

# 绿色荧光蛋白——发现、表达和发展

Måns Ehrenberg

(Department of Cell and Molecular Biology, BMC, Uppsala University, Sweden)

罗文新, 夏宁邵 (译)

(厦门大学国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心)

由于在发现和研究绿色荧光蛋白方面做出的贡献, 日本科学家下村修 (Qsamu Shimomura)、美国科学家马丁·沙尔菲 (Martin Chalfie) 和美籍华裔科学家钱永健 (Roser Y Tsien) 共同获得了 2008 年度的诺贝尔化学奖。

20 世纪期间, 生物化学成为探索活体细胞合成代谢、分解代谢基本原理的主要手段。20 世纪也见证了一场进步和变革: 我们能够了解各种酶的功能, 并通过晶体学及核磁共振从原子层面揭示蛋白质的结构。20 世纪后半叶, 基于飞速发展的各种生物的全基因组序列测定, 传统遗传学和核酸化学融入了现代基因组学中。生物信息学及其他辅助技术推动了这一遗传学革命, 并波及生物科学的各个领域, 对医学、制药学和生态学都产生了实际的影响。然而, 不论是生物化学或者遗传学的革命都未能提供一种实验工具, 用以定量并在实验中从时间、空间上精确地监控分子水平的胞内或胞外过程, 从而确定所有活体系统的动态行为。为获得这些认识, 实验方面及概念上的新工具必不可少。如今, 在 21 世纪初, 分离自维多利亚多管水母的绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP), 以及分离自其它生物体的类似蛋白或者经改造获得的突变体构成的“GFP 家族”蛋白, 使这一工具得到飞速发展。

这些 GFP 类似蛋白可以用于在空间和时间上监控活细胞和生物体内的大量生物现象, 例如基因表达、蛋白质定位和动力学、蛋白质相互作用、细胞分化、染色体复制和调控、细胞内转运途径、细胞器的遗传和发生等, 不胜枚举。而且, 单个 GFP 荧光成像的空间分辨率高于衍射极限。许多反映 pH 值、钙离子浓度及活细胞内重要特征的传感器也来自 GFP 类似蛋白的工程改造。

GFP 带来的技术革命主要源自荧光发色基团

的神奇特性。在 GFP 一级结构中的一个三肽基序自发形成该发色基团, 在表达 GFP 的各种生物体中, 荧光可以自发产生。换言之, GFP 中基于三肽的发色基团的成熟需要的只是氧分子, 无需任何酶和辅助因子的存在。因此, GFP 及其变体提供了通用的遗传标签, 可以在各种活体系统中观察大量的时空过程。GFP 给生物科学带来的变革也大大加快了定量光学显微镜、电子学、计算科学和用系统生物学方法研究细胞内外生物过程的分子建模的发展。

下面, 将从六个方面进行介绍: 1) 来自维多利亚多管水母 GFP 的基本特征; 2) 来自其他生物体的天然相关蛋白及 GFP 家族成员突变体的基本特征; 3) GFP 类似蛋白产生重要影响的一些科学领域; 4) GFP 蛋白的发现; 5) GFP 蛋白可以在其他非维多利亚多管水母中表达并产生荧光的验证; 6) GFP 家族成员突变体的设计及其成为用于活体系统时空过程检测的通用工具。后面三部分与获得 2008 年诺贝尔奖直接相关。

## 1 GFP 蛋白的性质及其荧光发色基团

来自维多利亚多管水母的天然绿色荧光蛋白 (GFP), 最先由 Morin 和 Hastings 命名, 它包含 238 个氨基酸。GFP 序列中的 65~67 位残基 (Ser-Tyr-Gly) 自发形成荧光发色基团——对羟基苯咪唑啉酮 (图 1)。

GFP 的激发光谱在 400 nm 处有一主要激发峰, 在 470 nm 处有一次要激发峰, 发射光谱在 505 nm 处有一尖锐的主要发射峰, 在 540 nm 处有一肩峰 (图 2)。

该文素材摘自 <http://nobelprize.org>

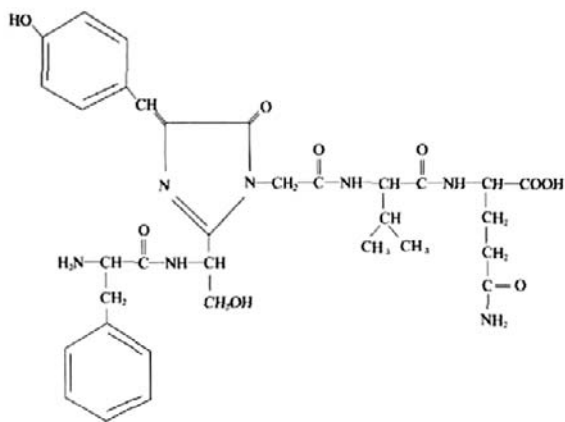


图 1 GFP 一级结构中第 65 ~67 位氨基酸残基 (Ser-Tyr-Gly) 形成的荧光发色基团 (Cody CW, et al. Biochemistry, 1993,32(5):1212~1218)

