

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）。

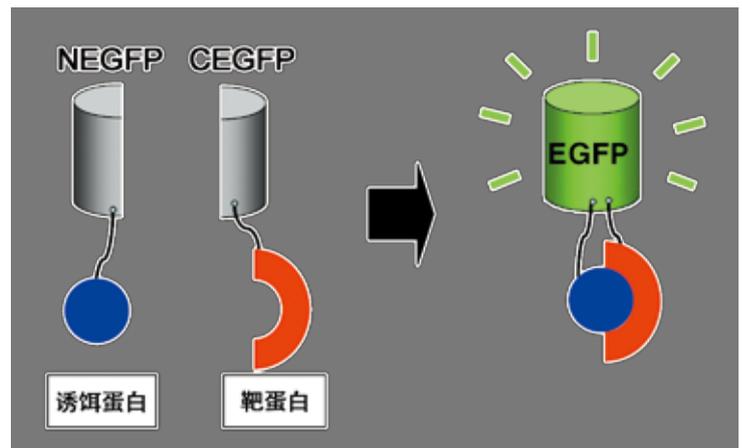


图7 EGFP作为报告蛋白的酵母双杂交系统原理示意图。EGFP的N-末端和C-末端分别与诱饵蛋白（已知蛋白）和靶蛋白融合表达。当诱饵蛋白与靶蛋白发生相互作用，荧光发色团就被拉近，EGFP就发出荧光。

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

止子序列终止。

构建的EGFP报告质粒pNEGFP和pCEGFP分别为色氨酸和亮氨酸选择性，并且它们都是携带有低拷贝数起始位点（CEN6/ARS4起始位点）的着丝粒质粒。这些低拷贝数的质粒降低了蛋白表达水平，从而解决了酵母细胞中的蛋白毒性问题。为了克隆操作的方便，在质粒的多克隆位点（MCS）还引入了*BamH I*、*Sal I*及*Pst I*等其它克隆位点。另外，为了评价周围的结构域会不会产生空间位阻效应，研究人员还分析了由多种不同方法构建的EGFP报告系统，进行构象优化。

下文将以酵母GAL4DD与GAL11P的相互作用为例，说明该系统的功能。

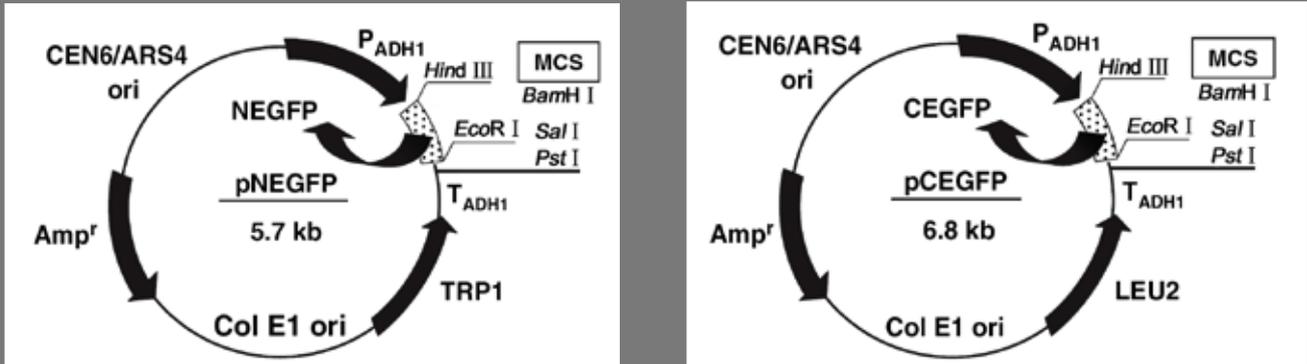


图8 含有EGFP N-末端的诱饵质粒和含有EGFP C-末端的靶蛋白质粒的构建。这些报告质粒被命名为pNEGFP和pCEGFP。在乙醇脱氢酶I（ADH1）启动子控制下，诱饵蛋白质粒编码的EGFP N-末端及靶蛋白质粒编码的EGFP C-末端能够被组成型地表达，其转录被ADH1终止子序列终止。几个独特的限制性酶切位点已列出。*EcoR I*的酶切位点为GAA TTC。PADH1：ADH1启动子；NEGFP：编码EGFP N-末端的基因；CEGFP：编码EGFP C-末端的基因；MCS：多克隆位点；TADH1：ADH1终止子；TRP1：编码色氨酸生物合成蛋白的基因；LEU2：编码亮氨酸生物合成蛋白的基因；Col E1 ori：Col E1起始位点；Amp^r：氨苄青霉素抗性基因；CEN6/ARS4 ori：CEN6/ARS4起始位点。（图片来源：The Protein Journal）

1.2 以分离的EGFP为报告系统的酵母双杂交系统

为了验证当酵母中的蛋白间发生相互作用时，被分离的EGFP会互补结合，研究人员以GAL4DD作为诱饵蛋白，GAL11P作为靶蛋白进行了实验。在蛋白与蛋白相互作用的研究中，经常使用这两种蛋白作为对照。实验中，研究人员将含有GAL11P的pCEGFP质粒（pCEGFP:GAL11P）与包含GAL4DD的pNEGFP:GAL4DD质粒一起转入酵母细胞，这样酵母就会含有pCEGFP:GAL11P和pNEGFP:GAL4DD两个质粒，这两个质粒均可用于研究荧光重建。另外，由于EGFP片段（NEGFP和CEGFP）的空间位阻效应可能会影响到荧光发色基团的形成，为了确定合适的融合蛋白空间结构，研究人员构建了不同组合的EGFP报告质粒，它们能够表达不同的EGFP片段组合（图9）。

将NEGFP和CEGFP融合载体转入YM4217酵母中（该酵母是ura3-52、his3-200、leu2-3和trp1-901突变株），同时添加Ura、His、Leu和Trp。为了确定酵母细胞是否含有相应的质粒，采用表1中NEGFP和CEGFP融合蛋白特异引物进行PCR扩增。得到的PCR产物经1%琼脂糖电泳分离后，分别得到594bp（1N-5N）、474bp（6N）、513bp（1C-4C, 6C）、243bp（5C）的扩增产物。如图10a所示，相应的594bp（1N-5N）、474bp（6N）、513bp（1C-4C, 6C）、243bp（5C）PCR产物只存在于转入后的酵母中，不存在于用作对照的YM4217酵母中，这说明在酵母双杂交系统中可以使用不同的选择标记。

为了确定酵母双杂交系统能否产生荧光，研究人员在共聚焦显微镜下观察表达NEGFP和CEGFP融合蛋白的YM4271酵母。计数发出荧光的酵母细胞后，他们发现在不同的NEGFP和CEGFP构建方式下，荧光重建效率不同，说明空间效应会影响荧光蛋白的互补结合。如图10b所示，以全长EGFP作为阳性对照，荧光重建率（R/E）为67%；而阴性对照，即未转染的酵母细胞根本不发出荧光。

表2总结了相关的荧光重建率百分比。设定酵母细胞转染效率为100%，另外还评估了分离的EGFP相对于阳性对照的重建率百分比，数据为三个独立样品的平均值。如图10b和表2所示，以pNEGFP和pCEGFP两个空载体转染作为空白对照，EGFP重建率为14.9%。NEGFP:GAL4DD与CEGFP:GAL11P发生相互作用（图9组合1），与EGFP阳性对照相比，EGFP重建率达到40.1%。

