Martin Chalfie则证明了GFP在作为多种生物学现象发光遗传标记方面的应用价值。

钱永健为我们阐明了GFP发光的机制，并且发现了除绿色之外可用于标记的其它颜色。他对细胞生物学和神经生物学领域的贡献具有划时代的意义。他的多色荧光蛋白标记技术让科学家能够用不同颜色对多个蛋白和细胞进行标记，从而实现了同时对多个生物学过程进行追踪。

现在，三位科学家的研究成果已经作为标记工具在生物科学中得到广泛应用。

参考文献

1. http://nobelprize.org
2. Roger Tsien. (2007) Roger Tsien: bringing color to cell biology. A passion for chemistry, color, and conversations with cells is what drives Roger Tsien. Interview by Ruth Williams, *The Journal of Cell Biology*, 179 (1):6-8.

一、GFP背景概述

绿色荧光蛋白（green fluorescent protein, GFP）最早由Osamu Shimomura于1962年在水母（*Aequorea victoria*）（图2a）中发现。这种蛋白质在蓝色波长范围的光照激发下发出绿色荧光，其发光过程需要冷光蛋白质Aequorin的帮助，而且，这个冷光蛋白质可与钙离子（Ca^{2+}）相互作用（图3）。在*Aequorea victoria*中发现的野生型绿色荧光蛋白的分子量较小，仅为27~30kDa，而编码GFP的基因序列也很短，为2.6kb。

