

www.pibb.ac.cn

红色荧光蛋白的光谱多样性及体外分子进化*

樊晋宇 1, 2) 崔宗强 2) 张先恩 2)**

(心华中科技大学生命科学与技术学院,武汉 430074; 心中国科学院武汉病毒研究所,病毒学国家重点实验室,武汉 430071)

摘要 从珊瑚中来源的各种红色荧光蛋白(red fluorescent protein, RFP)经过一系列体外进化,其波谱范围覆盖了 570~655 nm, 极大地丰富了细胞内或体内光学成像的荧光探针.简要阐述了来源于 *Discosoma sp., Entacmaea quadricolor, Anemonia sulcata, Heteractis crispa, Actinia equina* 5 种珊瑚的红色荧光蛋白的光学特征、结构、体外分子进化及其应用.

关键词 红色荧光蛋白,分子进化,光学性质 学科分类号 Q5,Q7

荧光蛋白作为分子标签,在分析生物技术和细胞内分子示踪方面具有广泛的应用.尤其是在细胞分子影像的应用方面,可以通过融合蛋白技术,将荧光蛋白融合到细胞内的某个靶标蛋白上,以标记和分析靶标蛋白在细胞内的定位、分布和运动以及与其他细胞内分子的相互作用.目前已经出现了许多基于荧光蛋白的细胞内蛋白质相互作用的动态分析技术,如荧光共振能量转移技术(FRET)和双分子荧光互补技术(BiFC)等,它们是当今细胞内分子事件"可视化"的主流技术.

从水母(Aequorea victoria)中克隆的绿色荧光蛋 白(GFP)^[1]通过一系列体外突变进化,发展出荧光强 度更强(EGFP),波长不同的各种突变体,如蓝色 (EBFP)、青色(ECFP,Cerulean)、黄色(EYFP, Citrine)荧光蛋白^[2~5].这些荧光蛋白已经广泛用于 蛋白质分子标记和细胞内分子示踪,极大地促进了 生物学的研究,不足的是,这些荧光蛋白的发射光 谱局限在 440~529 nm,激发和发射波长较短,能 激发细胞内的某些物质产生荧光,因此细胞内成像 时背景较高.

1999 年报道了第一个红色荧光蛋白 drFP583 (DsRed)¹⁶,其优点显而易见:可与 GFP 系列荧光 蛋白共用,且激发和发射波长更长,细胞内成像背 景低,因此迅速被关注.短短数年,对红色荧光蛋 白的一系列研究,极大地丰富了荧光蛋白的光谱多 样性,为细胞内的多色标记提供了更多的荧光标

签. 迄今所有的红色荧光蛋白都是从珊瑚纲下的类 珊瑚目或海葵目的不同种中分离进化而来. 最初发 现并报道的红色荧光蛋白通常采用 Matz 等¹⁰的命 名原则,即用小写字母表示蛋白质来源的珊瑚种 类, FP 表示荧光蛋白(fluorescent protein), 紧接着 的数字表示荧光蛋白的发射波长.如 drFP583,表 示从 Discosoma sp. 分离出来的荧光蛋白,最大发 射波长为 583 nm. eqFP578^[7]和 eqFP611^[8]表示从 Entacmaea quadricolor 分离出来的荧光蛋白,最大 发射波长分别为 578 nm 和 611 nm. 荧光蛋白的成 熟过程即发色团的形成过程.荧光蛋白表达后发生 自体催化,将发色团的三个氨基酸环化氧化形成一 个 π 共轭体系,进一步氧化增加一个酰基,形成 成熟发色团.由于野生型的红色荧光蛋白成熟速度 较慢以及常以四聚体或二聚体形式出现且易于聚 合,对细胞或组织具有一定的毒性,影响所标记蛋 白的功能,其应用受到限制.因此,体外分子进化 技术便被用来对野生型红色荧光进行改造.改造的 目标包括: 缩短成熟时间; 消除四聚化, 发展单体 红色荧光蛋白:改变发射波长,发展远红光荧光蛋 白;提高其荧光强度等.本文对这方面的进展进行 简要综述.

