

- 181:75-149.
- [19] Del, Vecchio., et al., 1997, *Protoplasma*, **196**:224-234.
- [20] Blackman, et al., 1999, *J. Cell Biol.*, **78**:297-304.
- [21] Vignes, B., et al., 1999, *Cell Motil Cytoskeleton*, **43**(1): 72-81.
- [22] Sullivan, D S., et al., 1998, *J. Cell Biol.*, **143**(3):751-765.
- [23] Richard, A., et al., 2000, *Microscopy research and technique*, **49**:451-457.

绿色荧光蛋白应用研究进展

徐飞虎 龚兴国*

(浙江大学生命科学学院 杭州 310027)

绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)是来源于发光水母(*Aequorea Victoria*)的一种功能独特的蛋白质,分子量为27kD,具有238个氨基酸。自1992年Prasher^[1]等人克隆到GFP的cDNA以来,绿色荧光蛋白作为一种新型的标记基因,已日益引起人们的兴趣。以GFP为报告基因已成为基因转移研究领域的热点之一,并成功应用在多种基因转移系统和靶细胞。迄今为止,GFP已在大肠杆菌、酵母、果蝇、鼠及植物等异源细胞中表达成功,并保存天然荧光活性。由于绿色荧光蛋白受光激发产生荧光是一个特异性的独立过程^[2],并不需要任何的协同因子、底物或其他来自水母的基因表达产物,且由于其在异源细胞内融合表达后可自发环化成熟,自发产生荧光且对异源细胞内的生理过程无干扰,因而可应用于活体细胞的实时检测。如用来在活体内追踪某一特定蛋白的合成、运输和定位,用于观测细胞分泌过程等等^[3]。将GFP与特定抗体或细胞因子结合进行融合表达,可用于对肿瘤的检测、细胞因子受体的分布以及功能等方面的研究。此外绿色荧光蛋白还可应用于药物筛选等方面的研究。本文拟就这些方面的研究进展作一简单综述,以期相关的研究提供一些有益的参考。

一、GFP的分子结构和发光机制

绿色荧光蛋白为一个由238个氨基酸残基组成的单链,GFP有两个吸收峰,主峰在395nm,次峰在470nm,其荧光发射峰在509nm。GFP的化学性质相当稳定,其变性需要在90℃或pH<4或pH>12的条件下用6mol/L盐酸胍处理,这一性质与GFP的结构特性相关。

Yang^[4]等的研究表明,GFP是由两个相当规则的内含一个 α -螺旋和外面包围11个 β -折叠的 β -桶

状结构组成的二聚体, β -桶状结构直径约3nm,高约4nm。 β 折叠彼此紧密结合,象桶板一样形成桶状结构的外围,并且形成了一个规则的氢键带。桶状结构和位于其末端的短 α 螺旋以及环状结构一起组成一个单独的致密结构域,没有可供扩散的配体进入缝隙。这种坚实的结构保证了其稳定和抗热、抗变性的特点。

GFP的生色基团附着于 α -螺旋上,几乎完美的包被于桶状结构中心。位于圆桶中央的 α -螺旋含有一个由六肽组成的发光中心,而发光团是由其中的三肽Ser65-Tyr66-Gly67经过环化形成了对羟基苯咪唑啉酮。GFP的生色基团是蛋白质自身催化环化的结果,环化是一个有氧过程,在严格厌氧条件下GFP不能形成荧光,因为GFP的生色团形成需要O₂使Tyr66脱氢氧化。生色基团通过Tyr66的脱质子(酚盐)和质子化状态(羟酚基)的转换决定荧光发射^[4],此模型为Yang等的晶体学证据所支持。

二、GFP在生物技术中的应用研究

1. 分子标记

作为一种新型的报告基因,GFP已在生物学的许多研究领域得到应用。利用绿色荧光蛋白独特的发光机制,可将GFP作为蛋白质标签(protein tagging),即利用DNA重组技术,将目的基因与GFP基因构成融合基因,转染合适的细胞进行表达,然后借助荧光显微镜便可对标记的蛋白质进行细胞内活体观察。由于GFP相对较小,只有238个氨基酸,将其与其他蛋白融合后不影响自身的发光功能,利用GFP的这一特性已经加深了我们对细胞内一些过程的了解,如细胞分裂、染色体复制和分裂,发育和信号转导等。1996年,Ehrhardt^[5]等人首次报道

* 通讯作者。E-mail:gongxg@cls.zju.edu.cn

了利用 GFP 的特性研究细胞分化蛋白 FtsZ 的定位。研究显示 FtsZ 在细胞分裂位点形成了一个环状物,且至少有 9 种蛋白在细胞分裂中起重要作用,尽管对这些蛋白功能仍然不是很清楚,但是利用 GFP 融合蛋白已经搞清楚了它们聚合的顺序以及在蛋白定位中的一些特征。利用 GFP 来检测目标蛋白的定位已为我们提供了一种对细胞内的一些基本的生理过程进行更详尽观察的新方法。

