

橙色荧光蛋白 ——绿色荧光蛋白 GFP_{Xm} 的改造

罗文新 陈 敏 程 通 管宝全 李少伟 李少菁 张 军 夏宁邵*

(厦门大学细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室 厦门 361005)

摘 要 最近报道了从大型多管水母中分离出新的 *gfp* 基因。经大肠杆菌表达并纯化出的绿色荧光蛋白(GFP_{Xm})具有 476nm 的激发峰和 496nm 的发射峰,但是只能在低温下成熟的缺点限制了它的应用。这里进一步报道 GFP_{Xm} 的 12 种突变型。在大肠杆菌中的表达结果表明,有 7 种突变型在 37℃ 条件下产生高的荧光强度。在 25、32 和 37℃ 条件下表达 6 h, GFP_{Xm16}、GFP_{Xm18} 和 GFP_{Xm19} 的相对荧光强度均高于增强型绿色荧光蛋白(EGFP),而 GFP_{Xm16} 和 GFP_{Xm163} 在 42℃ 高温表达时仍能保持高的荧光强度。这 7 种突变型中的 4 种在哺乳动物细胞中已获得良好表达。此外,有 6 种突变型的荧光光谱红移,目前所达到的最长激发峰为 514nm、最长发射峰为 525nm。另外有 3 种突变型具有包括紫外在内的两个激发峰,1 种突变型只有单一的紫外激发峰。首次报道具有橙色荧光的突变型 OFP_{Xm},它的激发峰为 509nm、发射峰为 523nm。523nm 属于黄绿色,但肉眼看到的蛋白为橙色。OFP_{Xm} 在高温下可得到高水平表达且很好地成熟,但是因为低的量子产率而荧光强度相对较低。

关键词 绿色荧光蛋白,橙色荧光蛋白,突变型,荧光光谱,荧光强度
中图分类号 Q754 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2003)01-0056-08

发光水母的绿色荧光蛋白(GFP)作为良好的细胞、发育、分子生物学的活体标记,用于监测各种体系中的基因表达、蛋白定位以及多种细胞活动,从而革新了细胞生物学、生物技术等多个研究领域。随着生物信息学、定点突变、DNA-shuffling 等一系列理论和技术的运用,荧光蛋白的家族成员不断扩大,出现荧光光谱、量子产率、溶解性、密码子嗜性、温度敏感性等改变的多种变异型。目前已有的具不同光谱的代表性的突变型有 EBFP、ECFP、EGFP、EYFP,分别呈现蓝、青、绿、黄 4 种颜色。迄今所获得突变型的最大发射波长为 529nm,实际上为黄绿色荧光^[1]。具有不同光谱特性的 GFP 突变体的获得进一步拓宽了 GFP 的应用范围,解决了许多单独运用 GFP 不能解决的问题。X-射线晶体学、超速光学显微镜(Ultrafast optical spectroscopy)以及定点突变技术的应用,较好地解析了 GFP 的生物物理特性,但是目前的结果并不表明完全明确了绿色荧光的物理化

学基础,令人惊讶的反向光漂白等现象的发现同时预示着新的用途^[2]。更多的荧光蛋白的发现及其性质研究将使人们更深入地走进多彩的荧光蛋白世界,探索新的光物理化学性质,掌握结构与功能关系的规律,更为随意地改变荧光的颜色,使名符其实的活的色彩得到更广泛的应用。

本课题组已从大型多管水母分离出一种新的绿色荧光蛋白基因,并已在在大肠杆菌中获得高效表达。来自大型多管水母的绿色荧光蛋白 GFP_{Xm} 与来自维多利亚多管水母的野生型 GFP,具有 83.6% 的氨基酸同源性,存在 39 个氨基酸残基的差异,但是大多数差异属于类似氨基酸残基,只有 9 个位点的氨基酸差异完全不具有相似性^[3]。这就导致两种不同来源的 GFP 具有很多相似的荧光性质,也必然有所差异。本论文报道对 GFP_{Xm} 进行的一系列突变研究,试图获得具有新的荧光光谱或理化性质的荧光蛋白。

收稿日期:2002-08-26,修回日期 2002-10-31。

基金项目:“863”计划海洋领域青年基金(No. 819-Q-06)、“863”计划资源环境技术领域青年基金(No. 2001AA628120);国家自然科学基金(No. C01040101)福建省自然科学基金(No. C0010001)。

