

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.04.001

## • 基础研究 •

## 新型荧光探针 mMaple3 与 mEos3.2 应用于 Fsp27 介导脂滴融合的功能研究\*

黄超 郁苗 汪文敏 廖榕玉 徐俐 周林康<sup>△</sup>

(清华大学生命科学院 北京 100084)

**摘要 目的:** Fsp27 已经被证明定位在脂滴上并且介导脂滴融合与增大。为研究 Fsp27 介导脂滴融合的动态分子机制,我们构建了 Fsp27-mMaple3 和 Fsp27-mEos3.2 两种新型荧光探针的融合蛋白并研究其对脂滴融合的功能影响,进而为研发 Fsp27 相关生理功能的光学显像技术奠定基础。**方法:** 对照传统绿色荧光的融合蛋白 Fsp27-EGFP,在共聚焦显微镜下观察 Fsp27-mMaple3 和 Fsp27-mEos3.2 两种新型融合蛋白的亚细胞定位和介导脂滴融合的功能,并利用荧光漂白恢复术 (fluorescence recovery after photo-bleaching, FRAP) 以判断脂滴与脂滴之间是否存在脂质的交换。**结果:** 表达 Fsp27-mMaple3 和 Fsp27-mEos3.2 两种新型融合蛋白的细胞中脂滴显著增大;同时,融合蛋白皆集中在脂滴与脂滴的接触位点上,且中性脂的交换实验显示脂滴与脂滴之间可以相互连通。**结论:** 我们建构的两种新型荧光探针融合蛋白 Fsp27-mMaple3 和 Fsp27-mEos3.2 保持了 Fsp27 介导脂滴融合的功能,并为我们进一步研发新型的超分辨光学显像技术提供功能基础。

**关键词:** 脂滴; 荧光探针; 亚细胞定位; Fsp27**中图分类号:** Q593; Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2018)04-601-05

## Novel Fluorescent Probes mMaple3 and mEos3.2 for The Functional Study of Fsp27-mediated Lipid Droplet Fusion\*

HUANG Chao, YU Miao, WANG Wen-min, LIAO Rong-yu, XU Li, ZHOU Lin-kang<sup>△</sup>

(School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing, 100084, China)

**ABSTRACT Objective:** Fsp27 has been proved to be localized on lipid droplets (LDs) and mediates LD growth. To study the molecular mechanism of Fsp27-mediated LD fusion, here, we investigated the functional effect of two novel fluorescent probes, Fsp27-mMaple3 and Fsp27-mEos3.2, on LD fusion for the super-resolution imaging in physiological studies. **Methods:** In comparison with arecently used fluorescence fused-protein Fsp27-EGFP, we observed the subcellular localization of the two novel probes and the sizes of LDs under confocal microscopy; And, fluorescence recovery after photo-bleaching (FRAP) was used to examine the lipid exchange between lipid droplets. **Results:** LDs expressing Fsp27-mMaple3 and Fsp27-mEos3.2 in 3T3-L1 pre-adipocytes were significantly larger than that without expression of the two probes. The FRAP experiment confirmed the normal exchange between LDs expressing the two probes. **Conclusions:** The two probes we constructed exhibit their comparable abilities with wild type Fsp27 in LD fusion and growth, and the study provides a functional basis on development of super-resolution imaging.

**Key words:** Lipid droplet; Fluorescent probes; Subcellular localization; Fsp27**Chinese Library Classification(CLC):** Q593; Q78 **Document code:** A**Article ID:** 1673-6273(2018)04-601-05

## 前言

肥胖时,体内能量失衡<sup>[2]</sup>,过多的营养以脂肪的形式储存起来<sup>[1,2]</sup>。脂滴是细胞内储存能量的细胞器,在能量代谢的调节中起到重要作用<sup>[3,4]</sup>。CIDE 蛋白包括 Cidea、Cideb、Cidec(在小鼠中为 Fsp27),是一类和脂肪代谢密切相关的蛋白<sup>[5,6]</sup>。既往研究显示 Fsp27 能够定位在脂滴上,并且能够介导脂滴融合和大脂滴的形成<sup>[7]</sup>,Fsp27 缺失的细胞中脂滴明显变小。脂滴融合过程