与此形成鲜明对比的是，NEGFP:GAL4DD与GAL11P:CEGFP融合蛋白的重建率只有19.4%（图9组合2）。

正如预料一样，NEGFP:GAL4DD与pCEGFP空载体（图9组合5）不会发生相互作用，作为非特异性对照，其与空白对照（空载体，NEGFP+CEGFP）重建效率相当。pNEGFP空载体与pCEGFP:GAL11P质粒（图9组合6）共转染的重建效率也相当低，只有17.9%，并且不会发出荧光。此外，GAL4DD:NEGFP融合蛋白无论与CEGFP:GAL11P还是GAL11P:CEGFP（图9组合3、4）的重建效率都很低，分别为19.4%和13.4%，都不会发出荧光。这些发现表明，分子结构造成的空间位阻效应使得荧光沉积失败。研究证明，如果NEGFP和CEGFP分别在诱饵蛋白和靶蛋白的N-末端就不会产生严重的空间位阻，从而形成荧光团发出荧光。

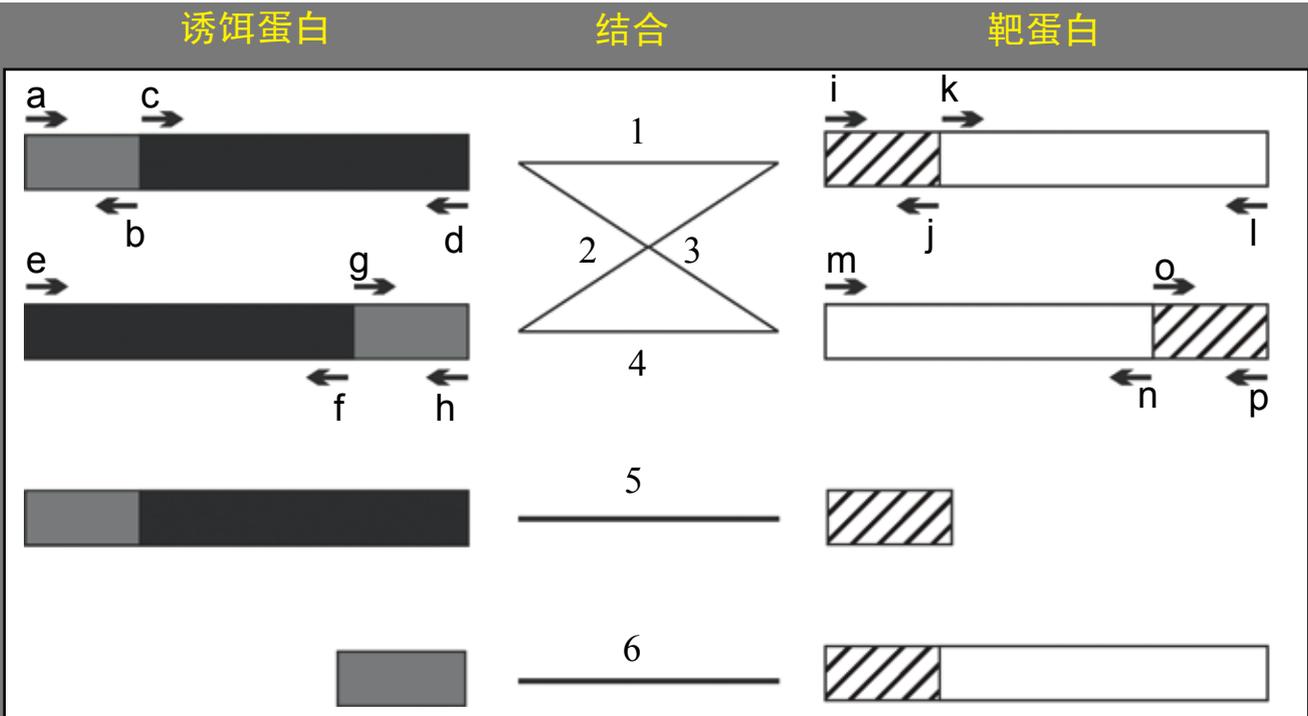


图9 NEGFP和CEGFP构建示意图。构建NEGFP和CEGFP六种组合的质粒。灰色框：NEGFP；黑色框：GAL4DD；阴影线框：CEGFP；白色框：GAL11P；1-6，组合1-6。（图片来源：The Protein Journal）

表1 图9所用的引物

引物编号	引物序列
a	CCC AAG CTT ATG GTG AGC AAG GGC GAG
b	GGA ATT CCT GCT TGT CGG CCA TG
c	GGA ATT CGG AGG AGG AGG AGA ATC AAG GCT AGA AAG
d	CGG GAT CCT CAA AAT AAT CCT GTT AAC
e	CCC AAG CTT ACT AGT GAA TCA AGG CTA GAA
f	GGA ATT CAA ATA ATC CTG TTA AC
g	GGA ATT CGG AGG AGG AGG AAT GGT GAG CAA GGG CGA G
h	CGG GAT CCT TAC TGC TTG TCG GCC ATG
i	CCC AAG CTT AAG AAC GGC ATC AAG G
j	CGG AAT TCC TTG TAC AGC TCG TCC ATG
k	GGA ATT CGG AGG AGG AGG ACC TCA ACA GCA GCA AAT G
l	CGG GAT CCT CAC AAA GCT TGG ATT TTT C
m	CCC AAG CTT ACT AGT CCT CAA CAG CAG CAA
n	GGA ATT CCA ATG CTT GGA TTT TTC
o	GGA ATT CGG AGG AGG AGG AAA GAA CGG CAT CAA GG
p	CGG GAT CCT TAC TTG TAC AGC TCG TC

