

· 综述 ·

绿色荧光蛋白及其在转基因动物研究中的应用

李 夏, 陈素文, 喻达辉

(中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东 广州 510300)

摘要: 绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 是源于水母 (*Aequorea victoria*)、海笔 (*Renilla reniformis*) 等海洋无脊椎动物的一种蛋白质, 这种蛋白质在体外经适当波长的光激发便可发出绿光, 所发出的绿光用普通荧光显微镜或荧光激活细胞分选器 (FACS) 均可检测到。GFP 基因是目前能在细胞内稳定表达的优良标记基因之一, 不需要任何反应底物及其它辅助因子, 无种属、组织和位置特异性, 对受体细胞基本无毒害, 且检测简单, 灵敏度高, 操作方便, 结果可靠, 无损于细胞或胚胎的完整性及活力, 是一种非常实用的新型报告基因, 在细胞生物学和分子生物学领域有着广泛的应用前景。

关键词: GFP; 转基因动物

中图分类号: Q786

文献标识码: A

文章编号: 1673-2227-(2005)05-0077-04

Green fluorescence protein and its application in animal transgenic study

LI Xia, CHEN Su-wen, YU Da-hui

(South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China)

Abstract: Green fluorescent protein (GFP) is a sort of protein produced by jellyfish (*Aequorea victoria*) and sea pansy (*Renilla reniformis*) which absorbs blue light and emits green fluorescence without exogenous substrates or co-factors, and the fluorescence can be easily detected with fluorescent microscope or fluorescence-activated cell sorter (FACS). Green fluorescent protein gene is an important new reporter gene that can express in living cells without other external substrate and no specific in species, tissues or cells at present. With features of sensitivity in detection, simplicity in manipulation, and reliability in result, GFP is an important reporter gene of practical. Being an effective selective marker, GFP has a great potential application in fields of cell, developmental and molecular biology.

Key words: GFP; transgenic animal

在研究基因的表达或蛋白质的定位与时序变化时常用荧光物质或报告基因作为标记。传统的荧光标记是通过纯化蛋白质再共价结合到荧光染料上, 此方法难以控制化学剂量和染料附着部位, 若该标记蛋白用于活细胞内检测, 则难以通过细胞膜。因此, 该方法已基本淘汰。现在常用

的报告基因如荧光素酶 (LUX) 基因和 β -葡萄糖苷酶 (GUS) 基因也不尽人意, LUX 所检测到的荧光产生部位不一定反映荧光素酶基因的特异表达部位; GUS 则需要昂贵的反应底物且由于其它因素的干扰, 反应颜色的深浅有时不能说明 GUS 活性的高低或有无。源于水母 (*Aequorea vic-*

收稿日期: 2005-04-21; 修回日期: 2005-07-18

资助项目: 国家“863”高技术研究发展计划项目 (2002AA603022); 广东省科技计划项目 (2002B2150101); 广东省自然科学基金 (37148)

作者简介: 李 夏 (1981-), 女, 研究实习员, 主要从事科研管理工作。E-mail: sweetgirl@tom.com

通讯作者: 喻达辉, E-mail: yudh231@21cn.com

toria) 等海洋无脊椎动物的绿色荧光蛋白 (GFP) 可吸收蓝光而后发出绿光^[1], 是生物发光现象中能量传递的受体之一, 它克服了上述缺陷, 具有灵敏度高, 操作简便, 不需要添加任何底物或辅助因子, 不使用同位素, 也不需要测定酶的活性等优点, 已成为目前最优良的标记基因之一^[2]。

1 GFP 的生化性质及其发光原理

1.1 GFP 的生化性质

源于水母和海笔 (*Renilla reniformis*) 的 GFP 在生化特征、发光光谱性质方面不尽相同, 2 种 GFP 的生化、发光光谱及编码序列特征见表 1。