中,Fsp27 蛋白的组装分布与动态行为仍然不清楚<sup>[8]</sup>。近几年,超高分辨率技术 (stochastic optical reconstruction microscopy, STORM)在观察细胞显微结构方面应用越来越多<sup>[9,10]</sup>。相比于传统的荧光蛋白技术,其可以提高拍摄影像的空间分辨率<sup>[12]</sup>,而且可以很好地观测活细胞从而对细胞内的分子进行追踪或者定量研究,可以大大提升观测影像的空间与时间解析能力<sup>[12]</sup>。因此,我们拟利用超分辨荧光显微技术来研究脂滴融合过程中以及完成后 Fsp27 的动态行为<sup>[11]</sup>。

\* 基金项目:中国博士后科学基金项目(2013T60103,2012M520249);周林康博士受中国科协 2016-2018 年度青年人才托举计划的支持

作者简介:黄超(1989-),男,硕士研究生,主要研究方向:生物学,电话:010-62797133, E-mail: hcqqiop222@163.com

<sup>△</sup> 通讯作者:周林康,男,博士,助理研究员,主要研究方向:生物学,电话:010-62797133, E-mail: zhoulinkang@mail.tsinghua.edu.cn

(收稿日期:2017-06-12 接受日期:2017-06-30)

超分辨技术需要用到特殊的光转换荧光蛋白 mMaple3 和 mEos3.2, 这两类光转换荧光蛋白拥有闪烁特性<sup>[13]</sup>, 可以通过多次的闪烁 - 熄灭实现定位<sup>[14]</sup>。我们拟构建 Fsp27-mMaple3 和 Fsp27-mEos3.2 的融合蛋白, 通过 mMaple3 和 mEos3.2 蛋白的定位来显示 Fsp27 的蛋白定位。利用这两种荧光蛋白的光学特性, 我们可以观察到更精确的 Fsp27 的亚细胞定位<sup>[15]</sup>, 为 Fsp27 的研究乃至其他重要蛋白的研究提供一种新型的技术方案<sup>[13]</sup>。本研究主要关注 Fsp27-mMaple3 和 Fsp27-mEos3.2 融合蛋白的功能, 观察其融合蛋白是否保持 Fsp27 本身促进脂滴融合的功能? 包括融合蛋白在细胞内的定位, 是否能像 Fsp27 蛋白一样促进脂滴的增大? 为进一步通过荧光漂白恢复术(fluorescence recovery after photo-bleaching, FRAP) 证明这种新型的荧光蛋白融合 Fsp27 能否介导脂滴与脂滴之间的脂滴交换。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

HEK293T 细胞系和 3T3-L1 前脂肪细胞系购自美国的 ATCC 公司。DMEM 细胞培养基, 转染试剂 Lipofectamine2000, 带有荧光标记的二抗购自 Invitrogen 公司。识别 Fsp27 的一抗由本实验室自制。Bodipy C12 购自 Molecular Probes 公司。无脂肪酸的 BSA 购自 Sigma 公司。油酸(Oleic Acid)购自 Sigma 公司。BodipyC12 购自 Thermo Fisher Scientific 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 质粒构建** pFsp27-EGFP-N1 质粒由本实验前期构建, 是表达 Fsp27 全长的质粒。将 pFsp27-EGFP-N1 中的 EGFP 对应序列用合适的限制性内切酶切去, 将 mMaple3 和 mEos3.2 表达载体中编码这两个荧光蛋白的序列并分别克隆到切好的载体中, 得到 pFsp27-mMaple3-N1 和 pFsp27-mEos3.2-N1。构建好的质粒已通过测序来保证序列的准确性。pmMaple3-N1 和 pmEos3.2-N1 质粒来自于北京大学生物动态光学成像中心孙育杰实验室。

**1.2.2 细胞培养和转染** HEK293T 细胞在含有 10% 四季青胎牛血清的 DMEM 培养基中培养, 5% CO<sub>2</sub>, 湿度 80%; 3T3-L1 细胞在含有 10% Gibco 胎牛血清的 DMEM 中培养, 5% CO<sub>2</sub>, 湿度 80%。HEK293T 和 3T3-L1 细胞均采用转染试剂 Lipofectamine2000 转染, 转染操作按照说明书。当细胞密度达到 70%-80% 时进行转染, 分别在两个干净的 EP 管中加入 100 μL 的 opti-MEM, 其中一个加入适量的质粒, 另一个加入 2 倍质粒体积的 Lipofectamine2000, 轻轻摇匀后, 在室温静置 5 分钟, 然后将两个 EP 管中的液体放在一起, 并且轻轻混匀, 在室温静置 15 分钟。待转染细胞则更换为 opti-MEM 培养基, 将混合后的溶液逐滴均匀地加入细胞中, 4 个小时后, 将培养基换位普通的培养基, 20 小时后收取细胞。

