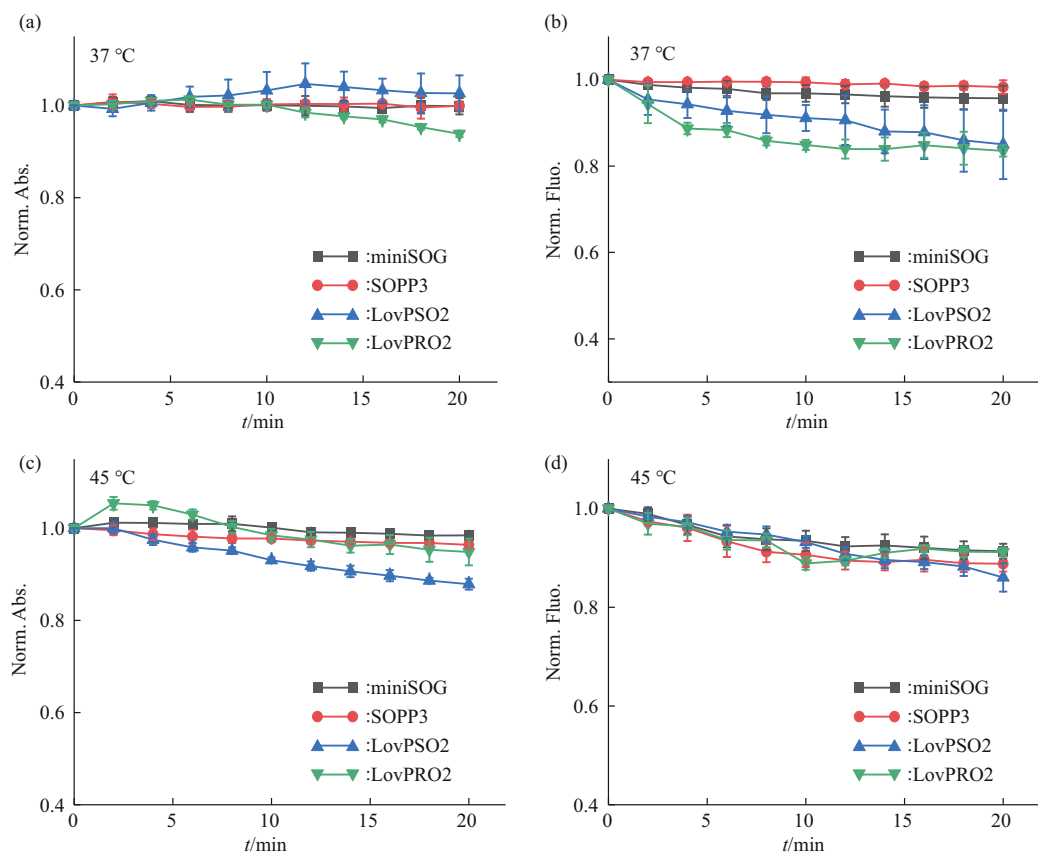


Fig. 9 Thermostability analysis of the proteins

The changes in absorption intensity (a) and fluorescence intensity (b) of miniSOG, SOPP3, LovPSO2, LovPRO2 at 37°C for 20 min. The changes in absorption intensity (c) and fluorescence intensity (d) of miniSOG, SOPP3, LovPSO2, LovPRO2 at 45°C for 20 min. The error bars show the SDs ($n=3$).