1.2 源于水母的 GFP 的发光原理

GFP 之所以能产生绿色荧光是由于其蛋白分子多肽链内含有特殊的生色基团结构, 即第 65~67 位氨基酸 Ser-

Tyr-Gly 链内环化加氧形成对羟苯甲基咪唑环酮, 和周围其它 3 个氨基酸形成六肽生色团^[3]。但上述 3 个氨基酸残基是如何控制光谱的特征目前还不十分清楚。

体外试验时, 当 Ca^{2+} 与来自水母的发光蛋白质结合时, 便可以观察到一种蓝光, 这种分子内的反应受一种在结合了 Ca^{2+} 后转化为荧光素酶蛋白质的催化, 产生 CO_2 和蓝色荧光蛋白 (BFP), BFP 在反应中也是一种发光体, 如果在反应体系中加入 GFP, 即可以观察到绿光, 这一体外模拟试验与水母自然的发光现象一致^[4,5]。总的过程可用下式表示:

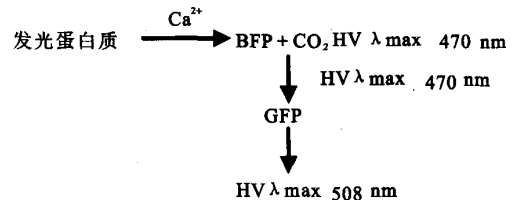


表 1 源于水母和海笔的 GFP 生化性质, 发光光谱及编码序列的比较

Tab. 1 Comparison of biochemical characteristics, emission spectrum and coding sequence of GFP originated from jellyfish (*A. victoria*) and sea pansy (*R. reniformis*)

	水母 GFP jellyfish (<i>A. victoria</i>)	海笔 GFP sea pansy (<i>R. reniformis</i>)
分子量/kDa molecular weight	≈27	≈54
结构 structure	单体多肽	同二聚体
稳定性 stability	稳定 (65°C, pH 11, 1% SDS, 6 M 盐酸胍等不同的处理荧光不消失)	更稳定
氨基酸残基数 number of amino acid	238	未见报道
吸收/激发峰/nm absorbtion / irradiation peak	2 个 (主 395, 次 475)	1 个 (498)
最大发射峰/nm maximum emission peak	508	509
消光系数/mM - cm - absorbtion coefficient	21~30, 7~15	270
量子当量数 quanta equivalent weight	0.72~0.85	0.80
编码序号中内含子数 number of introns	3	未见报道
cDNA 长度/bp cDNA length	962	未见报道

1.3 GFP 作为标记蛋白的优点

(1) 荧光特性稳定。GFP 的荧光非常稳定。只有在过热、过酸、过碱或添加某些变性剂条件下, GFP 才会变

性, 甚至荧光消失。一旦恢复中性环境, 或是除去某些变性剂, 荧光就可恢复并具有和原来一致的发射光谱。在很大的 pH 范围内 (7~12.2) GFP 的吸收、发射光谱基本相

同。(2) 检测方便。用荧光显微镜或肉眼就可以观察到, 且可进行活体观察, 不会损伤正在生长的细胞和组织。(3) 无种属特异性, 也没有细胞种类和位置的限制。Chalfie 等^[6]发现 GFP cDNA 既可以在大肠杆菌 *E. coli* 中表达, 也可以在真核生物线虫 *Caenorhabditis elegans* 中表达。(4) GFP 对受体细胞基本无毒害。Sheen 等^[7]证实玉米转 GFP 基因植株中, 即使 GFP 在细胞中的表达量很高时, 对细胞也不会产生明显毒害。(5) 不受假阳性干扰。由于其他生物本身不含有 GFP, 因此不会出现假阳性结果, GFP 作为分子探针可以代替荧光染料避免由于染料非特异性结合造成的定位不准, 使结果真实可靠^[8]。(6) 无需任何反应底物和辅助因子。(7) 可制成永久标本。GFP 的荧光可以耐受光漂白, 也可耐受福尔马林的固定, 因而可制成长期保存的标本。(8) 灵敏度高。GFP 标记方法比免疫组织化学方法具有更高的灵敏度和分辨率。

