

# 用于基因表达调控及蛋白定位研究中的新型标记——绿色荧光蛋白

## A NEW MARKER - GREEN-FLUORESCENT PROTEIN WHICH CAN BE USED TO STUDY EXPRESSION OF GENE AND LOCATION OF PROTEIN

相 渊 张培军

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

绿色荧光蛋白(Green-fluorescent protein, GFP)是许多腔肠动物所特有的生物荧光素蛋白。1971年, J. G. Morin 等<sup>[8]</sup>发现维多利亚水母(*Aequorea victoria*)发出的绿光不是缘于水母发光蛋白,而是另一种蛋白——GFP造成的。1974年, Morise 等<sup>[9]</sup>首次证明在维多利亚水母体内发出的绿光,是钙离子激活的水母荧光蛋白(发蓝光)将能量传递给GFP后产生的,GFP是一种接收及最终放射能量的物质,所接收的能量来自荧光素酶-氧化荧光素的复合体或钙离子激活的发光蛋白。纯化的GFP,是具有238个氨基酸,分子量为26 888Da的单体蛋白<sup>[10]</sup>。GFP的构像十分稳定<sup>[11]</sup>,只有在极端的条件下才会变性<sup>[13]</sup>。它吸收蓝光(最大吸收在395nm,在470nm有一个最小吸收峰),放射绿光(509nm有一峰,540nm有一肩)<sup>[14]</sup>,GFP这种光谱上的特性,是由一个共价结合的发色团造成的,不同物种由于有不同的发色团而有许多GFP的衍生物,单一发色团所发出的荧光非常稳定,没有漂移<sup>[3]</sup>。C. W. Cody 等从维多利亚水母的GFP的木瓜酶分解产物中发现了以已肽形式释放出来的发色团,这种已肽位于第64个氨基酸位点,由一个环化的丝氨酸-脱氢酪氨酸-甘氨酸残基同原有的氨基酸序列相连<sup>[4]</sup>。发色团的形成依赖于氧,通常在翻译之后形成<sup>[7]</sup>,而且也不需要酶的催化<sup>[6]</sup>。为了检测在维多利亚水母中是否有其他的因子帮助GFP发光, M. Chalfie 等在异源细胞中对GFP的表达作了检测,发现在其他的原核及真核细胞中,GFP在蓝光激发下,仍可发出绿光,从而证实了这种荧光的产生不需任何协助因子,而发色团的形成也不具物种特异性<sup>[3]</sup>。

随着分子生物学、细胞生物学的不断发展,转基因技术、细胞生物遗传育种技术的日臻完善,人们不但要将外源目的基因转入生物体内并获得表达,而且需要了解外源基因在生物体内的发育命运及表达调控,特

异蛋白在生物体内随时相变化的分布,从而对生物的发育、进化、所培育的新品种同环境因子的相互作用以及生物体内蛋白与蛋白的相互作用很直观地进行评估。由于GFP的一些独特性,使其作为新的荧光标记进行活体检测的研究重新得到重视。自1992年D. C. Prasher 纯化了GFP后,编码GFP的GFP基因也由哥伦比亚大学的科学家们分离获得。CLONTECH公司也将GFP的有关产品包括真核报告载体、重组GFP及抗-GFP小鼠血清等制成成品出售。许多研究人员期待着GFP这一新生事物能为分子生物学、细胞生物学及医学带来方法学上的突破。

### 1 用于基因表达调控的研究

通过重组DNA技术将相关调控区域同易检测的报告基因相融合,来研究编码难于或不可能直接检测的蛋白质的基因调控,这一方法近几年来已广泛应用于哺乳动物细胞和胚胎的基因表达调控的研究,成为研究基因表达调控的有力工具。到目前为止,有几种细胞内蛋白定位及基因表达的检测方法,包括利用编码 $\beta$ 半乳糖苷酶、萤火虫荧光酶、细菌荧光酶的融合基因进行检测<sup>[5,16]</sup>,但这些方法都需要有底物或辅助因子,在活组织的应用十分有限,因此,仅用紫外光或蓝光便可检测的GFP便为研究者提供了一种十分有效的活体检测基因表达调控的方法。mcc-7基因编码的 $\beta$ 微管蛋白在*Caenorhabditis elegans*的6个感觉神经元中大量表达,而在其他神经元中基本上没有表达, M. Chalfie 等<sup>[3]</sup>在*C. elegans*的体内用mcc-7基因的启动子来控制GFP的表达,检测出所表达的部位同用mcc-7抗体及mcc-7-LacZ融合基因所检测的表达部

收稿日期:1996年1月6日

位相同。最明显的荧光在 *C. elegans* 的 4 个感觉神经元 (ALML, ALMR, PLML, PLMR) 及其神经索中发现, 在刚孵化出的一期幼虫中没有产生荧光, 二期晚期幼虫中的 4/10, 四期早期幼虫的全部, 早期成体的 7/8 产生荧光。

Niedz 将 GFP 基因转移至由甜橙分离的细胞中, 24h 后, 用蓝光照射并在显微镜下观察, 细胞发出强烈的绿光。Niedz 准备将 GFP 基因连接到所希望的基因上, 如耐寒性基因, 再插入受试植物中, 从而将 GFP 基因作为报告基因。与目的基因一起向植物中转移<sup>[1]</sup>, 并作为检测基因转入与否的手段。

