

珊瑚和海葵来源红荧光蛋白的研究和应用*

钟卫鸿^{1**} 陈建孟¹ 陈伟² 路争¹ 宋艳绒¹

(1 浙江工业大学生物与环境工程学院 杭州 310032)

(2 Center for Cellular and Molecular Biophysics, University of South Florida, Tampa Florida 33620, USA)

摘要 绿色荧光蛋白作为标记蛋白和报告蛋白在生物科学研究中应用越来越广。但在荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)等技术中存在一些缺陷,需要更大波长范围的荧光蛋白。最近研究发现了多种来源于珊瑚和海葵的红荧光蛋白,这些长波长的荧光蛋白对绿色荧光蛋白是一种很好的代替和补充,可以实现细胞内多荧光标记,提供更理想的 FRET 荧光对。经随机突变和定点突变等方法改建获得的红荧光蛋白变种显示出更高的荧光强度,成熟时间也更短。目前应用较多的是来源于香菇珊瑚(*Discosoma sp.*)的红荧光蛋白 DsRed。

关键词 绿色荧光蛋白 红荧光蛋白 FRET 标记蛋白

自从 1962 年首次发现存在于水母体内的绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)后,人们完成了 GFP 分离纯化、发光机制、结构功能、基因克隆和融合表达等的研究,并引入到生物学和生物工程研究中作为标记蛋白或报告蛋白获得广泛应用^[1,2],并逐渐拓展至环境科学等领域^[3]。为了增强 GFP 的应用效果和应用领域,不少研究进行了 GFP 改进^[4]和荧光(蛋白)色的拓展工作,如通过 GFP 的随机和定点突变,获得红移荧光蛋白,红移荧光会有利于减少背景自发荧光,也有利于进行两种标记(如绿色与红色荧光)的同步追踪。同时也发现其他的红移荧光蛋白,如丙酸细菌的尿卟啉原(III)甲基转移酶(CoBA),可作为大肠杆菌、裂殖酵母和哺乳动物细胞基因表达的报告蛋白,其在细胞内大量表达时产生明亮的红荧光^[5]。但是近几年研究和应用最多的还是来源于珊瑚和海葵的红荧光蛋白,并显示出特有的研究和应用价值。

1 珊瑚和海葵来源红荧光蛋白

1.1 珊瑚和海葵来源红荧光蛋白的种类及光学特性

Matz 等最早报道珊瑚动物能提供各种类似

GFP 的荧光蛋白,并开展了一系列的红色荧光蛋白等色蛋白的研究工作,发现了一些有应用价值的红荧光蛋白。如 drFP583 蛋白,其最大发射波长为 583nm^[6]。随后,Fradek 等报道从香菇珊瑚(*Discosoma sp.*)分离到红荧光蛋白 dsFP593(或 DsRed)的基因,其最大发射波长达到了 593nm,鉴定发现 DsFP593 与 drFP583 高度同源,并通过随机突变获得了 ds/drFP616 突变蛋白,使得最大发射波长进一步红移到 616nm^[7]。海葵和珊瑚都同属于腔肠动物门中的珊瑚虫纲(*Actinozoa*),他们都具有柱状的身体与触手环绕在口部,而两者之间最主要的差别在于珊瑚具有碳酸钙成分的骨骼(或是骨针)而海葵则无,但他们均有鲜艳的色彩,是各种荧光蛋白的很好来源。近年来陆续发现的来自珊瑚和海葵的红荧光蛋白主要有:

(1) asCP: 分离自美国粉红海葵(*Anemonia sulcata*)的唯一一种 GFP 类似色蛋白,asCP 最初没有荧光,但当受强绿光照射时可产生强烈荧光,发射波长为 595nm^[8]。

(2) gtCP: 从 *Goniopora tenuidens* 获得的红色蛋白 gtCP,其中包含与 DsRed 化学结构一样的生色基团,证实其属于 GFP 类似蛋白的 DsRed 亚族^[9]。

(3) HcRED: 结合定点突变和随机突变方法从紫点海葵(*Heteractis crispa*)的色蛋白中获得的唯一远红荧光蛋白(HcRED),该蛋白在 645nm 显示明亮发射光。与 drFP583 相比(图 1),其清晰的红移荧