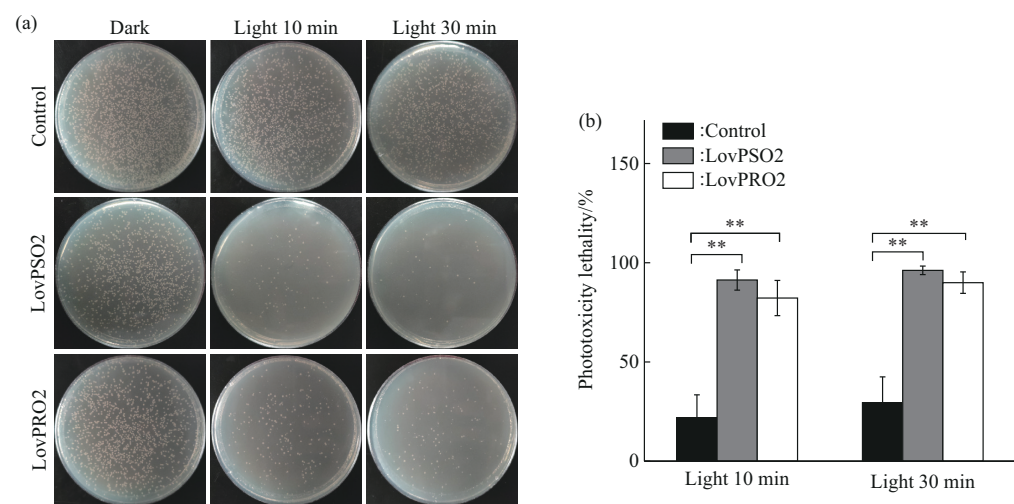


Fig. 10 Phototoxicity analysis of the proteins in *E. coli* BL21(DE3)

E. coli BL21(DE3) colony growth on LB solid medium (a) and the phototoxicity lethality of LovPSO2 and LovPRO2 for *E. coli* BL21(DE3) under blue light irradiation at 445 nm, 30 mW/cm² (b). ** Indicates that the lethality of strains expressing LovPSO2 and LovPRO2 was significantly difference from the control group ($P<0.01$), the error bars show SDs ($n=3$).

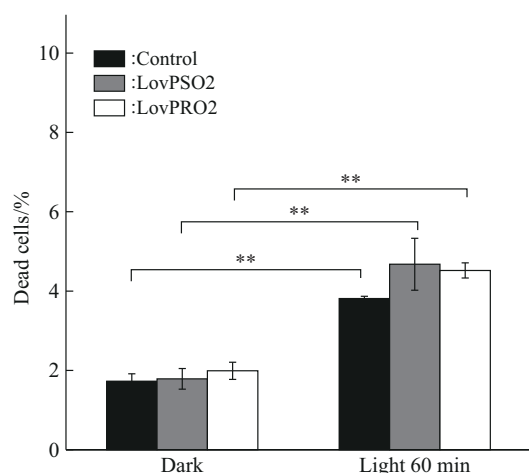


Fig. 11 Phototoxicity analysis of the proteins in HeLa cells

The phototoxicity of LovPSO2 and LovPRO2 on HeLa cells were measured via flow cytometry in the dark or under blue light irradiation at 445 nm, 30 mW/cm². ** Indicates the light group significantly difference from the dark group ($P < 0.01$), and the error bars show SDs ($n=3$).

3 讨 论

本工作是基于梗稻的类向光素 1B, 开发得到一种¹O₂量子产率较高的基因编码的 II 型 LOV 光敏剂 LovPSO2 ($\Phi_A=0.61$) 和一种能同时产生¹O₂和 O₂⁻的光敏剂 LovPRO2。研究发现, LovPSO2 的¹O₂量子产率分别是 LovPRO2 的 1.24 倍和 SOPP3 的 1.22 倍, LovPRO2 的 O₂⁻量子产率是 LovPSO2 的 1.46 倍, 导致这一结果的原因可能是, LovPRO2 是在 LovPSO2 的基础上首先将 56 位点的 R 突变为 H, 这一突变可能促进了 FMN 的光还原过程, 从而促进了其光加合物的形成。然后将 103 位点的 L 突变为具有亲水性 T, 这可能会增强基于电荷转移的氧自由基的产生。因此, LovPSO2 具有较高的¹O₂量子产率, LovPRO2 具有较高的 O₂⁻量子产率。对光敏剂的光稳定性进行分析发现, 在 445 nm、30 mW/cm²蓝光照射下, LovPSO2 在 400~500 nm 范围内的吸收光谱在蓝光照射 4 min 后消失, SOPP3 在 400~500 nm 范围内的吸收光谱在蓝光照射 10 min 后消失, LovPRO2 在 400~500 nm 范围内的吸收光谱在蓝光照射 15 min 后消失, miniSOG、SOPP3、LovPSO2 和 LovPRO2 的 $t_{1/2}$ 分别为 22.2、2.7、2.4 和 7.1 min, LovPRO2 的 $t_{1/2}$ 分别是 LovPSO2 的 3.0 倍和 SOPP3 的 2.6 倍。这表明, 在 445 nm、30 mW/cm²的蓝光照射下, miniSOG 和