资料来源: *The Protein Journal*

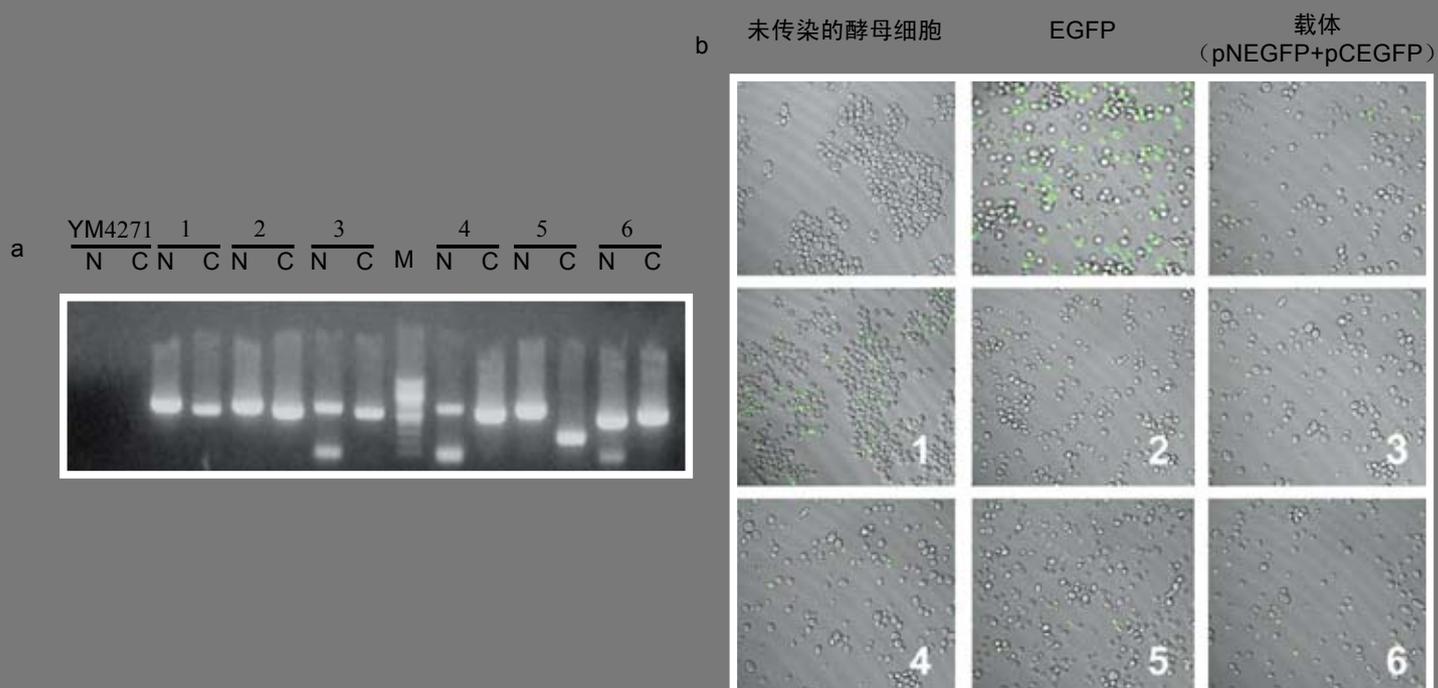


图10 (a) PCR法验证酵母转化株。PCR产物用含有0.5ug/ml的溴化乙锭的1%的琼脂糖电泳分离。1-6, 含有NEGFP和CEGFP融合蛋白(如图9)的转化株。N: NEGFP融合质粒; C: CEGFP融合质粒; M: 分子量标准。(b) EGFP为报告蛋白的酵母双杂交实验。通过检测产生荧光的酵母细胞来确定与NEGFP和CEGFP融合的蛋白间的相互作用。以未转染的酵母细胞作为阴性对照, 全长EGFP作为阳性对照, 同时转染两个空载体pNEGFP和pCEGFP作为背景对照。1-6为按照图9进行的6种配对组合。(图片来源: *The Protein Journal*)

表2 不同NEGFP和CEGFP融合蛋白组合的相对重建效率百分比

组合	NT	EGFP	Vector	1	2	3	4	5	6
相对重建效率百分比	0	100	14.9	40.1	19.4	19.4	13.4	14.9	17.9

NT: 未转染; EGFP: 阳性对照; Vector: 空白对照;

1. NEGFP:GAL4DD+CEGFP:GAL11P; 2. NEGFP:GAL4DD+GAL11P:CEGFP;
3. GAL4DD:NEGFP+CEGFP:GAL11P; 4. GAL4DD:NEGFP+GAL11P:CEGFP;
5. NEGFP:GAL4DD+CEGFP; 6. NEGFP+CEGFP:GAL11P。

资料来源: *The Protein Journal*

总之, 在以EGFP为报告基因的酵母双杂交系统中, 当诱饵蛋白与靶蛋白相互作用时, 被分开的EGFP就会重建, 其原有的荧光特性得以恢复, 而且能够快速直接地监测到这种相互作用。

该系统有三方面的优势:

- 第一, EGFP报告基因既不需要外源底物也不需要任何辅助因子;
- 第二, 该系统采用低拷贝数质粒, 减少了细胞毒性;
- 第三, 这些转录因子可被用作诱饵蛋白。

参考文献

1. Kyoungsook Park, So Yeon Yi, Chang-Soo Lee, *et al.* (2007) A Split Enhanced Green Fluorescent Protein-Based Reporter in Yeast Two-Hybrid System, *The Protein Journal*, 26(2): 107-116.

小词典

组成型表达

生物只有适应环境才能生存。当周围的营养、温度、湿度、酸度等条件变化时, 生物体就要改变自身基因表达状况, 以调整体内执行相应功能蛋白质的种类和数量, 从而改变自身的代谢、活动等以适应环境。生物体内的基因调控各不相同, 仔细观察基因表达随环境变化的情况, 可以大致把基因表达分成两类。

(1) 组成型表达 (constitutive expression)

组成型表达, 指基本不因环境变动而改变的一类基因表达。其中某些基因表达产物是细胞或生物体整个生命过程中都持续需要而必不可少的, 这类基因可称为看家基因 (housekeeping gene), 在这些基因中有不少是在生物个体的其它组织细胞, 甚至是在同一物种的细胞中持续表达的, 也可以把它看成是细胞基本的基因表达。但是, 组成型基因表达也不是一成不变的, 其表达强弱同样受到一定机制的调控。

(2) 适应性表达 (adaptive expression)

适应性表达, 指环境的改变容易使其表达水平变化的一类基因表达。因环境条件变化基因表达水平增高的现象称为诱导 (induction), 这类基因被称为可诱导型基因 (inducible gene); 相反, 随环境条件变化而基因表达水平降低的现象则称为阻遏 (repression), 相应的基因被称为可阻遏基因 (repressible gene)。

复能基因的eGFP

——标记您的蛋白，标记您的细胞，标记您的成绩……

You've been there, you've done that, now do something better.
--Roger Yonchien Tsien 2008 Nobel Prize in chemistry

非淡泊无以明志，非宁静无以致远。
--诸葛亮 三国时期先哲

GeneCopoeia, Inc.

Tel: 301-515-6982 (USA)
Fax: 301-515-6983 (USA)
Web: <http://www.genecopoeia.com>

 复能基因
FulengGen

广州复能基因有限公司

电话: (020)32052376, 32052410, 32290874
传真: (020)32052677
公司网址: <http://www.fulengen.com>

GeneCopoeia™
Expressway to Discovery

2. GFP在转基因动物研究中的应用

目前，小鼠已成为哺乳动物遗传研究中首选的模式生物。经过过去几十年的努力，培育基因打靶和转基因小鼠已经变成很平常的工作，以目前的技术可以获得在核酸水平上的突变品系。现在，诸如此种基因组修饰变得越来越精细，而在基因水平上标记不同的细胞群已成为非常普遍的研究。

虽然Lac Z，即细菌 β -半乳糖苷酶基因仍在许多小鼠研究中作为筛选标记，但GFP在小鼠中的应用更具吸引力。由于GFP自身的特点，它能够在体内或体外进行实时监测。GFP还有另一个优势，能采用流式细胞仪、共聚焦显微镜及荧光计等技术进行定量检测。目前，人们已经改进了野生型GFP基因，从中获得的几种变体在热稳定性和荧光强度等方面都有所增强。增强型GFP（EGFP）就是其中之一。现在，它已普遍应用于转基因或基因打靶小鼠。更为重要的是，人们现在已经开发出多种GFP光谱变体，其中两种全新颜色的变体——增强型