除用于特定蛋白的标记定位外,GFP 亦大量用于各种细胞器的标记如细胞骨架、质膜、细胞核等等。Shi 等人^[6]曾报道将 GFP 融合到大肠杆菌细胞膜表面用作标记蛋白,这一技术将有助于提高多肽库的筛选效率、疫苗的研制、构建细胞生物传感器用作环境检测以及探测信号转导过程等等。这些都为传统生物学研究提供了新思路和新方法,成为交叉学科研究的热点。

2. 药物筛选

许多新发展的光学分析方法已经开始利用活体细胞来进行药物筛选,这一技术能从数量众多的化合物中快速筛选出我们所感兴趣的药物。基于细胞的荧光分析可分为三类:即根据荧光的密度变化、能量转移或荧光探针的分布来研究目标蛋白如受体、离子通道或酶的状态的变化^[7]。荧光探针分布是利用信号传导中信号分子的迁移功能,将一荧光蛋白与信号分子相偶联,根据荧光蛋白的分布情况即可推断信号分子的迁移状况,并推断该分子在迁移中的功能。由于 GFP 分子量小,在活细胞内可溶且对细胞毒性较小,因而常用作荧光探针。

在细胞体内分子之间的相互作用非常复杂,其中很多涉及到信号分子在细胞器之间的迁移。例如当信号分子和某一特殊受体结合后常会导致配体-受体复合物从某一细胞区域迁移到另一区域,而这一迁移过程通常会介导一重要的生理功能。因而,这些受体常常被用作药物筛选的目标,若某一药物具有与信号分子类似的功能,那么该药物即具有潜在的医药价值。利用 GFP 荧光探针,将很容易从数量众多的化合物中判断出那些化合物具有与信号分子相似的能引起配体-受体复合物迁移并介导生理反应的功能,且这一筛选过程简单方便,所需成本也很低。利用这一原理,已经成功构建了一个筛选模型用于研究药物介导的糖皮质激素受体(hGR)的迁移过程^[8]。在一 96 孔板中培养细胞,并以一编码 hGR-GFP 蛋白的质粒转染该细胞。当细胞用待筛选的药物处理后,hGR-GFP 从细胞质迁移入细胞核

的过程可实时或在某一时段内被证实,根据荧光分布即可推断哪一种药物具有与 hGR 配体相类似的功能。利用 GFP 来进行药物筛选由于受其必须与迁移的信号分子相偶联,其筛选容量相对较低,但是由于 GFP 在细胞内的穿透性强及独特的发光机制,因而在药物筛选中具有相当大的应用潜力。

3. 融合抗体

近二十年来,抗体生成技术有了飞速发展,已经从细胞工程抗体(杂交瘤技术-单克隆抗体)发展到了第三代抗体:基因工程抗体,尤其是噬菌体抗体库技术的出现,解决了人源抗体的研制问题^[9],促进了各种性能优良抗体以及具有多种功能的抗体融合蛋白的开发。单链抗体(Single-chain variable fragment, ScFv)是研究得较多的一种小分子抗体,其优越性在于可在宿主细胞内大量表达,易于基因工程操作,尤其易于构建抗体融合蛋白。近年来,关于绿色荧光蛋白融合单链抗体的报道很多^{[10][11]},国内也有相关报道,如程虹等报道将抗肝癌单链双功能抗体融合 GFP 真核表达载体并导入小鼠成纤维细胞 NIH3T3 表达并获得成功^[12]。因融合抗体具有与抗原结合及发射荧光两种特性,故这一人工分子可用做免疫染色的检测试剂,直接应用于流式细胞仪和免疫荧光的标记及肿瘤的检测等等。

由于技术上的原因,一般融合抗体均置于原核表达系统如 *E. coli* 中表达。为便于表达蛋白的分离纯化,一般在单链抗体的 N 端或 C 端插入一 6×His 序列,便于用 Ni-NTA 亲和层析柱纯化目标蛋白。但这一技术也存在一些问题。由于抗体分子内存在二硫键,而在原核表达系统内由于抗体不能正确折叠,容易形成包涵体,表达出来的目标蛋白无活性,需要在氧化还原体系中进行复性。但近来也有报道在动物细胞细胞质中成功表达出具有抗原结合活性的单链抗体^[13-15]。若能成功解决融合抗体的表达问题,则在免疫染色及肿瘤检测这一领域融合抗体将扮演极为重要的角色。

