

表4 肿瘤成像的定量

肿瘤部位	像素	mm ²
GFP 脑部	912	6.00
RFP 脑部	811	5.34
GFP 骨	3561	23.42
GFP 大肠 (全身成像)	2465	16.22
GFP 大肠 (活体内成像)	2731	17.97
GFP 胰腺	2813	18.51
RFP 肝脏	2254	14.83
RFP 胰腺	25103	165.15

资料来源: *BioTechniques*

表5 大肠中GFP标记的肿瘤全身成像与活体内成像的比较

成像类型	肿瘤大小 (像素)	荧光强度
全身成像	2465	137
剖开后成像	2731	196

资料来源: *BioTechniques*

以上表明, 在动物体内用GFP或RFP等标记的肿瘤能够发射出很强的信号, 获得的图像可以很容易定量, 自发荧光的干扰可以忽略, 并且可以用简单的低成本的设备进行GFP和RFP的全身成像。

所有这些表明, 荧光蛋白在肿瘤研究及体内高通量药物筛选等其它方面有广阔的应用前景。

参考文献

1. Anna-Katerina Hadjantonakis, Andras Nagy. (2001) The color of mice: in the light of GFP-variant reporters, *Histochem Cell Biol*, 115:49-58.
2. 刘忠华, 宋军, 王振坤等. (2008) 体细胞核移植生产绿色荧光蛋白转基因猪, *科学通报*, 53(5): 556-560.
3. Meng Yang, George Luiken, Eugene Baranov, *et al.* (2005) Facile whole-body imaging of internal fluorescent tumors in mice with an LED flashlight, *BioTechniques*, 39: 170-172.

三、 荧光蛋白技术的最新研究进展

1. 新增荧光蛋白

在过去几年发展起来的荧光蛋白变体的荧光激发谱几乎覆盖了整个可见光的光谱范围。发色团周围环境的变化, 如带电氨基酸残基的位置、氢键网络及蛋白间疏水作用等可能产生蓝色或红色光谱漂移, 经吸收和激发后最大可漂移40nm。更大的光谱漂移会产生新的光谱型荧光蛋白, 如CFP、GFP、YFP等, 这是由于发色团共价结构和外部轨道连接的不同(图20、21)。人们进一步研究荧光蛋白发色团的复杂特性, 找到了关于多肽骨架结构与功能关系的线索, 因此借助基因工程更精细的调整颜色变体, 并扩大有用蛋白的光谱范围就变得更加容易了。

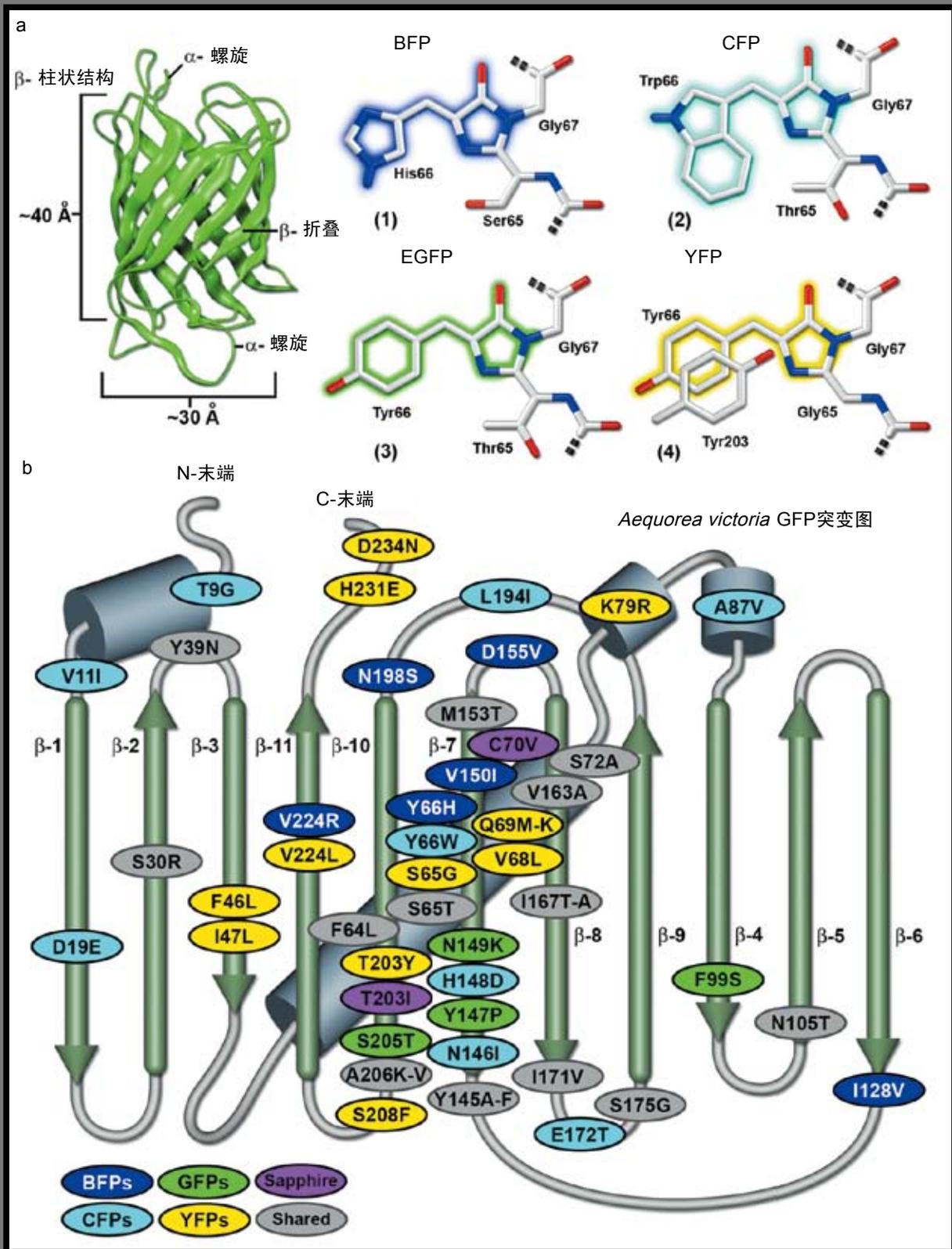


图20 (a) 荧光蛋白 β -柱状结构及常见 *Aequorea* 荧光蛋白衍生物的发色团结构。(1) BFP; (2) CFP; (3) EGFP; (4) YFP。(b) *Aequorea victoria* GFP突变图。 β -折叠 (绿色带有箭头的细柱状结构, 箭头指向C-末端, 已编号为 β -1~11), α -螺旋 (灰色圆柱结构)。肽链拓扑结构图上标明了常见的突变。标记所用颜色代表相应颜色的荧光蛋白, BFP (蓝色)、CFP (蓝绿色)、GFP (绿色)、YFP (黄色)、Sapphire (紫色)、折叠、共有及单体化 (灰色)。图中可以看出, 几乎75%的突变都发生在中心 α -螺旋以及 β -折叠7、8、10处。