收稿日期:2004-12-17 修回日期:2005-03-08

* 国家自然科学基金资助项目(20276070),浙江省自然科学基金资助项目(Y304091)

**电子邮箱:whzhong@zjut.edu.cn

光使其成为更理想的多色标记附加色,更重要的是 HcRED 可在 600 nm 激光激发,因而可以引入新的检测通道用于多色流式细胞仪检测^[10]。

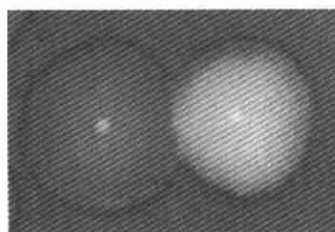


图1 表达 HcRED 及 drFP583 的 *E. coli*

菌落荧光显微镜照片

(左: HcRED; 右: drFP583)

Fig.1 Image of *E. coli* colonies expressing HcRed and drFP583 by fluorescence microscopy (left: HcRed; right: drFP583)

(4) eqFP611: 来自拳头海葵 (*Entacmaea quadricolor*) 的另一种新型远红荧光蛋白, 该蛋白最大激发波长在 559nm, 最大发射波长在 611nm, 因而 eqFP611 在很多应用方面也可作为 DsRed 的替代品^[11]。

1.2 珊瑚和海葵来源红荧光蛋白的结构与功能

对珊瑚和海葵红荧光蛋白的结构与功能的研究已获得重要进展, 主要集中于对 DsRed 的研究。研究发现刚合成的 DsRed 分子大部分是单体而且缺少共价闭合的发色基团, 体内成熟过程诱发了红荧光发色基团的表达形成。另外该蛋白只在寡聚态构象时才产生荧光, 单体态构象时不产生荧光, 即红荧光生色基团仅以寡聚体形式发挥功能, 而二聚体可能是其功能单位^[12]。已经探明了 DsRed 红荧光发色团单体的形成过程及单体发生有利于聚合的变化, 即成熟过程需要分子氧, 在成熟的最后一步发生了 66 位氨基酸残基 Gln 的 α 位碳氮键的氧化形成了酰氨化合物, 并进一步扩展连接成红荧光发色团(图 2)^[13]。

在探明 DsRed 结构与功能的基础上, 针对野生型 DsRed 存在生色团成熟慢和溶解性差的缺陷, 用随机突变和定点突变的方法构建了 DsRed 变种使其成熟时间比野生型快 10~15 倍。同时发现当 42 位的氨基酸残基 Asp 替换为 Glu 时, 成熟过程大大加速, 但同时却增加了绿光的发射, 而其他的氨基酸替代则在抑制绿光发射同时进一步加速了其成熟过程。另外, 通过减少蛋白 N-端的净电荷, 可增强溶解性。经过优化后的 DsRed 变种甚至在如醇

母这种快速生长的机体中也能产生明亮的荧光^[14]。Verkhusha 等^[15]构建了 DsRed S197Y 变种, 使荧光亮度比野生型蛋白增强 3~3.5 倍, 并且没有二次荧光峰, 是一种理想的与 GFP 共用的双标记报告蛋白。而且发现 DsRed S197Y 成熟时间比 GFP 滞后, 这对发育生物学研究是很有用的, 可用作荧光发育计时器, GFP 和 DsRed 同时表达, 发射光却在先后产生, 这提供了细胞内蛋白表达启动后的时间信息, 可反映细胞分化次序。