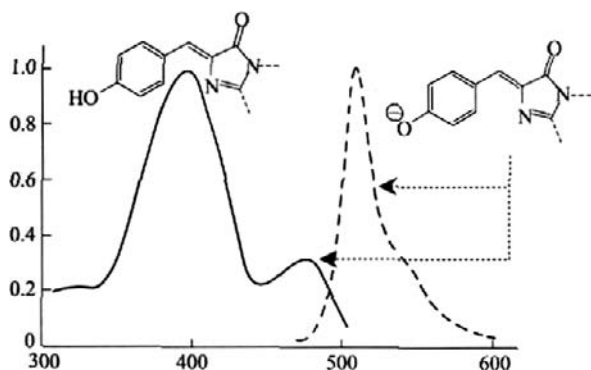


图 2 来自维多利亚多管水母的天然 GFP 的荧光激发光谱 (实线) 和发射光谱 (虚线) (Tsien R. Annu Rev Biochem, 1998,67:509~544)

GFP的晶体结构是 11 个  $\beta$ - 折叠组成的桶状结构，在桶中央有一个  $\alpha$ - 螺旋 (图 3)。发色基团在  $\alpha$ - 螺旋上，非常靠近桶的中心 (图 1，图 3)。蛋白的一级结构大部分用来形成  $\beta$ - 折叠和  $\alpha$ - 螺旋。



图 3 GFP 的四级结构。桶状结构中央为带有发色基团的  $\alpha$ -螺旋

在 N 端和 C 端可以去除几个氨基酸残基而仍然保留 GFP 的发光特征，N 端最多可去掉 2 个，C 端为 6 个。两端的氨基酸残基无序，因而在图 3 的结构中未被解出。

在无折叠或变性的 GFP 蛋白中，Ser65-Tyr66-Gly67 三肽没有显著特征 (图 4，上)。但是当 GFP 折叠成天然构象时，这三个氨基酸形成了一个急弯 (图 4，中左)，使 Gly67 的氨基对 Ser65 羰基的亲核攻击，通过环化 (图 4，中右) 和失水 (图 4，下左) 作用形成咪唑啉酮。此时，GFP 不发荧光。但是当氧分子存在时，66 位氨基酸残基的  $\alpha$ - $\beta$  键会发生脱氢现象，并与咪唑啉酮结合 (图 4，下右)，从而使 GFP 的发色基团成熟成发光形式。

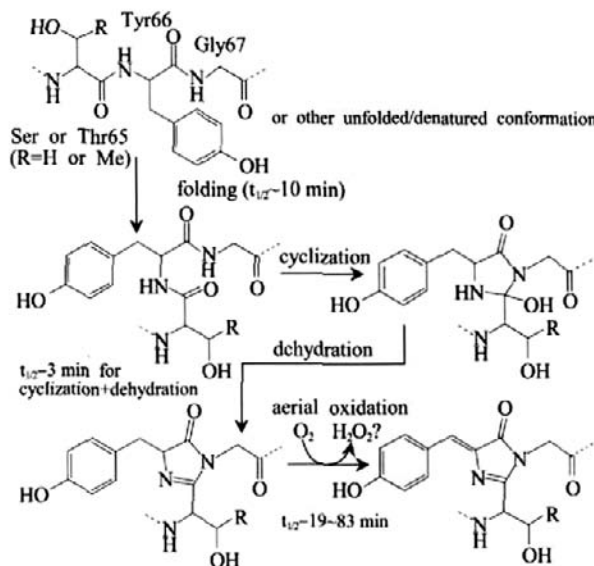


图 4 在分子氧存在时，GFP 天然构象中的 Ser65-Tyr66-Gly67 三肽基序自发形成其发色基团的化学反应步骤

GFP 蛋白没有毒性，在不同的生物中都能高水平表达且不影响其生理机能。当 GFP 基因与目的蛋白基因融合并在生物体内表达时，目的蛋白仍保持正常活性，且 GFP 能够保持其荧光，所以借助显微镜监测 GFP 荧光，就可以跟踪目的蛋白的定位、移动及其它活动。总之，来自维多利亚多管水母 GFP 的这些显著特征，使其能够用于活体细胞内动态过程的分子水平研究。

现在有很多新的 GFP 突变体出现，与来自维多利亚多管水母的 GFP 相比，它们具有改善或互补的特性，下一部分将对其中一些进行讨论。

## 2 GFP 家族及其突变体

从其在生命科学的应用前景来看, GFP 在某些方面的功能非常突出。这包括: 1) 分子亮度, 为最大激发波长 (图 1) 下的消光系数和量子产率的乘积, 即发色基团的电偶极子受到激发后产生光子而不是热量, 从而回到其基态; 2) 分子的光稳定性, 即在荧光消失之前, 发色基团发射光子的平均数量, 取决于源于第一激发单重态并导致光解的化学事件; 3) 存在多种 GFP 样分子, 它们的激发和发射光谱覆盖整个可见光区域; 4) 在细胞内可以快速而有效地折叠; 5) 发色基团能在蛋白折叠后迅速成熟; 6) GFP 类似蛋白的单价形式可以方便地与目的蛋白融合表达。其中, 强的亮度和光稳定性决定了 GFP 来源的胞内信号的信噪比。多样的激发与发射特征可以用于监测事件, 尤其是当供体的发射光谱与受体的激发光谱相匹配的两个 GFP 分子相互靠近时。荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET)