* 通讯作者。 Tel: 86-5922184110 Fax: 86-5922184110 E-mail: nsxia@xmu.edu.cn 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:大肠杆菌 ER2566 株购自 Promega 公司,质粒 pTO-T7、pTO-T7EGFP、pTGFP_{xm} 由本室构建保存^[4],pEGFP、pEYFP、pEGFPuv、pEBFP 质粒购自 Clontech 公司。

1.1.2 酶及其它生化试剂:限制酶、T4 DNA 连接酶购自美国 Promega 公司,DNA 柱式胶回收试剂盒购于上海华舜生物工程公司,PCR 用 Taq 酶、dNTP 购自上海生工生物工程公司,DNase I 购自大连宝生物工程公司,FITC 购自美国 Promega 公司。PCR 引物合成和 DNA 测序由上海博亚生物技术有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 定点突变:将目的基因克隆至 pTO-T7 载体并以此为载体,采用 PCR 方法对 GFP_{xm} 及其变异型的氨基酸残基进行盒式定点突变。设计并合成 4 条特异性引物,其中两条引物与载体上的 T7 启动子和 T7 终止子一致;另两条引物则位于目标氨基酸残基处,上游引物为兼并引物即在其中引入核苷酸突变,下游引物则与兼并引物的 5' 端完全互补。其中 64 位可替换的氨基酸为 F、L,65 位为 A、G、T、S,66 位为 R、H、Q、C、W、Y,69 位为 L、Q、K,203 位为 Y、C、F、H、R、L、Q、W,在定点突变中将各位点单独或组合使用。定点突变方法参见分子克隆操作指南^[5]。

1.2.2 用 DNA shuffling 方法对 GFP_{xm} 进行突变:将 EGFP、EYFP、GFPuv、EBFP 分别克隆至经 BamH I/Hind III 双酶切的 pTO-T7 载体,然后各质粒与 pTO-T7GFP_{xm}、pTO-T7GFP_{xm}16、pTO-T7GFP_{xm}18、pTO-T7GFP_{xm}19 同量混合后,用 T7F/T7R 引物扩增,得到 8 种基因的 DNA 混合物作为初级文库。DNA shuffling 按 Cramer 等^[6]的方法进行。

1.2.3 GFP_{xm} 突变型的筛选:突变基因库克隆至 pTO-T7 载体,连接物转化 ER2566 菌株,挑单个菌落于装有 3mL LB 液体培养基的试管中,37℃ 摇床培养到 OD₆₀₀ 为 0.8 左右时,以 IPTG 诱导,25℃ 诱导 6 h 以上,用荧光全谱仪(俄罗斯 Lumax 公司)直接测定菌株的荧光光谱。对荧光特征改变的菌株进行测序及核苷酸、氨基酸序列分析。

1.2.4 GFP_{xm} 突变型的表达及纯化、荧光光谱测定及量子产率测定按本室建立的方法进行^[7]。

1.2.5 表达温度和时间对 GFP_{xm} 突变型的表达量和荧光强度的影响:将表达质粒转化 ER2566 菌株,

挑单个菌落于装有 3mL LB 液培的试管中,37℃ 摇床培养到 OD₆₀₀ 为 0.2 ~ 0.3 左右时,以 IPTG 诱导,分别于 25℃、32℃、37℃、42℃ 表达 6 h,并于 37℃ 表达时每隔一小时取出部分样品。将所有样品的 OD₆₀₀ 调至 0.225,用 F-4500 荧光光度计(Hitachi)测定样品的荧光强度(激发和发射狭缝为 5nm),然后菌体总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,用 UViband 进行蛋白含量分析(UVIBAND software for windows, V.99),样品总蛋白以 100 计。样品的相对荧光强度是以样品荧光强度除以蛋白含量所得到的数值。

1.2.6 GFP_{xm} 突变型在哺乳动物细胞中的表达:将 GFP_{xm}16、GFP_{xm}18、GFP_{xm}19、GFP_{xm}163、GFP_{xm}19uv、OF_{xm} 基因片段,分别插入 BamH I/Xho I 双酶切的真核表达载体 pcDNA3.1 中,得到的质粒分别用 lipofect AMINE 转染法转染 CHO、Hela 和 HepG2 细胞,24h 后用 Nikon Diaphot 300 倒置显微镜观察细胞荧光。

