

对该技术的引进和追踪, 这对我国生命科学的发展是十分必要的.

参 考 文 献

- 1 Sauer B. Inducible gene targeting in mice using the Cre/Lox system. *Methods*, 1998, **14** (4): 381~ 392
- 2 Guo F, Gopaul D N, Duyne G D. Structure of Cre recombinase complexed with DNA in a site-specific recombination synapse. *Nature*, 1997, **389** (6646): 40~ 46
- 3 Lakso M, Sauer B, Mosinger B, *et al.* Targeted oncogene activation by site specific recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89** (14): 6232~ 6236
- 4 Wakita T, Taya C, Katsume A, *et al.* Efficient conditional transgene expression in hepatitis C virus cDNA transgenic mice mediated by the Cre/loxP system. *J Biol Chem*, 1998, **273** (15): 9001~ 9006
- 5 Gu H, Marth J D, Orban P C, *et al.* Deletion of DNA polymerase β gene segment in T cell using cell type specific gene targeting. *Science*, 1994, **265** (5168): 103~ 106
- 6 Kellendonk C, Troche F, Casanova E, *et al.* Inducible site-specific recombination in the brain. *J Mol Biol*, 1999, **285** (1): 175~ 182
- 7 Wagner K U, Wall R J, St Onge L, *et al.* Cre-mediated gene deletion in the mammary gland. *Nucleic Acids Res*, 1997, **25** (21): 4323~ 4330
- 8 Shibata H, Toyama K, Shioya H, *et al.* Rapid colorectal adenoma formation initiated by conditional targeting of the Apc gene. *Science*, 1997, **278** (5335): 120~ 123
- 9 Lobe C G, Koop K E, Kreppner W, *et al.* Z/AP, a double reporter for cre-mediated recombination. *Dev Biol*, 1999, **208** (2): 281~ 292
- 10 Stange L, Urth P A, Gruss P. Temporal control of the Cre recombinase in transgenic mice by a tetracycline responsive promoter. *Nucleic Acids Res*, 1996, **24** (19): 3875~ 3877
- 11 Saez E, No D, West A, *et al.* Inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Curr Opin Biotech*, 1997, **8** (3): 608~ 616
- 12 Brocard J, Warot X, Wendling O, *et al.* Spatio-temporally controlled site-specific somatic mutagenesis in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94** (26): 14559~ 14563
- 13 Schwenk F, Kuhn R, Angrand P O, *et al.* Temporally and spatially regulated somatic mutagenesis in mice. *Nucleic Acids Res*, 1998, **26** (6): 1427~ 1432

Strategies and Applications of the Cre/LoxP System in Transgenic Mice. ZHU Huan-Zhang, SHI Jing-Quan (Department of Pathology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China).

Abstract Cre site-specific DNA recombinase system has been developed as a novel powerful tools for manipulating DNA both *in vitro* and *in vivo*. It has been used in transgenic mice to induce site-specific DNA recombination leading to gene expression or deletion/mutation not only in a tissue-specific or at a certain stage of development, by combining with inducible systems for controlling Cre expression or function, but also in temporally and spatially manner. These recombination-based strategies are likely to have a profound impact on study of gene function and the generation of animal models of human diseases.

Key words integrase/Cre, recombination, gene expression regulation, transgene, gene targeting, mice

绿色荧光蛋白

刘默芳 王恩多

(中国科学院上海生物化学研究所, 分子生物学国家重点实验室, 上海 200031)

摘要 来源于水母 *Aequorea victoria* 的绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 现已成为在生物化学和细胞生物学中研究和开发应用得最广泛的蛋白质之一. 其内源荧光基团在受到紫外光或蓝光激发时 ($\lambda_{\max} = 395 \text{ nm}$, 小峰在 479 nm) 可高效发射清晰可见的绿光. GFP 的高分辨率晶体结构为了解和研究蛋白质结构和光谱学功能关系提供了一个极好的机会. GFP 已成为一个监测在完整细胞和组织内基因表达和蛋白质定位的理想标记. 通过突变和蛋白质工程构建的 GFP 嵌合蛋白在生理指示剂、生物传感器、光化学领域以及生产发光纤维等方面展示了广阔前景.