的原理是, 当一级速率常数与两个电偶极子之间距离的六次方成反比时, 它们之间发生无辐射能量转移。FRET 可用于评估小于 100 Å 的发色基团间的距离, 这个方法已经被推广到三个而不是两个 GFP 发色基团间的能量转移。

对维多利亚多管水母 GFP 的改造增强了其亮度和光稳定性。此外, 通过工程改造还获得了一些 GFP 突变体, 它们在比维多利亚多管水母栖息地——北太平洋温度更高的条件下, 也能更好地进行蛋白折叠, 还得到了一些激发与发射光谱改变的 GFP 分子。最终在一种珊瑚 (*Antozoans*) 中找到了发射红光的 GFP 样分子, 并且通过突变去掉了其寡聚化的特点, 并应用于胞内蛋白标记。至 2002 年, GFP 类似蛋白的发射光谱覆盖可见光谱的情况如图 5 所示。

其他重要的 GFP 样突变体也可以通过光激活从非荧光状态变成荧光状态, 或使发射光的波长产生变化。

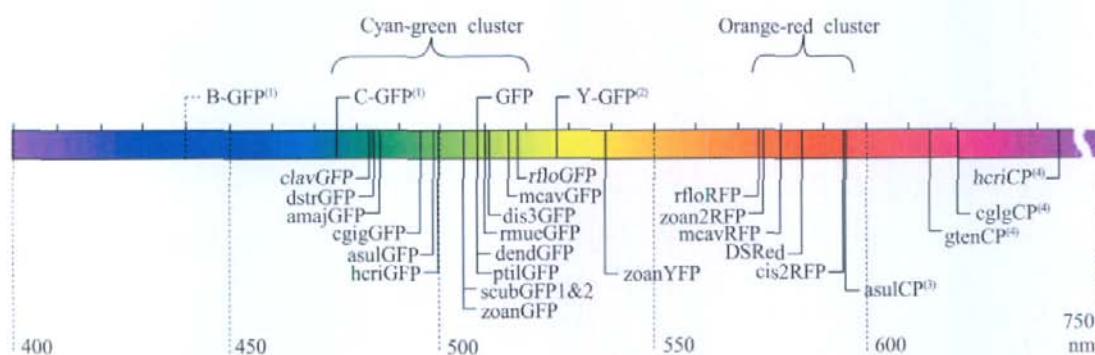


图 5 GFP 家族突变体的光谱特征 (Matz MV, et al. Bioessays, 2002,24:953-959)

## 3 GFP 对科学的影响

GFP 类似蛋白非常适合作为细胞内精确靶定的遗传标签, 加上成像技术和数据分析技术的快速发展, 使 GFP 在生命科学领域的应用得到飞速发展。早期发展起来的生物物理学荧光技术, 如 FRET、荧光相关谱技术 (fluorescence correlation spectroscopy, FCS)、荧光互相关谱技术 (fluorescence crosscorrelation spectroscopy, FCCS)、荧光漂白后恢复技术 (fluorescence recovery after photo-bleaching, FRAP) 和全内反射显微技术, 都是利用 GFP 类似蛋白产生的荧光信号来监测细胞内的事件。此外, 像荧光寿命影像技术 (fluorescence

life-time imaging, FLIM)、高分辨光激活定位显微技术 (photo-activation localization microscopy, PALM) 和其他基于 GFP 荧光的高分辨率技术也已经出现。事实上, 近期没有任何其他发现, 可以像 GFP 一样对设计和解释生命科学实验产生如此重大的影响。从 1992 年起, 涉及 GFP 的论文已超过 20000 篇, 也证实了其影响之重大。下面提供一些 GFP 使用的例子, 以说明基于 GFP 技术如何从根本上发掘了实验在生命科学所有领域的潜能。

GFP 最通常的运用是将目的蛋白与 GFP 融合表达, 从而监测目的蛋白的位置、移动及化学反应。GFP 融合蛋白在细胞不同部位的定位已经得到广泛研究, 如应用于细胞周期或对数生长期。如

图 6 所示, 通过 MinDE 系统的极间震荡可以确定细菌细胞隔膜形成和细胞分裂的中点。

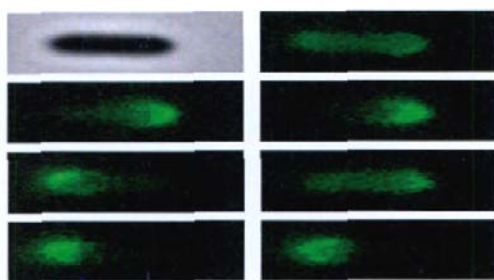


图 6 GFP 与 MinC (紧接 MinD) 融合蛋白的极间震荡 (David Fange, Uppsala, unpublished data obtained in the laboratory of J. Paulsson in Harvard, Med.School)。第一排左栏: 大肠杆菌细胞的显微镜成像。在大肠杆菌细胞中每 5 秒钟间隔的 GFP-MinC 融合蛋白荧光成像图: (左栏, 2, 3, 4 排), (右栏, 1, 2, 3, 4 排)。图中显示, MinC 在细胞两极的停留时间较极间振荡稍长。通过振荡, 使 MinD 蛋白在细胞中点的浓度最小, 从而标记出细胞分裂之前隔膜形成的中点