图片来源: *Journal of Cell Science*

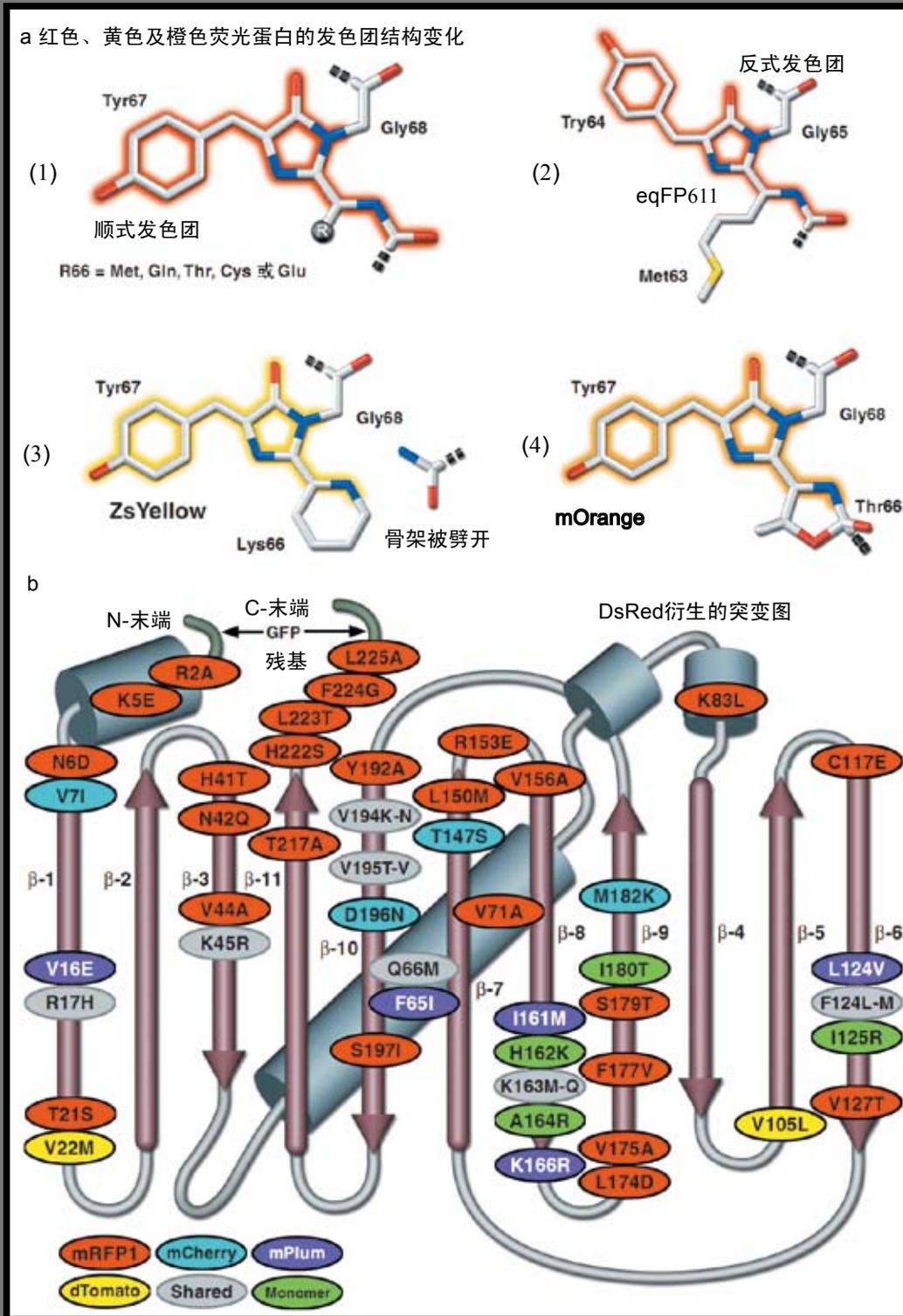


图21 (a) 黄色、橙色及红色荧光蛋白的发色团结构变化。(1) 源自DsRed和其它造礁珊瑚的荧光蛋白有一个顺式发色团, 第66位残基可以是Met、Gln、Thr、Cys或Glu; (2) 来源于*Entacmaea quadricolor*的红色变体eqFP611, 它是已知的唯一具有反式发色团的荧光蛋白; (3) 来源于纽扣型珊瑚虫*Zoanthus*的ZsYellow, 也称为zFp538, 它具有一种新的三环发色团, 由66位赖氨酸残基与自身 α -碳原子环化形成四氢吡啶环再连接到发色团形成; (4) mOrange, 也具有三环发色团, 是由66位苏氨酸与前面羧基碳环化产生的部分连接的噁唑环; (b) DsRed突变图。 β -折叠(红褐色带有箭头的细圆柱结构, 箭头指向C-末端, 已编号为 β -1~11)、 α -螺旋(灰色圆柱结构); 肽链拓扑结构图上标明了突变, 标记所用颜色代表相应颜色的荧光蛋白。mRFP1(红色)、mCherry(蓝绿色)、mPlum(紫色)、dTomato(黄色)、共有突变(灰色)及单体化突变(绿色)。与围绕*Aequorea* GFP发生基因的突变簇不同(图20b), 红色荧光蛋白突变遍布整个序列。

图片来源: *Journal of Cell Science*

2. 各种荧光蛋白的最新研究进展

2.1 蓝色和蓝绿色荧光蛋白

目前, 虽然大多数研究人员把注意力集中于橙色到远红外光谱区域, 但最近BFP和CFP变体在成像中的应用潜力出人意料地受到研究人员的关注。虽然EBFP是*Aequorea* GFP来源的最早的光谱变体之一, 但其亮度低、光稳定性差, 使其很久以来没有引起多数研究者的注意。最近, 有三个研究小组报道指出, 改进的蓝色*Aequorea* 荧光蛋白变体与EBFP相比, 亮度和光敏感性有明显增强。这些新的变体被命名为Azurite (石青或蓝铜矿)、强力增强型蓝色荧光蛋白2 (strongly enhanced blue fluorescent protein 2, SBFP2) 及EBFP2 (图22a), 它们第一次使得活细胞在蓝色光谱区域成功地长时间成像成为可能。即使这三种荧光蛋白在高浓度的微环境中表现出很弱的二聚体特性, 但是它们能够在与亚细胞定位的靶蛋白融合中有效地发挥作用, 并且它们能够很容易地通过滤光片设备与标准的BFP及4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 一起成像。所有这些BFP变体都可以通过A206K突变改造成真正的单体, 而且这种突变不会影响它们的特性。更重要的是, 亮度最强、光稳定性最强的蓝色荧光蛋白EBFP2 (表6), 是EGFP在活细胞中FRET的很好的供体。

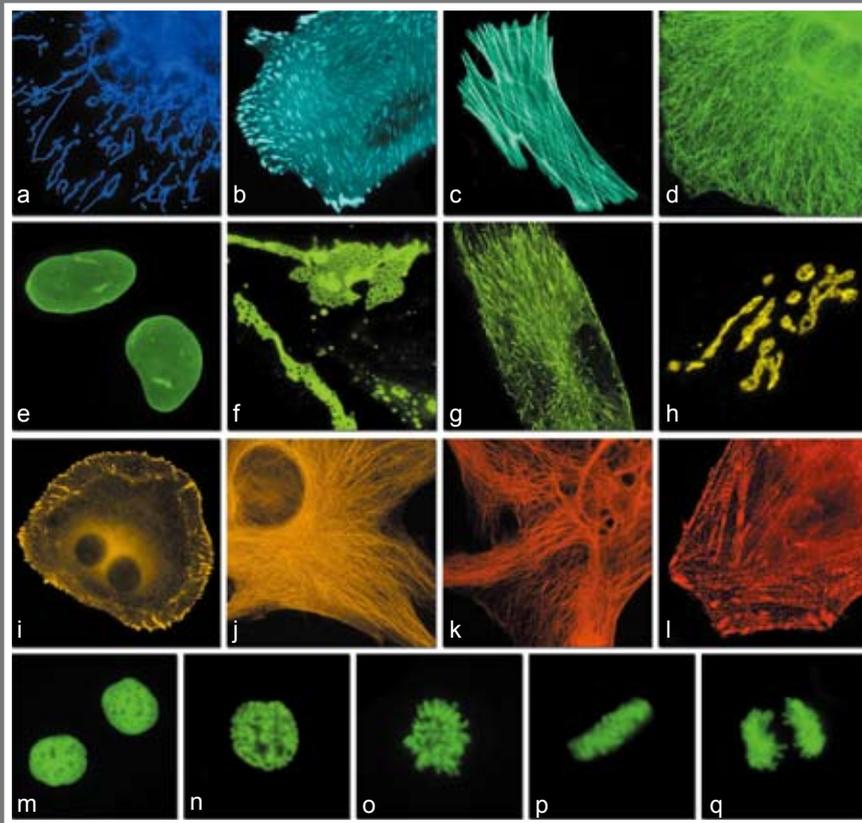


图22 (a-l) 单体荧光蛋白与靶蛋白融合蛋白的亚细胞定位。(a) EBFP2-mito-N-7 (人细胞色素C氧化酶VIII亚基; 线粒体); (b) mCerulean-paxillin-N-22 (鸡; 粘着斑); (c) mTFP1-actin-C-7 (人 β -肌动蛋白; 丝状肌动蛋白); (d) mEmerald-keratin-N-17 (人细胞角蛋白18; 中间丝); (e) 超折叠GFP-lamin B1-C-10 (人核纤层蛋白B1; 核被膜); (f) mVenus-Cx43-N-7 (大鼠 α -1间隙连接蛋白-43; 间隙连接); (g) YPet-EB3-N-7 (人微管相关蛋白; RP/EB家族); (h) mKO-Golgi-N-7 (人 β -1, 4半乳糖基转移酶N-末端81个氨基酸; 高尔基复合体); (i) tdTomato-zyxin-N-7 (人斑联蛋白; 粘着斑); (j) TagRFP-tubulin-C-6 (人 α -微管蛋白; 微管); (k) mCherry-vimentin-N-7 (人波形蛋白; 中间丝); (l) mPlum- α -actinin-N-19 (人非肌肉; 细胞骨架); (m-q) mEGFP与人组蛋白H2B融合 (mEGFP-H2B-N-6)。(m) 间期; (n) 前期; (o) 前中期; (p) 中期; (q) 后期。(图片来源: *Journal of Cell Science*)