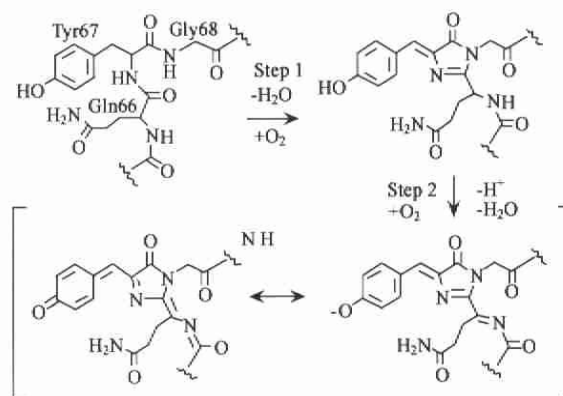


图2 DsRed 红荧光发色团单体的形成及聚合

Fig.2 Formation and conjugation of the red-emitting chromophore of DsRed

2 珊瑚和海葵来源红荧光蛋白的应用

红荧光蛋白自被发现后, 就开始被应用于多种活细胞中的发光标记或分子定位。陆续地已有几种红荧光蛋白载体由 Clontech 公司开发成功, 可以直接从该公司购买, 目前有: (1) 来源于美国粉红海葵 (*Anemonia sulcata*) 的 pAsRed2、pAsRed2-C1 和 pAsRed2-N1 3 种载体主要用于哺乳动物细胞表达系统; (2) 来源于香菇珊瑚 (*Discosoma sp.*) 的 pDsRed-Express、pDsRed2 和来源于紫点海葵 (*Heteractis crispa*) 的 pHcRed1 3 种载体主要用于细菌表达系统。迄今, 报道最多的是 DsRed 载体在微生物学和 FRET 技术中的应用。

2.1 在微生物学研究中的应用

红荧光蛋白已分别在原核和真核微生物研究中开始应用。如 Mikkelsen 等^[16]用 DsRed-Express 载体构建了 pPgpd-DsRed 质粒载体, 成功地与 gGFP 在子囊菌纲的青霉 (*Penicillium paxilli*)、哈茨木霉 (*Trichoderma harzianum*) 和绿色粘帚霉 [*Trichoderma virens* (syn. *Gliocladium virens*)] 3 菌中共转化和表

达,双标记的转化子在同一菌丝中同时表达两种荧光,可用激光共聚焦显微镜进行荧光强度的比较。Jakobs 等^[17]则用激光共聚焦显微镜,双光子和荧光显微镜观察比较了 EGFP 和 DsRed 荧光标记大肠杆菌培养物,显示 DsRed 有更长的成熟时间和荧光寿命,但表达 DsRed 的大肠杆菌细胞比表达 EGFP 的细胞要小的多,衰老细菌细胞中会发生 DsRed 的凝聚并伴随荧光寿命的缩短。Nanchaiah 等^[18]成功地用 GFP 和 DsRed 双荧光标记恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)进行 TOL 质粒接合转移的原位监测。即将带有 GFP 的 TOL 质粒(pWWO)转入恶臭假单胞菌 KT2442(该菌已通过转座插入在染色体上带上 dsRed 标记),获得绿色和红色荧光共同表达的受体细胞,共表达细胞明显比只表达 GFP 的细胞要小,因而混合培养物或污泥中的受体和结合子很容易用荧光显微镜图像分辨,而不用培养菌体来检测质粒转化频率。

2.2 在 FRET 技术中应用

荧光共振能量转移(FRET)是近年来生命科学领域出现的一种崭新技术,能够定时、定量、定位及无损伤检测活细胞内蛋白质-蛋白质间相互作用,甚至检测细胞内或细胞外蛋白质分子间或分子内的不同基团或残基间的相互作用。目前主要用于蛋白酶活性检测、蛋白质分子间相互作用和分子构象变化(如细胞膜蛋白分子构象)等研究。目前主要是基于 GFP 及其突变体的 FRET 技术,GFP 突变体主要有黄色荧光蛋白(yellow fluorescent protein, YFP),青色荧光蛋白(cyan fluorescent protein, CFP)

等,图 3 分别是蓝色(BFP)、青色(CFP)、绿色(GFP)、黄色(YFP)及红色(mRFP1)荧光蛋白激发光谱图和发射光谱图^[19]。这些突变体和红色荧光蛋白的拓展使 FRET 方法用来研究活细胞内蛋白质-蛋白质间相互作用成为可能并不断拓展^[20]。