已有研究数据表明, 将 GFP 的一些光谱突变体偶联到细胞内的不同蛋白, 可以观察到这些蛋白对化学抑制剂、突变和基因敲除的动态反应。

另外一个应用是监测基因表达的时序性, 例如观察使细菌具有趋化反应的鞭毛及其动力蛋白等分子发动机的形成。

通过表达全长 GFP 标记、天然水平定位于染色体上的蛋白质, 更易于监测该蛋白在细胞内的定位及不同生物中蛋白酶体的浓度谱。

基于 GFP 荧光的单细胞和单分子显微镜技术可以对细胞内的动力学现象进行细致研究。例如, 一个蛋白分子结合到细胞内一个固定的靶标上, 如果在其处于结合状态时收集它的荧光, 就可以检测到一个确定的点; 相反, 如果在观察时间内该蛋白在细胞内自由扩散, 那么它发射的荧光会被背景荧光覆盖。最近对融合了 GFP 的转录因子与染色体上的特定和非特定位点的解离动力学研究, 阐明了上述原理。利用不同的激光脉冲宽度来改变显微镜监测的时间, 可以确定两种情况下的转录因子在染色体上的停留时间, 以及转录因子在特定和非特定位点的解离速率常数。

两个蛋白分别与两种 GFP 融合, 其中一种 GFP 的发射光谱与另一种 GFP 的激发光谱重叠。当这两个蛋白相互作用时, 就会产生一个强烈的 FRET 信号。另外也可通过 GFP 的蛋白互补来研究

这种直接相互作用。即一个蛋白与半个 GFP 分子融合, 另一个蛋白与另外半个 GFP 分子融合, 当两个蛋白形成复合物时, 这两个不完整的 GFP 会连在一起并产生荧光。

另外一种间接证明蛋白复合物的方法是通过 FCCS 技术。发射光谱不同的 GFP 分子分别标记两个目的蛋白, 当活细胞内一个小体积激发的这两种波长的荧光强度互相关时, 可以确定这两种蛋白是单独扩散还是以复合物的形式扩散。

还有许多基于 GFP 的技术用于研究细胞内运输。其中之一是 GFP 分子光漂泊或光激活后突显特异蛋白区。这些技术使对动力学、区域大小以及蛋白质在亚细胞不同位点之间移动的停留时间等的检测成为可能。

GFP 也用于膜结合细胞器的研究, 一个重要的发现就是很多细胞器间不断地相互交换其组成成分。例如, 高尔基体接受来自内质网的分泌泡, 也向内质网运输其组成部分并且在有丝分裂过程中去组装。

在细胞核结构领域, 基于 GFP 的研究表明了细胞间期细胞核结构具有动态和自我组织特征。

GFP 融合蛋白也被成功用于构建传感器来测定细胞内各种参数, 例如 pH、Ca<sup>2+</sup> 和各种代谢物的浓度。

最后, GFP 融合蛋白也广泛应用于多细胞生物的细胞和组织成像, 并且在神经生物学中已经成为一个很重要的实验工具。

## 4 GFP 的发现

维多利亚多管水母可以发出荧光。Davenport 和 Nicol 首次描述了水母通过光化学反应提供能量用于光子激发并发射绿光。1960 年, Osamu Shimomura 加入了普林斯顿大学 Frank Johnson 的实验室, 研究维多利亚多管水母的发光机制。Shimomura 来自名古屋大学, 已与 Y Hirata 教授一起完成了对介形类动物 (*Cypridina*) 的生物发光研究。维多利亚多管水母是在华盛顿州普捷湾的一个港口采集到的。

多管水母发光的活性成份被确认为一种蛋白质, 命名为光蛋白 (aequorin), 在 Ca<sup>2+</sup> 存在时发射蓝光。因为维多利亚多管水母发的是绿色荧光, 而纯化的光蛋白的发射峰是在可见光谱中的蓝色区域, 这使人感到奇怪。为了解开这一谜团,

Shimomura及其同事分离到了另外一种产生强烈绿色荧光的蛋白。

接着, Shimomura 和他的同事发现, 来自于光蛋白的蓝色荧光 ( $\lambda_{\max}=470$ ) 与 GFP 激发光谱中的长激发峰 ( $\lambda_{\text{exmax}}=460$  nm) 相符, GFP 的发射峰大约为 510 nm ( $\lambda_{\text{emmax}} 508\sim 515$  nm)。

从这些数据看来, 尽管没有直接的试验数据, 但可提示维多利亚多管水母的绿光来源: 光蛋白化学激发的电偶极子通过无辐射能量转移而激发了 GFP 的电偶极子, 后者进而发射光子而回到基态。用现在的语言解释, 这意味着在一种 FRET 类型的能量转移反应中, GFP 是一种受体而光蛋白是供体。Shimomura 及其同事在一篇论文中 (1974) 提供了这种假设的实验证据, 包括在维多利亚多管水母的发光细胞中 GFP 和光蛋白的距离评估, GFP 的纯化方法以及吸收和发射光谱的详细特征。