蓝绿光谱区域(约470nm~500nm)一直是原始的*Aequorea* ECFP(表6)衍生物占优势,直到一个单体的水鸭色(又称水鸭蓝,是蓝色与绿色正中的颜色)变体mTFP1(图22c)出现。这种荧光蛋白亮度更强,具有酸不敏感性,而且光稳定性更强。来源于四聚体软珊瑚蛋白的mTFP1光谱特性与大多数CFP相比,有稍微的红移,所以命名为水鸭色而不是蓝绿色。与其它CFP不同,mTFP1在发色团的第66位氨基酸是酪氨酸而不是通常的色氨酸。酪氨酸代替色氨酸,使得荧光激发光谱宽度从大约60nm降低到更容易操作的30nm,这样就降低了多色实验和FRET实验中的色度亮度干扰效应。当蓝绿色荧光蛋白与黄色或橙色荧光蛋白组合使用时,mTFP1(表6)作为一个FRET的供体,就成为除了mECFP和mCerulean(蔚蓝色或天蓝色荧光蛋白)(图22b,表6)之外的一个极好的选择。虽然说mTFP1需要特殊的滤光片设备来成像,但是用标准的ECFP滤光片设备也能产生合适的信号水平。

最近,应用一种更好的点直接突变方法进行ECFP和EYFP单体变体的突变优化,以增强亮度、折叠效率、可溶性及FRET性能。这样就产生了超级蓝绿色和黄色荧光衍生物,它们分别被命名为SCFP和SYFP。在细菌中表达的这两种荧光蛋白明显要比原荧光蛋白亮度更强,但在哺乳动物细胞中表达的亮度却比原荧光蛋白弱两倍。不过,这些高性能的荧光蛋白应该有利于融合标签,能够用来创造新的更先进的且具有更大动态范围的CFP-YFP FRET生物传感器,用来检测代谢、pH变化、Ca²⁺波动、蛋白质和酶磷酸化及其它细胞内的生物活动。

表6 常用荧光蛋白的物理属性

蛋白	光谱型颜色	激发峰 (nm)	发射峰 (nm)	亮度	光稳定性	pKa	聚集状态	发色团	滤光装置
EBFP2	蓝色	383	448	18	55	5.3	弱二聚体	SHG	DAPI/BFP
ECFP	蓝绿色	433/445	475/503	13	64	4.7	弱二聚体	TWG	CFP
mCerulean	蓝绿色	433/445	475/503	27/24	36	4.7	单体	TWG	CFP
mTFP1	蓝绿-绿色	462	492	54	110	4.3	单体	AYG	CFP
mEGFP	绿色	488	507	34	174	6.0	单体	TYG	FITC/GFP
mEmerald	绿色	487	509	39	101	6.0	单体	TYG	FITC/GFP
sfGFP	绿色	485	510	54	157	5.5	弱二聚体	TYG	FITC/GFP
EYFP	黄色	514	527	51	60	6.9	弱二聚体	GYG	FITF/YFP
mVenus	黄色	515	528	53	15	6.0	单体	GYG	FITC/YFP
mCitrine	黄色	516	529	59	49	5.7	单体	GYG	FITC/YFP
YPet	黄色	517	530	80	49	5.6	弱二聚体	GYG	FITC/YFP
mKO	橙色	548	559	31	122	5.0	单体	CYG	TRITC/DsRed
tdTomato	橙色	554	581	95	98	4.7	T-二聚体	MYG	TRITC/DsRed
TagRFP	橙色	555	584	48	37	<4.0	单体	MYG	TRITC/DsRed
mRFP1	红色	584	607	12.5	8.7	4.5	单体	QYG	TxRed
mCherry	红色	587	610	17	96	<4.5	单体	MYG	TxRed
mKate	远红外	588	635	15	166	6.0	单体	MYG	TxRed
mPlum	远红外	590	649	3.2	53	<4.5	单体	MYG	TxRed

资料来源: Journal of Cell Science

2.2 绿色荧光蛋白

在光谱的绿光区（500nm-525nm）已经发现了多种荧光蛋白，而且来源广泛，包括不同种属的 *Aequorea*、桡足类动物、文昌鱼以及珊瑚。然而多数有齐聚反应，即使最好的荧光蛋白与EGFP相比，也没有明显的优点（表6；图22 m-q）。或许目前活细胞成像最好的选择是GFP衍生的Emerald（祖母绿）（图22d），它与EGFP的特性相似。Emerald包含F64L和S65T突变，另外还有四个点突变从而改进了折叠、37°C时的突变率以及亮度。虽然Emerald比EGFP更有效，但含有快速光漂白成分，可能在某些环境下其定量成像会受到影响。过去几年，关于GFP最重大的进展是超折叠GFP（图22e）的发现，即使与不溶性蛋白质融合表达仍然可以高效地折叠而且比EGFP和Emerald的亮度更强、耐酸性更好（表6）。然而，需要注意的是，超折叠GFP可能会产生较高的背景干扰，不过它仍能产生亮度较强的荧光。

2.3 黄色荧光蛋白

作为一种光谱型，黄色荧光蛋白已经被开发成亮度最亮及最通用的遗传编码探针。然而最早的变体EYFP（表6）虽然仍被广泛应用，但由于其 pK_a 值高、对卤化物敏感，导致EYFP的应用还很不理想。单体形式的变体柠檬黄（mCitrine）和维纳斯（mVenus）（图22f）是目前应用最多的黄色荧光蛋白探针（表6），但二者都还没有商业化。然而与之相似的，来源于*Aequorea*被命名为诞生石Topaz（黄玉）的变体可从Invitrogen公司买到。另外，一旦新开发的SYFP在哺乳动物细胞中能够融合表达并得到证实，一定会成为一种有用的黄色荧光蛋白。

另一种很有应用潜力的黄色荧光蛋白是能量转移黄色荧光蛋白（yellow fluorescent protein for energy transfer, YPet），它经合成的DNA重排获得，与荧光激活的细胞分选术结合能够增强FRET中蓝绿色荧光蛋白和黄色荧光蛋白的配对。YPet是已经开发的亮度最强的黄色荧光蛋白，并且有很好的光稳定性（图22g，表6）。YPet对酸性环境的耐受性要比mVenus及其它黄色荧光蛋白变体强，这将拓宽这种探针在研究酸性细胞器的生物传感器中的应用。虽然YPet对FRET是最优化的，但仍存在一个很大的疑问，就是YPet具有如此好的特性的原因，或许仅是由于YPet与CyPet的二聚化作用得到增强。

2.4 橙色荧光蛋白

与数以百计的蓝绿色、绿色及黄色光谱型荧光蛋白相比，在橙色和红色波长（约560nm到650nm）光谱区仅仅开发了几种探针。尽管如此，现有的这几种光谱型的蛋白（图21，表6）都是从珊瑚中分离得到的，并且在多种成像情景中显现出应用潜力，但在对橙色区域荧光蛋白的命名中存在混乱。通常被命名为红色荧光蛋白RFP的探针如DsRed、TagRFP及tdTomato，实际上具有明显的橙色多于红色的发射谱。不考虑颜色的指示，用标准的四甲基罗丹明异硫氰酸脂（tetramethyl-rhodamine isothiocyanate, TRITC）滤光片设备，橙色光谱型的蛋白在多种颜色，如蓝绿色、绿色和红色情景中更易于成像。