黄色荧光蛋白（EYFP）和增强型蓝绿色荧光蛋白（enhanced cyan fluorescent protein, ECFP）已应用于小鼠研究中。

由于ECFP和EYFP的谱线轮廓截然不同且没有重叠，所以这两种荧光蛋白可同时用作报告基因并共同显色，这对体内双标记或荧光能量转移分析等研究是非常理想的。GFP及其颜色变体作为报告蛋白的应用为科学研究提供了一个空前的高精度检测方法，代表着小鼠基因组改造技术的未来发展方向，并开启了在同一个动物体内应用组合无创性报告基因的广阔前景。

本章节主要综述彩色小鼠的生产，即以GFP为基础的报告基因在小鼠基因打靶和转基因方面的应用及进展。另外，我国科学家于2007年通过体细胞核移植，成功获得了绿色荧光蛋白转基因猪，也值得关注。

2.1 基因打靶和胚胎干细胞（ES）技术

基因打靶和胚胎干细胞技术的出现为小鼠基因组操作引进了新的方法。胚胎干细胞是来源于后胚泡期胚胎的多能干细胞系，经体外繁殖和处理后可再导入胚胎。自人们从胚胎干细胞克隆出小鼠生殖细胞，并证明将亲本的基因组传递给后代后，胚胎干细胞就成为常用的工具。现在，只要在体外进行基因打靶和转基因操作，就可通过生殖细胞将亲本的基因组传递给后代。

在胚胎干细胞中可进行两种基因组改造：定向改造和非定向改造。定向改造就是预先确定并精确设计所要做的改变，基因打靶就是定向改造。非定向改造是随机的，包括转基因和突变。研究中，这两种方式可混合使用以达到不同的目的。

2.1.1 报告系统

一直以来，追踪研究发育及疾病过程中细胞的命运、迁移和增殖等的变化都是一种挑战。研究人员会使用不同的标签基因来追踪不同成分，尤其在基因突变（敲除）动物中得到广泛的应用。LacZ是常用的嵌合体突变标签，而另一个报告基因则是

同源重组和点特异重组可对基因组进行任何想要的改变。可通过多种方式进行随机突变，利用外源基因陷阱载体可在基因组中随机定位，从而“劫持”基因表达并破坏基因功能。胚胎干细胞的另一种应用是转基因，它与经典的原核注射类似。在体外，将载体自身的驱动目的基因（通常为报告基因）的启动子整合入基因组，然后导入体内。因此，任何改造都能够导入胚胎干细胞，随后通过生殖细胞传递给后代，这样就可以建立小鼠突变品系或嵌合体，从而进行原位研究了。由于转基因细胞系能在体外增殖，所以与DNA注射相比，用ES细胞制备转基因动物的优势在于，可在动物模型体外使用试剂进行研究。

人胎盘碱性磷酸酶（hPLAP）。但是，它们都需要通过样本固定过程和经酶显色反应。而荧光蛋白（fluorescent protein, FP）报告基因则比酶类报告基因有优势，它们可定量、无需实验样品处理并且是无创的。多年来，多种外源荧光染料，如DiI

或DiO的应用已经证明它们在荧光标记中的作用。但是，由于它们不是基因水平上的标记，观察的窗口期很短，而且不能向下遗传，所以无法应用于基因打靶和转基因动物。

1992年，人们首次克隆出GFP，并随后在线虫中表达GFP并检测到荧光，从而确立了新型GFP基因报告系统。

2.1.2 GFP——一个出众的荧光蛋白报告分子

在生物发光水母*Aequorea victoria*体内，当能量从钙激活的发光蛋白转移至GFP时就会发光。GFP可在不同的系统中表达，当受到适当波长的光（主峰在400nm附近，次峰在470nm附近）激发后，GFP就会发出绿色荧光并在505nm附近达到高峰。研究人员已经证实这种发光蛋白被激发后发出荧光是种属非依赖性的。

GFP发色团包括一个环形三肽Ser65-Tyr66-Gly67，并且只有在完整的GFP蛋白中才能发出荧光。GFP有单体和二聚体两种形式，二者的比例取决于蛋白浓度及周围环境。由于在多种系统中能监测到GFP活性，一般认为其发出荧光的过程是自身催化的或仅需要广泛存在的细胞因子。

GFP可以作为报告基因，且标记过程是无创的，这一特点吸引着人们的注意力。因此，GFP不仅可以作为基因表达的标签或经改构后的融合蛋白用于亚细胞定位，而且可在体外或原位实时监测。另外，GFP分子很小，仅为27KD，它主要以单体形式发挥功能；而lacZ就大得多，达135KD，并且以四聚体形式发挥功能。因此，GFP作为报告基因从本质上更适合用作融合蛋白。

2.1.3 GFP变体——热稳定荧光蛋白谱

野生型GFP (wild type GFP, wtGFP) 从一开始就引起了人们极大的兴趣，而且被用作新型的简单报告基因及体内标记。wtGFP在线虫中表达成功，促进了它在转基因动物和植物，包括果蝇 (*Drosophila*)、斑马鱼 (*Danio rerio*) 和粘液菌 (*Dictyostelium*) 等中的应用。虽然在多种生物中获得成功，但GFP在异源生物体中的表达并非那么简单。例如，在植物拟南芥中表达的wtGFP被截短，因为在其编码序列中有一个隐蔽型的内含子，造成mRNA加工异常。另外，研究人员很早就发现需要在较高的温度下孵育才能在细胞或生物体中表达GFP。起初，wtGFP在小鼠中的应用未能获得与在线虫中相同的应用效果，其主要原因是wtGFP在37℃的热稳定性差。这些都阻碍了它在小鼠基因打靶和转基因中的应用。

这些难题促使人们进一步筛选分离wtGFP的变体。现在，人们已经找到了荧光强度更强且更耐热的变体。这些变体多数为经突变的脱辅基蛋白，它们可防止高温导致的错误折叠。近年来出现的新型wtGFP基因突变体的激发和发射谱发生了改变，热稳定性和荧光强度得到了提高，GFP报告基因在小鼠中的应用就是以这些变体作为基础的。

现在，应用最为广泛的是红移变体增强型GFP (EGFP)。诸如EGFP这些红移变体的最大激发峰发生红向移动，大约为490nm，这一波长也恰好是多数分光设备、流式细胞仪及共聚焦显微镜的常用波长。EGFP有两个氨基酸突变(表3)，当被蓝光激发时，它发出的荧光要比wtGFP亮30-40倍。wtGFP和包括EGFP在内的多数变体半衰期长，所以不适合精确追踪表达的减少或损耗。

为克服这一问题，人们在1998年构建了不稳定增强型绿色荧光蛋白(dEGFP)。原理就是将EGFP的cDNA融合到小鼠鸟氨酸脱羧酶(Ornithine decarboxylase, ODC)基因的C-末端。ODC含有一个PEST序列，这个序列可促进该蛋白在细胞内的降解。虽然，目前这些不稳定变体还没有在小鼠中应用，但这些变体有利于实时追踪基因表达动力学的研究。

另一种红移变体是增强型黄色荧光蛋白(EYFP)，该变体有四个氨基酸突变(表3)。在527nm时，EYFP的发射光从绿色变为黄绿色(图11)。EYFP荧光的亮度水平与EGFP相当。