尽管 Shimomura 原本的主要兴趣是光蛋白的生物发光, 包括在活细胞中作为钙指示剂的运用, 但他还是将注意力转移到了 GFP 的荧光发色基团, 并试图阐明其化学结构。他用木瓜蛋白酶来消化 GFP, 导致蛋白荧光的消失, 但是发现一个肽段具有与完整蛋白相同的吸收光谱。他研究了 this 肽的理化性质并与那些模式化合物相比较, 提出发色基团是一个对羟基苯咪唑啉酮 (见图 1)。随着 GFP 一级结构的清晰, Cody 等同样利用核磁共振的方法重新鉴定了 GFP 的发色基团。他们证实发色基团的功能部分为对羟基苯咪唑啉酮, 正如 Shimomura 所述。但重新鉴定出的 Ser 和 Gly 两种氨基酸构成了咪唑啉酮环 (图 1)。

总之, Shimomura 对 GFP 的发现, 包括 GFP 的纯化及其理化性质的鉴定, 以及在各种条件下的荧光发射和激发光谱, 做出了首要贡献。他与他的同事证明了, 在 FRET 中光蛋白作为供体而 GFP 作为受体, 这就解释了为什么维多利亚多管水母发出绿光而不是蓝光。最后, 他正确指出了 GFP 肽链中发色基团所在的功能部分。虽然主要使用的是蛋白纯化和光谱的经典方法, 但没有 Shimomura 的前沿研究, GFP 革命就将延迟 10 年甚至仍是太平洋深藏的秘密。

## 5 GFP 在其它生物中的表达

在 MJ Cormier 的实验室工作的 Douglas Prasher, 克隆了光蛋白基因。用同一个来自于维多

利亚多管水母的 cDNA 文库, Prasher 和他的同事首次尝试用编码已知 GFP 肽序列的 DNA 寡核苷酸来钓 GFP 基因。用这种方法, 他们鉴定了一个编码 168 个氨基酸的开放读码框 (ORF), 提示这种蛋白的分子质量比之前其他方法评估的小很多。这种误差表明这个开放读码框是不完整的, 但是它同样可用于鉴定构成 GFP 发色基团核心的三个氨基酸 (图 1)。利用来自于维多利亚多管水母的第二个 cDNA 文库, 他们获得并克隆出 GFP 的完整读码框, 编码 238 个氨基酸, 位于 65~67 位的 Ser-Tyr-Gly 是发色基团的形成序列。当时很多专家认为 GFP 荧光发色基团的形成可能需要一个未知的酶系统, 只对应于维多利亚多管水母, 所以认为在异源系统的表达将会导致不发荧光的 GFP 前体形式, 而不是它在科学上有用的荧光形式。在他们克隆文章的最后, Prasher 等总结了他们对前景的观点:

“这些克隆结果将帮我们构建一个用来制备不发荧光的原 GFP 的表达载体。由于对这种发色基团的生物合成还没有得到任何可用信息, 对于这种独特蛋白发色基团形成的生化检测以及光蛋白和 GFP 之间的能量转移机制研究而言, 这种蛋白的重组形式将是一种十分有价值的试剂。”

Prasher、Ward 及其合作者运用当时已知的 GFP 多肽序列来寻找形成发色基团功能核心的三肽基序。在这项研究中, 他们运用与 Shimomura 最早使用的木瓜蛋白酶水解蛋白相似的方法, 再加上核磁共振技术, 确证了发色基团的模型 (见图 1)。他们确证的发色基团功能中心与 Shimomura 预测的相同, 而且他们还能确认 Ser65 和 Gly67 是杂环咪唑啉酮环的前体。尽管 GFP 发色基团已经被准确定位, 但是从原 GFP 中的 Ser-Tyr-Gly 多肽片段到发荧光的 GFP 变体的成熟过程仍旧是个谜。他们简要的概括了发生变化的可能条件: “现在还不知道发色基团形成需要的翻译后事件。发色基团的形成不太可能是自发的, 它的形成可能需要一些酶的参与。”

GFP 发色基团的形成是自发的还是需要辅酶系统的参与, 这个问题很快就有了答案, 但是在这之前, 亮丽的荧光 GFP 在几种模式生物中的表达产生了重大的生物学意义。

Martin Chalfie 在英国剑桥大学 Sidney Brenner (2002 年医学生理学奖获得者) 实验室做博士后期间, 对小型土壤线虫——秀丽隐杆线虫

(*C. elegans*) 的神经发育进行了研究。S Brenner 及其合作伙伴将 GFP 与许多有意义蛋白的基因融合并置于可靠的启动子控制下，进一步将这些基因转化到线虫体内。当 Chalfie 第一次听到 GFP 时，对他们在线虫方面的分子遗传学结果及其运用前景产生了浓厚的兴趣。在哥伦比亚大学工作时，当 Prasher 发表了论文后，他从 Prasher 处获得 GFP 基因 (*gfp*)，并在同年就将其表达在大肠杆菌里。GFP 在这种异源的宿主中产生了明亮的绿色荧光，这表明它确实可以在所有生物中作为一种很好的遗传标记。在线虫体内六元触觉神经 (six touch receptor neurons) 里广泛存在一种调控  $\beta$ -微管蛋白表达的启动子。Chalfie 将 *gfp* 置于这个启动子控制下并转入线虫，结果线虫在其不同部位及不同发育时期表达了 GFP。