关键词 水母, 绿色荧光蛋白, 生色团, 变种

学科分类号 Q785

绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 是一类存在于包括水母、水螅和珊瑚等腔肠动物体内的生物发光蛋白. 当受到紫外或蓝光激发时, GFP 发射绿色荧光. 其独特之处在于: 它产生

荧光无需底物或辅因子, 发色团是其蛋白质一级序列固有的^[1]. 来源于水母 (*Aequorea victoria*) 的

Tel: (021) 64374430-241, E-mail: wed@server.shnc.ac.cn

收稿日期: 1999-04-08, 修回日期: 1999-08-24

GFP 由 238 个氨基酸残基组成, 分子质量为 27 ku^[2]. 水母 GFP 基因是目前唯一已被克隆的 GFP 基因^[3]. 本文主要综述关于这种 GFP 的研究.

水母 GFP 的荧光很稳定, 无种属限制, 已在网柄菌、大肠杆菌、酵母及多种动植物细胞中表达成功并产生荧光. 首先, 一系列与 GFP 的 N 端和 C 端融合的蛋白质的性质研究已证明融合蛋白质具有 GFP 的荧光性质和配体蛋白质的生物功能^[4]. 即使在使用甲醛或戊二醛固定的细胞中, GFP 的荧光也不受影响, 适用于与其他荧光试剂同时进行双标实验^[5]. 另外, GFP 的检测极其方便, 可用荧光显微镜、流式细胞计或显微成像技术方便地在活细胞中检测, 而对活细胞无伤害^[2,6]. 由于这些优点, GFP 已成为监测体内基因表达及细胞内蛋白质原位定位的十分重要的报告分子^[1,2].

但野生型 GFP 也有一些缺点, 如用蓝光激发时在 470 nm 处的荧光强度较低、蛋白质生物合成 GFP 及通过蛋白质折叠产生荧光的过程明显滞后、复杂的光异构化、蛋白质折叠极易受温度影响以及

其基因在某些种属的哺乳动物和植物细胞中的表达较低等, 对 GFP 作为报告分子极为不利. 为改善其性能, 已成功地筛选出一系列更适于作为报告分子的 GFP 变种, 为它的开发及应用带来更加广阔的前景. 另外, 该蛋白质也为生产荧光纤维, 美化人类的生活提供了极好的材料.

1 结 构

1.1 一级结构

野生型水母 GFP 的一级序列已由其 cDNA 序列推导出来^[2,3], 至少存在四种同工 GFP, 但这些突变似乎都不影响 GFP 的功能^[7]. 另外, 根据 cDNA 序列重新合成了 GFP 基因, 按需要改变了部分密码子及翻译起始序列, 使表达出的变种 GFP 具有新性质.

GFP 的生色团位于 64~69 的六肽内, 确切地说是 65~67 残基 (野生型中是 Ser-Try-Gly) 生成的 4-(对-羟基苯亚甲基) 咪唑-5-啉酮. 图 1 为生色团形成机制^[2,4,8].