Kusabira Orange是来源于香菇珊瑚*Fungia concinna*的四聚体，它通过cDNA克隆的点特异性突变在蛋白质的N末端添加了10个残基。得到的荧光蛋白在548nm有最大吸收，发射光谱以559nm为中心发出亮的黄-橙色荧光。随后再另外引入20个突变，得到单体形式的mKO（图22h，表6）。mKO表现出与EGFP相似的亮度，并且在更广泛的荧光发射范围都具有光稳定性，是所有荧光蛋白中最好的，所以它是长期成像实验中的最佳选择。更重要的是，mKO消光系数高，使它成为FRET中蓝绿色和水鸭绿色荧光蛋白的极好受体。现在Kusabira Orange的四聚体和单体变体都已经商业化。

最近，研究人员引进了一种新的高亮度的单体橙色蛋白TagRFP，在定位研究和FRET研究中是很有希望的候选物。人们最早是从海葵*Entacmaea quadricolor*中克隆到其二聚体形式，随后的随机突变产生一种快速成熟变体TurboRFP，其特点是光稳定性高、亮度强、pH耐受性高等。在来自相同种属的相近蛋白（eqFP611，图21）的晶体结构基础上，Merzlyak等在二聚体中替换了几个关键的氨基酸残基，同时进行随机突变以保留蛋白的折叠特性。最终得到的变体TagRFP具有很好的光物理学特性（表6），并且能在哺乳动

物细胞中与多种蛋白融合表达（图22j）。然而，有些实验室发现其光稳定性不如原来描述的那样高。Merzlyak等推测，当GFP和YFP作为供体时，TagRFP将成为极好的FRET受体，但这仍需要进一步验证。

通过点特异性和随机突变，人们已经解决了原始*Discosoma* DsRed荧光蛋白的主要问题。但是要从其它种属的珊瑚虫蛋白构建真正的单体DsRed变体，却是一项困难的任务。要得到第一代单体红色荧光蛋白（mRFP1），需要改造DsRed序列的33个残基。mRFP1在584nm吸收最大，发射谱607nm。然而，与天然蛋白相比，这种衍生物表现出明显的荧光发射减弱以及很快的光漂白，这导致其比类似的单体GFP和YFP用处要小得多。研究人员利用突变技术来寻找橙色、红色和远红外的荧光蛋白变体，进一步降低这些生物探针的自缔合

2.5 红色荧光蛋白

在活细胞及动物全身成像中需要表现较好的红色荧光蛋白，主要是由于在多种颜色成像实验中需要红色探针，另外基于较长的激发波长产生的光毒性较小，可以用来探测较深的生物组织。最新研究进展是，通过mRFP1（表6）发色团残基的直接突变产生的新的荧光蛋白，得到的单体荧光蛋白发射峰在560nm~610nm，并以相应的水果名字来命名。

这其中mStrawberry和mCherry，发射峰分别为596nm和610nm（表6，图22k），亮度分别为EGFP的75%和50%左右。mCherry的光稳定性要远强于mStrawberry，所以长期成为成像实验中mRFP1最好的替代品。这些以水果命名的荧光蛋白单体与mKO和TagRFP共同填补了水母红移荧光蛋白（如YPet）与大量低聚红色珊瑚荧光蛋白间的空白，并且目前已经商业化。虽然，某些荧光蛋白缺乏许多成像实验所需要的亮度和光稳定性，但是它们的存在提示我们，最终可以找到跨越整个可见光谱的亮度高、稳定性强的单体探针。

研究人员借助一种新技术迭代体细胞超突变（somatic hypermutation, SMH），获得了两种新

（self-association，文后小词典）的倾向，同时将发射峰推进到更长的波长区域。

在所有光谱型中，亮度最强的荧光蛋白是串联形式的二聚体Tomato（dimeric Tomato, dTomato）。它是一种原始的水果蛋白的橙色衍生物。dTomato来源于一种被命名为dimer2的中间体，这种中间体是在四聚体DsRed蛋白崩解过程中产生的。这种变体包含GFP的N末端和C末端的前后各七个氨基酸残基，这样可以提高与融合蛋白的兼容性并降低潜在的定位假象。串联二聚体包含dTomato的两个拷贝，由12个氨基酸残基的接头链接。由于有一对发色团，导致tdTomato（图22i）亮度极强并且有得天独厚的光稳定性（表6）。tdTomato最大的缺点是分子较大，在某些情况下可能会干扰融合蛋白的折叠。

的荧光蛋白，这表明首次获得了真正的远红外基因工程探针（发射波长为625nm及649nm）。其中最具有应用潜力的是mPlum（图22i），虽然其亮度有限仅为EGFP的10%（表6），但它有极好的光稳定性。mPlum可与蓝绿色、绿色、黄色及橙色荧光蛋白一起应用于多色成像实验中，也可在FRET中与绿色和黄色荧光蛋白如mEmerald（表6）、mCitrine配对使用。

Chudakov等人在2007年组合应用点特异性突变和随机突变得到了编码TurboRFP变体的库，它包含了发色团周围关键位点的突变。经过筛选及进一步突变，人们最后获得了一种二聚体蛋白，并将其命名为Katushka（发射峰为635nm）。虽然亮度仅为EGFP的三分之二，但Katushka是650-800nm光谱区亮度最强的荧光蛋白，此区域对较深的组织成像非常重要。将Katushka的四个主要突变引入TagRFP，产生的一种单体的远红外蛋白mKate（表6）具有相似的光谱特点。研究表明，mKate的光稳定性是个例外，其亮度与mCherry类似，这使得它成为在远红外光谱区成像的定位实验中极好的选择。

2.6 光学加亮荧光蛋白

人们对对荧光蛋白变体复杂的光物理学特性的研究，找到了可被两种方式激活的发色团，它们可从静息态发射荧光（即光激活）或者发生荧光发射带宽的转变（即光转化）。这些蛋白出现后被作为一种新型的探针，在活细胞成像中及对蛋白质动力学的研究中最为理想。如表7，理想的光学加亮荧光蛋白应易于光激活或光转化以产生更高水平的对比，以单体形式作为融合标签。这些为相对苛刻的光漂白技术提供了一个温和的选择，如光脱色荧光恢复技术（fluorescence recovery after photobleaching, FRAP）和光漂白过程中的荧光损失（fluorescence loss in photobleaching, FLIP），它们需要强的激光并反复照射，以便从感兴趣的区域完全清除活化的光团。更重要的是新合成的或未转化的荧光蛋白并未对它们产生消极的影响，它们仍然是不可见的或继续发射原有的波长。

第一个可光活化的（photoactivatable, PA）光学加亮PA-GFP（图23a，表7），就是通过将wtGFP的203位苏氨酸替换为组氨酸（T203H）而产生的只有被激活才发出绿色荧光的变体。用强烈的紫色光（390-415nm）照射，这个变体产生的绿色荧光（发射峰在504nm）提高了100倍，从而可以用来追踪分子亚群动力学（图24 a-c）。PA-GFP的非活化形式很难被检测到，这或许是它最大的

缺陷。然而，这一点对于建立一个较大的光活化动力学范围是至关重要的。在Emerald和超折叠GFP基础上开发的类似荧光蛋白动力学范围被降低，这或许是因为非活化状态下的荧光强度明显要比PA-GFP亮。

来源于水母*Aequorea coerulea*的一种新蛋白质PS-CFP2，就是在405nm照射下发生光转化从蓝绿色变成绿色荧光的（表7）。这种光学加亮的荧光蛋白与PA-GFP有相同的发色团，可能是通过类似的机制进行光活化的（图23a）。PS-CFP2与PA-GFP相比有一优势，在光转化前会发出有效的蓝绿色荧光，这就更容易追踪和定位。然而PS-CFP2的动力学范围要比PA-GFP低，这种探针在光转化效率上不如绿色到红色光学加亮的荧光蛋白。