2 GFP 基因的特征及其遗传改进

2.1 GFP 基因的特征

1992 年, Prasher 等^[9]根据 GFP 的氨基酸序列合成了相应的寡核苷酸片断, 以此为探针从水母 *A. victoria* PBR322-cDNA 文库中分离到 GFP1 cDNA, 以 GFP1 序列为探针筛选另一噬菌体文库 λ gt10-cDNA 时, 得到 GFP10, 11, 12, 13 共 4 个 GFP 重组子。以 GFP1 cDNA 为探针, 从水母 *A. victoria* 的基因组文库中筛选到 3 种 GFP 克隆。通过对这些阳性克隆限制性酶切和 Southern blot 分析, 发现存在有 3 种不同的内切酶图谱, 这和天然存在 3 种不同 GFP 同分异构体的结果相符合。对阳性克隆 GFP10 的 EcoRI 酶切片段的全序列分析发现: GFP10 cDNA 含有 965 个核苷酸, 含有一个编码 238 个氨基酸的开放阅读框 (ORF)。对 GFP 基因结构进一步研究表明, 它由 3 个外显子组成, 分别编码 69、98 和 71 个氨基酸残基。

尽管 GFP 基因作为报告基因或分子探针有许多无可比拟的优点, 但野生型 GFP 发光较弱, 其次荧光反应不是酶反应, 不能通过添加某些物质来加强信号, 且不易对荧光进行定量检测。

2.2 对 GFP 的遗传改进

针对上述存在的问题, 进行了如下改进。

2.2.1 更换 GFP 生色团氨基酸 由于 Tyr⁶⁶ 和 Gly⁶⁷ 很保守, 是维持生色团活性所必需的, 而 Ser⁶⁵ 则相对易变, 因此可用其它氨基酸来替换 Ser。Heim 等^[10]发现当以 Ala, Leu, Cys, Thr 取代 Ser 时, 荧光强度增加 4~6 倍, 其中, 以 Thr 取代 Ser 时, 其激发光和发射光波最长分别为 490 和 510 nm, 且生色团的形成速度比野生型快 4 倍。可以更快地在受体细胞中表达出来, 能更好地应用于实验研究。

而以 Arg, Asn, Asp, Phe 和 Trp 取代 Ser 时, 其荧光强度比野生型弱。Delagrave 等^[11]对 64~69 位氨基酸进行随机突变, 筛选出了激发波长向红光偏移的突变株 (Red-shifted GFP, RSGFP), 最大发射波长 490 nm, 很容易与野生型 GFP 区分。因此, 利用 GFP 和 RSGFP 共表达, 再利用不同波长的光激发标记物, 可以分析比较同一细胞或组织内不同蛋白质, 启动子或其它调控元件的作用情况。

2.2.2 改变碱基成分 Rouwendal 等^[12]把密码子改为植物偏爱的蛋白表达的密码子, 增加 G 和 C 的含量, 降低 A 和 T 的含量, 能有效地提高 GFP 基因在植物受体中的表达效率。

2.2.3 改变 GFP 基因序列 Pang 等^[13]在 gfp10 cDNA 的第 404 与 405 位之间插入一个植物内含子, 以增强其表达并连接于强启动子之后, 通过组织培养得到转基因植株, 可明显观测到荧光。同时由于第 405~488 位为隐蔽型内含子 (Cryptic intron), 该段序列转录的 mRNA 被植物误识别为内含子, 从而被错误加工, 导致 GFP 不能正确表达。因此要除去隐蔽型内含子, 避免植物细胞的错误剪接^[14]。GFP 在受体内的表达水平的提高还有赖于寻找更为通用的转录翻译的增强子和更强的启动子。