**1.2.3 免疫荧光固定** 用 PBS 缓冲液将需要固定的细胞清洗 2~3 遍, 加入 4% 多聚甲醛室温下固定 30 分钟, 然后用 PBS 缓冲液清洗 3 遍。细胞预先在含有玻璃底的培养皿中或者载玻片上培养。

**1.2.4 Fluorescence Recovery After Photo-bleaching (FRAP) 实验** 在带有玻璃底的培养皿中培养 3T3-L1 细胞, 并转染 1 μg 的 pFsp27-EGFP-N1 质粒, 转染方法同之前的转染。同时在换液

时, 需要在新鲜的 DMEM 中加入适量的油酸, 终浓度是 100 μM 和适量的 Bodipy C12, 最终浓度是 1 μg/mL。在拍摄前, 提前 1 h 将多余的 Bodipy C12 洗去, 并换上新鲜的培养基, 待细胞适应后方可进行拍摄。选择其中的较小的脂滴进行荧光淬灭, 用高强度的激光照射小脂滴的某个区域, 同时记录下脂滴中荧光强度的变化, 拍摄周期为 50 s, 每组细胞进行 3 次循环。

### 1.3 统计学分析

两组数据的差异显著性将利用双尾 Student's T test 进行比较, 以 P 值小于 0.05 代表差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 构建 pFsp27-mMaple3-N1 和 pFsp27-mEos3.2-N1 质粒以及酶切鉴定

将 pFsp27-EGFP-N1 中的 EGFP 对应序列用合适的限制性内切酶切去, 将 mMaple3 和 mEos3.2 表达载体中编码这两个荧光蛋白的序列分别克隆到切好的载体中, 插入的酶切位点分别是 BamH1 和 Not1。mMaple3 的编码序列大小为 711 bp, mEos3.2 的编码序列大小为 630 bp。pFsp27-mMaple3-N1 和 pFsp27-mEos3.2-N1 均用双酶切来鉴定, 所选的限制性内切酶为 BamH1 和 Not1。BamH1 位于 mMaple3 和 mEos3.2 编码序列的 5' 端, 而 Not1 则位于 3' 端。酶切的结果显示, 这两个质粒被酶切后分别有一条约 800 和 600 的条带, 说明 mMaple3 和 mEos3.2 确实已经克隆到表达载体中, 如图 1 所示。

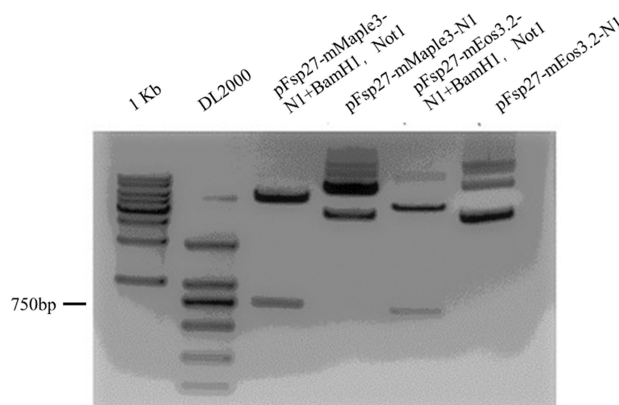


图 1 pFsp27-mMaple3-N1 和 pFsp27-mEos3.2-N1 的酶切鉴定

Fig.1 Double restriction enzyme digestions of pFsp27-mMaple3-N1 and pFsp27-mEos3.2-N1

### 2.2 重组质粒在 HEK293T 中的表达情况

将构建好的质粒转染入 HEK293T 细胞中, 通过检测 Fsp27 蛋白的表达来检测这两个质粒是否能够表达。pFsp27-mMaple3-N1, pFsp27-mEos3.2-N1 和 pFsp27-EGFP-N1 都转入 1 μg。对照组(NC)不转染质粒。对应的 western blot 的结果如图 2 所示, 利用 Fsp27 的抗体能够在转染 Fsp27-mMaple3, Fsp27-mEos3.2 和 Fsp27-GFP 的组检测到条带, 说明在这三组都有融合蛋白的表达, 其分子量在 55KD 处。