在光谱的另一端是蓝色/蓝绿色变体，包括增强型蓝色荧光蛋白(EBFP)变体。它有四个氨基酸突变，

激发波长和发射波长分别为380nm和440nm。由于这些突变改进了蛋白折叠和发色团形成的效率，所以也增强了所发出荧光的亮度（与蓝色变体相比）和蛋白溶解性。但唯一的不足之处，就是EBFP产生的荧光信号大致与wtGFP相当。

增强型蓝绿色荧光蛋白（**ECFP**）是发出蓝色/蓝绿色荧光的另一种变体，产生的荧光信号要比wtGFP强。**ECFP**有六个氨基酸突变（表3），发射光谱从绿色迁移到蓝绿色，最大激发波长在433nm（主峰）和453nm（次峰），最大发射在475nm，于510nm处有一肩峰（图11）。**ECFP**另一特点是比其它蓝色/蓝绿色变体光漂白效应弱，而且比**EBFP**的亮度强。

值得一提的是，wtGFP的主要绿色荧光变体，如**EGFP**等已经在ES细胞、基因打靶和转基因小鼠研究中得到充分应用。

表3 wtGFP邻近三肽发色团（Ser65、Tyr66、Gly67）的序列以及三种变体蛋白的相应氨基酸替换情况

wtGFP及其变体	发色团序列及相应氨基酸替换
wtGFP	Phe ⁶⁴ -Ser-Tyr-Gly-Val-Gln ⁶⁹ ...Ser ⁷² ...Tyr ¹⁴⁵ ...Thr ²⁰³
增强型绿色荧光蛋白/ EGFP	Phe ⁶⁴ Leu、Ser ⁶⁵ Thr
	红移
	采用人源化密码子
增强型黄色荧光蛋白/ EYFP	Ser ⁶⁵ Gly、Val ⁶⁸ Leu、Ser ⁷² Ala、Thr ²⁰³ Tyr
	红移
	采用人源化密码子
增强型蓝绿色荧光蛋白/ ECFP	Phe ⁶⁴ Leu、Ser ⁶⁵ Thr、Tyr ⁶⁶ Trp、Asn ¹⁴⁶ Ile、Met ¹⁵³ Thr、Val ¹⁶³ Ala
	蓝移
	采用人源化密码子

资料来源: *Histochem Cell Biol*

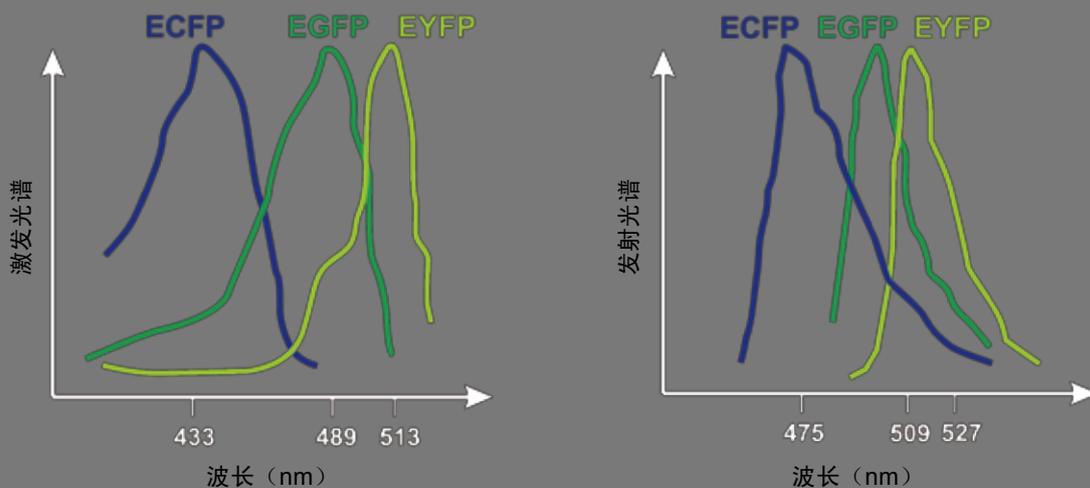


图11 wtGFP三种变体（ECFP、EGFP和EYFP）的激发光谱（左）和发射光谱（右）图示。

图片来源: *Histochem Cell Biol*

2.1.4 GFP为基础的报告系统在基因打靶和转基因中的应用

1995年，Ikawa第一次将以GFP为基础的荧光蛋白报告系统应用于小鼠。他们的研究表明，在胚胎着床前，利用GFP快速无创地筛选转基因胚胎是切实可行的。荧光报告系统的另一个优点是，所获得的转基因的类型（纯合子、半合子）可能与荧光强度有关。

许多实验室应用ES细胞作为转基因工具来检验wtGFP变体。如图12所示，表达荧光蛋白的转基因ES细胞可以生成嵌合体胚胎，该嵌合体胚胎，在导入假孕雌鼠前的桑葚期就能被鉴定。目前，人们已经建立了一些转基因小鼠品系，这些品系有些是通过经典注射技术获得，有些则通过ES细胞转基因技术获得。它们从八细胞桑葚期到成年鼠都能发出荧光。如图13所示，这些荧光蛋白在小鼠的各个发育时期和成年期都能作为标记应用。