LovPRO2 的光稳定性相对较好, SOPP3 和 LovPSO2 的光稳定性较差, 说明在持续高强度光照下, 与 miniSOG 和 LovPRO2 相比, SOPP3 和 LovPSO2 中的发色团 FMN 更容易被破坏, 即更容易发生光漂白^[45]。对光敏剂的温度稳定性进行研究发现, 在 37℃ 和 45℃ 条件下, 随着时间的延长, LovPSO2 和 LovPRO2 的吸收和荧光峰值波动较小, 说明蛋白质与 FMN 结合较好, 因此, LovPSO2 和 LovPRO2 具有较好的温度稳定性, 在细胞中表达时温度对蛋白质稳定性的影响较小。

以上结果表明, LovPSO2 具有较高的¹O₂量子产率和较好的温度稳定性, 而 LovPRO2 不仅具有较高的 O₂⁻量子产率还具有较好的光稳定性和温度稳定性。为了进一步确定光敏剂的光毒性效应, 对 LovPSO2 和 LovPRO2 的光毒性进行研究具有重要意义。首先将光敏剂 LovPSO2 和 LovPRO2 分别在 *E. coli* BL21 (DE3) 中表达, 发现其在 445 nm、30 mW/cm²蓝光照射下产生的 ROS 对大肠杆菌菌株有较好的光毒性, 致死率高达 90%。因此, LovPSO2 和 LovPRO2 可作为抗菌光敏剂, 在环境中不仅可以用于植物病原体的管理^[46]、鱼类养殖中水生病原体的控制^[47]、医院废水中多重耐药细菌的灭活^[48]和去除食品生产过程中的污染物(通常是细菌或真菌)^[49], 还可以将其作为光抗菌材料, 通过提供光激活的表面来加强卫生保健环境中的环境感染控制^[50-51]等。

此外, 我们还发现 LovPSO2 和 LovPRO2 介导的 HeLa 细胞的光毒性较弱, 导致这一结果的原因可能是细胞内环境分别加剧了 LovPSO2 和 LovPRO2 包裹的 FMN 的光漂白, 减轻了 ROS 对细胞组织的破坏, 限制了 LovPSO2 和 LovPRO2 作为研究氧化应激的机制工具的使用范围^[45]。因此, 后续开发和设计应用于细胞内部的 LOV 光敏剂, 应该以提高 LOV 光敏剂的光稳定性为着力点进行进一步的研究。

4 结 论

本研究中, LovPSO2 是一种在 445 nm 蓝光激发下能产生大量¹O₂的 II 型光敏剂 ($\Phi_A=0.61$), LovPRO2 是一种能够同时产生¹O₂和 O₂⁻的光敏剂。蛋白质的稳定性分析结果表明, LovPSO2 和 LovPRO2 均具有较好的温度稳定性, 其中 LovPRO2 的光稳定性更好。蛋白质的光毒性分析结果表明, 在 445 nm、30 mW/cm²的蓝光照射下,

LovPSO2 和 LovPRO2 对 *E. coli* BL21 (DE3) 菌株有较好的光毒性, 致死率高达 90%, 因此, LovPSO2 和 LovPRO2 可作为抗菌光敏剂, 在食品和医疗等方面均有较为广阔的应用前景, 但 LovPSO2 和 LovPRO2 介导的 HeLa 细胞的光毒性较弱, 后续还需进一步开发和设计应用于细胞内部的光稳定性较好的 LOV 光敏剂。