4. 生物传感器

蛋白质工程技术已经开始采用将一具有信号传导功能分子识别位点的分子结合到另一分子上来设计生物感受器。绿色荧光蛋白由于其独特的光信号传导机制,以及在表达后易被周围化学环境和蛋白之间的相互作用所影响的特性,因而极适于用做活细胞体内的光学感受器。第一个基于 GFP 的生物感受器为 Ca^{2+} 感受器,由 Romoser^[16] 和 Miyawaki^[17] 几乎同时提出。这一感受器原理是利用钙

调蛋白结合钙离子后引起的空间构象变化导致两种 GFP 突变体间发生荧光共振能量转移。但是由于大多数蛋白不能像钙调蛋白那样承受较大的空间构象变化,为克服这一缺点,人们开始提出利用基因融合技术将一新的分子识别位点结合到 GFP 上以构建新的分子感受器。Doi 和 Yanagawa^[18]根据这一原理将 TEM1 β -内酰胺酶(Bla)融合到 GFP 上。当缺少目标分子时,GFP 处于静止状态不会产生荧光。但是当目标分子 β -内酰胺酶抑制蛋白(BLIP)与 Bla 结合后,即使 GFP 活化产生荧光,而这一变化很容易被检测到。将受体蛋白插入到 GFP 表面的技术已经成为构建分子感受器的有力工具,这种 GFP 感受器能被用来检测多种分子,如蛋白质、核酸、激素、药物、金属及其他的一些小分子化合物等,其潜在应用前景极为广阔。

三、小结及展望

由于荧光蛋白的自发荧光特性,发光不需要其他的协助因子,荧光生色团对热、pH、化学变性剂稳定,具有较强的抗光漂白,因而在分子生物学的众多研究领域中有广泛的应用,如基因表达,蛋白定位等等。但是也存在着一些不足,主要表现在 GFP 表达后要成为具有荧光活性形式的过程比较慢,因而对某些细胞动力学过程不能实时监测。检测的灵敏度也需要进一步提高,某些细胞的荧光背景会影响 GFP 的检测。随着对 GFP 研究的深入,预计将会有更多的突变改进型 GFP 出现,能逐步克服上述的一些缺点,推动 GFP 在生命科学研究中更广泛的应用。

摘要

作为一种新型的报告基因,由于其自身独特的发光机制,GFP 在分子生物学的研究中得到越来越

广泛深入的应用,如用于特定蛋白的标记定位,活体内的肿瘤检测、药物筛选等等。GFP 的运用,为传统生物学研究提供了新思路和新方法。本文简要概述了近年来相关方面的研究进展。

参考文献

- [1] Prasher D, et al., 1992, *J. Gene*, **111**:229-233.
- [2] George N P., 1997, *Current Opinion in Structural Biology*, **7**:821-827.
- [3] Gregory J P., 2001, *FEMS Microbiology Letters*, **204**: 9-18.
- [4] Yang F, et at, 1996, *Nat. Biotechnol.*, **14**(10):1246-1251.
- [5] Ma X, et al., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **93**: 12998-13003.
- [6] Shi H D, et al., 2001, *Enzyme and Microbial Technology*, **28**:25-34.
- [7] Jesus E G, et al., 1998, *Current Opinion in Biotechnology*, **9**:624-631.
- [8] Steven R K., 1999, *Drug Discovery Today*, **4**(7):304-312.
- [9] 杜桂鑫, 1999, 国外医学免疫学分册, **22**(6):350-354.
- [10] Remko A G, et al., 1999, *J. Immuno. Methods*, **230**: 121-130.
- [11] Kazuhiko M, et al., 2001, *J. Immuno. Methods*, **257**: 175-184.
- [12] 程虹等, 2001, 世界华人消化杂志, **9**(6):640-644.
- [13] Mhashilkar A M, et al., 1995, *EMBO J*, **14**: 1542-1551.
- [14] Cohen P A, et al., 1998, *Oncogene*, **17**:2445-2456.
- [15] Levin R, et al, 1997, *Mol. Med.*, **3**:96-110.
- [16] Romoser V A, et al., 1997, *J. Biol. Chem.*, **272**: 13270-13274.
- [17] Miyawaki A, et al., 1997, *Nature*, **388**:882-887.
- [18] Nobuhide D, et al., 1999, *FEBS Lett*, **453**:305-307.

HIV 的基因结构与功能及致病机理

王洪军* 王继群 胡玲美

(沈阳军区军事医学研究所 沈阳 110034)

人获得性免疫缺陷病毒(HIV)是造成 AIDS 的主要病原体。根据其基因结构特点、免疫反应和地理分布,将 HIV 分为两大类,即人获得性免疫缺陷病毒 I 型(Human Immunodeficiency Virus Type I),人获得性免疫缺陷病毒 II 型(Human Immunodeficiency

Virus Type II)^[1,2]。HIV-1 和 HIV-2 的同源性仅为 40%,具有一定程度的免疫交叉反应,其基因组结构和蛋白的组成也基本相同^[3]。

* 联系人。E-mail:wanghongjun007@sina.com