所有已经报道的绿色到红色光学加亮的荧光蛋白（包括Dendra2、Eos、Kaede和KikGR，表7），都有一个能发出绿色荧光的来源于三肽HYG的发色团。用短波长的可见光或长波长的紫外线照射，就会引起酰胺氮和组氨酸残基的 α 碳原子断开，接下来发色团会连接到组氨酸支链上（图23b）。这一过程需要完整蛋白的催化作用，结果荧光发射向着长波长（橙色-红色）漂移。这种包括发色团转变的非常规的化学反应，为开发更好的加亮荧光蛋白提供了很好的基础。

表7 常用光学加亮荧光蛋白物理属性

蛋白	光谱型颜色	激发峰 (nm)	发射峰 (nm)	亮度	pK _a	聚集状态	发色团	滤光装置
PA-GFP(N)	绿色	400	515	2.7	4.5	弱二聚体	SYG	DAPI/FITC
PA-GFP(P)	绿色	504	517	13.8	4.5	弱二聚体	SYG	FITC/GFP
PS-CFP2(N)	蓝绿色	400	468	8.6	4.3	单体	SYG	CFP
PS-CFP2(P)	绿色	490	511	10.8	6.1	单体	SYG	FITC/GFP
PA-mRFP1(P)	红色	578	605	0.8	4.4	单体	QYG	TxRed
tdEos (N)	绿色	506	516	55.4	5.5	串联二聚体	HYG	FITC/GFP
tdEos (P)	红色	569	581	19.8	5.5	串联二聚体	HYG	TRITC
Dendra2(N)	绿色	490	507	22.5	6.6	单体	HYG	FITC/GFP
Dendra2(P)	红色	553	573	19.3	6.9	单体	HYG	TRITC
KFP1(P)	红色	580	600	4.1	NA	四聚体	MYG	TRITC/DsRed
Dronpa(P)	绿色	503	518	80.8	5.0	单体	CYG	FITC/GFP

N: 天然构象; P: 光活化或光转化后构象。

资料来源: *Journal of Cell Science*

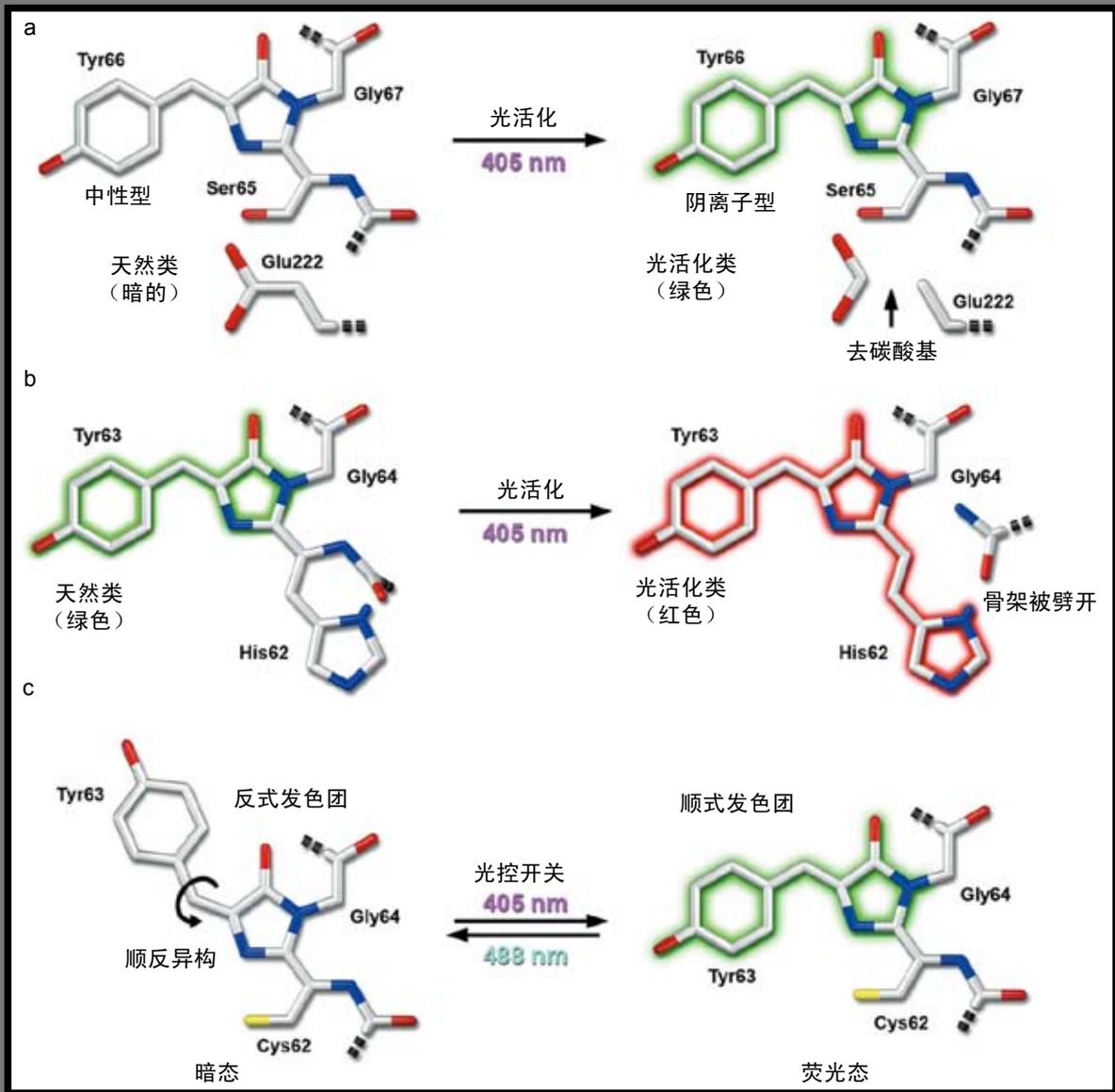


图23 光学加亮荧光蛋白光活化、光转化和光控的机制。(a) PA-GFP和PS-CFP2的光活化是当发色团由中性转变为阴离子态而导致222位谷氨酸脱羧基引起的。(b) 包含HYG发色团的Kaede、KikGR、Dendra2和Eos, 它们的绿色到红色的光转化, 紫外或紫色光照射后引起62位组氨酸残基的酰胺氮与 α -碳原子间连接断裂, 形成一个相连的双咪唑环系统。(c) Dronpa的光控是照射光在405nm和488nm间转换引起的顺-反式光异构化。mTFP0.7和KFP1的异构化机制与此相似。(图片来源: *Journal of Cell Science*)

遗憾的是, 光学加亮的荧光蛋白的全部潜能还远远没有被认识到。在现有的几种光活化探针中, PA-GFP仍然是绿色荧光区最好的选择, 而且在动力学范围方面远优于红色变体PA-mRFP1。PS-CFP2是蓝绿到绿色光转化的唯一选择, PS-CFP2虽然以单体形式存在, 但其亮度低, 而且在成像过程中会因持续的光转化而造成伪像。在绿色到红色类型中, 在亮度和转化效率方面表现最好的是Kaede和KikGR。然而二者都是四聚体, 在大多数实验中都不能应用。Dendra2是单体变体, 或许在感光融合及FRET研究中是最好的选择(图24 g-i)。但是由于在激光扫描共聚焦成像中, 快速光漂白使其亮度不到四聚体的50%。绿色到红色光加亮荧光蛋白Eos的二聚体在亮度及光稳定性方面比Dendra2要好, 但体积大两倍(图24 d-f)。很明显, 所有的种类都需要进一步找到更好的荧光蛋白。

来源于Pectiniidae(一种石化珊瑚虫)的单体荧光蛋白Dronpa的产生, 宣告了新一代专门的开-关可控的可逆光学加亮荧光蛋白的产生。Dronpa是经过定向和随机突变的基因工程改构获得的, 表现出非同寻常的光致变色, 用两种不同激发波长照射可使其开启或关闭荧光(图23c和图24j-l)。Dronpa在503nm有一个最大