GFP由238个氨基酸残基组成。GFP序列中的65-67位残基（Ser65-Tyr66-Gly67）可自发形成荧光发色基团——对羟基苯咪唑啉酮（图4）。

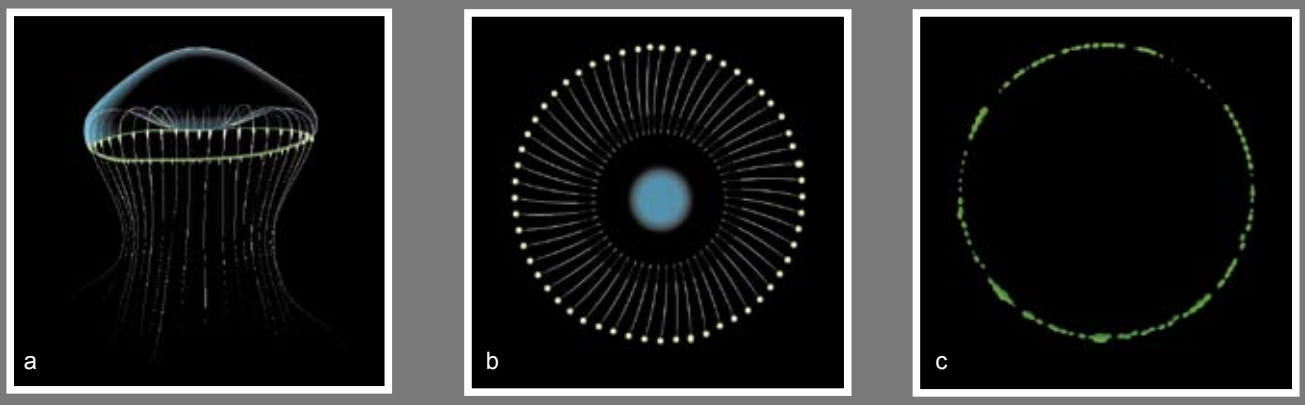

图2 居住于北美西海岸附近的水母*Aequorea Victoria*（a）。它的发光器官位于“伞状结构”的边缘（b和c）。

图片来源：*The Royal Swedish Academy of Sciences*

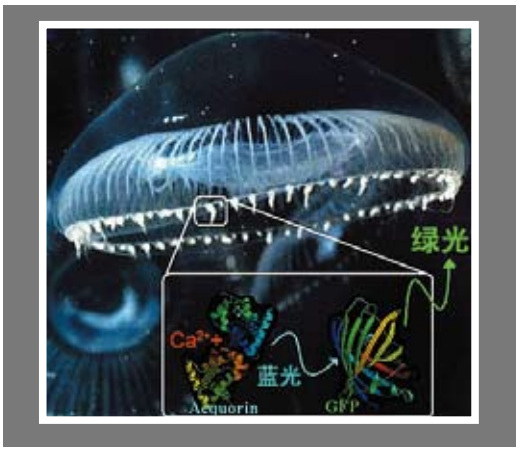

图3 水母体内有一种发光蛋白——Aequorin，它与钙离子结合时会发出蓝光。这道蓝光立刻就会被一种蛋白吸收，从而发出绿色荧光。这种捕获蓝光，发出绿光的蛋白质，就是GFP。

图片来源：Osamu Shimomura

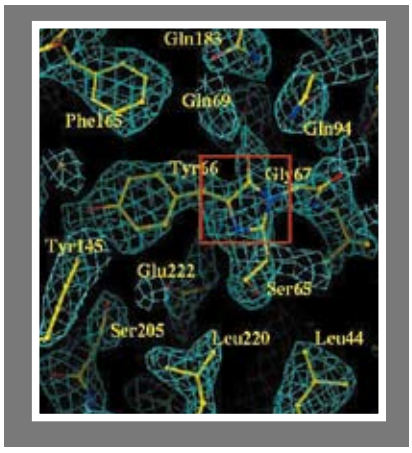

图4 GFP一级结构中第65～67位氨基酸残基（Ser-Tyr-Gly）形成的荧光发色基团（红色方框内）。

图片来源：http://www.biochem.arizona.edu

GFP的激发光谱在400nm附近有一个主激发峰，在470nm附近有一个次激发峰。发射光谱在505nm附近有一尖锐的主发射峰，在540nm附近有一肩峰（图5）。

GFP的晶体结构是由11个β-折叠组成的柱状结构，直径约3nm，长约4nm。柱中央有一个α-螺旋（图6），发色基团在α-螺旋上，非常靠近柱的中心（图4，图6）。蛋白的二级结构大部分为α-螺旋和β-折叠。

GFP的化学性质相当稳定，无光漂白现象（Photobleaching），用甲醛固定和石蜡包埋亦不影响其荧光性质。在细胞生物学与分子生物学领域中，绿色荧光蛋白基因常被用作报告基因。

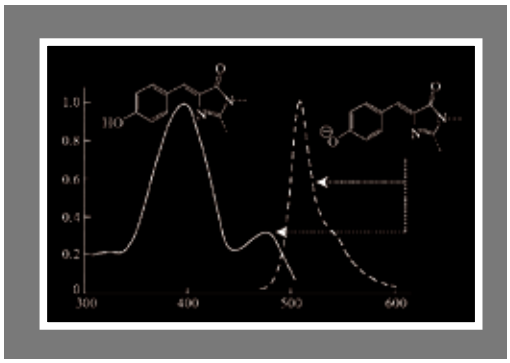

图5 *Aequorea victoria*的天然GFP 的荧光激发光谱（实线）和发射光谱（虚线）。

图片来源：*Annu Rev Biochem*

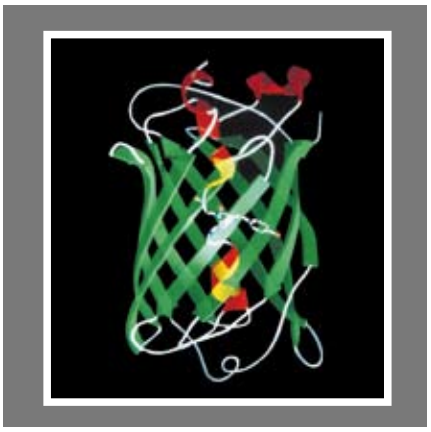

图6 GFP 的四级结构。柱状结构中央为带有发色基团的α-螺旋。

图片来源：google

参考文献

1. http://www.tsienlab.ucsd.edu/
2. http://www.conncoll.edu
3. http://nobelprize.org/
4. http://www.brighterideasinc.com/GFPNobelPrize.htm

5. http://brainwindows.wordpress.com/2008/10/08/2008-nobel-prize-in-chemistry-to-gfp/
6. The Nobel Prize in Chemistry 2008, *The Royal Swedish Academy of Sciences*, 1-7. www.kva.se
7. Roger Tsien. (2007) Roger Tsien: bringing color to cell biology. A passion for chemistry, color, and conversations with cells is what drives Roger Tsien. Interview by Ruth Williams, , 179 (1):6-8.