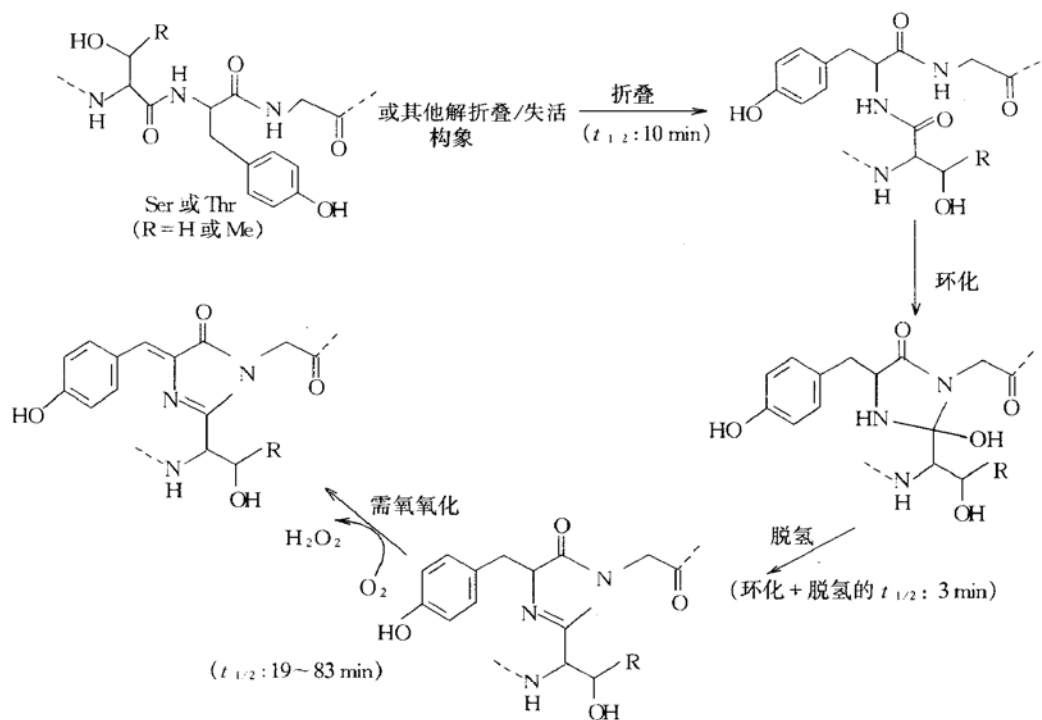


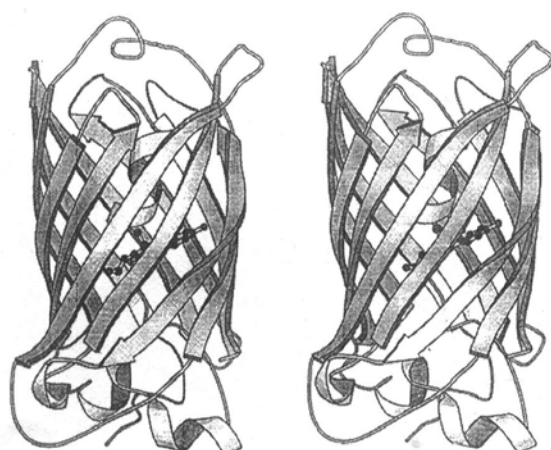
图 1 生色团形成机制

速度常数从 S65T 变种估算提供^[2,8,13].

1.2 晶体结构

虽然早在 1974 年就得到 GFP 结晶, 1988 年报道了它的衍射图谱, 但到 1996 年才解出结构^[9,10]. GFP 的立体结构是由 11 条 β 桶状结构

(β -barrel) 绕成的一个圆柱体, 一条 α 螺旋缠绕在圆柱体的轴位置. 生色团附着在 α 螺旋上, 几乎完美地包埋于圆柱体中心 (图 2). 这种方式被称为 β 罐 (β -can)^[10].

图2 GFP的三维立体结构^[9]

11条 β 链形成一个中空圆柱体,负载生色团的螺旋串在其中,以球棒模型描述。

1.3 二聚化

野生型 GFP 既可以单体形式结晶^[11],也可以二聚体形式结晶^[10]. 二聚体的形成似乎是高度依赖于晶体生长条件,而非 GFP 固有的特征^[12]. 同源二聚体的解离常数为 100 $\mu\text{mol/L}$.

2 光吸收及荧光性质

基于组成生色团的元件不同,可将已知的 GFP 及其变种分为 7 种(表 1). 每一种都有一组不同的荧光激发和发射波长. 1~4 种的生色团是由肽链与 Tyr66 衍生而来,而另外 3 种则分别由肽链与 66 位的 Trp、His 或 Phe 衍生出生色团. 这 7 种生色团的组成和特点如下:

表 1 主要绿色荧光蛋白 (GFPs) 的光谱特性

突变	通用名	$\lambda_{\text{激发}}/\text{nm}$	$\lambda_{\text{发射}}/\text{nm}$	相对荧光密度 ¹⁾
第一种: 野生型				
无或 Q80R	野生型	395~ 397 470~ 475	504	6
F99S, M153T, V163A	Cycle 3	397, 475	506	100
第二种: 酚盐阴离子				
S65T		489	509~ 511	12
F64L, S65T	EGFP	488	507~ 509	20
F64L, S65T, V163A		488	511	54
S65T, S72A, N149K, M153T, I167T	Emerald	487	509	100
第三种: 中性酚				
S202F, T203I	H9	399	511	13
T203I, S72A, Y145F	H9-40	399	511	100
第四种: 含有 π 电子系统堆积的酚盐阴离子				
S65G, S72A, T203F		512	522	6
S65G, S72A, T203H		508	518	12
S65G, V68L, Q69K, S72A, T203Y	10C Q69K	516	529	50
S65G, V68L, S72A, T203Y	10C	514	527	58
S65G, S72A, K79R, T203Y	Topaz	514	527	100
第五种: 咪唑生色团 (青蓝色荧光蛋白)				
Y66W		436	485	—
Y66W, N146I, M153T, V163A	W7	434 452	476 505	61
F64L, S65T, Y66W, N146I, M153T, V163A	W1B or ECFP	434 452	476 505	80
S65A, Y66W, S72A, N146I, M153T, V163A	W1C	435	495	100
第六种: 咪唑生色团 (蓝色荧光蛋白)				
Y66H	BFP	384	448	18
Y66H, Y145F	P4-3	382	446	52
F64L, Y66H, Y145F	EBFB	380~ 383	440~ 447	100
第七种: 苯基生色团				
Y66W		360	442	—