1.2.7 DNA 序列分析:DNA 序列分析、蛋白质序列同源性比较用 DNASTAR 软件。

1.2.8 GenBank 登录号:GFP_{xm} AY013824, GFP_{xm}16 AY013825, GFP_{xm}18 AY013826, GFP_{xm}19 AY013827, GFP_{xm}161 AF435427, GFP_{xm}162 AF435428, GFP_{xm}163 AF435429, GFP_{xm}191uv AF435430, GFP_{xm}19uv AF435431, OF_{xm} AF435432, ShG24 AF435433。

2 结果及分析

2.1 GFP_{xm} 突变型的获得

根据已知的 GFP 突变结果^[1],选择 64-66 位、69 位、203 位作为突变氨基酸位点,其替换氨基酸的选择亦根据已知突变结果,又由于兼并引物的引入而增加了其它的氨基酸。经定点突变和 DNA shuffling 突变,共获得 12 种 GFP_{xm} 突变型,它们的荧光特征见表 1,荧光光谱见图 1。将 12 种突变型的表达质粒分别转化 ER2566 菌株,37℃ 诱导 4h 后,表达的蛋白在菌体总蛋白中的含量都在 32% 左右,没有明显差别(图版 I-A)。

2.1.1 高温表达下荧光强度增强的突变型:野生型 GFP_{xm} 在低于室温表达时的折叠缓慢,15℃ 表达 24 h 以上才能看到荧光,在高温条件下表达则几乎看不到荧光。但是多数情况下的应用要求 GFP_{xm} 在 37℃ 能够有高水平的表达并且折叠快速和正确。

对 GFP_{xm} 的 64-66 位氨基酸进行定点突变,从约 5700 个单菌落中筛选出了 2 株 GFP_{xm} 突变型

——GFP_{xm18}、GFP_{xm19} 在 37°C 高温表达产生明亮的绿色荧光。氨基酸序列分析表明 ,GFP_{xm18} 发生了 F64L、S65A 突变 ,而 GFP_{xm19} 发生了 F64L、Q69L 突变 ,估计第 69 位氨基酸的突变是由 PCR 错配引起。两组氨基酸的替换只引起了激发和发射峰的微小移动。

2.1.2 具有紫外激发峰的突变型 :突变型 GFP_{xm191uv}、GFP_{xm19uv}、GFP_{xm181uv} 具有包括紫外在内的 2 个激发峰。GFP_{xm191uv} 在 498nm 有一个激发主峰 ,是 394nm 激发肩峰的 3 倍高。GFP_{xm19uv}

的激发主峰为 393nm ,次峰为 476nm ,主峰的高度为次峰的 2 倍。GFP_{xm19uv} 的荧光光谱与维多利亚 GFP 的一种突变型 Cycle 3 相似^[6]。GFP_{xm181uv} 的荧光光谱与 GFP_{xm19uv} 相似 ,但荧光强度相对较弱。

当 GFP_{xm18} 发生 T203H 突变时获得 GFP_{xm18uv} ,它具有单一的紫外激发峰 ,激发波长为 400nm ,发射波长为 513nm。其荧光光谱类似于维多利亚多管水母 GFP 的突变型之一 - H9 ,它的激发峰为 399nm ,发射峰为 511nm^[8]。

表 1 GFP_{xm} 及其突变型的荧光特征

Table 1 Fluorescent characteristics of GFP_{xm} and its mutants

Mutation	Common name	λ_{exc}/nm	λ_{em}/nm	Quantum yield	Relative fluorescence intensities *
Mixture of neutral phenol and anionic phenolate					
F64L	GFP _{xm19uv}	393 (476)	505		100
F64L Q69L T203C	GFP _{xm191uv}	498 (394)	510		23
F64L S65A T203H	GFP _{xm181uv}	398 (500)	514		4.7
F220L					
Phenolate anion					
Without	GFP _{xm}	476	496	1	-
F64L S65A	GFP _{xm18}	472	502	0.96	100
F64L Q69L	GFP _{xm19}	475	502	0.7	72
F64L S65G	GFP _{xm16}	485	506	0.74	75
I11V V14I I16V	ShG24	486	506		60
F64L S65G Q69L					
F64L S65G T203L	GFP _{xm161}	500	510		-
Neutral phenol					
F64L S65A T203H	GFP _{xm18uv}	400	513		
Phenolate anion with stacked π -electron system					
F64L S65G T203F	GFP _{xm162}	514	525		11
F64L S65G T203Y	GFP _{xm163}	512	523	1	100
I11V V14I I16V	OF _{xm}	509	523	0.25	3.5
F64L S65G Q69L					
T203Y					