荧光共振能量转移是指两个荧光发色基团在足够靠近时,供体分子吸收一定频率的光子后被激发到更高的电子能态,在该电子回到基态前,通过偶极子相互作用,实现了能量向邻近的受体分子转移(即发生能量共振转移)。如 CFP 的发射光谱与 YFP 的吸收光谱有相当的重叠,当它们足够接近时,用 CFP 的吸收波长激发,CFP 的发色基团将会把能量高效率地共振转移至 YFP 的发色基团上,所以 CFP 的发射荧光将减弱或消失,主要发射将是 YFP 的荧光。2 个发色基团之间的能量转换效率与它们之间的空间距离的 6 次方成反比,因而对空间位置的改变非常灵敏。如要研究两种蛋白质 a 和 b 间的相互作用,可以根据 FRET 原理构建一融合蛋白,这种融合蛋白由三部分组成:CFP、蛋白质 b 和 YFP。用 CFP 吸收波长 433nm 为激发波长,当蛋白质 a 与 b 没有发生相互作用时,CFP 与 YFP 相距很远不能发生荧光共振能量转移,因而检测到的是发射波长 476nm 的 CFP 荧光。但当蛋白质 a 与 b 发生相互作用时,由于蛋白质 b 受蛋白质 a 作用而发生构象变化,使 CFP 与 YFP 充分靠近发生荧光共振能量转移,此时检测到的就是发射波长为 527nm 的 YFP 荧光,将编码这种融合蛋白的基因通过转基因技术使其在细胞内表达,这样就可以在活

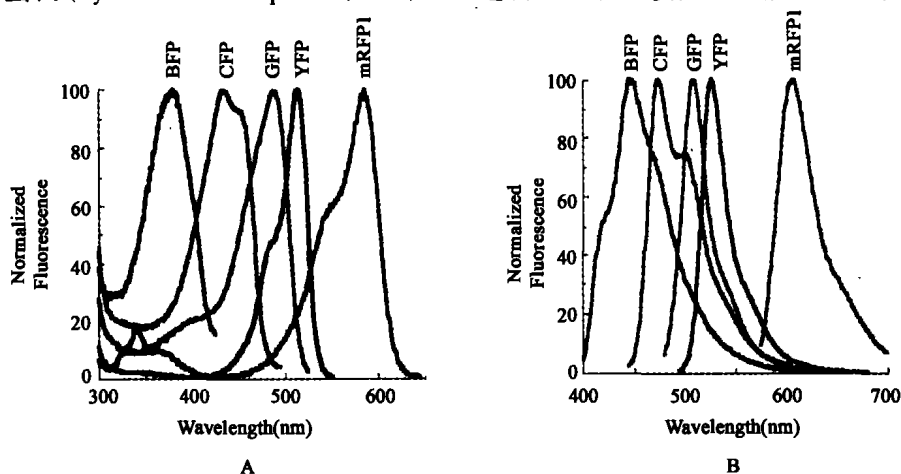


图 3 各色荧光蛋白光谱图

A: 激发光谱; B: 发射光谱; mRFP1: DsRed 突变种

Fig.3 The excitation and emission spectra of different fluorescent proteins

(A: excitation spectra; B: emission spectra; mRFP1: a mutant of DsRed)

细胞生理条件下研究蛋白质-蛋白质间的相互作用。如王进军等^[21]利用 CFP 和 YFP 标记 PKA(蛋白激酶 A)的两端,当 PKA 发生构象变化使得两端的 CFP 和 YFP 相靠近,发生可监测的 FRET,实现以 FRET 变化检测 PKA 酶活性的变化。

从光谱特征看 DsRed 是 GFP 和 CFP 的很好 FRET 对子,而且可以突破目前常用的 CFP/YFP 对子的一些局限,如 CFP/YFP 只能以 Argon 激光进行亚最适供体(波长)激发(荧光),而当以 DsRed 为受体,GFP 或 CFP 为供体则可避免这些局限,但是 DsRed 生色团的成熟过程慢也会影响 FRET 的量化。Erickson 等采取脉冲激活等措施来减少成熟慢带来的失真问题。结果显示 DsRed 与 GFP 和 CFP 配对产生强的 FRET,为类似 DsRed 的海洋珊瑚或海葵的生色基因与 GFP 和 CFP 作为 FRET 对子应用展示了很好的前景^[22]。