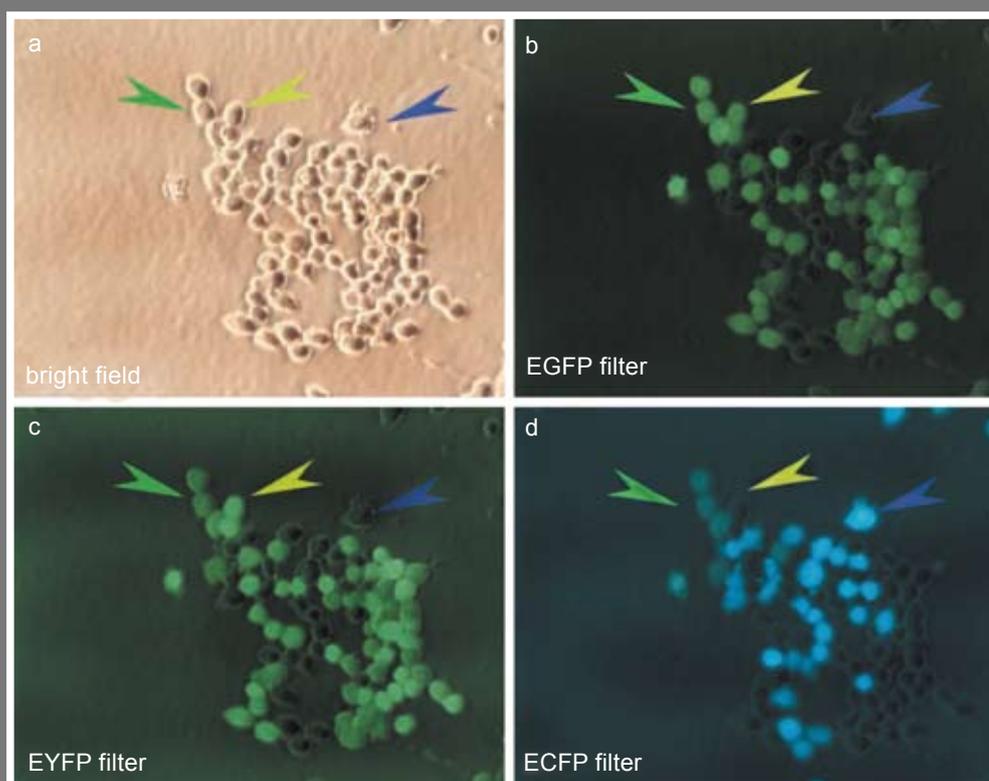


图12 不同的滤光片组合能够将表达不同GFP变体的胚胎干细胞区分清楚。EYFP和ECFP的光谱重叠程度最少，而EGFP在二者中间，EGFP的表达会漏进ECFP滤带而呈蓝绿色，但EYFP则不会出现这种情况。ECFP不会漏进EYFP滤带，但会有极少量漏进EGFP滤带。（a）在明视野（bright field）中观察胚胎干细胞。（b-d）通过不同的滤光片观察同一视野细胞：（b）EGFP滤光装置（EGFP filter）；（c）EYFP滤光装置（EYFP filter）；（d）ECFP滤光装置（ECFP filter）。蓝色箭头代表ECFP+细胞；绿色箭头代表EGFP+细胞；黄色箭头代表EYFP+细胞。所用滤光片分别为：EGFP，激发波长470/40nm，分色镜495nm，遮光滤光片为500nm长波滤光片；ECFP，激发波长436/20nm，分色镜455nm，遮光滤光片为480/40nm；EYFP，激发波长500/20nm，分色镜515nm，遮光滤光片为535/30nm。（图片来源：*Histochem Cell Biol*）

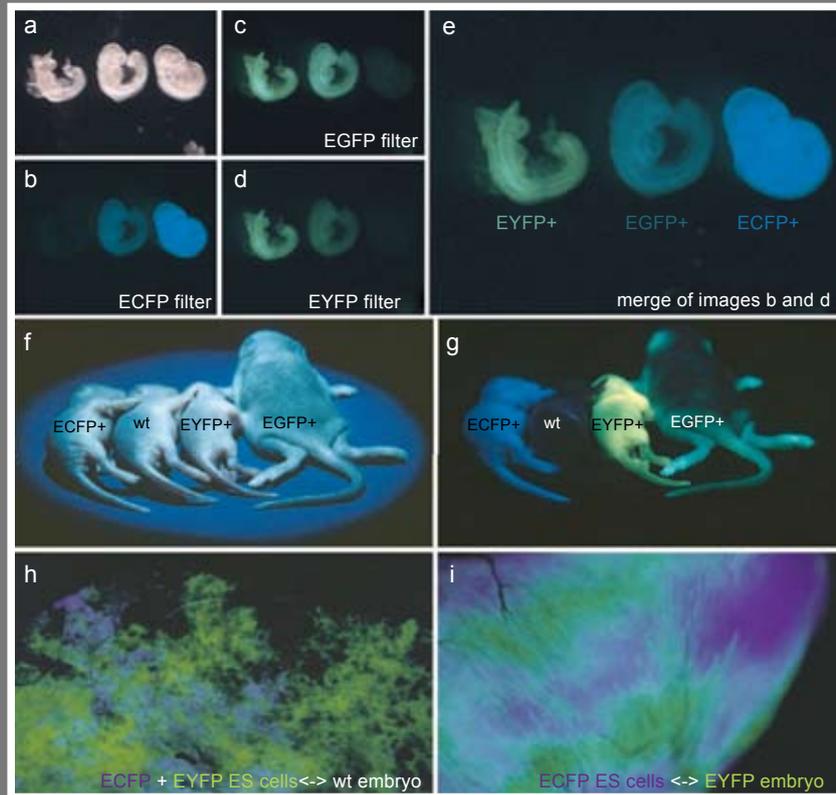


图13 通过适当的滤光片能够将小鼠表达不同荧光蛋白的部位及非转基因的部位区分清楚。EYFP和ECFP的光谱重叠程度最少，而EGFP在二者中间。通过多种倒置荧光滤片组合观察EYFP+、EGFP+及ECFP+的小鼠胚胎。图（a-e）表明，ECFP和EYFP可以很容易区分，但EGFP则会漏进这两个区域。9.5天的转基因小鼠胚胎分别用明亮视野（a）、ECFP（b）、EGFP（c）及EYFP（d）滤光装置观察，图中左、中、右分别为EYFP+小鼠胚胎、EGFP+小鼠胚胎、ECFP+小鼠胚胎。e图为b图和d图的合并，这种合并加亮了ECFP和EYFP光谱中重叠缺失。（f）为明亮视野下的四只幼鼠图。（g）为暗视野下倒置荧光观察转基因小鼠的颜色。从左到右分别为ECFP+一周龄幼鼠、非转基因一周龄幼鼠（无荧光）、EYFP+一周龄幼鼠和EGFP+两周龄幼鼠。在成年鼠器官中也能分清不同GFP变体的表达。（h）为在暗视野下近距离观察活的嵌合体小鼠的肝脏表面（由表达ECFP+、EYFP+荧光蛋白及不表达荧光蛋白的细胞组成）。（i）为近距离观察活的嵌合体小鼠的心脏表面（由表达ECFP+和EYFP+荧光蛋白的细胞组成）。（图片来源：*Histochem Cell Biol*）

2.1.5 表达荧光蛋白小鼠的新应用——荧光激活细胞分选（FACS）

GFP作为报告系统在基因打靶和转基因小鼠中的应用，引发了一些新的很有应用前景的方法的建立和应用。从复杂的组织中获得感兴趣的细胞类型对现代生物学的许多领域都是有益的。

以前，多数分选特殊细胞类型的策略，都是采用荧光标记的抗体来标记细胞或者用染料来标记。GFP为基础的报告系统的出现解决了这一问题，它很容易就能分离得到表达报告基因的细胞。用适当的倒置荧光光学设备，就能观察到表达荧光蛋白的活细胞在整个胚胎或成体中的分布情况。用酶将成体动物组织或整个胚胎的不同细胞层分离，然后进一步制成单细胞悬液，就可以直接用流式细胞仪进行检测，并能分选得到标记有荧光蛋白的目的细胞。图14是该技术平台基本原理的说明。图中的例子是转基因胚胎的心脏细胞亚群表达荧光蛋白。取出心脏，捣碎后被流式分选成两群细胞：FP+和FP-。这一方法适用于所有的组织和器官。