吸收峰，在390nm处有一个次峰。主峰归因于去质子化的发色团（阴离子型），而次峰产生于质子化（中性）形式的发色团。当在488nm照射时，阴离子型的发色团在最大518nm发射，此时，相应的光量子产率较高达到0.85（表7）。与此形成鲜明对照的是，中性形态的发色团几乎发不出荧光。Dronpa的光控开关就是去质子化与质子化形态的相互转换。一旦在488nm受到照射，Dronpa就变成质子化形式，荧光减弱变暗即关闭状态，此时390nm吸收峰占优势。在最低照度（405nm）下，能很容易地令其从暗淡状态转换回原来的去质子化状态，发出荧光（图23c）。2007年，研究人员报道了水鸭绿荧光蛋白前体mTFP0.7类似的行为，从结晶学上描述了其暗状态和荧光状态的转换。

目前，人们已经从*Anemonia sulcata*分离到一种非荧光色素蛋白，开发出另一种光可控加亮荧光蛋白Kindling荧光蛋白（商品名KFP1，表7）。KFP1只有在525nm和580nm间的绿色或黄色光照射

下才发出荧光。低亮度的光导致瞬时红色荧光，其最大激发和发射谱分别为580nm和600nm，随着照射的停止而慢慢地衰退，重新恢复到原来非荧光状态。用强烈的蓝光（450-490nm）照射，会立即完全地淬灭红色荧光，这使得荧光标记受到很好的控制。相反，高强度的绿光（约550nm）照射或以中等水平持续照射，结果导致不可逆的光转换，产生强度比非活化蛋白强30倍的荧光。KFP1主要的缺点是其强制性的四聚体，这严重地影响其作为融合标签及其FRET中的应用。

荧光蛋白光控机制的研究表明，发色团顺-反异构体是开关过程的关键事件。顺式构象代表荧光形态，而反式异构体为发色团的非荧光或暗状态（图23c）。这些构象的改变很显然是伴随着发色团各种各样的质子化作用。更重要的是，光诱导的光控可能是发色团平面性及其内部氨基酸支链结构重排的表现。这可能是各种光活化和光控荧光蛋白基本的机制。

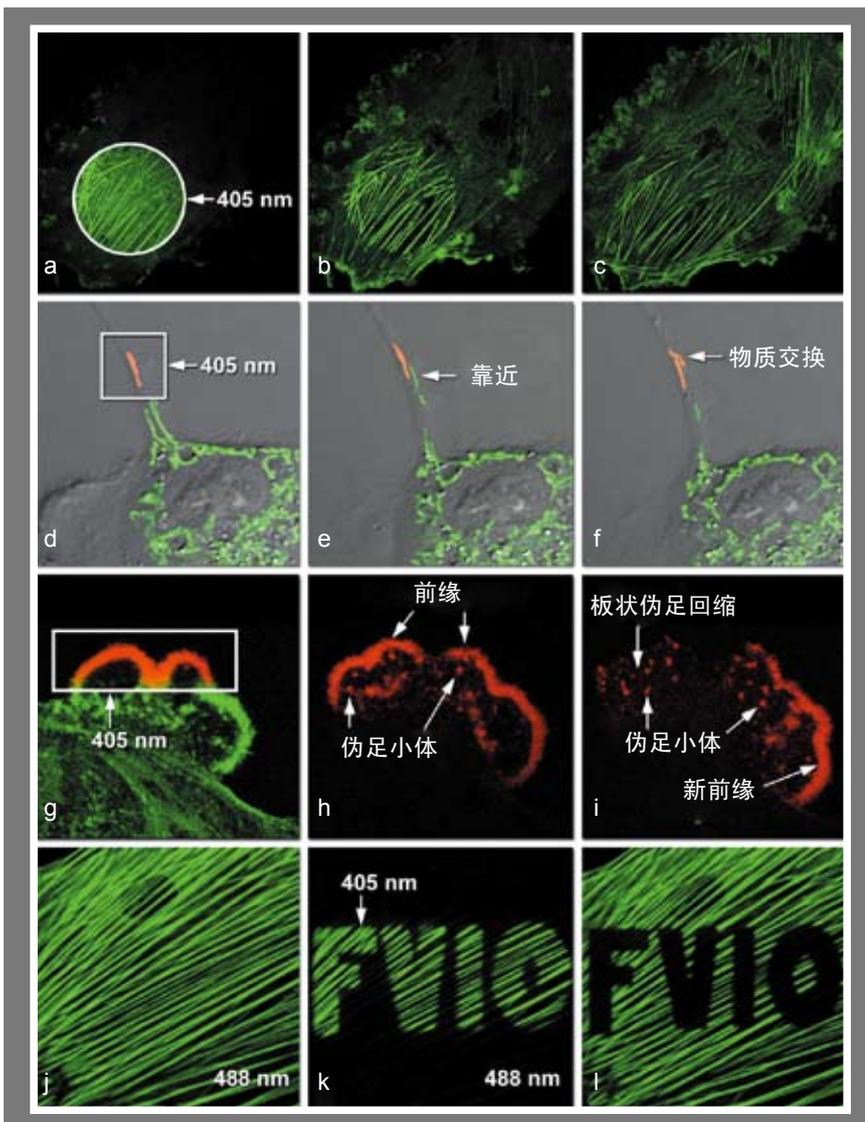


图24 光学加亮荧光蛋白在激光扫描共聚焦显微镜下成像。(a-c) mPA-GFP-actin-C-7在负鼠肾上皮细胞（OK细胞系）中的光活化。(a) 用Olympus FV1000 飓风扫描器选定的环状区域，在405nm照射5秒钟。(b) 光活化的肌动蛋白嵌合体，时间为5分钟。(c) 胞浆肌动蛋白池和丝状肌动蛋白网，时间为60分钟。(d-f) 跟踪兔肾上皮细胞（RK-13细胞系）中tdEos-mito-N-7标记的线粒体。(d) 选定的区域中，单个线粒体（红色）在405nm光照下的光转化。(e) 箭头所示为未转化的线粒体（绿色）向光转化的线粒体靠近，时间为10分钟。(f) 线粒体间的物质交换，时间为20分钟。(g-i) 在OK细胞中用Dendra2-actin-C-7检测板状伪足。(g) 用405nm激光选定区域的光转化（红色）。(h) 光转化肌动蛋白形成的伪足小体及其前缘的改变，时间为20分钟。(i) 光转化的板状伪足回缩，从而促进新伪足小体和新前缘的形成，时间为45分钟。(j-l) 大鼠胸主动脉成肌细胞（A7r5细胞系）中Dronpa-actin-C-7标记的肌动蛋白细胞骨架的光控开关。(j) 肌动蛋白网在488nm激光下的成像。(k) 完全光控开关后，标记的肌动蛋白在488nm“关闭”，拼写有FV10的区域在405nm激光下被激活，时间为3分钟。(l) 肌动蛋白网在488nm成像时FV10区域被光漂白。

图片来源: *Journal of Cell Science*

除了选择性地标记融合蛋白亚群用来研究动力学外，光学加亮荧光蛋白在超分辨率显微镜技术中也是有价值的工具，它打破了传统的Abbe衍射屏障。最新建立的方法，如光敏定位显微技术（photoactivated localization microscopy, PALM；图25）和随机光学重建显微法（stochastic optical reconstruction microscopy, STORM）就是很好的例子。这些技术使得研究者能够在更高的分辨率下更快地进行活细胞成像。

这些独特的光激活探针、绿色到红色光学加亮荧光蛋白及来源于GFP衍生物和造礁珊瑚蛋白的光控变体，都对解决与聚合及微调光激活及发射谱的问题有积极的作用。将来，随着更先进的光学加亮蛋白工程的发展，其光转化波长将漂移到蓝色和绿色光谱区域，比现在常用的紫外波长对活细胞毒性更小，发射波长漂移到穿过远红外区域的黄色区域，这些都将极大地扩展这类探针的应用潜力。