^{*}国家自然科学基金资助项目 (90606028, 30700169).

^{**} 通讯联系人. Tel: 027-87199492, E-mail: x.zhang@wh.iov.cn 收稿日期: 2008-02-12, 接受日期: 2008-04-12

1 红色荧光蛋白的光谱多样性

克隆于珊瑚的荧光蛋白具有荧光光谱多样性. 既有绿色,也有黄色,且有各类红色^[6~9].不同野 生型的红色荧光蛋白经过一系列体外进化,得到各 种不同发射波长的突变体,发射光谱可以覆盖 574 nm 到 655 nm(图 1). Verkhusha 等^[10]认为荧光 蛋白光谱多样性源于两个因素:一是发色团与其所 处的微环境之间的非共价相互作用的多样性,二是 发色团本身的多样性.该分析已经被后来的实验所 印证. Shu 等^[11]从晶体结构角度,通过比较 DsRed 来源的不同单体荧光蛋白发色团和所处微环境的非 共价相互作用,解释了不同突变体发射光谱相异的 原因.随着多种红色荧光蛋白的晶体结构解析,发 现了多种发色团如 drFP583 (DsRed)的发色团为 (Gln66-Tyr67-Gly68)^[13], eqFP611 和 asFP595 的发色 团为(Met63-Tyr64-Gly65)^[13],14], hcRed 的发色团为 (Glu64-Tyr65-Gly66)^[15].红色荧光蛋白的光谱多样 性提供了多样的红色荧光蛋白选择,以实现不同的 标记及成像目的.



Fig. 1 Emission wavelength and relative brightness of various RFPs 图 1 不同红色荧光蛋白的发射波长及其相对亮度示意图

相对亮度是以 DsRed1 的亮度为 1,其他荧光蛋白与 DsRed1 相比较所得数值. 图中数据来源于表 1 所列文献.

2 红色荧光蛋白的特征及体外分子进化

2.1 源于 Discosoma sp. 的红色荧光蛋白 DsRed (drFP583)

2.1.1 DsRed (drFP583)的特征和结构.drFP583的商品名为DsRed,由225个氨基酸残基组成,最大吸收波长为558 nm,最大发射波长为583 nm.该荧光蛋白有较高的量子产率和光稳定性,并且受pH值影响小,在pH5~12范围内吸收和发射光强度没有明显变化^[6,16].野生型DsRed成熟速度很慢,体外成熟过程需经过两个阶段.在室温下,最初的激发发射波长分别为475和499 nm(为绿色荧光蛋白的特征波长),约7h后,绿色荧光的光强达到

最大值,随后开始衰减,2天之后,绿色荧光完全 消失.而红色荧光需要27h才达到其最大荧光强 度的一半,至少48h才能达到最大荧光强度的 90%^[16].Tubbs等^[17]从晶体结构角度分析了DsRed 红色发色团(Gln 66-Tyr 67-Gly 68)的荧光形成过 程.发色团在成熟过程中先形成一个GFP的发色 团,进一步氧化形成DsRed的发色团.DsRed的发 色团比GFP的发色团多一个酰基(图2).DsRed的 生物化学、生物物理学实验^[16]以及晶体结构^[12] 18]表 明,DsRed在体外或体内均会形成四聚体,其四聚 体的每个单体结构与GFP蛋白相似,由11个β折 叠形成一个桶状结构,一个α螺旋从桶中心穿过, 而发色团位于桶中央的α螺旋上.四聚体的形成



Fig. 2 Chromophore formation steps of DsRed^[18] 图 2 DsRed 发色团的形成过程^[18]

会影响融合的目标蛋白定位及功能,而且易聚 集^[19],对细胞产生毒性.为了克服野生型红色荧光 蛋白 DsRed 成熟速度慢以及四聚化的缺点,研究 人员对其进行了一系列分子改造.

