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。

下面举几个实例，简要说明建立在GFP基础上的方法是如何从根本上改变生物科学的所有分支学科的实验潜力的。

GFP最常用的用途是监测与GFP融合表达的蛋白的定位、运动及化学反应。GFP融合蛋白的定位被广泛地应用于细胞周期或指数生长期等不同的细胞研究中。

研究者用多种GFP光谱变体标记细胞中不同的蛋白质，已经得到了许多关于这些蛋白如何对化学抑制剂、突变及基因敲除等反应的动力学数据。

GFP的另一种应用是监测基因的时序表达，例如在大分子机器的形成研究中的应用，这些大分子机器包括能使细菌具有趋化反应的鞭毛及其运动纤维等。

通过在其原有染色体位置表达全长GFP标签蛋白，能够监测不同生物体中所有蛋白酶体的细胞内定位及其浓度谱。

在GFP荧光基础上建立的单细胞单分子显微技术，为细胞内运动现象的动力学研究开辟了新的途径。例如，单个蛋白分子在细胞内与稳定的靶标结合就能以一个点的形式检测到，在比它们结合的时间还要短的时间内就能收集到其发出的荧光。相反，如果在监测时间内蛋白在细胞内自由地扩散，其荧光就会被隐藏在背景荧光中。这一GFP融合转录因子的溶解过程动力学原则，是最近才被阐明的，无论结合在染色体特异位点或非特异位点上都是如此。

当两种GFP融合蛋白，一种发射光谱波长与另一种的激发光谱重叠，就会产生相互作用，并发出较强的FRET信号。研究这种直接相互作用的另一种方法是通过GFP蛋白的互补。一种蛋白与GFP的一部分融合，同时另一种蛋白与GFP的另一半融合。当两种蛋白形成复合体，GFP的两部分会结合在一起从而产生荧光。

通过荧光交叉相关光谱（fluorescence cross-correlation spectroscopy, FCCS）可以间接鉴定蛋白质复合体。将两种感兴趣的蛋白分别用发射波长不同的GFP分子标记，当这两种波长的荧光交叉后，就能够确定这两种融合蛋白是各自独立地扩散还是以复合体的形式扩散。

许多以GFP为基础的技术已经被用来研究胞内运输。这些方法使得研究动力学蛋白池的大小及蛋白在不同亚细胞结构间运动的留存时间成为可能。

GFP被用来研究膜结合细胞器，一个关键的发现就是细胞器间持续地交换蛋白成分。例如，高尔基体是接受内质网分泌物的细胞器，但研究发现它的组分持续地循环回到内质网，并且在有丝分裂过程中分解掉。

GFP在细胞核结构研究中的应用，已经揭示分裂间期细胞核结构是动态的和自组装的。

GFP融合蛋白已经成功地用于构建检测细胞内参数的传感器，来测定pH、Ca^{2+}及各种代谢物的浓度。

最后，GFP已广泛地用于多细胞生物体内细胞及组织的成像，并且已经成为神经生物学研究中一种非常重要的实验工具。

原文检索：http://www.nobelprize.org

2.Nature对GFP的评述

2008年，诺贝尔化学奖授予Osamu Shimomura、Martin Chalfie和钱永健三位为绿色荧光蛋白的发现和发展做出贡献的科学家。

人们熟知的GFP是一种由238个氨基酸构成的柱状蛋白。外围由β折叠片围绕，内部则是一个线状的α-螺旋通过其长轴从中间穿过。当GFP受紫外光或蓝光激发时，α-螺旋包含的发色团会发出绿色荧光。由于这一特点及其无种属限制，GFP作为荧光标签被广泛用于细胞水平上的监测生物活动。

GFP的故事开始于海洋中的水母*Aequorea victoria*，这种水母有一个与众不同的特点，当激动或表现不安时其外侧边缘会发出绿光。20世纪60年代早期，Osamu Shimomura从收集到的成千上万水母中提取出了少量的蓝色发光蛋白，后来命名为水母发光蛋白（*aequorin*）。在此过程中，他也发现了另一种物质，这种物质受到紫外光激发会发出绿光，这就是后来被广为熟知的GFP。Shimomura等人进一步研究表明，水母产生的绿色