附件 见本文网络版 (<http://www.pibb.ac.cn>, <http://www.cnki.net>):

PIBB_20240175_Table_S1.pdf

PIBB_20240175_Table_S2.pdf

PIBB_20240175_Table_S3.pdf

PIBB_20240175_Table_S4.pdf

PIBB_20240175_Table_S5.pdf

PIBB_20240175_Figure_S1.pdf

参 考 文 献

- [1] Rocha L G B. Development of a Novel Photosensitizer for Photodynamic Therapy of Cancer[D]. Portugal: Faculty of Pharmacy of the University of Coimbra, 2016
- [2] Westberg M, Etzerodt M, Ogilby P R. Rational design of genetically encoded singlet oxygen photosensitizing proteins. *Curr Opin Struct Biol*, 2019, **57**: 56-62
- [3] Kutta R J, Magerl K, Kensy U, *et al.* A search for radical intermediates in the photocycle of LOV domains. *Photochem Photobiol Sci*, 2015, **14**(2): 288-299
- [4] Warrier A, Mazumder N, Prabhu S, *et al.* Photodynamic therapy to control microbial biofilms. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2021, **33**: 102090
- [5] Sai D L, Lee J, Nguyen D L, *et al.* Tailoring photosensitive ROS for advanced photodynamic therapy. *Exp Mol Med*, 2021, **53**(4): 495-504
- [6] Li M, Shao Y, Kim J H, *et al.* Unimolecular photodynamic O₂-economizer to overcome hypoxia resistance in phototherapeutics. *J Am Chem Soc*, 2020, **142**(11): 5380-5388
- [7] Sun X, Sun J, Sun Y, *et al.* Oxygen self-sufficient nanoplatfor for enhanced and selective antibacterial photodynamic therapy against anaerobe-induced periodontal disease. *Adv Funct Materials*, 2021, **31**(20): 2101040
- [8] Wainwright M, Maisch T, Nonell S, *et al.* Photoantimicrobials-are we afraid of the light?. *Lancet Infect Dis*, 2017, **17**(2): e49-e55
- [9] Villa K, Sopha H, Zelenka J, *et al.* Enzyme-photocatalyst tandem microrobot powered by urea for *Escherichia coli* biofilm eradication. *Small*, 2022, **18**(36): e2106612
- [10] Hamblin M R, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease?. *Photochem Photobiol Sci*, 2004, **3**(5): 436-450
- [11] Kasimova K R, Sadasivam M, Landi G, *et al.* Potentiation of photoinactivation of Gram-positive and Gram-negative bacteria mediated by six phenothiazinium dyes by addition of azide ion. *Photochem Photobiol Sci*, 2014, **13**(11): 1541-1548
- [12] Pereira Gonzales F, Maisch T. Photodynamic inactivation for controlling *Candida albicans* infections. *Fungal Biol*, 2012, **116**(1): 1-10
- [13] Costa L, Faustino M A F, Neves M G P M S, *et al.* Photodynamic inactivation of mammalian viruses and bacteriophages. *Viruses*, 2012, **4**(7): 1034-1074