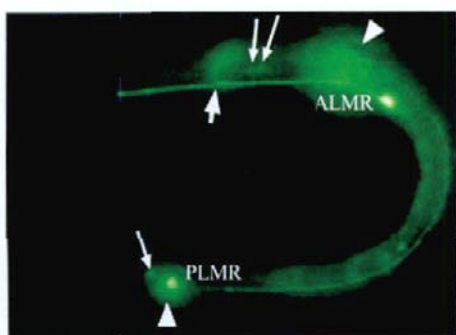


图 7 线虫 (*C. elegans*) 幼体中 GFP 的表达。细胞体中的两个触觉神经元 ALMR 和 PLMR 被荧光标记，图中显示两个很强的荧光点。从这些细胞可以观察到发出荧光的过程。箭头标记的光圈由位于该动物另一边的同源细胞产生。粗箭头标记 ALMR 细胞分支的神经环 (未在焦距内)；细箭头标记较弱的荧光细胞体 (Chalfie M, et al. Science, 1994, 263:802~805)

1993 年 9 月中旬，Chalfie 和他的同事向《科学》杂志提交了他们在大肠杆菌及线虫中表达 GFP 的结果，94 年 2 月初该文章得以发表。同时，1993 年 10 月在 Worm Breeder's Gazette 上发表了一篇题为“一种观察线虫基因表达的新方法”的文章，在摘要中提及他们的线虫实验结果。该结果总结如下：

“利用来自维多利亚多管水母的荧光蛋白 (绿色荧光蛋白，GFP)，我们发展了一种新的方法用于观察线虫 (和其它生物) 的基因表达。GFP 能够在蓝光的照射下发出明亮的绿色荧光。我们还发现这种荧光属性不依赖于维多利亚多管水母的任何其

它成分，所以 GFP 可以替代诸如 lacZ，用于基因表达融合。”

GFP 不仅可在大肠杆菌和线虫中表达，Roger Tsien 和他的同事证明其还可在一种啤酒酵母 (*Sacharomyces cerevisiae*) 中表达，后来 Lanini 和 Mackeon 又证明了其可以在哺乳动物细胞中表达 (Ibid)。同年，在另一种重要的模式生物果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 中，亦证明了 GFP 与目标蛋白融合的可能性。具有明亮荧光的 GFP 能在四种非常重要的模式生物中表达，其中 GFP 融合蛋白可同时保持 GFP 的荧光和目标蛋白的活性，以上这些发现说明 GFP 作为一种在生物学研究中普遍使用的遗传标记具有巨大潜力。而此时，GFP 的发色基团成熟机制尚不清楚。

总体来说，Martin Chalfie 从 Douglas Prasher 处获得 *gfp* 基因的克隆，首先证明了发荧光的 GFP 可以在大肠杆菌和线虫中表达，不需要添加辅助性异源因子。这些结果意味着一个重要突破，即他们证明了将 GFP 作为一种普遍的遗传标志的可行性，从而使活细胞内动态过程的定量研究具有普遍的实验可行性。

## 6 GFP 和 GFP 类似蛋白的发展

Roger Tsien 在厌氧条件下利用大肠杆菌表达了 *gfp* 基因，发现在缺氧的条件下，尽管在细胞中表达并折叠，但 GFP 不发荧光。然而，在没有蛋白重新合成的情况下，在活细胞或非常稀的细胞提取物中加入氧气，原来不发荧光的 GFP 分子会逐渐发出荧光。Tsien 和他的同事根据这些数据推测，GFP 的荧光发色基团的形成发生在翻译后，并且以分子氧作为唯一的辅助因子。分子氧在好氧的活细胞中普遍存在，他们的发现解释了为何在所有表达 GFP 的生物体中都很容易发荧光，而且也表明对于所有试图表达 GFP 的好氧生物体也会有同样的结果。他们还提出了发色基团形成的化学机制 (图 4)。

在该文章中，他们还介绍了许多 GFP 的点突变，这些突变对其光谱学性质有很大的影响，一些突变体的激发光谱的主峰从野生型 GFP 的紫外 (图 2) 移到蓝光区。他们的工作成为 GFP 突变工程的开端，并为它们在生物科学中的成功应用铺设了道路。

在这段时期，Tsien 和他的同事加深了对 GFP

荧光机制的理解，并得到了几种新的 GFP 突变体，这些变异体的光谱特征改变，发光强度增加，折叠更完善 (图 6)。

一个非常重要的进步是，Remington 和 Tsien 以及 Yang 等分别解出了 GFP 的晶体结构，这使得突变体的设计更为合理。

除了对维多利亚多管水母 GFP 的改造外，Tsien 还对红色荧光蛋白变种的研究做出了重要贡献。这些红色荧光蛋白通常是来自珊瑚海葵的 DsRed，它们是由 Lukyanov 和他的合作者发现