* Expression results at 37°C. They have been arbitrarily normalized to 100 for the brightest member of each class and cannot be used to compare different classes. The fluorescent intensity measurements of the first class were under the condition of uv excitement. " - " show extremely low. The other parameters were not detected.

2.1.3 激发和发射光谱红移的突变型 :经突变获得 6 种激发和发射光谱红移的突变型。突变型 GFP_{xm16} 中两个氨基酸的替换使激发峰移至 485nm ,发射峰移至 506nm。由 DNA shuffling 突变获得的具有 6

个氨基酸突变位点的突变型 ShG24 ,其激发和发射光谱的形状及最大值都与 GFP_{xm16} 极为相似。这两种突变株在高温下都能有效而快速地成熟并且产生很高的荧光强度。根据亮度和荧光光谱 ,这两种

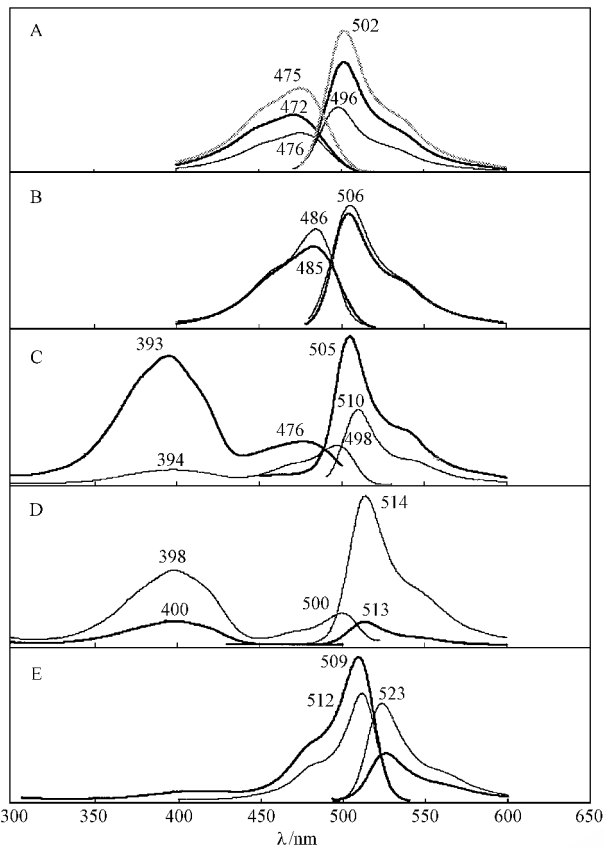


图 1 GFP_{xm} 突变型的荧光光谱

Fig.1 Excitation-emission spectra for GFP_{xm} mutants

A. Spectra of wild-type GFP_{xm} (thin lines) and GFP_{xm}18 (medium thick lines) and GFP_{xm}19 (grey thick lines); B. Spectra of GFP_{xm}16 (solid thick lines) and ShG24 (thin lines); C. Spectra of GFP_{xm}19uv (solid thick lines) and GFP_{xm}191uv (thin lines); D. Spectra of GFP_{xm}18uv (solid thick lines) and GFP_{xm}181uv (thin lines); E. Spectra of OFP_{xm} (solid thick lines) and GFP_{xm}163 (thin lines)

突变株与维多利亚多管水母 GFP 的一种突变型 EGFP 相似^[9]。当 GFP_{xm}16 的第 203 位氨基酸由 T 突变成 F 时,得到了目前所达到最长的发射峰 525nm。这个突变株称为 GFP_{xm}162,其荧光强度比较低。