- [14] Smith T G, Kain K C. Inactivation of *Plasmodium falciparum* by photodynamic excitation of heme-cycle intermediates derived from delta-aminolevulinic acid. *J Infect Dis*, 2004, **190**(1): 184-191
- [15] Ferro S, Coppelotti O, Roncucci G, *et al.* Photosensitized inactivation of *Acanthamoeba palestinensis* in the cystic stage. *J Appl Microbiol*, 2006, **101**(1): 206-212
- [16] Zerdin K, Horsham M A, Durham R, *et al.* Photodynamic inactivation of bacterial spores on the surface of a photoactive polymer. *React Funct Polym*, 2009, **69**(11): 821-827
- [17] Wei T, Yu Q, Chen H. Responsive and synergistic antibacterial coatings: fighting against bacteria in a smart and effective way. *Adv Healthc Mater*, 2019, **8**(3): e1801381
- [18] Ren Y, Liu H, Liu X, *et al.* Photoresponsive materials for antibacterial applications. *Cell Rep Phys Sci*, 2020, **1**(11): 100245
- [19] Maisch T. A new strategy to destroy antibiotic resistant microorganisms: antimicrobial photodynamic treatment. *Mini Rev Med Chem*, 2009, **9**(8): 974-983
- [20] Riani Y D, Matsuda T, Takemoto K, *et al.* Green monomeric photosensitizing fluorescent protein for photo-inducible protein inactivation and cell ablation. *BMC Biol*, 2018, **16**(1): 50
- [21] Jacobson K, Rajfur Z, Vitriol E, *et al.* Chromophore-assisted laser inactivation in cell biology. *Trends Cell Biol*, 2008, **18**(9): 443-450
- [22] Takemoto K, Iwanari H, Tada H, *et al.* Optical inactivation of synaptic AMPA receptors erases fear memory. *Nat Biotechnol*, 2017, **35**(1): 38-47
- [23] Marek K W, Davis G W. Transgenically encoded protein photoinactivation (FlAsH-FALI): acute inactivation of synaptotagmin I. *Neuron*, 2002, **36**(5): 805-813
- [24] Tour O, Meijer R M, Zacharias D A, *et al.* Genetically targeted chromophore-assisted light inactivation. *Nat Biotechnol*, 2003, **21**(12): 1505-1508
- [25] Takemoto K, Matsuda T, McDougall M, *et al.* Chromophore-assisted light inactivation of HaloTag fusion proteins labeled with eosin in living cells. *ACS Chem Biol*, 2011, **6**(5): 401-406
- [26] Wojtovich A P, Foster T H. Optogenetic control of ROS production. *Redox Biol*, 2014, **2**: 368-376
- [27] Trewin A J, Berry B J, Wei A Y, *et al.* Light-induced oxidant production by fluorescent proteins. *Free Radic Biol Med*, 2018, **128**: 157-164
- [28] Westberg M, Bregnhøj M, Banerjee C, *et al.* Exerting better control and specificity with singlet oxygen experiments in live mammalian cells. *Methods*, 2016, **109**: 81-91