### 2.3 Fsp27-mMaple3 和 Fsp27-mEos3.2 可以促进脂滴增大并且定位在脂滴上

本实验室之前的研究显示 Fsp27 可以定位在脂滴上, 并且在脂滴 - 脂滴的结合部上富集, 促进脂滴的融合和大脂滴的形

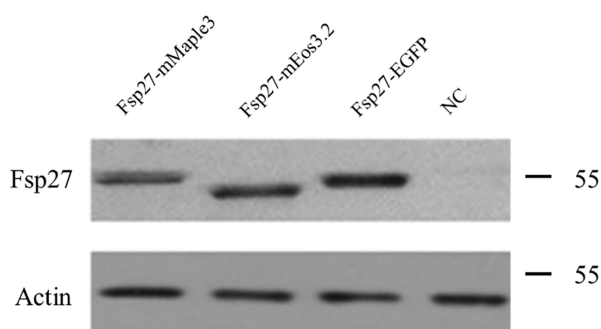


图2 Fsp27-mMaple3 和 Fsp27-mEos3.2 在 293T 细胞中的表达量  
Fig.2 Expression levels of Fsp27-mMaple3 and Fsp27-mEos3.2 in 293T cells, Actin was used as a loading control

成。Fsp27-EGFP 融合蛋白也已经被证明能够促进脂滴的融合,说明 GFP 并不会影响 Fsp27 促进脂滴融合的功能。在 3T3-L1 细胞中转入 1  $\mu$ g pFsp27-EGFP-N1、pFsp27-mMaple3-N1 和 pFsp27-mEos3.2-N1,另一组不转入质粒。如图 3 所示,在不转入重组质粒的情况下,细胞中的脂滴较多,大部分都是一些较小的脂滴。在分别转入 pFsp27-EGFP-N1、pFsp27-mMaple3-N1 和 pFsp27-mEos3.2-N1 的三组细胞中,细胞内脂滴数量变少,脂滴大小明显变大。和之前的研究类似<sup>[7]</sup>,Fsp27-GFP 融合蛋白能够定位于脂滴上,并且在脂滴-脂滴接触点富集。我们发现 Fsp27-mMaple3 和 Fsp27-mEos3.2 融合蛋白也能够定位于脂滴上,在脂滴-脂滴接触点也有富集。这说明 Fsp27-mMaple3 和 Fsp27-mEos3.2 融合蛋白具有促进脂滴融合的功能,mMaple3 和 mEos3.2 蛋白并不会影响 Fsp27 蛋白脂滴融合的功能。

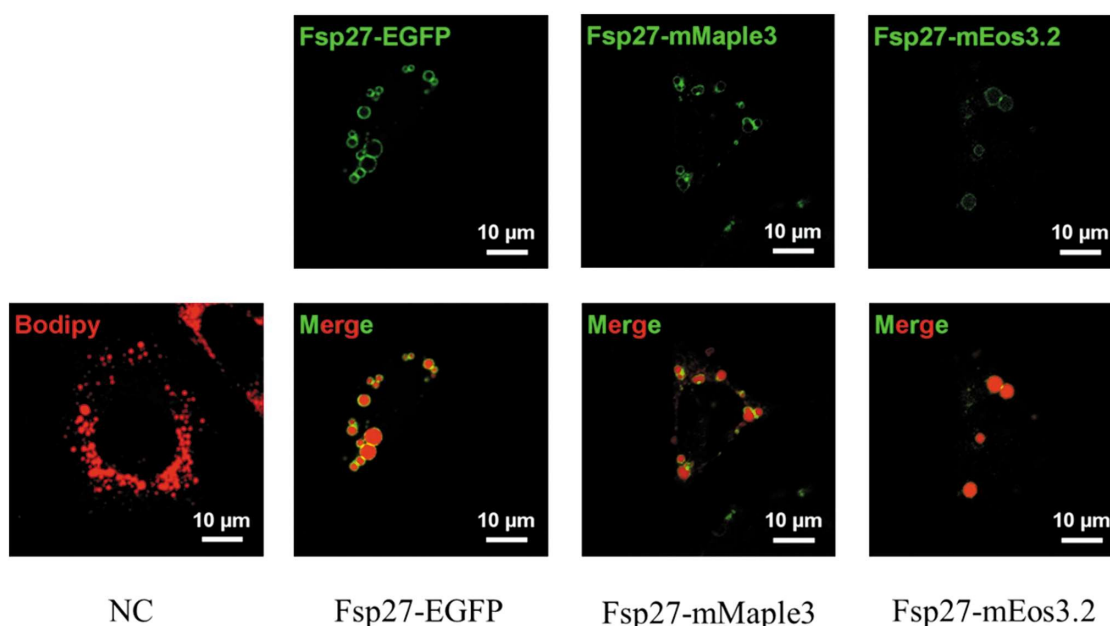


图3 Fsp27-EGFP, Fsp27-mMaple3 和 Fsp27-mEos3.2 的脂滴定位

Fig.3 The localizations of Fsp27-EGFP, Fsp27-mMaple3 and Fsp27-mEos3.2 in 3T3L1 preadipocytes.