二、 GFP在生命科学研究中的应用

1．GFP在蛋白质相互作用研究中的应用

在活体内检测蛋白与蛋白相互作用，对我们理解生物学过程至关重要。研究蛋白质相互作用的经典技术是酵母双杂交系统。它是一个基于转录因子模块结构的遗传学方法，由Fields和Song等人于1989年首次建立，随后在蛋白相互作用研究领域广泛应用。酵母双杂交系统的实验过程，就是将已知蛋白作为诱饵蛋白，在系统中捕获与其相互作用的蛋白质。来源于水母的GFP在此系统中得到了广泛应用，人们可用它直接监测蛋白质与蛋白质的相互作用。

科学家利用两个增强型GFP（EGFP）片段重建功能，从而开发出一种新型的报告系统以应用于酵母双杂交系统。该系统在基因水平上将EGFP片段分别与诱饵蛋白及要捕获的蛋白融合，在体内共表达，从而研究蛋白与蛋白间的相互作用。与现有的酵母双杂交系统相比，EGFP系统中的诱饵、靶蛋白载体的报告基因和复制控制元件均得到了改进。在酵母中，当蛋白与蛋白发生相互作用时，分开的EGFP能够重新结合而发出荧光（图7）。

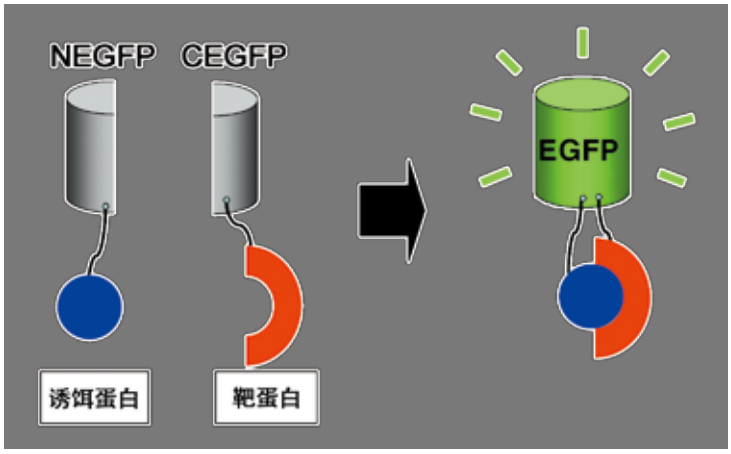

图7 EGFP作为报告蛋白的酵母双杂交系统原理示意图。EGFP的N-末端和C-末端分别与诱饵蛋白（已知蛋白）和靶蛋白融合表达。当诱饵蛋白与靶蛋白发生相互作用，荧光发色团就被拉近，EGFP就发出荧光。

图片来源：*The Protein Journal*

1.1 构建分离的EGFP报告质粒

以分离的EGFP作为酵母双杂交系统的报告基因有明显的优势，因为它不需要外源底物及辅助因子就能发出荧光。从理论上讲，该报告系统的基础是酵母中蛋白与蛋白间发生相互作用后，被分开的荧光蛋白片段会再次互相结合从而发出荧光。EGFP报告质粒包括pNEGFP和pCEGFP。构建模式见图8。

在乙醇脱氢酶1（ADH1）启动子控制下，诱饵蛋白质粒编码的EGFP N-末端（NEGFP, 1-158位氨基酸）及靶蛋白质粒编码的EGFP C-末端（CEGFP, 159-239位氨基酸）能够被组成型表达，其转录被ADH1终