在 GFP_{xm}16 的第 203 位氨基酸处进行的 T203Y 突变,得到突变株 GFP_{xm}163,其激发和发射峰为 512nm 和 523nm。GFP_{xm}163 的荧光强度和颜色与维多利亚多管水母 GFP 的一种突变型 EYFP 相似^[7]。

2.1.4 具橙色荧光的突变型:在 ShG24 的第 203 位氨基酸处进行的 T203Y 突变,得到突变株 OFP_{xm} (Orange Fluorescent Protein) 其荧光光谱与 GFP_{xm}163 极为相似。然而有趣的是二者产生的荧光绝然不同,GFP_{xm}163 产生黄绿色荧光,OFP_{xm} 产生的是橙色荧光(图版 I-B)。虽然 523nm 仍然属于绿色,但是在长波长处的尾峰使荧光呈现出黄色。OFP_{xm} 同样

具有 523nm 的发射峰和长波长处的尾峰,但是它的荧光是橙色,全无绿色的痕迹,所以称之为橙色荧光蛋白(OFP_{xm})。

2.2 表达温度和时间对 GFP_{xm} 突变型荧光强度的影响

2.2.1 表达温度对 GFP_{xm} 突变型荧光强度的影响:在细胞生物学应用过程中,各种 GFP_{xm} 突变型在高温下的正确折叠非常重要。5 种 GFP_{xm} 突变型在不同温度下表达 6 h 后的相对荧光强度如图版 I-B 所示,其中以 EGFP 和 EYFP 作为阳性对照。所有类型 GFP 的相对荧光强度随温度的升高而下降。在 25、32 和 37℃ 条件下,GFP_{xm}16、GFP_{xm}18 和 GFP_{xm}19 的相对荧光强度高于 EGFP,其中 37℃ 条件下 GFP_{xm}18 的相对荧光强度最高,是 EGFP 的 1.5 倍。当温度上升至 42℃ 时,GFP_{xm}16 的相对荧光强度最强,是 EGFP 的 2.3 倍。随着表达温度的上升,OFP_{xm} 的相对荧光强度下降并不显著,但是相对来说比较低(图版 I-C-a)。在任何温度下,GFP_{xm}163 的相对荧光强度是所有 GFP_{xm} 突变型中最强的,但是仍稍低于 EYFP(图版 I-C-b)。

2.2.2 表达时间对 GFP_{xm} 突变型荧光强度的影响:转化了 GFP_{xm} 突变型质粒的 ER2566 菌株在 37℃ 培养至光密度为 0.2 ~ 0.3 时,用 IPTG 诱导。37℃ 诱导 0.5h 后,GFP_{xm}16、GFP_{xm}18 和 GFP_{xm}19 都显示高的荧光强度(图 2-A),其中表达 GFP_{xm}18 的菌株可以用肉眼看到强的绿色荧光。GFP_{xm}18 的荧光强度是 EGFP 的 1.6 倍,而 GFP_{xm}16 与 EGFP 相当,GFP_{xm}19 的荧光相对低一些。蛋白含量分析结果显示,这些样品中表达的蛋白在菌体总蛋白中的含量都在 26% ~ 28% 之间,没有显著差别。图 2-A 中所有曲线的形状都类似,说明这些 GFP 的表达水平及折叠速度相近。GFP_{xm}163 的荧光强度随着诱导时间的延长而迅速升高,速度与 EYFP 相似,但稍低于 EYFP 的荧光强度(图 2-B)。因为荧光强度较低,在诱导 4 h 后才能看到 OFP_{xm} 的橙色荧光。在 37℃ 条件下诱导,所有 GFP_{xm} 突变型的荧光强度在 6 ~ 7h 后达到最高值。

2.3 GFP_{xm} 突变型在哺乳动物细胞中的表达

将 6 种 GFP_{xm} 突变型基因克隆至真核表达载体 pcDNA3.1 中,得到的真核表达质粒分别转染 CHO、Hela 和 HepG2 细胞。24 h 后检测荧光,发现突变型 GFP_{xm}16、GFP_{xm}18、GFP_{xm}19 和 GFP_{xm}163 在这 3 种哺乳动物细胞中获得良好的表达,与 EGFP 的表达情况相似,而 GFP_{xm}19uv 的表达不理想。