的。Tsien 和他的合作者鉴定了 DsRed 发色基团的结构和使它成熟的化学步骤。这一工作还包括，与来自维多利亚多管水母的 GFP 相比，DsRed 的激发和发射光谱红移的量子化学计量。DsRed 的四聚体形式限制了其作为遗传标签的应用。Tsien 利用 DsRed 的广泛突变将其转变为保持荧光特征的单体。对于 Tsien 和他的合作者们所做的这一工作的近期拓展和总结可以在 Shaner 等的文章中找到。图 8 显示由 DsRed 发展来的不同蛋白的系谱。

这些蛋白的光谱特征总结于图 9。

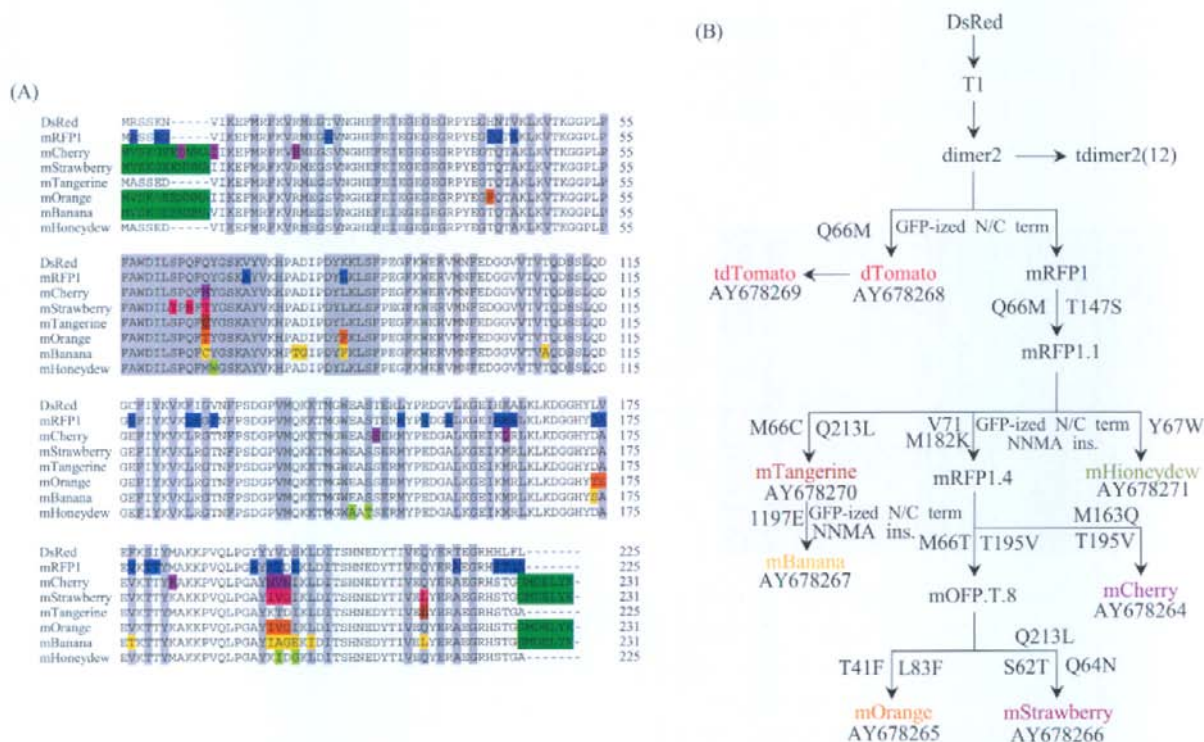


图 8 来自于 DsRed 的蛋白系谱。(A) 序列变化及其颜色；(B) DsRed 蛋白的家族树 (Shaner NC, et al. Nature Biotechnology, 2004,22:1567~1572)