¹⁾ 相对荧光密度是指在相似条件下用同一载体在 *E. coli* 中的蛋白质表达. 这些数据不仅包括内源荧光而且反应在 37℃ 下的折叠效率. 这仅是粗略的估计, 因为它们将随表达条件的变化而变化. 将每一种中最亮的计为 100, 不同种的 GFPs 之间不能通用.

2.1 野生型 GFP 中的中性酚和阴离子酚盐混合物

野生型水母 GFP 的光谱是所有 GFP 中最复杂的. 其荧光激发光谱主峰在 395 nm, 在 475 nm 处有一个峰高仅为主峰 1/3 的小峰. 溶液中, 395 nm 激发的荧光发射峰在 508 nm, 475 nm 激发的在 503 nm^[4]. 这类 GFP 的生色团至少由两种不同的化学成分组成, 即中性酚和阴离子酚盐. 475 nm 峰随 GFP 分子生色团的去质子化或阴离子生色团的增加而增加; 395 nm 峰则代表质子化或中性的生色团^[2, 4].

野生型 GFP 在室温或低于室温下表达时, GFP 几乎都能正确而快速地折叠, 但高于室温时, 折叠速度却剧烈下降. 这种温度的敏感性无碍于水母, 因为在它们的生活环境中是不可能遇到温水的. 但 GFP 折叠受温度影响却限制了 GFP 的应用. 另外, 在 GFP 应用于细胞生物学时, 野生型 GFP 的中性和阴离子型生色团共存, 并给出两个激发峰的光谱也是弊大于利的. 因此, 为拓宽 GFP 的应用, 有必要根据不同的用途, 对野生型 GFP 进行适当的改造.

2.2 酚盐阴离子生色团

具有酚盐阴离子生色团的 GFP 已在细胞生物学中得到广泛应用. 它们不但可以仅由简单的激发产生高光亮度的荧光, 而且发射峰的波长与一种最常用的小分子荧光试剂——荧光素的相似. 最常用的变种是以产生生色团酚阴离子的 Thr 取代 Ser65 的突变, 由几种其他的脂肪族残基, 如 Gly、Ala、Cys 或 Leu 取代 Ser65 也有类似的效果^[13, 14]. 从基因随机突变中发现的围绕生色团突变的一个变种 F64M-S65G-Q69L, 被命名为 RSGFP₄^[15], 也得到了广泛地应用. 这类变种中, 野生型 GFP 的由中性酚引起的 395 nm 激发峰被抑制, 而来源于阴离子酚盐的 470~475 nm 激发峰强度则提高了 5~6 倍, 并位移至 489~490 nm^[6, 13]. 取代 Ser65 提高生色团阴离子化的机制可能是仅有 Ser65 可作为氢供体, 与 Glu222 被包埋的侧链形成氢键, 使其距生色团不到 3.7 nm 的羧基阴离子化^[9, 11]. Gly、Ala 或 Leu 的侧链都不能提供氢键; 而 Thr 和 Cys 太大, 不能在狭小的蛋白质内部形成正确的构象. 在 65 位上的这些残基迫使 Glu222 的羧基不能阴离子化而保持中性, 而其他的极性基团溶剂化生色团, 促使其离子化至一个阴离子.

对生成荧光团的氧化步骤, 变种 S65T 的反应速度比野生型快 4 倍^[13]. 但类似于野生型 GFP,

S65T 变种在较高温度下也容易发生折叠错误并导致无荧光的聚集. 一些研究者在寻找能在高温下产生更高光亮度的变种的研究中投入了大量精力. 一些有利于蛋白质折叠的变种被相继筛选出来. 最常用的是变种 F64L^[14] 和 V163A^[15], 其他变种, 如 S72A、N149K 和 I167T 单独或结合使用都有一定的效果^[12]. 但同野生型 GFP 相比, 这些突变仅仅改善了折叠效率, 并非成熟 GFP 分子的荧光强度.