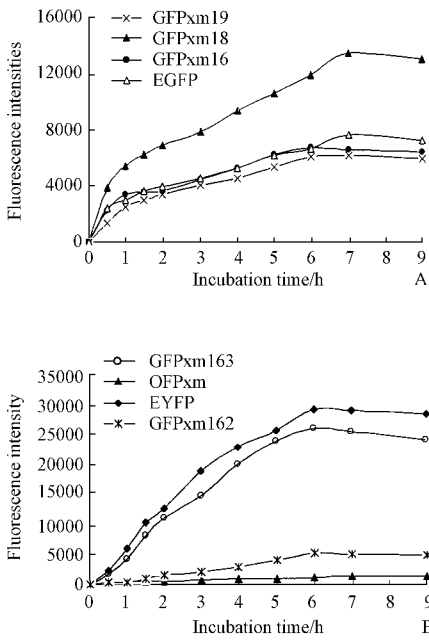


图2 GFPxm 突变型的荧光强度随诱导时间的变化

Fig.2 Change of fluorescence intensities of GFPxm mutants with induction time

OFPxm的检测需绿光激发,因为整个视野都呈现红色而难以区分(表2)。

表2 GFPxm 突变型在哺乳动物细胞中的表达

Table 2 Expression of GFPxm mutants in mammalian cells

GFPxm mutants	Mammalian cells		
	CHO	Hela	HepG2
GFPxm16	+++	+++	++
GFPxm18	+++	+++	++
GFPxm19	+++	+++	++
GFPxm163	+++	+++	++
GFPxm19uv	++	++	+
OFPxm	-	-	-

3 讨论

本研究运用定点突变和 DNA shuffling 的方法,获得了 12 种 GFPxm 突变型,其中 7 种突变型在 37℃ 条件下产生高的荧光强度,而 GFPxm16 和 GFPxm163 在 42℃ 高温表达时仍能保持高的荧光强度。此外,有 6 种突变型的荧光光谱红移,有 3 种突变型具有包括紫外在内的两个激发峰,1 种突变型只有单一的紫外激发峰。首次报道具有橙色荧光的突变型 OFPxm。

3.1 突变氨基酸与光谱移动

根据发色团的组成差异,Tsien 将已知的 GFP 变异型分成 7 个类型^[1],而 GFPxm 的 12 种突变型可归属于 7 类中的 4 类。

野生型 GFPxm 具有 476nm 的单一激发峰,属于酚盐阴离子类型,而野生型 GFP 有 2 个激发峰,属于中性酚和阴离子酚盐的混合物类型。虽然二者存在 39 个氨基酸的差异,但是其中只有 2 个氨基酸位于发色团附近,GFPxm 中的氨基酸为 I68/A72,而野生型 GFP 的相应氨基酸为 V68/S72。推测是因为这两个氨基酸的不同引起光谱的差异。在 GFPxm 中的 I68 和 A72 使 66 位的 Tyr 处在唯一的酚盐阴离子形式。

GFPxm19uv、GFPxm191uv 和 GFPxm181uv 的发色团同时存在中性酚和阴离子酚盐两种形式。而突变型 GFPxm18uv 就只有单一的紫外激发峰,因此发色团只存在中性酚形式。维多利亚多管水母 GFP 的突变过程中发现,第 203 位的 Thr 被 Ile 代替的时候,极大地抑制了野生型 GFP 的 475nm 激发峰,而只留下 399nm 的短波长激发峰^[10]。在 GFPxm18uv 中,引起激发峰向紫外移动的突变是 T203H,不同于维多利亚多管水母的 T203I 突变。

突变型 GFPxm162、GFPxm163、OFPxm 的发色团都属于含有 π 电子堆积的酚盐阴离子,其 Ser65 由 Gly 取代以增强生色团的离子化,T203 突变为芳香残基 F、Y,芳香环在酚盐阴离子后面堆积,二者的 π - π 电子相互作用可减少激发能,使激发波长和发射波长都加长。这一结果进一步证实了 Ormo 等^[11]基于维多利亚多管水母 GFP 晶体结构的推论。