| Class              | Protein                    | Source laboratory (references) | Excitation <sup>a</sup> (nm) | Emission <sup>a</sup> (nm) | Brightness <sup>a</sup> | Photostability <sup>1</sup> | pKa  | Oligomerization         |
|--------------------|----------------------------|--------------------------------|------------------------------|----------------------------|-------------------------|-----------------------------|------|-------------------------|
| Far-red            | mPlam <sup>2</sup>         | Tsien (5)                      | 590                          | 649                        | 4.1                     | 53                          | <4.5 | Monomer                 |
| Red                | mCherry <sup>3</sup>       | Tsien (4)                      | 587                          | 610                        | 16                      | 96                          | <4.5 | Monomer                 |
|                    | tdTomato <sup>3</sup>      | Tsien (4)                      | 554                          | 581                        | 95                      | 98                          | 4.7  | Tandem dimer            |
|                    | mStrawberry <sup>3</sup>   | Tsien (4)                      | 574                          | 596                        | 26                      | 15                          | <4.5 | Monomer                 |
|                    | J-Red <sup>3</sup>         | Evrogen                        | 584                          | 610                        | 8.8 <sup>3</sup>        | 13                          | 5.0  | Dimer                   |
| Orange             | DsRed-monomer <sup>3</sup> | Clontech                       | 558                          | 588                        | 3.5                     | 16                          | 4.5  | Monomer                 |
|                    | mOrange <sup>3</sup>       | Tsien (4)                      | 548                          | 562                        | 49                      | 9.0                         | 6.5  | Monomer                 |
| Yellow-green       | mKO                        | MBL Int'l. (10)                | 548                          | 559                        | 31 <sup>3</sup>         | 122                         | 5.0  | Monomer                 |
|                    | mCitrine <sup>3</sup>      | Tsien (16,23)                  | 516                          | 529                        | 59                      | 49                          | 5.7  | Monomer                 |
| Green              | Venus                      | Miyawaki (1)                   | 515                          | 528                        | 53 <sup>3</sup>         | 15                          | 6.0  | Weak dimer <sup>1</sup> |
|                    | YPet <sup>3</sup>          | Daugherty (2)                  | 517                          | 530                        | 80 <sup>3</sup>         | 49                          | 5.6  | Weak dimer <sup>1</sup> |
|                    | EYFP                       | Invitrogen (18)                | 514                          | 527                        | 51                      | 60                          | 6.9  | Weak dimer <sup>1</sup> |
|                    | Emerald <sup>3</sup>       | Invitrogen (18)                | 487                          | 509                        | 39                      | 0.89 <sup>3</sup>           | 6.0  | Weak dimer <sup>1</sup> |
| Cyan               | EGFP                       | Clontech <sup>3</sup>          | 488                          | 507                        | 34                      | 174                         | 6.0  | Weak dimer <sup>1</sup> |
|                    | CyPet                      | Daugherty (2)                  | 435                          | 477                        | 18 <sup>3</sup>         | 59                          | 5.0  | Weak dimer <sup>1</sup> |
|                    | mCFPm <sup>3</sup>         | Tsien (23)                     | 433                          | 475                        | 13                      | 64                          | 4.7  | Monomer                 |
|                    | Cerulean <sup>3</sup>      | Piston (3)                     | 433                          | 475                        | 27 <sup>3</sup>         | 36                          | 4.7  | Weak dimer <sup>1</sup> |
| UV-excitable green | T-Sapphire <sup>3</sup>    | Greiner (6)                    | 399                          | 511                        | 26 <sup>3</sup>         | 25                          | 4.9  | Weak dimer <sup>1</sup> |

<sup>a</sup>An expanded version of this table, including a list of other commercially available FPs, is available as Supplementary Table 1. The mutations of all reported FPs relative to the wild-type protein are available in Supplementary Table 2. <sup>1</sup>Major excitation peak. <sup>2</sup>Major emission peak. <sup>3</sup>Product of extinction coefficient and quantum yield at pH 7.4 measured or estimated (indicated by \*) in our laboratory under ideal excitation conditions, in [mM × cm<sup>-1</sup>] (for comparison, see Bouvier et al. 2004). Note for brackets: from an initial emission rate of 1,000 photons/s open to 500 photons/s (i.e., for comparison, fluorescence at pH 6.8 has  $t_{1/2}$  of 5.2 s). Data are not indicative of photostability under focused laser illumination. <sup>4</sup>Bracketed in spectral class. <sup>5</sup>Not recommended (due to poor bleaching at 37 °C). <sup>6</sup>Optimal YFP with A206K mutation; spectroscopic properties equivalent to Citrine. Can be made monomeric with A206K mutation. <sup>7</sup>Emerald has a pronounced fast bleaching component that leads to a very short time to 50% bleach. Its photostability after the initial few seconds, however, is comparable to that of EGFP. <sup>8</sup>Formally acid by Clontech, no longer commercially available. mRFP with A206K mutation; spectroscopic properties equivalent to FFP.

图 9 DsRed 突变体的光谱特征和其它相关性质 (Shaner NC, et al. Nature Methods, 2005,2(12):905-909)

Roger Tsien 还在基于荧光的钙离子浓度传感器的研究领域处于领先地位，在此之前是无法定量监测存在于整个生物体、组织、器官和亚显微环境中的钙离子浓度的。监测的原理是构建一个嵌合蛋白，由蓝色或青色的 GFP 突变体、钙调蛋白 (CaM)、两个甘氨酸连接子、肌球蛋白轻链激酶 (M13) 中的钙调蛋白结合域和一个绿色或黄色的 GFP 突变体组成。当钙离子结合到钙调蛋白上时，诱导钙调蛋白与 M13 的结合，这将缩短两种 GFP 突变体的距离，也因此增加了 FRET 的效率。以这种方式，FRET 信号可以用来定量细胞内钙离子的

浓度。

总而言之，Roger Tsien 为我们了解 GFP 及其家族成员的荧光化学性质做出了最初的主要贡献。他还对 GFP 突变体的发展做出了进一步的贡献，这些突变体的荧光发射光谱位于整个可见光谱中，并具有更强的亮度、光稳定性和改良的折叠性质，在折叠过程中其发色基团能快速成熟。Roger Tsien 的研究对 GFP 以及 GFP 类似蛋白成为高效遗传标签的发展至关重要，这些遗传标签现在组成了一个研究所有活体系统动态过程的通用“工具箱”。