3 GFP 在转基因中的应用

GFP 应用前景很广^[15], 可作为转基因动物和部分植物的筛选标记, 应用于基因表达与产物定位, 用于研究病毒与宿主的关系等等。

转基因动物研究在其问世后短短的十多年时间里已取得了很大的进展, 这一技术在农业、医药行业已显示出广阔的应用前景。然而时至今日, 转基因动物研究中还存在着一些技术上难以克服的困难, 突出地表现在制作转基因动物的效率极低, 从而极大地阻碍了这项研究的深入和拓宽。GFP 这一选择标志的应用, 兴许能为克服这一困难带来一线曙光。

从理论上讲, GFP 的应用至少在以下 2 个方面对转基因动物的研究有所帮助。

3.1 制作转基因动物的前期工作

GFP 基因的表达产物极易检测, 可以单独构建包含这一报告基因的载体以检查基因构件中调控序列调控能力的强弱以及表达的组织特异性, 调控序列调控能力的强弱可通过 GFP 荧光的强弱来反映。这一作用不能低估, 不少报道表明转基因的表达存在着表达过高或太弱的问题。转基因表达水平低固然不是人所希望的, 但也不是转基因表达水平越高越好, 因为外源基因的表达水平不仅会影响到宿主动物本身的健康, 也会影响到转基因产品的质量。

3.2 提高转基因动物的制作效率

可以将待转的目的基因构件与 GFP 基因串联起来一并

整合, 由于 GFP 基因的表达产物在胚胎发育的早期即可检测到, 可以只选择那些表达了 GFP 的胚胎进行移植, 这样就可以减少移植胚胎的盲目性。由于 GFP 基因具有特性稳定、检测方便等优点, 所以将 GFP 应用于转基因动物研究中, 可以节约成本, 提高效率。

日本的科技工作者在这方面作了一些卓有成效的尝试。Takada 等^[16]将细胞巨化病毒 (CMV) 1E 增强子, 人延伸因子 1 α 启动子 (EF-1 α , 包括 5' 侧翼区的一部分, 完整的外显子 1, 内含子 1 及外显子 2 的一部分, 共计 1 187 bp), GFP 基因 (S65T) 以及 SV40 的早期加尾信号组成的基因构件显微注入 383 个原核期小鼠胚胎, 经过 4 d 的体外培养, 其中 148 个胚胎发育至囊胚期, 应用普通荧光显微镜研究者很简单地在其中 59 个囊胚期小鼠胚胎中检测到了 GFP。用聚焦激光扫描镜 (激光波长 480 nm) 研究者在桑椹胚及孵化囊胚期的小鼠胚胎中均检测到荧光 (带通滤波器 500 ~ 530 nm)。将 55 个 GFP 阳性胚胎植入假孕母鼠子宫, 获得 8 只胎鼠和 4 只活鼠, PCR 检测结果表明其中 11 只属转基因阳性, Southern 印迹杂交的结果证实其中 8 只属真正意义上的转基因鼠。后期的研究工作表明, 表达 GFP 的小鼠生长正常, 行为也无明显的异常, 携带 GFP 基因的母鼠与正常小鼠交配后, 收集其胚胎并在体外培养, 在半数胚胎的 4 细胞至囊胚期胚胎中均可清晰地检测到 GFP。用上述同一基因构件研究者显微注射了 389 个牛胚胎, 43 个在体外培养时发育至囊胚, 在其中的 4 个胚胎中检测到了 GFP, 2 个是内细胞团表达了 GFP, 2 个是滋养外胚层细胞表达了 GFP, 研究者未报道关于牛胚胎移植后的结果。

作为先驱性的研究工作, Wang 等^[17]将 GFP 基因与 *exu* 基因串联后转入果蝇基因组, 结果表明 2 种基因均得到高水平的表达。这一尝试在研究 *exu* 基因的转入活动规律及确定相应蛋白质的位置上获得了满意的结果。