2.3 中性酚生色团

把 Thr203 突变成 Ile 抑制了 475 nm 激发峰, 仅留下位于 399 nm 处的短波长激发峰^[4]. 推测可能是因为 Thr203 突变后 —OH 不再存在, 阴离子生色团就不能恰当地溶剂化, 所以几乎所有基态分子的生色团都维持在中性. 但发射峰仍在 511 nm, 因为激发态持有的酸性足够发射出一个质子. 该变种及它的折叠优化后代可产生有价值的紫外光激发的绿色荧光, 并克服了野生型 GFP 复杂的光化学性质. 因为去掉了 479~490 nm 附近的激发峰, 它们可同酚盐阴离子型 GFP (第二种 GFP) 偶联用于双标. 虽然在 400 nm 和 480 nm 附近有两个不同的激发谱带, 却仅有一个大于 500 nm 的发射峰. 中性酚 GFP 是激发波长和发射波长相差最大的 GFP. 这个大的 Stokes 式位移在支持激发行为时很 有利, 因为在此应用中, 染料在产生荧光或产生激发的波长处要有尽可能小的吸收.

2.4 含有 π 电子堆积的酚盐阴离子

目前, 拥有最长激发和发射波长的 GFP 是在生色团中酚盐阴离子后面加一个芳香环的变种 GFP. 该芳香环都由 203 位残基提供, 并由 Gly 或 Thr 取代 Ser65 来增强生色团的离子化. 四种芳香残基 (His, Trp, Phe 和 Tyr) 在 203 位都可使激发波长和发射波长加长 20 nm^[9]. 这些变种是根据 S65T 变种的晶体结构设计的, 期望在生色团周围增加极性基团和 π - π 电子相互作用来减少激发能, 使激发波长和发射波长都加长.

事实上, 含有 Tyr203 的变种的晶体结构已证实有芳香环在生色团后面堆积. Gln69 突变为 Lys 给出另一个波长约 1~2 nm 的位移, 产生一个围绕 529 nm 的发射峰, 这是目前已知的最长波长的荧光^[16]. 虽然 529 nm 处的荧光呈绿色, 但在拖尾峰更长的波长处却足够产生黄色荧光, 用肉眼可清楚地将它与前三种 GFP 发射的绿色荧光区分开来. 因此, 第四种 GFP 已被命名为 YFP (yellow fluorescent protein), 意为黄色荧光蛋白.

2.5 衍生于 Y66W 变种的吡啶生色团

用 Trp 取代 Tyr66 产生了一种用吡啶代替酚或酚盐的新型生色团^[4]. 激发波长和发射波长分别在 436 nm 和 476nm, 介于中性酚和酚盐生色团之间. 因为它发射蓝绿色荧光, 这类 GFP 被称为蓝绿色荧光蛋白. 其光谱有一个奇怪的特征: 大多数都是双隆起峰而非单激发峰和发射峰. 双发射峰可能来自于振动或在激发期量子平衡状态的波动, 尽管激发波长不同, 但它们的形状和相对振幅都一样.

2.6 衍生于 Y66H 的咪唑生色团

在 Y66H GFP 变种的生色团中引入了一个咪唑基, 使波长位移到比含 Trp66 的 GFP 还要短^[4]. 其激发峰和发射峰分别在 383 nm 和 447 nm 附近, 发射蓝色荧光, 称其为蓝色荧光蛋白 (blue fluorescent protein, BFP). 已解出来几种 BFP 的晶体结构^[12, 17]. 这些蛋白质的应用也有助于蛋白质折叠的突变^[12]. BFP 和一个紫外光激发的 GFP 一起可用于双标细胞来探测结构. 它们可由一个在 390 nm 附近的激发光同时激发而发射两种颜色的荧光. 但是, 即使使用折叠效率改善了的 BFP, 其荧光量子生成率仍相对较低, 并且相当容易淬灭.

2.7 衍生于 Y66F 的苯基生色团

Y66F 变种 GFP 的激发和发射波长是所有 GFP 中最短的^[4]. 因为它没有明显的实际应用价值, 对这个变种的研究报道不多. 但该突变证明在 66 位的任何带芳香基团的氨基酸都能形成生色团.