## 2.4 Fsp27-mMaple3 和 Fsp27-mEos3.2 可以促进脂滴间脂质的交换

在脂滴与脂滴结合部位,Fsp27 会聚集形成脂滴接触位点(Lipid droplet contact site, LDCS)。小脂滴中的中性脂通过接触位点流向大脂滴中,最终形成一个大脂滴。融合是一个非常缓慢的过程,整个过程需要 2 小时或是更长的时间完成。Fsp27-mMaple3 和 Fsp27-mEos3.2 在上一章已经被证明能够在细胞中形成大脂滴。荧光漂白恢复实验通常用来证明膜的流动性和蛋白的扩散速率。这里我们运用荧光漂白恢复实验来验证两个脂滴之间的中性脂是可以相互流通的。本实验室之前的工作已经验证了 Fsp27 在形成脂滴接触位点时,可以使得两个脂滴保持连通<sup>[7]</sup>。在本实验中,在转入 Fsp27-mMaple3 质粒后,Fsp27-mMaple3 融合蛋白定位在脂滴上,在荧光漂白相邻脂滴中较小的一个时,发现小脂滴明显的变暗了,然后每隔一段时间,小脂滴的亮度慢慢升高,而大脂滴的亮度则逐渐下降(如图 4),说明两个脂滴之间是连通的,脂滴中的中性脂可以进行交换。该实验证明 Fsp27-mMaple3 融合蛋白也具有促进中性脂流通的功能。

## 2.5 Fsp27-mMaple3 介导脂交换的动力学分析

Fsp27-mMaple3 可以介导脂滴间脂质的交换,因此若测量了中性脂的交换速率我们可以进一步估算出交换时的孔径大小,为此我们选取了 44 对带有 Fsp27-EGFP 的脂滴和 37 对带有 Fsp27-mMaple3 的脂滴(图 5)。用 ImageJ 测量每一个脂滴中红色的亮度,代表了中性脂的含量,并测量每一个脂滴的直径得到脂滴的体积。从而得到脂交换的速率和孔径的大小。之前的实验已经证明了外源的 Fsp27-EGFP 有着内源 Fsp27 同样的功能。实验结果显示,转染了 Fsp27-mMaple3 和 Fsp27-EGFP 细胞中,脂交换的速率和孔洞的大小并没有发生太大的变化( $P > 0.05$ )(如图 5),进一步证明了 Fsp27-mMaple3 也保持了 Fsp27 原有的功能。

## 3 讨论

Fsp27 作为一个新的脂滴结合蛋白,近十年来受到了越来越多的关注<sup>[16-18]</sup>。2008 年,同时有两篇文章报道了 Fsp27 缺失小鼠的表型。Fsp27 缺失小鼠白色组织脂肪明显减少,胰岛素敏感

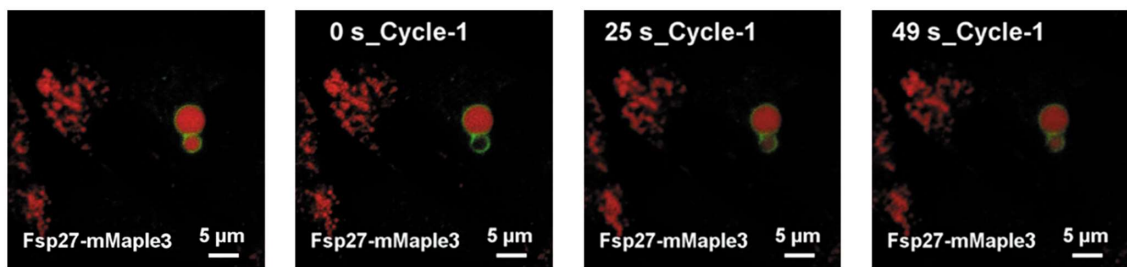


图4 Fsp27-mMaple3 的FRAP 实验检验成对脂滴的中性脂交换

Fig.4 The FRAP assay of Fsp27-mMaple3 for exchange of neutral lipids between a pair of lipid droplets