4 GFP 用于转基因动物研究时值得考虑的问题

将 GFP 作为选择标记应用于转基因动物的研究中, 为研究工作带来了许多方便。但是, 由此而产生的伦理学及社会学等问题, 更值得我们思考。

生物学家利用对生命运动规律的认识成果有目的、有预见地改变动物的遗传组成, 赋予动物一些新的生产性状以求更好地服务于人类, 这种行为能被生物学家接受并受到推崇, 然而社会学家、生态学家以及其它领域的人士对以 GFP 标记的“发绿光”、“发红光”的转基因动物持何种态度值得审慎考虑。

参考文献:

[1] 刘洋, 沈霞霞, 陈松林, 等. 绿色荧光蛋白基因向花鲈胚胎的

转移及其表达 [J]. 中国水产科学, 2004, 11 (5): 385-390.

- [2] 龙华, 木下政人. GFP 标记在转基因青鳞同系繁殖纯化中的应用 [J]. 遗传, 2003, 25 (4): 409-413.
- [3] Cody C W, Prasher D C, Westler W M, et al. Chemical structure of the hexapeptide chromophore of *Aequorea* green-fluorescent protein [J]. *Biochem*, 1993, 32 (5): 1212-1218.
- [4] Inouye S, Tsuji F I. Evidence for redox forms of the *Aequorea* green fluorescent protein [J]. *FEBS Letters*, 1994, 351 (2): 211-214.
- [5] Inouye S, Tsuji F I. *Aequorea* green fluorescent protein: Expression of the gene and fluorescent characteristics of the recombinant protein [J]. *FEBS Letters*, 1994, 341 (2-3): 277-280.
- [6] Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression [J]. *Sci*, 1994, 263 (5148): 802-805.
- [7] Sheen J, Hwang S, Niwa Y, et al. Green-fluorescent protein as a new vital marker in plant cells [J]. *Plant J*, 1995, 8 (5): 777-784.
- [8] 陈营, 陆承平. 用绿色荧光蛋白标记的细菌研究鱼体吸收颗粒抗原的部位 [J]. 水产学报, 2000, 24 (5): 472-475.
- [9] Prasher D C, Eckenrode V K, Ward W W, et al. Primary structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein [J]. *Gene*, 1992, 111 (2): 229-233.
- [10] Heim R, Prasher D C, Tsien R Y. Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91 (26): 12501-12504.
- [11] Delagrave S, Hawtin R E, Silva C M, et al. Red-shifted excitation mutants of the green fluorescent protein [J]. *Bio/Tech*, 1995, 13 (2): 151-154.
- [12] Rouwendal G J, Mendes O, Wolbert E J H, et al. Enhanced expression in tobacco of the gene encoding green fluorescent protein by modification of its codon usage [J]. *Plant Mol Biol*, 1997, 33 (6): 989-999.
- [13] Pang S Z, Deboer D L, Wan Y, et al. An improved green fluorescent protein gene as a vital marker in plants [J]. *Plants Physiol*, 1996, 112 (3): 893-900.
- [14] Haseloff J, Siemering K R, Prasher D C, et al. Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94 (6): 2122-2127.
- [15] Liu Zhiyi, Xiang Jianhai, Zhou Guoying, et al. Foreign gene transfer into Chinese shrimps (*Penaeus chinensis*) with gene gun [J]. *Chin Sci Bull*, 2001, 46 (9): 766-770.
- [16] Takada T, Iida K, Awaji T, et al. Selective production of transgenic mice using green fluorescent protein as a marker [J]. *Nature Biotech*, 1997, 15 (5): 453-461.
- [17] Wang S, Hazelrigg T. Implications for *bed* mRNA localization from spatial distribution of *exu* protein in *Drosophila oogenesis* [J]. *Nature*, 1994, 369 (6479): 400-403.