3 GFP 的表达、成熟

3.1 启动子、偏爱密码子和剪接

GFP 的表达水平受多种因素的影响. 很明显高基因拷贝数和强启动子/增强子有利于转录和翻译. 在植物细胞中表达 GFP 时, 改变一些原 GFP 基因的密码子为该植物使用的偏爱密码子, 并消除潜在的剪接位点是重要的^[18]. 也将密码子改变为适合哺乳动物和致病酵母白色念珠菌 (*Candida albicans*) 表达系统的偏爱密码子^[5, 19]. 目前适用于哺乳动物表达系统的 GFP 已得到广泛应用, 并且可能会发挥更大的作用. 一般来说, 哺乳动物化的 GFP 基因在细菌中的表达不受影响. GFP 还可以顺利地在无细胞的体外翻译系统中表达并自发折叠^[20].

3.2 有助于折叠的突变及嗜热性

用一些小体积的氨基酸残基取代大体积残基可以提高 GFP 在高温下正确折叠的速度. 这些突变位点分布于成熟蛋白质三维结构的各个部位, 几乎

不能提供如何帮助 GFP 折叠和成熟的线索. 另外, 分子伴侣的存在也有助于 GFP 的折叠, 反过来, 这个发现也使 GFP 成为测试分子伴侣功能的一个好底物, 因为 GFP 可提供一个连续地、无破坏性地监测蛋白质折叠成功的分析方法^[21].

3.3 对氧的需求

GFP 的生色团形成需要 O₂ 使 66 位氨基酸残基的 α , β 键间脱氢, 这就意味着 GFP 在严格厌氧条件下不能形成荧光^[4, 8]. 这也是至今对 GFP 表达系统的唯一限制. 氧化似乎是 GFP 的生色团形成过程中最慢的一步反应^[8], 它是用 GFP 监测基因表达快速变化的限制因素.

4 GFP 的应用

4.1 报告基因和细胞标记

GFP 作为报告分子和细胞标记最明显的优势是无需底物或辅因子参与; 无论在活细胞还是在完整的转基因胚胎和动物中, 都能有效地监测基因转移的效率.

但在这方面的应用中, GFP 最大的缺点就是没有放大作用, 它不能象酶一样能通过加工无数的底物分子而将信号放大. 所以一般都需强启动子以驱动 GFP 基因在细胞内足量的表达. 也可用亚细胞分辨率的显微成像系统检测基因产物, 靶入的基因被限制于一个细胞器内, GFP 的浓度则相对提高了许多倍.

4.2 融合标记

应用得最多和最成功的是 GFP 同宿主蛋白构成融合子来监测宿主蛋白的定位和最后归宿. 既有荧光又有宿主蛋白原有的正常功能和定位的融合蛋白效果最佳. GFP 可融合于宿主蛋白的 N 端或 C 端, 也可插入其内部. 迄今为止, GFP 已成功地靶入了大部分细胞器中, 如质膜、细胞核、内质网、高尔基体、分泌小体、线粒体、液泡和吞噬体等^[7].

4.3 其他

GFP 分子生色团的坚固外层保护荧光不被熄灭, 但同时也降低了 GFP 分子的荧光对环境的敏感性. 通过随机重组和基因定向突变得到了多种对环境敏感的 GFP, 它们可用作环境指示剂^[3]. 如: 对 pH 敏感的 GFP 可以测定细胞器内的 pH 值; 通过基因工程, 可在 GFP 中插入磷酸化位点以便用磷酸化控制 GFP 的荧光. 另外, 最近报道的利用靶入了水母 GFP 基因的丝蛋白昆虫病毒, 感染蚕

的幼虫, 用改造的基因取代了蚕的正常基因, 当蚕吐丝时这种丝是一种能在黑暗中发绿色荧光的纤维^[22].

5 展 望

尽管对 GFP 的荧光生成机制及开发应用已有许多了解, 但是在 GFP 的研究中还有许多空白和挑战. 如: 除了水母外的其他发光生物 (如珊瑚、水螅等) 中 GFP 基因的克隆、GFP 是怎样折叠成 β 桶状结构的、突变是如何影响生色团形成的、荧光波长是否可以再增加以适合更多种标记和报告分子及中介转移受体、可否在 GFP 的分子内部融合其他蛋白质以及研究如何利用 GFP 生物合成有色纤维等.