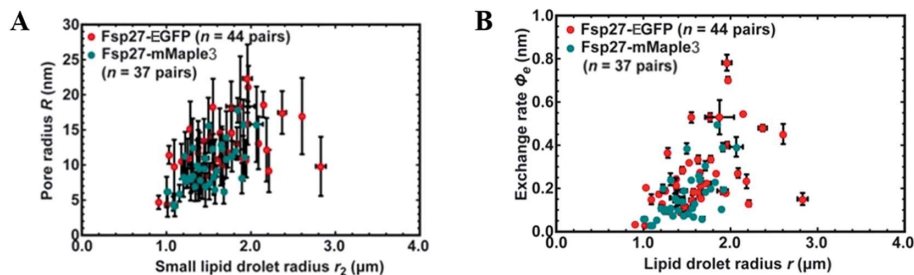


图5 Fsp27-mMaple3 介导两脂滴间的中性脂交换速率与孔径大小估算

(A)Fsp27-mMaple3 介导两脂滴间的脂交换速率。(B)Fsp27-mMaple3 形成的孔洞大小

Fig.5 The exchange rate and pore size of Fsp27-mMaple3-mediated lipid droplet fusion

(A)Exchange rates of neutral lipids between lipid droplets

(B)Pore sizes of Fsp27-mMaple3-composed complexes

性增强,脂肪细胞内线粒体活性增高,小鼠有较高的代谢速率<sup>[19,20]</sup>。白色脂肪组织是储存脂类的重要器官,而白色脂肪细胞的一个典型特征是细胞内有一个体积巨大的脂滴。脂滴几乎占据了白色脂肪细胞 90%以上的体积,细胞核和少量的内质网被挤到细胞边缘。而 Fsp27 缺失后,白色脂肪细胞内脂滴的数目明显增多,可达 200 多个。虽然 Perilipin, seipin, lipin 基因敲除的小鼠也表现出脂肪组织变少<sup>[21-23]</sup>,脂肪细胞也变小,但是其都没有表现出细胞内脂滴数目的增多的现象。后续的细胞生物学研究显示 Fsp27 定位于脂滴表面,其在脂滴的融合中起到重要作用。Fsp27 能够富集在脂滴-脂滴接触点,推测其可能形成了一个中性脂流通的通道,同时也鉴定出 Perilipin, Rab8a 等蛋白质和 Fsp27 相互作用<sup>[24]</sup>,这些蛋白质形成蛋白复合物来调控脂滴的融合。Fsp27 究竟是如何形成孔径的,包括孔径的大小都不得而知。解析 Fsp27 的结构将可以回答这些问题,但是 Fsp27 是膜蛋白,比较难形成均一的晶体。因此,我们拟利用超高分辨率技术来观察 Fsp27 形成的孔径的大小以及其在融合过程中的动态变化。

标签蛋白如 GFP、GST、His、Flag、HA 等的利用在生物学的研究中起到了重要作用,但不可忽视的是标签蛋白的加入可能会影响蛋白质的功能。Fsp27 蛋白有两个结构域,N 端结构域(1-135aa)可以形成二聚体,C 端(136-219)结构域是跨膜结构域<sup>[25]</sup>。我们之前的研究显示将标签蛋白如 Flag、HA 放到 Fsp27 蛋白的 N 端所形成的融合蛋白丧失了 Fsp27 促进脂滴融合的功能。而将标签蛋白如 HA、GFP 放到 Fsp27 蛋白的 C 端,则保持了 Fsp27 促进脂滴融合的功能。以 Fsp27-EGFP 融合蛋白作为参照,我们构建重组质粒 pFsp27-mMaple3-N1 和 pFsp27-mEos3.2-N1,然后研究 mMaple3 和 mEos3.2 是否会对

Fsp27 促进脂滴融合的功能产生影响,通过实验证明新的荧光探针同样能够发挥原来 Fsp27 的功能。当转入重组质粒并且表达的时候,细胞中的脂滴会明显增大,而且数量会减少,与 Fsp27-EGFP 进行比较可以看出他们在促进脂滴增大的功能上并没有太大的变化。在重组蛋白的亚细胞定位上,将他们与 Fsp27-EGFP 也做了进一步的比较,结果是 Fsp27-mMaple3 和 Fsp27-mEos3.2 也都会聚集在脂滴与脂滴的结合部位,并且能够很好的定位在脂滴上,尤其是在脂滴结合部位,进而促进脂滴的融合,形成大脂滴,说明 Fsp27 促进脂滴融合的功能并未受到中两个荧光蛋白的影响。

