

荧光素酶研究进展*

张菊梅 吴清平 周小燕 郭伟鹏 吴慧清 王元平

(广东省微生物研究所 广州 510070)

摘要: 荧光素酶 (Luciferase) 可以分为萤火虫荧光素酶和细菌荧光素酶两大类。萤火虫荧光素酶是分子量为 60~64kD 的多肽链, 在 Mg^{2+} 、ATP、 O_2 存在时, 催化 D-荧光素 (D-Luciferin) 氧化脱羧, 发出光 ($\lambda = 550 \sim 580nm$)。细菌荧光素酶是含 α 、 β 两个多肽亚基的加单氧酶, 它催化长链脂肪醛、 $FMNH_2$ 和 O_2 的氧化反应, 发出绿蓝光 ($\lambda = 490nm$)。萤火虫荧光素酶和细菌荧光素酶可分别从萤火虫和发光细菌中直接提纯, 亦可用基因工程的方法进行生产。荧光素酶催化的发光反应能用生物发光检测仪进行灵敏、快速检测, 因此该酶有多方面的用途, 如应用于快速检测、报告基因分析、有毒有害物质分析等。

关键词: 萤火虫荧光素酶, 细菌荧光素酶, 生物发光

中图分类号: Q554 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2001) 05-0098-04

荧光素酶 (Luciferase) 是生物体内催化荧光素或脂肪醛氧化发光的一类酶的总称。自然界有许多发光生物, 1956年, McElroy 等首次从萤火虫中提取到荧光素酶, 此后各国研究人员相继报道了对各种发光生物中荧光素酶的研究。由于荧光素酶检测简便、灵敏、快速, 因此目前荧光素酶基因在基因工程方面已成为广泛使用的报告基因, 同时荧光素酶在发光免疫分析及环境监测、微生物检测等方面的应用正愈来愈受到关注。

1 荧光素酶的种类

自然界中具有发光能力的生物种类很多, 常见的主要有: 发光蘑菇 (Luminous mushrooms)、发光蚯蚓 (Luminous earthworms)、发光细菌 (Luminous bacteria)、发光水母 (Luminous jellyfish)、发光甲虫 (Luminous beetles, 它们主要由萤火虫 (fireflies), 叩头虫 (click beetles) 和欧洲萤 (glow worms) 3 大种类组成)。目前, 除发光蘑菇和发光蚯蚓的发光机理尚不清楚外, 其余生物的发光机理已研究得较为透彻, 并使细菌荧光素酶 (Bacterial Luciferase 简称 BL) 和萤火虫荧光素酶 (Firefly Luciferase 简称 FL) 形成商品酶用于分析检测。

北美萤火虫 (*Photinus pyralis*)^[1], 日本萤火虫 (*Luciola cruciata*)^[2] 及东欧萤火虫 (*L. mingrelica*) 可产生 FL。夏威夷弧菌 (*Vibrio harveyi*)、费氏弧菌 (*V. fischeri*)、明亮发光杆菌 (*Photobacterium phosphoreum*) 及鳃发光杆菌 (*P. leiognathi*) 等海洋发光细菌^[3] 和发光致病杆菌 (*Xenorhabdus luminescens*)、羽田希瓦氏菌 (*Alteromonas hanedai*) 等陆生发光细菌^[4] 可产生 BL。

2 荧光素酶的性质和结构

2.1 萤火虫荧光素酶的性质和结构 FL 在 Mg^{2+} 、ATP、 O_2 存在时, 催化 D-荧光素 (D-Luciferin) 氧化脱羧, 同时发出可见光, 不同种之间发射波长略有不同 (550~580nm),

* 广东省自然科学基金资助项目 (No. 980881)

收稿日期: 2000-08-20, 修回日期: 2000-12-20

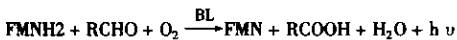
其反应式为:



FL的分子量约60-64kD,从日本萤火虫(*L. cruciata*)中提取的FL含548个氨基酸,分子量约61kD^[2];北美萤火虫(*P. pyralis*)的FL则含550个氨基酸,分子量约62kD^[1];东欧萤火虫(*L. mingrelica*)的FL与日本萤火虫FL相似。日本萤火虫FL与北美萤火虫FL氨基酸序列67%同源^[2]。有研究表明,FL的N端16个氨基酸与催化活性密切相关^[1]。

FL是蛋白质和脂类复合物(磷脂和中性脂质与FL结合),在去氧胆酸钠中能使酶活性迅速减弱, Mg^{2+} 与FL结合能提高酶的活性;磷酸脂是特定的酶激活剂,能稳定FL,不致失活,而长链胆碱衍生物($\text{C}_{12} \sim \text{C}_{18}$)能使FL快速、不可逆地失活;牛血清白蛋白、氨基乙醇、CoA能显著提高FL的活性,并促进光的产生^[5]。随着反应体系pH的降低,产生的光波长增加;如果各种反应底物成过量状态,则发射光强度与反应体系中FL的量成正比。