荧光源于一个能量传递过程，在此过程中，水母发光蛋白激发GFP然后发出绿光。

20世纪90年代早期，Martin Chalfie及其合作者证明GFP也能够在*Aequorea victoria* 以外的生物中表达，比如大肠杆菌和小秀丽线虫。这一突破为GFP作为荧光标签在生物活动研究中的实际应用铺平了道路。当时普遍认为GFP中的发色团需要多个步骤和其它蛋白的参与，这些实验推翻了这一论断。更值得注目的是，这一结果证明GFP不需要其它辅助试剂就能产生荧光，这就意味着GFP可被用作一个通用标签。通过基因工程在小秀丽线虫的细胞中表达GFP，Chalfie就能在绿光下观察细胞活动了！

GFP的进一步发展是基于对这种蛋白质分子结构及其发色团的充分了解。钱永健及其合作者解释了GFP肽链中65位的丝氨酸（serine）、66位的酪氨酸（tyrosine）和67位的甘氨酸（glycine）在氧存在条件下如何发生反应形成三肽环形荧光发色团*p*-hydroxybenzylideneimidazolinone。在此基础上，钱永健进一步发展出了其它的GFP衍生物，这些衍生物具有不同光谱特性并且稳定性得以提高。现在不仅荧光亮度能够增强，而且荧光颜色也能够调整。今天，GFP和GFP类蛋白能够发出所有彩虹颜色的荧光。

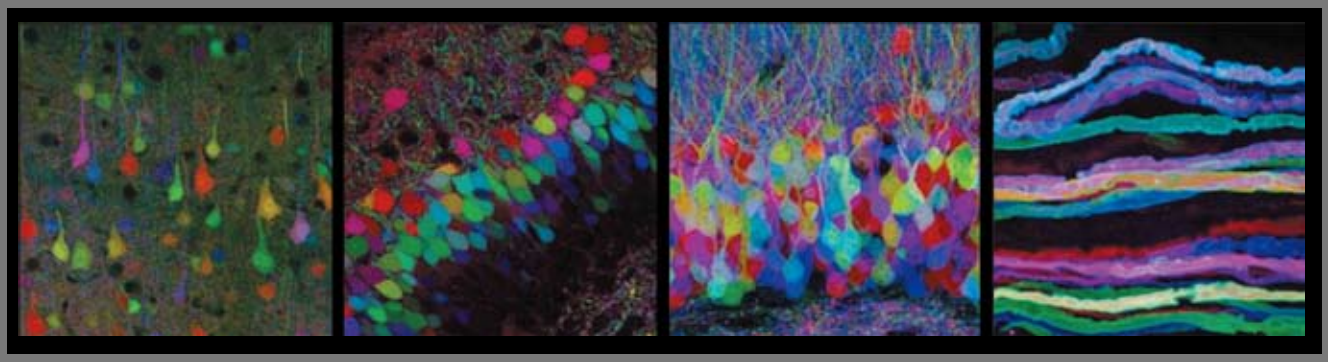

图26 美国哈佛大学（Harvard University）的研究人员给小鼠的脑部神经细胞染色，使得它们能发出像彩虹般的荧光色彩。通过这种方法，研究人员就能追踪脑部神经细胞的动向。（图片来源：*Nature*）

显然，GFP在生物医学中得到广泛的应用，除此之外，GFP传感器也能够探测化学物质，如金属离子和一些小分子。所以，GFP不仅能使科学家在一种全新的绿光中观察生物活动，而且还有许多化学方面的应用有待开发。

GFP的前景一片光明！

参考文献

1. Nature Chemistry, October 2008 Research Highlights, www.nature.com/nchem/
2. The Nobel Prize in Chemistry 2008, *The Royal Swedish Academy of Sciences*, 1-7. www.kva.se