除了从直观的角度看到脂滴增大的现象,我们进一步从动力学的角度比较了 Fsp27-EGFP 和 Fsp27-mMaple3 所形成的孔径对中性脂交换速率的影响,结果显示两者并没有明显的差异。既往研究已证明 Fsp27 会在脂滴与脂滴结合部位富集,如果要进行融合,还要将两个脂滴连通起来,我们通过荧光漂白恢复术实验来验证脂滴是连通的,其中的中性脂可以相互交换。同样,我们用 Fsp27-EGFP 作为参照,Fsp27-mMaple3 和 Fsp27-mEos3.2 转染的细胞中都可以观察到中性脂相互交换的现象,说明他们仍然保持了原有 Fsp27 的功能,改变了膜的结构,使得接触的脂滴连通起来,进而进行中性脂的交换,并促进脂滴的融合。另一方面,Fsp27 的 CIDE-N 端结构域被证明会与 Perilipin1(Plin1)相互作用,而 Plin1 作为激活因子能加强了原本 Fsp27 的功能<sup>[6,26]</sup>,我们未来也将进一步探究 Fsp27-mMaple3 是否仍保持这一特性,检查是否 Fsp27-mMaple3 并没有影响 CIDE-N 结构域的发挥。

mMaple3 和 mEos3.2 这两种新的荧光探针对 Fsp27 的脂滴融合功能已充分研究,我们可以利用这两种荧光蛋白的光学

性质来完成一些传统绿色荧光蛋白 GFP 不能完成的空间超分辨定位实验<sup>[27,28]</sup>,为我们进一步了解 Fsp27 乃至其他重要的蛋白提供了一种可靠的方法<sup>[29]</sup>。此外,我们不仅要关注 Fsp27 所起的作用,例如 Plin1 等其他脂滴相关蛋白也是参与整个脂滴融合过程并确保融合正常运行。已有的研究表明,Fsp27 可以介导脂滴间形成中性脂转移的孔径,而 Plin1 的存在可以大大的增加中性脂转移的效率<sup>[30]</sup>,是否 Plin1 是直接影响孔径进一步增大的原因或同时影响脂滴的表面张力将是未来研究的重点之一。同样,研究 Plin1 在脂滴上的分布与 Fsp27 结合的动态行为,这两种新型的荧光探针 mMaple3 和 mEos3.2 也可以在将来用来解决这方面的问题。