2.2 细菌荧光素酶的性质和结构 BL催化长链脂肪醛、 FMNH_2 和 O_2 的氧化反应,发出绿蓝光($\lambda = 490\text{nm}$),反应式可表示如下:



BL是杂二聚体,含 α 、 β 两个多肽亚基的加单氧酶。单独 α 、 β 亚基均无发光活性,只有 α 、 β 共存时才有活性。从不同海洋细菌中提取到的BL其分子量基本相同,其中 α -亚基含354个氨基酸,分子量约40kD, β -亚基含325个氨基酸,分子量约37kD。从陆生细菌中分离到的BL的 α -亚基含360个氨基酸,分子量约41kD, β -亚基含327个氨基酸,分子量约38kD,其中陆生细菌的 α -亚基和 β -亚基氨基酸序列分别有85%和60%与海洋细菌同源^[3,4]。有研究表明,BL与黄素(Flavin)结合点在 α -亚基;通过基因重组及定位点诱变发现 α -亚基控制酶的催化能力和结构特点,亦是评判酶的热稳定性的关键因素; α -113位对酶与黄素的相互作用密切相关, α -227位在调整酶与底物醛的作用中处于中心位置^[3]。

和其它酶一样,BL活性受许多因素的影响: O_2 和离子浓度均能影响发光, H_2O_2 、乙醛及长链烷基化合物在反应中刺激发光。从发光致病杆菌(*X. luminescens*)中提取的BL发现,酶与FMN和豆蔻酸(十四烷酸)形成三元络合物,三元络合物的慢分解限制了酶的转换,脂肪酸能促进酶与FMN的相互作用^[6]。研究热稳定性发现,BL的热稳定性与其所表达的有机体有关,但与有机体细胞的抗热性无关,木糖醇、甘油加入培养基中保护酶的活性^[7]。N-乙基顺丁烯二酰亚胺对BL失活的影响与pH有关,随缓冲溶液浓度的增大,失活率升高。

3 荧光素酶的制备

作为FL生产原料的萤火虫,要依靠人工捕捉或养殖,受地域和季节性限制,且该生物生产周期长、养殖成本高、提取的酶成分复杂,随着分子生物学的发展,人们转向用基因工程的方法进行生产。1985年,de Wet, J. R.等首次克隆了*P. Pyralis*的FL基因,并在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中表达,从中得到具有活性的FL^[8]。1986年,他们测定了FL基因的cDNA序列。随后,各种发光甲虫的FL基因相继克隆成功,

并能在原核和真核表达系统中表达。取自 *P. Pyralis* 长约 1.8kb 的 cDNA 基因在 *E. coli* 表达的产物是分子量为 62kD, 含 550 个氨基酸的多肽链, 与自然提取得到的 FL 相比, 具有同样的反应动力学特性和发射波长, 在相同的反应条件下酶的稳定性亦无差异^[8]。萤火虫荧光素酶基因通过克隆在 *E. coli* 表达, 转化体在 37℃、LB 培养基中生长到对数后期收集菌体, 用渗透压法、冻融法提取细菌胞质组分, 经均质、离心, 用凝胶排阻、离子交换色谱提取纯酶, 冷冻干燥保存^[9]。

BL 可从培养发光细菌直接提取得到, 其制备方法与 FL 类似。从 *V. harveyi* 中提取的酶活可达 1.8×10^{11} LU/mg, 为获得特殊用途的 BL, 亦可通过诱变或基因克隆得到。各种发光细菌的基因克隆均有许多报道^[10]。

4 荧光素酶的测定

荧光素酶的测定可以采用多种不同的体系, 常用的 FL 酶活测定系统为: 10 μ L 酶溶液, 400 μ L 25mmol/L glycylglytine (pH7.8), 5.4mmol/L MgSO₄, 0.086mmol/L D-Luciferin, 反应以加入 80 μ L 10mmol/L ATP 开始, 用液闪仪或生物发光测定仪 (Luminometer) 测定发光强度^[11], 测定温度为 25℃。

常用的 BL 测定系统包括: 10 μ L 酶溶液, 180 μ L 50mmol/L 磷酸缓冲液 (pH7.0), 10 μ L 十四醛饱和液 (以缓冲液溶解), 测定温度为 25℃, 反应从加入 100 μ L 25mmol/L FMNH₂ 开始, 用生物发光测定仪测定光的强度^[10]。

在反应体系中, 生物发光随反应时间的延长其发光不断减弱, 开始的 1min 内, 发光脉冲计数值下降最快, 以后随时间下降速度不断减缓, 因此, 反应体系混合后应尽快测定, 才能取得较准确的发光脉冲计数值。

5 荧光素酶的应用

5.1 快速检测

ATP 既是 FL 催化发光的必需底物, 又是所有生物生命活动的能量来源, 传统的测定方法操作复杂, 灵敏度低, 缺乏足够的专一性。在 FL 催化的发光反应中, ATP 在一定的浓度范围内, 其浓度与发光强度呈线性关系, 因此, 测定 ATP 具有快速灵敏的特点, 自 1947 年 McElroy 等首次应用 FL 测定 ATP 以来, 荧光素酶在生物化学及生物技术的分析应用不断发展, 其检测和研究范围包括: 临床医学及法医学检测; 生命科学研究; 环境监测和制备广谱酶联免疫检测试剂。