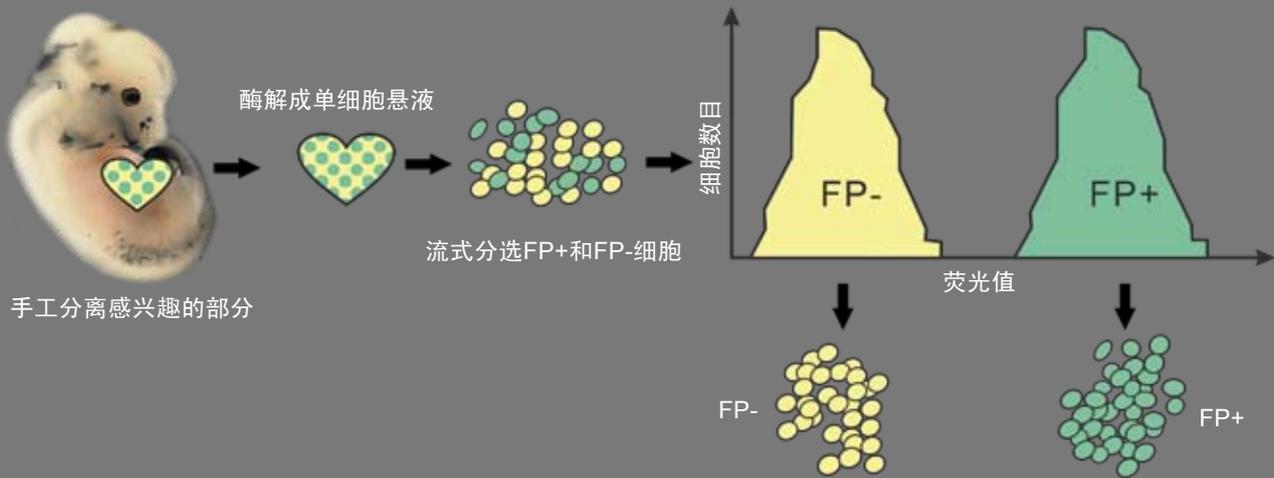


图14 从胚胎或成体复杂的组织中分离得到表达荧光蛋白的活细胞的过程示意图。首先，解剖分离含有目的荧光蛋白的组织，然后酶消化成单个细胞，流式分选出表达目的荧光蛋白的活细胞。（图片来源：*Histochem Cell Biol*）

已经有多个研究证实了这一方法的可行性。这些研究都表明，能够从表达EGFP的转基因小鼠中分离获得FP+细胞。目前，研究人员已经成功地从转基因胚胎中分离得到纯的原生殖细胞、神经管细胞及心脏细胞等。另外，他们还从Col2-EGFP转基因小鼠的肋骨细胞悬液中分选到软骨细胞，从而证明荧光亮度（强度）与原骨胶原II的生物合成是相关的。另一个研究则从成年小鼠皮肤中分离得到了乳头细胞。纯的FP+乳头细胞亚群在皮肤重建试验中非常有用，可用来研究毛发毛囊诱导和维持所需要的信号通路。

原则上讲，这种方法可用来回收任何有荧光标记的细胞，包括转基因动物、带有条件激活FP报告基因的动物、FP+ES细胞在桑葚胚或注射胚泡产生的嵌合体、将FP+胚胎滋养层干细胞注射到胚泡生成的特殊嵌合体、基因敲除的FP+ES细胞纯合子四倍体胚胎，甚至被含有FP报告基因的病毒感染的动物等。这种从复杂生物结构的多种细胞中分离单个细胞的方法，可用来建立细胞系，可以定义蛋白表达的空间区域，还能更容易地研究相关细胞在野生型与突变动物中的不同功能。

2.1.6 表达多种荧光蛋白的小鼠的新应用——应用多种无创的报告基因的可行性

虽然，目前大多数基因打靶或转基因研究中多以EGFP变体荧光蛋白作为报告基因，但并非仅有这种变体能在小鼠中应用。ECFP和EYFP等其它荧光蛋白变体也可进行更复杂的研究。所有这些荧光蛋白变体就像EGFP一样，能够在ES细胞和小鼠中得以应用。目前，人们已经建立了多种仅用一种荧光蛋白标记的ES细胞，如ECFP、EGFP、EYFP，并且用它们生产了表达不同GFP变体报告基因的小鼠品系。最近，研究人员在转基因小鼠研究中混合使用多种荧光蛋白作为报告基因，证明了不同的荧光蛋白变体可在神经元中选择性表达，从而获得了表达两种不同荧光蛋白的转基因小鼠，并

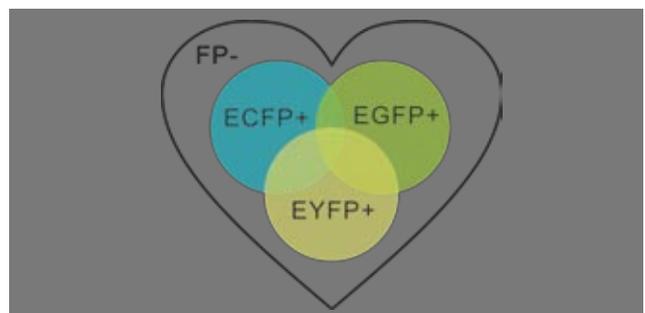


图15 wtGFP变体的出现使得在同一动物体内应用多种荧光蛋白作为报告基因成为可能。活体动物或器官成像可清楚了解表达一种或多种报告基因的细胞亚群的分布，也可以通过流式分选和分离技术得到特异的细胞亚群。

图片来源：*Histochem Cell Biol*

且能够在同一动物体内比较不同的神经元亚群。

目前，采用多种荧光蛋白作报告基因的转基因小鼠，多数是经过多次重组得到的。图15采用的策略就是将各自表达不同报告基因的组合转基因动物或组织进行混合重组。如图15，将黄色（EYFP+）和蓝绿色（ECFP+）荧光的ES细胞混合，产生的嵌合体就可以在同一个小鼠胚胎或成年鼠器官中同时看到两种荧光的细胞群。这样无论是在单转基因、双转基因甚至是在三重转基因动物中，都能分辨清楚单独表达某一种荧光蛋白的细胞。

2.2 我国科学家2007年获得体细胞核移植生产绿色荧光蛋白转基因猪

2007年，我国东北农业大学的科学家利用体细胞核移植技术成功构建出绿色荧光蛋白转基因猪（图16和17）。他们用脂质体转染猪胎儿成纤维细胞，筛选绿色荧光蛋白基因转染的阳性细胞作为体细胞核移植的核供体，体外成熟卵母细胞为核受体，从而获得绿色荧光蛋白转基因克隆猪胚胎。他们共获得6头克隆猪，其中4头为GFP阳性，经DNA检测确认为GFP转基因猪。