GFPxm163 与 OFPxm 的颜色差异让人感到迷惑。它们仅存在 4 个氨基酸的差异,其中的 3 个氨基酸残基位于 N 端的第一个 β 折叠内,属于同类氨基酸变异。从野生型 GFP 的突变结果来看,未发现由于 N 端的氨基酸残基改变而引起的突变,因此位于 N 端的这 3 个氨基酸差异不是问题的关键。另一个不同的氨基酸在发色团附近,GFPxm163 中的 69 位为 Q,是极性氨基酸,而即 OFPxm 中的 69 位为 L,是疏水氨基酸。推测 69 位氨基酸的差异加上相同的 T203Y 突变,导致两个发色团的微环境的差异,产生不同的颜色。如何解释光谱近似而色彩明显不同,需要在蛋白晶体结构、光物理化学等方面进行深入研究以找出可能解答。

3.2 荧光形成的温度敏感性与速度

作为活体标记,GFP 应具有在高温下正确折叠成熟的能力。除了 GFPxm161、GFPxm162、GFPxm

181uv、GFP_{xm18uv} 和 OFP_{xm}, GFP_{xm} 的其余突变型在 37℃ 表达都能达到高的荧光强度, 而 GFP_{xm163} 和 GFP_{xm16} 甚至在 42℃ 表达也能保持高的荧光强度。与野生型相比, 这些突变型的量子产率和表达水平并没有提高。但在 37℃ 条件下表达出的野生型 GFP_{xm} 聚集成包含体的形式, 而表达出的 GFP_{xm} 突变型主要以可溶性形式存在。因此推测, 高温表达影响野生型 GFP_{xm} 翻译后的成熟过程, 与 GFP 的特征一致^[12]。发色团的形成过程由 3 个有序的步骤组成: 蛋白折叠成具催化能力的构像形式, 65-67 位三个氨基酸的环化, 环化的发色团的氧化^[10, 13-14]。Siemering 等已证明 GFP 发色团的氧化无温度敏感性, 因此前面两步可能引起 GFP 成熟过程中的温度敏感性。在高温下, 野生型 GFP_{xm} 不能正确折叠, GFP_{xm} 突变型则能折叠成催化活性构像形式或者提高了发色团的环化率。多数的 GFP_{xm} 突变型都存在大体积的氨基酸残基被小体积残基代替, 如 F64L、S65A、S65G 和 Q69L。在 GFP 突变型中也有相同的情况, 这种替换可促进 GFP 在高温下折叠的能力^[9]。

对于细胞生物学和发育生物学应用而言, 能够影响荧光形成的速度而不是最终强度的 GFP 突变型是很有价值的。本研究中, 37℃ 诱导 30min 后就能看到 GFP_{xm18} 的荧光, 但其突变是否提高了荧光形成的速度仍然未知。

总之, 多数 GFP_{xm} 突变型的特征与 GFP 突变型相似, 也进一步证实了来自大型多管水母的 GFP_{xm} 与维多利亚多管水母的 GFP 在生化、结构和功能等多个方面非常相似。但是具有完全不同颜色的橙色荧光蛋白突变型的获得证明了 GFP_{xm} 和 GFP 之间的差异。

根据对维多利亚多管水母 GFP 的基因突变结果, 有 10 多个突变位点可以增强荧光强度、降低温度敏感性^[15-18]。其中一些突变在 GFP_{xm} 中已经存在, 而 Y66H、Y66W、F99S、S147P、M153T、V163A、S208L、T203I 等位点在 GFP_{xm} 突变中的单独或组合使用, 很有可能获得更好、更新的突变型。

REFERENCES (参考文献)

[1] Tsien R Y. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem*, 1998, **67**: 509 - 544