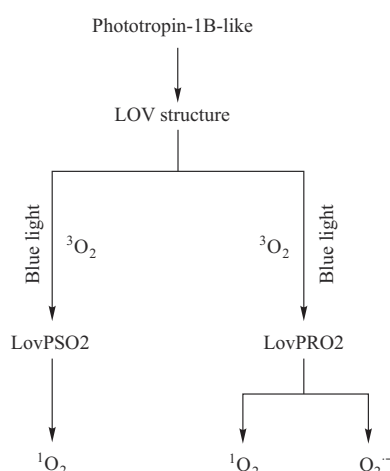
- [29] Westberg M, Bregnhøj M, Blázquez-Castro A, *et al.* Control of singlet oxygen production in experiments performed on single mammalian cells. *J Photochem Photobiol A Chem*, 2016, **321**: 297-308
- [30] Shu X, Lev-Ram V, Deerinck T J, *et al.* A genetically encoded tag for correlated light and electron microscopy of intact cells, tissues, and organisms. *PLoS Biol*, 2011, **9**(4): e1001041
- [31] Westberg M, Holmegaard L, Pimenta F M, *et al.* Rational design of an efficient, genetically encodable, protein-encased singlet oxygen photosensitizer. *J Am Chem Soc*, 2015, **137**(4): 1632-1642
- [32] Westberg M, Bregnhøj M, Etzerodt M, *et al.* No photon wasted: an efficient and selective singlet oxygen photosensitizing protein. *J Phys Chem B*, 2017, **121**(40): 9366-9371
- [33] Sha N, Xu S, Wan B, *et al.* Light-oxygen-voltage (LOV) domain-derived photosensitizers with the highest quantum yield for superoxide anion or singlet oxygen. *J Photochem Photobiol A Chem*, 2024, **452**: 115591
- [34] Gotthard G, Aumonier S, De Sanctis D, *et al.* Specific radiation damage is a lesser concern at room temperature. *IUCrJ*, 2019, **6**(Pt 4): 665-680
- [35] Guex N, Peitsch M C, Schwede T. Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: a historical perspective. *Electrophoresis*, 2009, **30**(Suppl 1): S162-S173
- [36] Arnold K, Bordoli L, Kopp J, *et al.* The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, 2006, **22**(2): 195-201
- [37] Zhang J, Wu X J, Wang Z B, *et al.* Fused-gene approach to photoswitchable and fluorescent biliproteins. *Angew Chem Int Ed*, 2010, **49**(32): 5456-5458
- [38] Ryumina A P, Serebrovskaya E O, Shirmanova M V, *et al.* Flavoprotein miniSOG as a genetically encoded photosensitizer for cancer cells. *Biochim Biophys Acta*, 2013, **1830**(11): 5059-5067
- [39] Mao C, Liu X, Zhang Y, *et al.* DHODH-mediated ferroptosis defence is a targetable vulnerability in cancer. *Nature*, 2021, **593**(7860): 586-590
- [40] Qu S, Jiao Z, Lu G, *et al.* PD-L1 lncRNA splice isoform promotes lung adenocarcinoma progression *via* enhancing c-Myc activity. *Genome Biol*, 2021, **22**(1): 104
- [41] 蔡渡江, 王联结. 基于电子效应的氨基酸分类与二级结构的倾向性分析. *安徽农业科学*, 2010, **38**(36): 20509-20510
Cai D J, Wang L J. *J Anhui Agric Sci*, 2010, **38**(36): 20509-20510
- [42] Westberg M, Bregnhøj M, Etzerodt M, *et al.* Temperature sensitive singlet oxygen photosensitization by LOV-derived fluorescent flavoproteins. *J Phys Chem B*, 2017, **121**(12): 2561-2574
- [43] Onukwufor J O, Trewin A J, Baran T M, *et al.* Quantification of reactive oxygen species production by the red fluorescent proteins KillerRed, SuperNova and mCherry. *Free Radic Biol Med*, 2020, **147**: 1-7
- [44] Gooran N, Kopra K. Fluorescence-based protein stability monitoring-a review. *Int J Mol Sci*, 2024, **25**(3): 1764
- [45] Mogensen D J, Westberg M, Breitenbach T, *et al.* Stable transfection of the singlet oxygen photosensitizing protein SOPP3: examining aspects of intracellular behavior. *Photochem Photobiol*, 2021, **97**(6): 1417-1430
- [46] de Menezes H D, Rodrigues G B, de Pádua Teixeira S, *et al.* *In vitro* photodynamic inactivation of plant-pathogenic fungi *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides* with novel phenothiazinium photosensitizers. *Appl Environ Microbiol*, 2014, **80**(5): 1623-1632
- [47] Arrojado C, Pereira C, Tomé J P C, *et al.* Applicability of photodynamic antimicrobial chemotherapy as an alternative to inactivate fish pathogenic bacteria in aquaculture systems. *Photochem Photobiol Sci*, 2011, **10**(10): 1691-1700
- [48] Almeida J, Tomé J P C, Neves M G P M S, *et al.* Photodynamic inactivation of multidrug-resistant bacteria in hospital wastewaters: influence of residual antibiotics. *Photochem Photobiol Sci*, 2014, **13**(4): 626-633
- [49] Meissner P E, Mandi G, Coulibaly B, *et al.* Methylene blue for malaria in Africa: results from a dose-finding study in combination with chloroquine. *Malar J*, 2006, **5**: 84
- [50] Felgenträger A, Maisch T, Späth A, *et al.* Singlet oxygen generation in porphyrin-doped polymeric surface coating enables antimicrobial effects on *Staphylococcus aureus*. *Phys Chem Chem Phys*, 2014, **16**(38): 20598-20607
- [51] McCoy C P, O'Neil E J, Cowley J F, *et al.* Photodynamic antimicrobial polymers for infection control. *PLoS One*, 2014, **9**(9): e108500