2.1.2 DsRed 的分子进化.

a. DsRed 的各种四聚体形态突变体. Clontech 公司将野生型的 DsRed 密码子进行人源型密码子 优化,产生了 DsRed1. DsRed1 成熟时间仍然很 慢,半成熟时间约 11 h. 该公司将 DsRed1 进一步 改造,突变其中 6 个氨基酸得到 DsRed2,其可溶 性和成熟速度都得到改进,半成熟时间缩短为约 6.5 h^[20]. Bevis 等^[21]以 DsRed1 为模板,采用随机和 定向突变技术,经过多轮筛选,获得 3 个成熟时间 大大缩短的突变体(成熟速度比野生型 DsRed 快 10~15 倍),分别命名为: DsRed.T1(商品名为 DsRed-Express), DsRed.T3 和 DsRed.T4. 在这些 突变中,氨基酸改变 N42Q 对加速荧光蛋白成熟贡 献最大,且能够减少绿色荧光的激发及发射.

DsRed.T3 和野生型 DsRed 一样,荧光团的成熟是 个多步过程,只是速度比野生型快约 10 倍,半成 熟时间约 1.3 h. 而 DsRed.T1 和 DsRed.T4 几乎不 再能被激发发射绿色荧光,成熟速度约为野生型的 15 倍,半成熟时间缩短为约 0.7 h. 在这一阶段的 分子进化中,DsRed 的成熟时间被大大缩短,但是 上述 5 个 DsRed 的突变体在细胞内或体外仍以四 聚体形式存在.

b. DsRed 的各种二聚体形态突变体. 为了解 决 DsRed 易聚集的缺陷, Campbell 等四对 DsRed. T1 进行改造. 其策略及突变如下: 根据 DsRed 的 晶体结构,用定向突变技术破坏单体界面相互作用 的关键氨基酸,然后通过随机突变技术拯救荧光蛋 白的优良性状. 形成四聚体的 4 个单体分别用 A、 B、C和D表示, 且AB界面和CD界面之间的相 互作用相同, AC 界面和 BD 界面之间的相互作用 相同[18,23]. 将每个单体界面处的关键氨基酸突变为 带正电的氨基酸.这样由于正电荷相斥以及不能通 过金属离子螯合各个单体,使得两个单体不能再形 成聚合物.将 DsRed.T1 进行一个点突变 I125R, 破坏 AB 界面之间相互作用,得到只能形成二聚体 的突变体 DsRed.T1(I125R). 在 DsRed.T1(I125R)的 基础上进行多轮随机突变,进行荧光蛋白优良性质 的拯救,得到了荧光亮度较亮和成熟速度较快的二 聚体红色荧光蛋白,命名为 Dimer2. 与野生型 DsRed 相比, Dimer2 含有 17 个突变位点(包括

DsRed.T1 上的突变位点). 根据 DsRed 的晶体结 构,用一个不易被蛋白酶水解的12个氨基酸残基 的 linker(GHGTGSTGSGSS)将 Dimer2 的两个单体 串联,使两个单体自身可以形成二聚体,相当于一 个类单体荧光蛋白,由此构建成荧光蛋白 tDmier2 (tandem dimer). tDimer2 和 Dimer2 具有完全相同 的半成熟时间(约2h)以及荧光特征光谱(激发和发 射波长分别为 555 nm 和 579 nm), 但 tDimer2 比 Dimer2 更亮. Shaner 等^[24]在 Dimer2 的基础上进行 5轮定向突变,筛选到成熟时间更短(半成熟时间 约1h)、不发绿色荧光的突变体.并将该突变体的 N端7个氨基酸残基替换为 EGFPN 端的7个氨基 酸序列,同时将 EGFP C 端的 7 个氨基酸序列追加 到该突变体的 C 端,以减少红色荧光蛋白对融合 蛋白的影响.得到一个新的可形成二聚体的荧光蛋 白 dTomato, 其激发和发射波长分别为 554 nm 和 581 nm. 然后采用构建 tDimer2 的策略, 用一个多 肽 linker 将两个 dTomato 蛋白串联在一起,构建成 类单体荧光蛋白 tdTomato. tdTomato 的亮度比 dTomato 提高了一倍,比野生型的 DsRed 蛋白还要 亮. (t)dTomato 比(t)Dimer2 的成熟时间提高了一 倍,而且其荧光蛋白性能受外源融合蛋白的影响较 小,因此可以作为一种红色荧光标签.