## 2 用于蛋白定位的研究

*bicoid* (*bcd*) 蛋白是激活合子基因表达的转录因子, *bcd* mRNA 在亚细胞的分布决定了 *bcd* 蛋白的分布, S. Wang & T. Hazelrigg<sup>[13]</sup>将控制 *bcd* mRNA 分布的果蝇 *exuperantia* (*exu*) 基因同 GFP 基因融合后, 在雌性生殖细胞中表达, 融合后的蛋白在活体或固定的细胞中都发出强烈的荧光。融合蛋白集中于环管(营养细胞同卵母细胞物质传递通道)的微粒中, 秋水仙素等影响微管稳定性的化学试剂可改变这些微粒的分布。从而推测这些颗粒是在微管中运输 *bcd* mRNA 的核蛋白复合体或液泡。这种高分辨率的 GFP 标记为研究 *exu* 在亚细胞的分布提供了新的数据。

P. Barthmaier 和 E. Fyrberg<sup>[2]</sup>将 GFP 基因同 *Act88F* 肌动蛋白基因的 PCR 扩增产物(包括 1 420 个核苷酸的 flanking DNA)相融合后, 同果蝇的转化载体 pCaSpeR 相结合, 并导入果蝇的染色体中, 在对转基因果蝇用表面荧光显微镜进行活体检测时, 发现 GFP 在蛹化早期开始积累, 在成肌细胞融合、增长时, GFP 在所有的发育阶段的肌纤维中都可以发现。将 GFP 分别在野生型及突变型果蝇中表达, 并比较其不同之处, 用此方法 Barthmaier 等对果蝇的间接翅肌的发育及病理学进行了研究。

根据 GFP 发色团的不同, 从野生型绿光发色团到蓝光发色团及红移衍生物, 已建立起来具不同颜色的 Crayon box, 用 GFP 标记的荧光共振能量转移 (FRET) 来测量蛋白间距即将成为现实, 蛋白与蛋白之间的相互作用也利用 GFP 在酵母的两个杂交系中得到评估<sup>[15]</sup>。并由此产生了崭新的药物研究的战略。

## 3 结论

GFP 对细胞生长没有任何毒害作用<sup>[3]</sup>, 且发光不需蛋白、底物或其他的协助因子, 只需在蓝光或紫外光

照射下便可发出绿光, 便于检测观察。由于 GFP 基因的诸多优点, 使它有希望成为基因工程实验中常用的标记基因来取代目前常用的 LacZ 基因(LacZ 基因需反应底物染色), 从而对基因表达及蛋白定位真正做到活体、原位、瞬时地检测, 极大地方便了研究者。同时, 从大肠杆菌中得到的工程重组 GFP 还可用于蛋白胶及 Western 杂交的标准。利用发出不同荧光的 GFP 衍生物作 FRET, 来观察单细胞内标记的蛋白的相互作用, 或将此作为标记, 显微注射到组织或细胞中, 用于荧光激活细胞分类术(FACS)、荧光光度计、共聚焦显微镜上, 其方法学上的价值也是不可估量的。此外, 由于在甲醛固定的细胞内也可发出荧光<sup>[12]</sup>, GFP 还可同其他荧光标记一起作双标记实验。

完全有理由相信, 随着不断深入的研究与应用, GFP 必将在分子生物学、细胞生物学及医学的研究中发挥其巨大的潜力。

## 参考文献

- [1] 陶冶, 1995. *AgBiotech News and Information* 7(1): 3N-4N.
- [2] Barthmaier, P. & Fyrberg, E., 1995. *Dev. Biol* 169: 770-774.
- [3] Chalfie, M., Tu, y., Euskirchen, G. et al., 1994. *Science* 263: 802-805.
- [4] Cody, C. W., Prasher, D. C., Westler, W. M. et al., 1993. *Biochemistry* 32: 1 212-1 218.
- [5] Gould, S. J., & Subramani, S., 1988. *Anal. Biochem.* 175: 5.
- [6] Heim, R., et al., 1994. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 12 501-12 504.
- [7] Inone, S. & Tsuji, F. I., 1994. *FEBS Letters* 351: 211-214.
- [8] Morin, J. G., Hastings, J. W., 1971. *J. Cell. Physiol.* 77: 313.
- [9] Morise, H., Shimomura, O., Johnson, F. H., et al., 1974. *Biochemistry* 13: 2 656-2 662.
- [10] Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., et al., 1992. *Gene* 111: 229-233.
- [11] Shimomura, O., & Shimomura, A., 1981. *Biochem. J.* 199: 825-828.
- [12] Wang, S., & Hazelrigg, T., 1994. *Nature* 369: 400-403.
- [13] Ward, W. W., & Bokman, S. H., 1982. *Biochemistry.* 21: 4 535-4 540.

[ 14 ] Ward, W. W. , Cody, C. W. , Hart, R. C. , *et al.* , 1980.  
*Photochem. Photobiol.* 31: 611.

[ 15 ] Youvan, D. C. , 1995. *Science* 268: 264.

[ 16 ] Reviewed in Sihary, T. J. , & Beckwith, J. R. , 1985.  
*Microbiol. Rev.* 49: 398.