#### 参考文献(References)

- [1] Crino M, Sacks G, Vandevijvere S, et al. The Influence on Population Weight Gain and Obesity of the Macronutrient Composition and Energy Density of the Food Supply [J]. *Current obesity reports*, 2015, 4: 1-10
- [2] Allison KR, Irving HM, Adlaf EM, et al. Ten-year trends in overweight/obesity among Ontario middle and high school students and their use in establishing baseline measures for government reduction targets [J]. *Canadian journal of public health*, 2016, 106: e514-519
- [3] McVicker BL, Rasineni K, Tuma DJ, et al. Lipid droplet accumulation and impaired fat efflux in polarized hepatic cells: consequences of ethanol metabolism [J]. *International journal of hepatology*, 2012, 2012: 978136
- [4] Xu X, Park JG, So JS, et al. Transcriptional activation of Fsp27 by the liver-enriched transcription factor CREBH promotes lipid droplet growth and hepatic steatosis[J]. *Hepatology*, 2015, 61: 857-869
- [5] Langhi C, Baldan A. CIDE/CSP27 is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and plays a critical role in fasting-and diet-induced hepatosteatosis [J]. *Hepatology*, 2015, 61: 1227-1238
- [6] Park HH. Structural insight into CIDE domains: the Janus face of CIDEs [J]. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 2015, 20: 240-249
- [7] Gong J, Sun Z, Wu L, et al. Fsp27 promotes lipid droplet growth by lipid exchange and transfer at lipid droplet contact sites [J]. *The Journal of cell biology*, 2011, 195: 953-963
- [8] Pol A, Gross SP, Parton RG. Review: biogenesis of the multifunctional lipid droplet: lipids, proteins, and sites [J]. *The Journal of cell biology*, 2014, 204: 635-646
- [9] Huang B, Babcock H, Zhuang X. Breaking the diffraction barrier: super-resolution imaging of cells[J]. *Cell*, 2010, 143: 1047-1058
- [10] Jungst C, Klein M, Zumbusch, A. Long-term live cell microscopy studies of lipid droplet fusion dynamics in adipocytes [J]. *Journal of lipid research*, 2013, 54: 3419-3429
- [11] Sun Z, Gong J, Wu L, et al. Imaging lipid droplet fusion and growth [J]. *Methods in cell biology*, 2013, 116: 253-268
- [12] Gu M, Kang H, Li X. Breaking the diffraction-limited resolution barrier in fiber-optical two-photon fluorescence endoscopy by an azimuthally-polarized beam[J]. *Scientific reports*, 2014, 4: 3627
- [13] Kuang C, Li S, Liu W, et al. Breaking the diffraction barrier using fluorescence emission difference microscopy [J]. *Scientific reports*, 2013, 3: 1441
- [14] Sun Q, Sun D, Song L, et al. Highly Selective Fluorescent Turn-On Probe for Protein Thiols in Biotin Receptor-Positive Cancer Cells[J]. *Analytical chemistry*, 2016, 88: 3400-3405
- [15] Dave K, Gelman H, Thu CT, et al. The Effect of Fluorescent Protein Tags on Phosphoglycerate Kinase Stability Is Nonadditive [J]. *The journal of physical chemistry. B*, 2016, 120: 2878-2885
- [16] Xu L, Zhou L, Li P. CIDE proteins and lipid metabolism [J]. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 2012, 32: 1094-1098
- [17] Xu W, Wu L, Yu M, et al. Differential Roles of Cell Death-inducing DNA Fragmentation Factor-alpha-like Effector (CIDE) Proteins in Promoting Lipid Droplet Fusion and Growth in Subpopulations of Hepatocytes[J]. *The Journal of biological chemistry*, 2016, 291: 4282-4293
- [18] Qian, H., Chen, Y., Nian, Z. et al. HDAC6-mediated acetylation of lipid droplet-binding protein CIDEc regulates fat-induced lipid storage[J]. *The Journal of clinical investigation*, 2017, 127: 1353-1369
- [19] Toh SY, Gong J, Du G, et al. Up-regulation of mitochondrial activity and acquirement of brown adipose tissue-like property in the white adipose tissue of fsp27 deficient mice[J]. *PloS one*, 2008, 3: e2890
- [20] Nishino N, Tamori Y, Tateya S, et al. FSP27 contributes to efficient energy storage in murine white adipocytes by promoting the formation of unilocular lipid droplets [J].*The Journal of clinical investigation*, 2008, 118: 2808-2821
- [21] Cui X, Wang Y, Tang Y, et al. Seipin ablation in mice results in severe generalized lipodystrophy [J]. *Human molecular genetics*, 2011, 20: 3022-3030
- [22] Reue K, Dwyer JR. Lipin proteins and metabolic homeostasis [J]. *Journal of lipid research*, 2009, 50(Suppl): S109-114
- [23] Krahmer N, Farese RV, Jr Walther TC. Balancing the fat: lipid droplets and human disease [J]. *EMBO molecular medicine*, 2013, 5: 973-983
- [24] Wu L, Xu D, Zhou L, et al. Rab8a-AS160-MSS4 regulatory circuit controls lipid droplet fusion and growth[J]. *Developmental cell*, 2014, 30: 378-393
- [25] Wu C, Zhang Y, Sun Z, et al. Molecular evolution of Cide family proteins: novel domain formation in early vertebrates and the subsequent divergence[J]. *BMC evolutionary biology*, 2008, 8: 159
- [26] Min J, Zhang W, Gu Y, et al. CIDE-3 interacts with lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor, and overexpression increases apoptosis in hepatocellular carcinoma[J]. *Medical oncology*, 2011, 28(Suppl 1): S219-227
- [27] Hirata T, Terai, T., Yamamura, H. et al. Protein-Coupled Fluorescent Probe To Visualize Potassium Ion Transition on Cellular Membranes [J]. *Analytical chemistry*, 2016, 88: 2693-2700
- [28] Charest-Morin X, Marceau F. Biotechnological Fluorescent Ligands of the Bradykinin B1 Receptor: Protein Ligands for a Peptide Receptor[J]. *PloS one*, 2016, 11: e0148246
- [29] Albers JJ, Vuletich S, Cheung MC. Role of plasma phospholipid transfer protein in lipid and lipoprotein metabolism[J]. *Biochimica et biophysica acta*, 2012, 1821: 345-357
- [30] Sun Z, Gong J, Wu H, et al. Perilipin1 promotes unilocular lipid droplet formation through the activation of Fsp27 in adipocytes [J]. *Nature communications*, 2013, 4: 1594