参 考 文 献

- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, *et al.* Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 1994, **263** (5148): 802~805
- Cubitt A B, Heim R, Adams S R, *et al.* Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem Sci*, 1995, **20** (11): 448~455
- Tsien R Y. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem*, 1998, **67**: 509~544
- Heim R, Prasher D C, Tsien R Y. Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** (26): 12501~12504
- Yang T T, Cheng L, Kain S R. Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein. *Nucleic Acids Res*, 1996, **24** (22): 4592~4593
- Cheng L Z, Fu J, Tsukamoto A, *et al.* Use of green fluorescent protein variants to monitor gene transfer and expression in mammalian cells. *Nat Biotechnol*, 1996, **14** (5): 606~609
- Chalfie M, Kain S. GFP: Green Fluorescent Protein Strategies and Applications. New York: Wiley & Sons, 1998. 11~80
- Reid B G, Flynn G C. Chromophore formed in green fluorescent protein. *Biochemistry*, 1997, **36** (22): 6786~6791
- Ormo M, Cubitt A B, Kallio K, *et al.* Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science*, 1996, **273** (5280): 1392~1395
- Yang F, Moss L G, Jr Philips G N. The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat Biotechnol*, 1996, **14** (10): 1246~1251
- Brejce K, Sixma T K, Kitts P A, *et al.* Structural basis for dual excitation and photoisomerization of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94** (6): 2306~2311
- Palm G J, Zdanov A, Gaitanaris G A, *et al.* The structure basis for spectral variations in green fluorescent protein. *Nat Struct Biol*, 1997, **4** (5): 361~365
- Heim R, Cubitt A B, Tsien R Y. Improved green fluorescence. *Nature*, 1995, **373** (6516): 663~664
- Cormack B P, Valdivia R H, Falkow S. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*, 1996, **173** (1): 33~38
- Kahana J, Silver P. Use of the *A. victoria* green fluorescent protein to study protein dynamics *in vivo*. In: Ausabel FM, Brent R, Kingston R E, eds. *Current Protocols in Molecular Biology*, **9** (7). New York: Wiley & Sons, 1996. 22~28
- Miyawaki A, Llopis J, Heim R, *et al.* Fluorescent indicators for Ca^{2+} based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature*, 1997, **388** (6645): 882~887
- Wachter R M, King B A, Heim R, *et al.* Crystal structure and photodynamic behavior of the blue emission variant Y66H/Y145F of green fluorescent protein. *Biochemistry*, 1997, **36** (32): 9759~9765
- Haseloff J, Siemering K R, Prasher D C, *et al.* Removal of a cryptic intron and subcellular location of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94** (6): 2122~2127
- Cormack B P, Bertram G, Egerton M, *et al.* Green fluorescent protein (GFP): a marker for gene expression in *Candida albicans*. *Microbiology*, 1997, **143** (2): 303~311
- Kahn T W, Beachy R N, Falk M M. Cell-free expression of a GFP fusion protein allows quantitation *in vitro* and *in vivo*. *Curr Biol*, 1997, **7** (4): R207~208
- Makino Y, Amada K, Taguchi H, *et al.* Chaperonin-mediated folding of green fluorescent protein. *J Biol Chem*, 1997, **272** (19): 12468~12474
- Yamao M, Katayama N, Nakazawa H, *et al.* Gene targeting in the silkworm by use of a baculovirus. *Genes and Development*, 1999, **13** (5): 511~516

Green Fluorescent Protein. LIU Mo-Fang, WANG En-Duo (State Key Laboratory of Molecular Biology, Shanghai Institute of Biochemistry, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China).

Abstract Recently the green fluorescent protein (GFP) from the jellyfish *Aequorea victoria* has emerged. It has been widely studied and used in biochemistry and cell biology. The protein emits green light ($\lambda_{\text{max}} = 508 \text{ nm}$) when excited with ultraviolet (UV) or blue light ($\lambda_{\text{max}} = 395 \text{ nm}$, minor peak at 479 nm). It is extremely useful as a marker for monitoring gene expression and as a tag in studying protein localization in organisms, intact cells and organelle. Mutagenesis and engineering of GFP fused into chimeric proteins are opening new prospect in physiological indicators, biosensors, photochemistry and production of luminescent fiber.

Key words *Aequorea*, GFP, chromophore, mutants