3 展 望

从珊瑚和海葵中分离得到的红荧光蛋白的开发利用,弥补了目前广泛应用的绿色荧光蛋白 GFP 的一些不足,有助于实现复杂研究体系(如微生物菌群、细胞内多组分的共定位)多荧光的同时标记。笔者实验室在国家基金资助下进行了 GFP 标记细菌构建生物膜工作,获得了一种在荧光显微镜或激光共聚焦显微镜下进行生物膜结构的量化描述方法,但是实现两种以上菌株构成的生物膜或混合培养系统的菌群组成的动态变化的实时和在线描述,对于环境生物技术和混合发酵技术的研究和应用有重要的意义。因而笔者正在相关的国家和省基金资助下采用 GFP 与 RFP、YFP 等多种荧光蛋白同时标记微生物群落(如硝化细菌群)中不同种细菌,并重构培育生物膜,以探索获得荧光显微镜或激光共聚焦显微镜方法描述多荧光标记菌株组成生物膜结构动态变化方法,考察用于环境治理的硝化细菌生物膜菌种构成对硝化效果的影响,这有利于实时在线揭示生物膜构成与效果关系,相关的工作结果将另文报道。红荧光蛋白系列的研究应用也为 FRET 技术提供了更多的供体和受体的配对选择,促进 FRET 技术的应用发展,对各种细胞生物学相关研究已经并将起到更大促进作用。如笔者拟应用 GFP 与 RFP 基因与细胞膜蛋白,如钠钾泵(Na,K-ATPase),构建融合蛋白以建立 FRET 检测方法考察研究膜蛋白的结构与功能关系,该融合

蛋白可用于考察理化因子对各种细胞的影响,甚至作为药物筛选的新模型。

参考文献

- [1] Kendall J M, Badminton M N. *Aequorea victoria* bioluminescence moves into an exciting new era. Trends in Biotechnology, 1998, 16(5): 216 ~ 224
- [2] 刘默芳,王恩多.绿色荧光蛋白.生物化学与生物物理进展, 2000, 27(1): 238 ~ 243
Liu M F, Wang E D. Prog Biochem Biophys, 2000, 27(1): 238 ~ 243
- [3] 叶海仁,钟卫鸿,陈建孟.绿色荧光蛋白分子标记在环境微生物研究中的应用.环境污染与防治, 2003, 26(6): 353 ~ 355
Ye H R, Zhong W H, Chen J M. Environmental Pollution and Control, 2003, 26(6): 353 ~ 355
- [4] 杨广, Wang-Pruski Gefu, 龙民生.绿色荧光蛋白的改进.农业生物技术学报, 2002, 10(4): 397 ~ 403
Yang G, Wang-Pruski G, Long M SH. Journal of Agricultural Biotechnology, 2003, 26(6): 353 ~ 355
- [5] Wildt S, Deuschle U. CobA, a red fluorescent transcriptional reporter for *Escherichia coli*, yeast, and mammalian cells. Nature Biotechnology, 1999, 17(12): 1175 ~ 1178
- [6] Matz M, Fradkov A, Labas Y, et al. Fluorescent proteins from non-bioluminescent *Anthozoa* species. Nature Biotechnology, 1999, 17: 969 ~ 973
- [7] Fradkov A F, Chen Y, Ding L, et al. Novel fluorescent protein from *Discosoma* coral and its mutants possesses a unique far-red fluorescence. FEBS Letters, 2000, 479(3): 127 ~ 130
- [8] Chudakov D M, Belousov V V, Zaraisky A G, et al. Kindling fluorescent proteins for precise *in vivo* photolabeling. Nature Biotechnology, 2003, 21: 191 ~ 194
- [9] Martynov V I, Maksimov B I, Martynova N Y, et al. A purple-blue chromoprotein from *Goniopora tenuidens* belongs to the DsRed subfamily of GFP-like proteins. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(47): 46288 ~ 46292
- [10] Gurskaya N G, Fradkov A F, Tersikh A. GFP-like chromoproteins as a source of far-red fluorescent proteins. FEBS Letters, 2001, 507(1): 16 ~ 20
- [11] Wiedenmann J, Schenk A, Röcker C, et al. A far-red fluorescent protein with fast maturation and reduced oligomerization tendency from *Entacmaea quadricolor* (*Anthozoa*, *Actinaria*). PNAS, 2002, 99(18): 11646 ~ 11651
- [12] Sacchetti A, Subramaniam V, Jovin T M, et al. Oligomerization of