利用 BL 催化的发光特性可用来检测特异性细菌如大肠杆菌、李斯特菌等, 其原理是带有 BL 基因 *Lux* 的噬菌体攻击特异性细菌, 将 *Lux* 带入宿主细胞, 荧光发射只出现在被噬菌体感染的细胞, 并与之数量相对应, 利用这种方法检测污染食品中的李斯特菌可从传统的分离、培养、鉴定至少 96h 缩短至 24h, 甚至将检测限降至 1 cell/g, 该方法简单、快速、灵敏, 容易掌握^[12]。

5.2 报告基因分析

早在 1988 年就有报道在分子生物学中应用荧光素酶基因作报告基因^[13]。通过测定荧光素酶基因的表达, 监测各种启动子 (promoter) 的活性; 利用荧光素酶基因与特定目的基因的连锁或共转移, 可以建立非放射性的外源基因检测体系。目前, 这一技术在全世界得到了广泛应用, 现代检测仪器甚至可以检测到 10^{-19} mol 的酶量, 比检测氯霉素乙酰转移酶 (CAT) 灵敏 100~1000 倍。由于荧光素酶酶活检测比 CAT 检测快速、方便、灵敏、经济, 而且可以进行活细胞直接检测, 因此在分子生物

学研究中可用荧光素酶表达检测代替 CAT 检测。

5.3 有毒有害物质分析 1994年,Zomer等报道了应用荧光素酶催化的生物发光现象进行水、土壤、食品等样品中有机磷和氨基甲酸酯等杀虫剂的灵敏检测^[14]。其原理是昆虫脑提取物中有杀虫剂攻击的受体或酶结合位点,将生物发光的底物——D-Luciferin 衍生物渗透至昆虫脑提取物中,昆虫脑提取物能将 D-Luciferin 衍生物水解为 D-Luciferin,添加 ATP 和 FL,即可发生生物发光,而杀虫剂能抑制这种水解活性,通过检测发光强度,即可计算杀虫剂的浓度,灵敏度可达 50 $\mu\text{g/L}$ 。

人们对生物发光的研究由来已久,通过基因重组及细胞融合技术,获得能满足各种用途的酶,如定位点诱变提高其耐热性,改变发射光波长等。由于荧光素酶来源有限,价格昂贵,同时在溶液中是不稳定的,使它的应用受到很大限制,为了降低分析测试成本,扩大其应用范围,实现测定的自动化、连续化,Deluca's等在1976年首次成功的用化学方法固定化 FL 和 BL,以后相继有多人采用了多种固定化方法,最近 Lundovskikh, I. A. 等应用 BrCN 活化的 Sepharose 固定化重组的 FL,使检测更稳定,ATP 检测范围为 0.01 ~ 10,000nmol/L 水平^[15]。随着固定化膜技术及生物传感器的发展,荧光素酶的应用范围将更宽广。

参 考 文 献

- [1] 陆建荣, 杨建, 金振华. 生物化学与生物物理进展, 1994, 21 (1): 70 ~ 71.
- [2] Masuda T, Tatsumi H, Nakano E. Gene, 1989, 77 (2): 265 ~ 270.
- [3] Sandalova T, Lindgist Y. Proteins Struct Funct Genet, 1995, 23 (2): 241 ~ 255.
- [4] Szittner R, Meighen E. J Biol Chem, 1990, 265 (27): 16581 ~ 16587.
- [5] Wood K V. PCT Int Appl WO 92 04, 68, 1992.
- [6] Li Z, Meighen E A. J Biol Chem, 1994, 269 (9): 6640 ~ 6644.
- [7] Mackey B M, Cross D, Park S F. J Appl Bacteriol, 1994, 77 (2): 149 ~ 154.
- [8] DeWet J R, Wood K V, Helinski D R, et al. Proc Natl Acad Sci, USA 1985, 82: 7870 ~ 7873.
- [9] Kajiyama N, Masuda T, Tatsumi H, et al. Eur Pat Appl EP0318915A₂, 1989.
- [10] Sabu K. J Biochem (Tokyo), 1994, 115 (4): 670 ~ 674.
- [11] Kajiyama N, Nakano E. Biochemistry, 1993, 32 (50): 13795 ~ 13799.
- [12] Loesner M J, Rees C E, Stewart G S, et al. Appl Environ Microbiol, 1996, 62 (4): 1133 ~ 1140.
- [13] Subramani S, Deluca M. In J K Setlow (ed.). Genetic engineering: Principles and Methods, Vol. 10. Plenum Press, New York, 1988, 75 ~ 89.
- [14] Zomer E, Saul S, Charm S E. U. S. US 5 283 180, 1994.
- [15] Lundovskikh I A, Dementieva E I, Ugarova N N. Biochemistry © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>