该研究对我国体细胞克隆转基因猪的研究具有重要价值，为转基因猪育种、人类疾病模型和人类器官移植研究奠定了良好的基础。

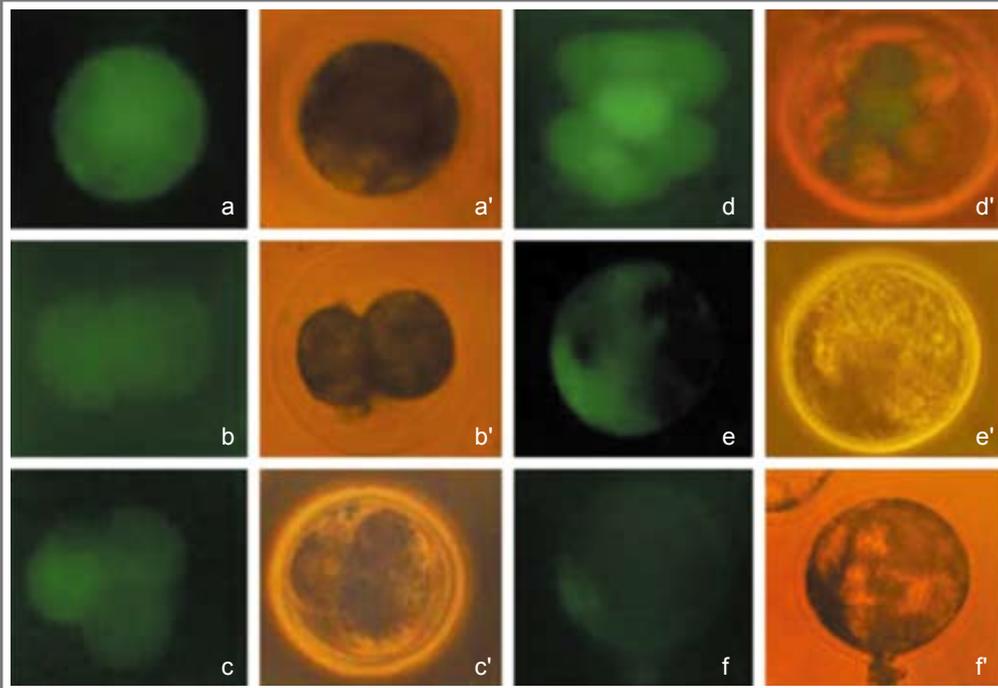


图16 GFP转基因猪体细胞核移植胚胎体外发育及绿色荧光蛋白表达结果。（a~f）荧光显微镜下：1个细胞、2个细胞、4个细胞、8个细胞、早期囊胚和扩展囊胚中GFP的表达；（a'~f'）普通光学显微镜下（a~f）的对应照片，×40。（图片来源：科学通报）

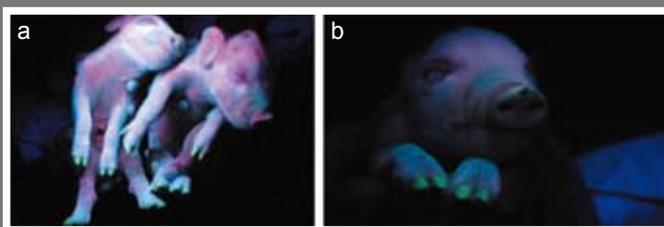


图17 绿色荧光转基因猪。（a）两只转基因猪出生后第2天在365nm波长紫外光激发下蹄部呈绿色；（b）转基因猪出生后第2天在365nm波长紫外光激发下蹄部及鼻头呈绿色。

图片来源：科学通报

3. GFP在肿瘤研究中的应用

目前，研究人员已经建立了应用GFP在活体内检测细胞并使之可视化的方法，从而能够在显微水平检测新鲜活组织中的肿瘤细胞。在此基础上建立的利用GFP进行全身成像技术更是在肿瘤研究中得到广泛应用。该技术能够实时观察活体小鼠体内荧光标记肿瘤的生长和转移并实时成像。GFP全身成像技术在动物体外操作，对动物无创。该技术能够让研究人员连续监测肿瘤在完整动物体内的恶性生长和转移的情况，无需注射任何底物也无需麻醉。另外，还可以通过数字化的全身成像来定量测定内脏肿瘤的生长，既可通过透射倒置荧光显微镜成像，也可用荧光盒和热电冷却的颜色电荷耦合器摄像头来成像。下面的例子能够更详细地说明GFP在肿瘤研究中应用的优势。

图18a显示的是小鼠体内两种肿瘤的全身成像结果。两种分别表达GFP、RFP的肿瘤被移植到小鼠的脑部。蓝光下，GFP、RFP同时被激发并很容易成像。图18b显示的则是将GFP标记的肿瘤移植到小鼠骨中的全身成像。

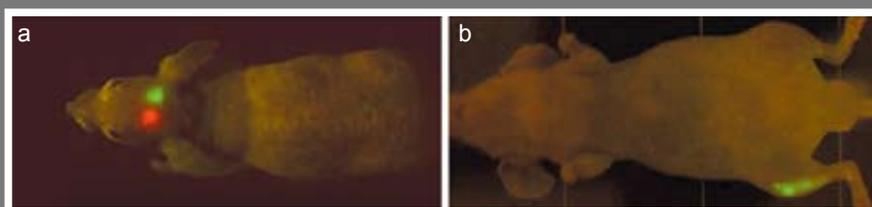


图18 裸鼠脑部绿色荧光蛋白（GFP）和红色荧光蛋白（RFP）标记的肿瘤全身成像。（a）在同一裸鼠的脑部移植入分别用GFP和RFP标记的肿瘤。激发光是由装有中心峰为470nm激发滤光片的蓝光发光二级管闪光灯发出的。图像由Hamamatsu电荷耦合器摄像头拍摄。（b）将GFP标记的肿瘤移入裸鼠右后肢胫骨后，在蓝光下的全身成像。（图片来源：BioTechniques）

图19a，显示的是GFP标记的肿瘤被移植到小鼠的大肠，在蓝光下的全身成像。图19b为同一个动物被剖开后的全身成像。对比a和b可见，全身成像的精确性非常好。

图19c，显示的是同一只小鼠的肝脏移植了RFP标记的肿瘤，同时胰腺移植了GFP标记的肿瘤的全身成像图。与RFP、GFP分别标记的肿瘤被移植到脑部一样，移植到肝脏的RFP肿瘤和移植到胰腺的GFP肿瘤同时被蓝光激发。

图19d显示的则是在蓝光激发下被移植到胰腺的RFP肿瘤发生了转移。两图都很容易用肉眼观察，无需麻醉，也不用任何底物或处理动物。

采用合适的软件可以计算每张图像的像素数量和强度，然后可转换成每一肿瘤的大小（ mm^2 ），如表4。荧光的强度为所有检测GFP的平均值。表5对比了上图中全身成像和剖开后成像中移植到大肠的肿瘤的大小和强度。从表5可见，全身成像和剖开后的成像是可比较的。比较明显的是全身成像的强度是剖开后成像的70%。虽然由于光的散射，全身成像时丢失了一些信息，但还是得到了大量重要的信息。

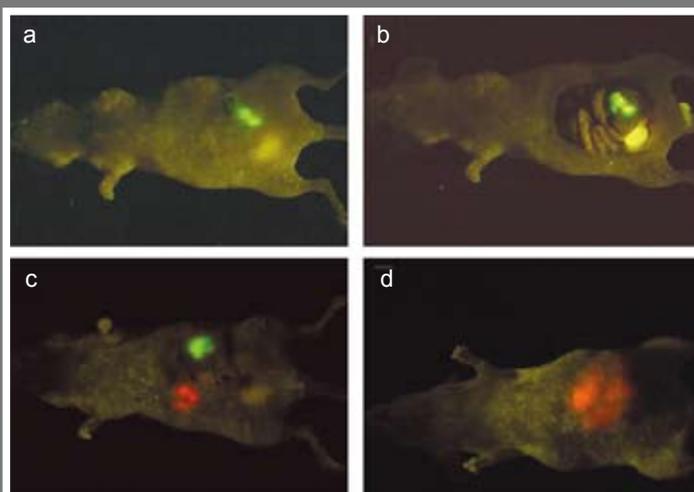


图19 裸鼠中绿色荧光蛋白（GFP）和红色荧光蛋白（RFP）标记的肿瘤的全身成像及剖开后成像。（a）全身成像显示大肠中GFP标记的肿瘤。（b）图a动物剖开后成像。（c）裸鼠肝脏中RFP标记的肿瘤和胰腺GFP标记的肿瘤的全身成像。（d）裸鼠胰腺中RFP标记的肿瘤发生转移的全身成像。（a~d）所用的蓝光发光二级管闪光灯与图18相同。（图片来源：BioTechniques）

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。