- DsRed is required for the generation of a functional red fluorescent chromophore. FEBS Letters, 2002, 525(1-3):13 ~ 19
- [13] Yarbrough D, Wachter R M, Kallio K, et al. Refined crystal structure of DsRed, a red fluorescent protein from coral, at 2.0 - Å resolution. PNAS, 2001, 98(2): 462 ~ 467
- [14] Bevis B J, Glick B S. Rapidly maturing variants of the *Discosoma* red fluorescent protein (DsRed). Nature Biotechnology, 2002, 20(1): 83 ~ 87
- [15] Verkhusha V V, Otsuna H, Awasaki T, et al. An enhanced mutant of red fluorescent protein DsRed for double labeling and developmental timer of neural fiber bundle formation. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276: 29621 ~ 29624
- [16] Mikkelsen L, Sarrocco S, Lubeck M, et al. Expression of the red fluorescent protein DsRed-Express in filamentous ascomycete fungi. FEMS Microbiol Letters, 2003, 223(1): 135 ~ 139
- [17] Jakobs S, Subramaniam V, Schonle A, et al. EGFP and DsRed expressing cultures of *Escherichia coli* imaged by confocal, two-photon and fluorescence lifetime microscopy. FEBS Letters, 2000, 479(3): 131 ~ 135
- [18] Nanchaiah Y V, Wattiau P, Wuertz S, et al. Dual labeling of *Pseudomonas putida* with fluorescent proteins for in situ monitoring of conjugal transfer of the TOL plasmid. Applied Environment Microbiology, 2003, 69(8): 4846 ~ 4852
- [19] Lippincott-Schwartz J, Patterson G H. Development and use of fluorescent protein markers in living cells. Science, 2003, 300: 87 ~ 91
- [20] 王进军, 陈小川, 邢达. FRET 技术及其在蛋白质-蛋白质分子相互作用研究中的应用. 生物化学与生物物理进展, 2003, 30(6): 980 ~ 984
- Wang J J, Chen X CH, Xing D. Prog Biochem Biophys, 2003, 30(6): 980 ~ 984
- [21] 王进军, 陈小川, 邢达. 利用 FRET 技术在活细胞内观察 EGF 对 PKA 作用的时空成像. 生物物理学报, 2004, 20(2): 109 ~ 113
- Wang J J, Chen X CH, Xing D. Acta Biophysica Sinica, 2004, 20(2): 109 ~ 113
- [22] Erickson M G, Moon D L, Yue D T. DsRed as a potential FRET partner with CFP and GFP. Biophysics Journal, 2003, 85: 599 ~ 611

Advance in the Study and Application of Red Fluorescent Protein from *Actinozoa*

ZHONG Wei-hong¹ CHEN Jian-meng¹ CHEN Wei² LU Zheng¹ SONG Yan-rong¹

(1 College of Biological & Environmental Engineering, Zhejiang University of Technology Hangzhou 310032, China)

(2 Center for Cellular and Molecular Biophysics, University of South Florida, Tampa Florida 33620, USA)

Abstract Green fluorescent protein (GFP) is broadly applied to biological study as marker or report molecule. But improvement of GFP is required for application in long wavelength scale, especially for the application as FRET (fluorescence resonance energy transfer) pair. The RFP (red fluorescent protein) recently developed from *Actinozoa* was found to be one of the best substitute and complement for GFP as mark protein. RFP, accompanied with GFP, helps to simultaneously tag different target proteins in the same cell or different kinds of strains in complex microbiological community. RFP could supply better FRET pairs with other FP. RFP and its mutants by site-directed and random mutagenesis showed higher fluorescent intensity and required lower mature time. So far, more studies and application of RFP were focused on DsRed from *Discosoma sp.*

Key words Green fluorescent protein Red fluorescent protein FRET Marker protein