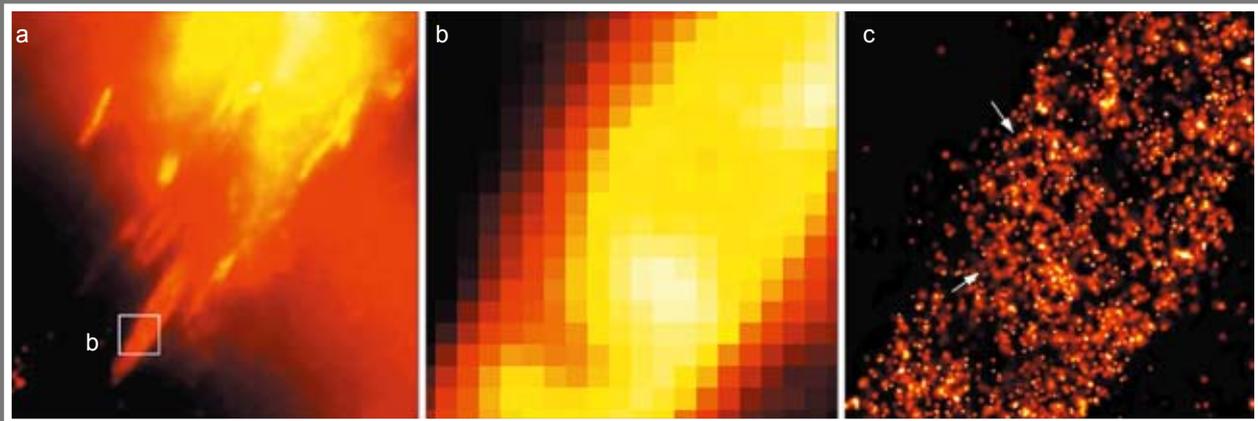


图25 多聚甲醛固定的灰狐肺成纤维细胞粘着斑在光敏定位显微镜（PALM）下成像。（a）tdEos 标记的多个粘着斑与人纽蛋白（human vinculin, VCL）融合后在广视野下荧光成像。（b）图a中框出区域的粘着斑全内反射荧光（TIRF）成像。（c）对图B所示的粘着斑结构进行光敏定位显微成像（粘着斑结构上有明显的纽蛋白装配，已用白色箭头标出）。（图片来源：Journal of Cell Science）

小词典

Abbe衍射屏障

早在1873年，Abbe就发现了一个规律，现在基本已成为一个定律。这个规律认为，根据透镜原理制造的光学显微镜，其分辨能力不可能超过光波波长的一半，这个限制被称为“衍射屏障（diffraction barrier）”。

自缔合（self association）

自缔合指借分子间作用力、氢键、弱的离子间引力而缔合。如在一定距离内羧基和氨基间的引力：距离近，发生缩合反应；距离远，引力太弱，则发生自缔合。

2.7 越来越多的荧光蛋白发生斯托克斯位移

除了采用工程设计来调整发射谱外，荧光蛋白突变技术也靶向吸收峰与发射峰间的分离，即斯托克斯位移，来产生更好的探针以用于FRET、FCCS及多色成像。将wtGFP的第203位氨基酸由T苏氨酸突变为异亮氨酸I而产生的变体Sapphire在475nm就没有次激发峰。Sapphire表现出引人注目的112nm的斯托克斯位移，其激发峰和发射峰分别为399nm和511nm。在此基础上再进行四个额外的突变产生的衍生物T-Sapphire，其折叠功能得以改进并产生更亮的荧光。由于这些变体在紫外区能够被激发，在FRET中可作为极好的供体与橙色和红色蛋白一起应用。

Miyawaki等人在来源于一种叫做Montipora的蔷薇珊瑚色素蛋白的基础上，采用更严格的方法构建了最长达180nm的斯托克斯位移荧光蛋白变体。将发色团周围的五个残基进行半随机突变得到一种具有双峰激发谱的红色荧光蛋白，双峰分别在452nm和580nm，其发射峰在606nm。另外，他们又进行了另外四个突变，结果完全减少了580nm峰，并且将另一个吸收峰蓝移到440nm。这种衍生

物被命名为Keima，发射峰在616nm，为四聚体。在进行多轮突变后得到了具有与Keima类似光谱特性的二聚体dKeima，以及发射峰为620nm的单体mKeima。mKeima的亮度有限与mPlum相似，它需要特殊的滤光片才能成像，但可在FCCS和多色成像实验中应用。

目前，每个光谱型中都有一些具有潜力的荧光蛋白（如图22及表6所示），但多数还没有与EGFP在光稳定性及其它至关重要的性能（除pH稳定性外）方面相当的荧光蛋白。蓝色和蓝绿色区域新成员充分地改进了亮度和光稳定性，所有的橙色荧光蛋白都是长期多色成像的极好选择。另外，YFP虽然亮度比EGFP强，但其光稳定性还没有达到最佳水平，而红色和远红外荧光蛋白是所有光谱型中亮度最暗的。不考虑光谱型和单体特性，更复杂的问题是潜在的难折叠蛋白的聚集假象。即便如此，表6所列的荧光蛋白也能够两种或三种颜色成像获得极好的结果。大多数荧光蛋白都是过去数年发现并引入研究领域的，它们的亮度和光稳定性仍需要将来进一步优化。

小词典

斯托克斯位移

1852年，G.G.Stokes在研究光致发光的光谱时，提出了一个论断：发光的波长总是大于激发光的波长。后来，在大量的实验中，出现了很多例外。于是他们把发光谱线分为两类，符合上述关系的叫做斯托克斯线，它的波长和激发光的波长之差，称为斯托克斯位移。反之，称为反斯托克斯线，相应的波长差，则称为反斯托克斯位移。

由于存在很多例外，上述斯托克斯提出的论断就不是规律，而只能称为定则。1879年，E.洛梅尔概括了大量实验结果，把斯托克斯定则修改为：发光光谱的峰值及重心的波长总是大于激发光光谱的峰值及重心的波长，称为斯托克斯-洛梅尔定律。

1927年，C.瓦维洛夫定律揭示了发光效率随着激发光的波长而变化的规律：在斯托克斯区（即发

光波长大于激发光波长的频段）发光的能量效率随着激发光波长的增大而上升，而发光的量子效率不因激发光波长的增大而改变；但是，进入反斯托克斯区以后，发光效率就急剧下降，从而进一步揭示了斯托克斯规则的物理内容。

近代关于发光光谱的研究又深入一步阐明了产生斯托克斯位移的物理过程。它反映了发光中心所受周围环境的影响，是发光中心与振动中的点阵相互作用的结果。对宽频带发光过程来说，斯托克斯位移是很有益的，因为它可以避免光被材料再吸收。近年来，人们发现了将长波光转换为短波光的材料，它吸收两个以上的光子后，发射出一个能量较大的光子，一般只是在高激发密度下才比较显著。

特约编辑招聘启事

为了及时收集生命科学最新资讯、提高《生命奥秘》办刊质量，现面向从事生命科学或对这学科有浓厚兴趣的科研人员、学生诚聘特约编辑（兼职）。

职位职责：

独立完成《生命奥秘》专题的策划：对基因组学、蛋白组学、生物信息学和细胞生物学等学科的发展以及生物医学领域相关技术（例如基因诊断技术、干细胞和克隆技术、生物芯片技术等）的应用进行翻译及深入评述。

选题要求内容新颖、评述精辟、注重时效和深入浅出。尤其欢迎以自身系统研究为基础的高水平译述与评论，结合所从事的科研工作提出自己的见解、今后设想或前瞻性展望。

要求：

- 1.具备基因组学、蛋白组学、生物信息学、细胞生物学等生命科学学科背景；
- 2.具备良好的生命科学前沿触觉；
- 3.具备较高的外文文献翻译、编译水平；
- 4.具备较强的选题策划、资料搜集、组织能力，以及专业稿件撰写能力；
- 5.具有高级职称；或者拥有（正在攻读）该领域的最高学位。

有意者请将个人简历发送至 editor@lifeomics.com

联系人：蔡小姐

3. 荧光蛋白工程进展

所有的荧光蛋白都是相似的三维圆柱形结构，多肽骨架的大部分折叠成11条氢键链接的 β 折叠片，中央为包含发色团的 α 螺旋，短的螺旋片段保护着圆柱的两端（图20）。这些 β 折叠片由不太有序排列的富含脯氨酸的环链接在一起，每个折叠片的氨基酸支链或者凹入蛋白质内部或者凸向表面。与多数可溶性蛋白相似，蛋白表面的残基常常带有电荷或极性，也包含部分疏水残基。该蛋白内部折叠很紧密，即使水分子也被疏水键固定在氨基酸上，而且离子或其它小分子的扩散空间极小。