[2] Prendergast F G. Biophysics of the green fluorescent protein. *Meth-*

ods Cell Biol, 1999, **58**: 1 - 18

- [3] XIA N S, LUO W X, ZHANG J *et al.* Bioluminescence of *Aequorea macrodactyla*, a Common Jellyfish Species in the East China Sea. *Marine Biotechnology*, 2002, **4**(2): 155 - 162
- [4] LUO W X (罗文新), ZHANG J (张军), XIA N S (夏宁邵) *et al.* Construction and application of an *Escherichia coli* high effective expression vector with an enhancer. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2000, **16**(5): 578 - 581
- [5] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [6] Cramer A, Whitehorn E A, Tate E, Stemmer W P C. Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. *Nature Biotechnology*, 1996, **14**: 315 - 319
- [7] LUO W X (罗文新), ZHANG J (张军), XIA N S (夏宁邵) *et al.* Green fluorescent protein of the jellyfish *Aequorea macrodactyla*. *Acta Oceanologica Sinica* (海洋学报), 2002, **24**(4): 82 - 91
- [8] Cubitt A B, Woollenweber L A, Heim R. Understanding structure-function relationships in the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Methods Cell Biol*, 1999, **58**: 19 - 30
- [9] Patterson G H, Knobel S M, Sharif W D *et al.* Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy. *Biophys J*, 1997, **73**: 2782 - 2790
- [10] Heim R, Prasher D C, Tsien R Y. Wavelength mutations and post-translational autooxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**: 12501 - 12504
- [11] Ormo M, Cubitt A B, Kallio K *et al.* Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science*, 1996, **273**: 1392 - 1395
- [12] Siemering K R, Golbik R, Sever R *et al.* Mutations that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein. *Current Biology*, 1996, **6**: 1653 - 1663
- [13] Cubitt A B, Heim R, Adams S R *et al.* Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem Sci*, 1995, **20**: 448 - 455
- [14] Reid B G, Flynn G C. Chromophore formation in green fluorescent protein. *Biochemistry*, 1997, **36**: 6786 - 6791
- [15] Ito Y, Suzuki M, Husimi Y. A novel mutant of green fluorescent protein with enhanced sensitivity for microanalysis at 488 nm excitation. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, **264**(2): 556 - 560
- [16] Kimata Y, Iwaki M, Lim C R *et al.* A novel mutation which enhances the fluorescence of green fluorescent protein at high temperatures. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, **233**(1): 69 - 73
- [17] Yang T T, Sinai P, Green G *et al.* Improved fluorescence and dual color detection with enhanced blue and green variants of the green fluorescent protein. *J Biol Chem*, 1998, **273**(14): 8212 - 8216
- [18] Stauber R H, Horie K, Carney P *et al.* Development and applications of enhanced green fluorescent protein mutants. *Biotechniques*, 1998, **24**(3): 462 - 466, 468 - 471

Orange Fluorescent Protein ——Modification of green fluorescent protein GFPxm

LUO Wen-Xin CHEN Min CHENG Tong GUAN Bao-Quan LI Shao-Wei
LI Shao-Jing ZHANG Jun XIA Ning-Shao*

(Ministry of Education , Cell Biology and Tumor Cell Engineering Laboratory , Xiamen University , Xiamen 361005 , China)

Abstract Recently , we have reported a new *gfp* gene isolated from *Aequorea macrodactyla* . The protein purified from expressed *E. coli* exhibited an excitation peak at 476 nm and an emission peak at 496 nm . However , the drawback of only maturing to fluorescence at low temperature limited its applications . In this paper , we further describe twelve mutants of GFPxm . Seven mutants produced enhanced fluorescence when expressed in *E. coli* at higher temperature (37 °C) . After six hours of induction at 25 °C , 32 °C and 37 °C respectively , the relative fluorescent intensities of GFPxm16 , GFPxm18 and GFPxm19 were higher than that of EGFP , moreover GFPxm16 and GFPxm163 could preserve high fluorescent intensity even expressed at 42 °C . Four mutants of the seven could reach high expression level in three kind of mammalian cells . Another 6 mutants had red-shift of excitation-emission maxima , and longest excitation-emission maxima were 514nm and 525nm . Another three mutants had two excitation peaks , and one mutant had only one UV-excitation peak . The most exciting result is the mutant of OFPxm with orange color . The mutant has an excitation peak at 509 nm and an emission peak at 523 nm . 523nm is yellowish green but the protein is orange observed by eyes . The mutant could reach high expression level and matured at higher temperature but the fluorescent intensity was comparatively low because of low quantum yield .

Key words green fluorescent protein , orange fluorescent protein , mutant , fluorescent spectrum , fluorescent intensity

Received : 08-26-2002

This work was supported in parts by High Technology and Development Programme of China (" 863 " Programme , No. 819-Q-06 , NO. 2001AA628120) ; National Natural Science Foundation of China (No. C01040101) ; Natural Science Foundation of Fujian , China (No. C0010001)

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

* Corresponding author . Tel : 86-5922184110 ; Fax : 86-5922184110 ; E-mail : nsxia@jngxian.xmu.edu.cn