Cytotoxicity Studies of Light-oxygen-voltage (LOV) Domain Photosensitizers

XU Shuang*, WAN Ben*, SHA Na, ZHAO Kai-Hong**

(National Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Graphical abstract



Abstract Objective At present, the most commonly used photosensitizers in photodynamic therapy are still chemical photosensitizers, such as porphyrin and methylene blue, in order to specifically target cellular tissues, and thus poison cells, chemical photosensitizers need to use antibody conjugation or a transgenically encoded tag with affinity for the modified photosensitizing ligand, *e. g.* FIAsh, ReAsh or Halo Tag. Gene-encoded photosensitizers can directly poison cells by targeting specific cell compartments or organelles. However, currently developed gene-encoded photosensitizers have low reactive oxygen species production and low cytotoxicity, so it is necessary to continue to develop and obtain photosensitizers with higher reactive oxygen species production for the treatment of microbial infections and tumors. **Methods** In this study, we developed a photosensitizer LovPSO2 based on the light-oxygen-voltage (LOV) structural domain of phototropin-1B-like from *Oryza sativa japonica*. LovPSO2 was expressed in *E. coli* BL21(DE3) and purified to obtain protein samples, the purified protein samples were added 3 $\mu\text{mol/L}$ singlet oxygen probe of SOSG and 5 $\mu\text{mol/L}$ superoxide anion probe of DHE after fixed to $A_{445}=0.063\pm0.003$, respectively, then measured every 2 min of singlet oxygen production for 10 min and every 1 min of superoxide anion production for 5 min under blue light irradiation at 445 nm, 70 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. **Results** The results showed that LovPSO2 could produce a large amount of singlet oxygen under blue light irradiation at 445 nm, 70 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, and its singlet oxygen quantum yield

* These authors contributed equally to this work.

** Corresponding author.

Tel: 86-15927097949, E-mail: 2019304110102@webmail.hzau.edu.cn

Received: April 28, 2024 Accepted: September 6, 2024

was 0.61, but its superoxide anion yield was low, so in order to improve the superoxide anion yield of LovPSO2, a mutant with a relatively high superoxide anion yield was obtained by further development and design on its basis LovPRO2. The stability of proteins is crucial for research in drug development and drug delivery, among others. Temperature and light are the key factors affecting the production of reactive oxygen species (ROS) by photosensitive proteins and their stability, while the temperature in cell culture and mammals *in vivo* is about 37°C, and the temperature inside tumor cells is about 42–45°C. Therefore, we further analyzed the photostability of miniSOG, SOPP3, LovPSO2, and LovPRO2 and their thermostability at 37°C and 45°C. The analysis of proteins thermostability showed that LovPSO2 and LovPRO2 had better thermostability at 37°C and 45°C, respectively. Analysis of the photostability of the proteins showed that LovPRO2 had better photostability. In addition, to further determine the phototoxic effects of photosensitizers, LovPSO2 and LovPRO2 were expressed in *E. coli* BL21(DE3) and HeLa cells, respectively. The results showed that LovPSO2 and LovPRO2 had better phototoxicity to *E. coli* BL21(DE3) under blue light irradiation, and the cellular phototoxicity lethality was as high as 90% after 30 min of continuous light irradiation, but the phototoxicity was weaker in HeLa cells. The reason for this result may be that the intracellular environment exacerbated the photobleaching of FMN encapsulated by LovPSO2 and LovPRO2, respectively, which attenuated the damage of reactive oxygen species to animal cellular tissues, limiting its use as a mechanistic tool to study oxidative stress. **Conclusion** LovPSO2 and LovPRO2 can be used as antibacterial photosensitizers, which have broader application prospects in the food and medical fields.

Key words photosensitizer, reactive oxygen species, singlet oxygen, superoxide anion

DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0175

CSTR: 32369.14.pibb.20240175