荧光蛋白内部的刚性结构是由独特的化学环境造成的，这有利于中央的 α 螺旋中由三个氨基酸形成自催化的发色团。这种环境的改变会产生一些变体，这些变体在光谱特点、光稳定性及其它物理特性方面都有所改变。这可用一个例子来说明，普通的三肽甲硫氨酸-酪氨酸-甘氨酸（MYG）能够形成跨越175nm发射区域的发色团，这明显仅是依靠 β 折叠柱内部造成的化学物理环境。值得注意的是，具有MYG发色团的荧光蛋白包括ZsGreen1（发射峰507nm）、tdTomato、TagRFP、mCherry、mKate和mPlum。在MYG光谱区域末端的荧光蛋白包括蓝绿色荧光蛋白、AmCyan1（Clontech，发射峰486nm）及远红外荧光蛋白、AQ14（发射峰663nm）。虽然，人们目前已经阐明报道的多数荧光蛋白包含MYG发色团，但是很可能还存在很大的差异。

理论上，进行新的荧光蛋白工程首先要改造发色团残基及其邻近残基。这种努力产生了多种光谱变体，它们的发射谱改变了数十纳米。在获得*Aequorea*荧光蛋白晶体后，蛋白质工程师就能在更大的范围设计新的变体，来改变光谱特性、光稳定性、齐聚反应、pH敏感性和成熟效率。珊瑚红移荧光蛋白的发现同样产生了新的变体，这些变体有一个大约160nm的发射光谱范围，它们的特性更是多种多样。然而仅从晶体结构来进行理论推断还有一些局限，许多通过随机突变产生的变体会出现亮度降低及蛋白折叠问题，甚至根本不能发出荧光。通常表面上看起来很明显的突变，都必须经过一轮或多轮随机突变才能保留其它必要的特性。正是由于这一原因，多个研究组已经采用创新的技术来改

进设计策略。

一种有潜力的方法应该有助于荧光蛋白特性的微调，就是将靶向特异残基的结构库与为了改良其特点的定量筛选结合起来。研究者应用这一方法成功地增强了BFP的亮度及光稳定性。最好的突变体被命名为Azurite，其亮度比天然BFP高60%。下一步，研究人员将研究这种方法能否应用于其它荧光蛋白。

Nguyen和Daugherty等人采用类似的被称为进化优化的方法，来优化用来检测凋亡的带有caspase-3（半胱氨酸蛋白酶3）酶切位点的FRET生物传感器中配对的CFP和YFP。结论是，YPet和一种蓝绿色变体CyPet表现出比ECFP更强的pH稳定性和更快速的成熟性。然而CyPet在37℃很难折叠，这严重地限制了其作为独立探针的应用范围。在CyPet和YPet中的氨基酸替换分布在整个蛋白中，有益的突变既有靠近发色团的也有离发色团比较远的。CyPet-YPet FRET caspase-3生物传感器的动态范围要比mCerulean-mVenus配对的FRET提高20倍。但是最近研究表明，CyPet-YPet生物传感器易于使二聚化增强，这可能是其超强表现的原因所在。因此有人对此提出了疑问，所以在设计实验时要认真考虑是否使用CyPet-YPet组合。

此外，研究者采用常规序列来改造来源于石珊瑚*Galaxeidae*的荧光蛋白，获得了单体的绿色变体Azami Green（mAG）。采用同样的工程方法，通过改良序列来改变蛋白的特性，结果得到的常规绿色蛋白（consensus green protein, CGP）与mAG相差23个残基，与来自于珊瑚*Agaricia fragilis*的GFP2相差76个残基。CGP在细菌中表达为单体形式，并且表现出高水平的荧光，但是表达量却比mAG降低了40%左右，这使得CGP明显变得暗淡。有趣的是，mAG与CGP不同的残基有超过85%在蛋白表面，这或许说明表面残基要比内部残基进化的快。虽然，首次荧光蛋白工程所得到的产品不如原来蛋白效率高，但是随着已知荧光蛋白序列的数据增多，这种方法毫无疑问会发挥更大的作用。

融合蛋白中折叠效率得到提高的GFP变体，为生产超折叠GFP奠定了基础。将GFP序列重排库与难折叠的多肽融合，这些难折叠的肽作为诱饵蛋

白在细菌中干扰GFP的正确折叠。经过四轮DNA重排，研究人员分离得到包含六个新的突变的荧光亮度强的克隆。这一工作至关重要的一点就是：即使在高度优化的GFP变体中也还有很大的工程改进空间。将这种方法应用在其它颜色的蛋白中可能会得到相似的结果。

钱永健等发明了一种真正独特的方法进行基因工程改造荧光蛋白，包括采用从免疫系统借鉴来的技术迭代体细胞超突变（somatic hypermutation, SHM）来直接优化。他们要产生发射波长在远红外区（>625nm）的红色荧光蛋白变体。人们已经知道，B淋巴细胞能够通过SHM将点突变引入抗体的可变区。研究人员证实，能够在超突变表达免疫球蛋白的B细胞系Ramos中采用这一技术来产生新的荧光蛋白。在Ramos细胞系中表达mRFP1的一种变体，启动子为四环素诱导启动子，载体为逆转录病毒，其转录在强力霉素调控下来控制SHM的水平。用FACS富集来选择最长发射波长的克隆，此过程需要多次重复。23轮后分离得到一种单体，发射波长在远红外区，并命名为mPlum（表6），同时对它的特性加以鉴定。mPlum的最大发射谱

为649nm，比原来位移了37nm，并且这种荧光蛋白也表现出非常大的斯托克司频移，达到59nm。早期得到的克隆mRaspberry发射谱波长更短，为625nm。虽然mRaspberry的光稳定性不足以在活细胞成像中应用，但mPlum的光稳定性与黄色光谱型的许多蛋白相当。

采用以上描述的方法对已有的蛋白进行微调，来改进它们的折叠特性、亮度、齐聚效应及光稳定性，毫无疑问最终能够得到比简单地从海洋中寻找到的荧光蛋白更好的探针。最近，荧光蛋白工程技术的突破已经得到了几种新的变体，这些都是传统方法无法做到的。这些技术已经用来产生新的颜色的荧光蛋白、建立更稳定的结构、增强折叠效率及优化FRET效率。或许新的方法将能够使得pH敏感性及光稳定性得到改善，这两点对其在酸性的细胞器官及长期成像实验中的应用是至关重要的。已知许多氨基酸三联体能使发射颜色发生巨大变化（如MYG, 177nm; QYG, 137nm; TYG, 91nm; CYG, 80nm），这表明在荧光蛋白序列中有足够的空间添加额外的突变，从而能够优化颜色及多种其它荧光蛋白的性质。

参考文献

1. Nathan C. Shaner, George H. Patterson & Michael W. Davidson. (2007) Advances in fluorescent protein technology, *Journal of Cell Science*, 120: 4247-4260.

四、更多阅读

1. GFP的科学影响

随着GFP类蛋白作为细胞内遗传标签的应用以及成像技术、数据分析的快速发展，GFP在生物科学中的应用得到极大的推进。早期发展起来的生物物理荧光方法，如FRET、荧光相关谱（fluorescence correlation spectroscopy, FCS）、荧光交叉相关光谱（fluorescence cross-correlation spectroscopy, FCCS）、光脱色荧光恢复技术（fluorescence recovery after photo-bleaching, FRAP）和全内反射显微术等，都是借助GFP类蛋白发出的荧光信号来监测细胞内发生的事件，而且已经得到广泛应用。此外，荧光寿命成像术（fluorescence life-time imaging, FLIM）、高分辨率光敏定位显微技术（photo-activation localization microscopy, PALM）及其它建立在GFP基础上的高分辨率方法也已经出现。实际上自1992年以来，各类期刊有超过20,000篇关于GFP的文章，这对生物科学实验的如何实施、如何解释都有巨大的影响。