c. DsRed 的各种单体红色荧光蛋白. Campbell等^[22]在二聚体红色荧光蛋白 Dimer2 的基础上,进一步破坏单体 AC 界面的相互作用,将 AC 界面相互作用的 2 个关键氨基酸残基 H162 和 A164 分别突变为带正电的 Lys 和 Arg. 再进行多 轮随机突变筛选,最终得到有较高亮度和较快成熟 速度的单体荧光蛋白 mRFP1(也称为 mRFP). 与野 生型 DsRed 相比, mRFP1 含有 33 个位点突变. 单 体荧光蛋白 mRFP1 的激发和发射波长(584/607 nm) 比野生型以及各种聚合体形态的突变体都长,且半 成熟时间不到 1 h.

Shaner 等^[24]在 mRFP1 的基础上,对发色团附 近的位点进行突变,发现 Q66M 的突变能促进单 体红色荧光蛋白的成熟,并且其激发和发射波长红 移,分别达到 587 和 610 nm. 该突变体 mRFP1 (Q66M)被命名为 mRFP1.1.为了减少荧光蛋白对 融合蛋白的影响,将突变体 mRFP1.1 的 N 端 7 个 氨基酸替换为 EGFP 的 N 端 7 个氨基酸序列 (MVSKGEE),在第 7 个氨基酸后添加 4 个氨基酸 NNMA(标记为 6a~d),得到 mRFP1.2.将 EGFP 的 C 端 7 个氨基酸添加到 mRFP1.2 的 C 端,得到

突变体 mRFP1.3. 从 mRFP1.3 出发, 筛选出有利 于荧光蛋白折叠的 mRFP1.4(含点突变 V7I 和 M182K). 将 mRFP1.4 的位点 M163 突变为 Q163 得到能消除绿色荧光发射的突变体. 在此基础上进 行两轮突变,对荧光蛋白进行优化,得到一系列波 长不同的第二代单体荧光蛋白,如 mHoneydew, mBanana. mOrange, mTangerine, mStrawberry 及 mCherry. 其中 mCherry 最为优秀. 与 mRFP1 相比, mCherry 的激发和发射波长更长(587 nm/610 nm), 荧光亮度更亮,成熟时间更短(半成熟时间约 15 min), 光稳定性好. 体内和体外实验表明, mCherry 在 N 端和 C 端融合外源蛋白时, 荧光蛋 白活性和被融合的目标蛋白功能相互没有明显影 响^[24]. mCherry 是从 DsRed 演化来的性能最好的一 个单体红色荧光蛋白,可以和 GFP 系列荧光蛋白 共用,实现多色标记.

为了获得更长波长的红色单体荧光蛋白,Wang 等^[25]采用体细胞超突变技术(somatic hypermutation, SHM),在细胞内对 mRFP1.2 进行多轮突变筛选. 在第 10 轮 SHM 筛选中得到含 3 个突变(F65C, A71G, I161M)的 mRaspberry.mRaspberry 的最大激发和发射波长分别为 598 nm 和 625 nm,半成熟时间约 55 min.在第 23 轮 SHM 筛选中得到发射 波长更长的一个单体红色荧光蛋白 mPlum.mPlum 的最大激发和发射波长分别为 590 nm 和 649 nm,达到了组织成像光学窗口(650~900 nm)^[26],能用于 组织或动物在体成像.但是其成熟速度较慢(半成 熟时间约 100 min),亮度较低(荧光量子产率只有 0.1).

2.2 源于 Entacmaea quadricolor 的红色荧光蛋白

2.2.1 eqFP578 和 eqFP611 简介.从不同的 Entacmaea quadricolor(可能来源于不同的变种^[7])中 分离出两个红色荧光蛋白, eqFP578^[7]和 eqFP611^[8]. eqFP578 的亮度约为 DsRed2 的 1.5 倍,是一个二 聚体红色荧光蛋白,其激发和发射波长分别为 552 nm和 578 nm,成熟时间较快.eqFP611 是一 个可以形成弱四聚体的红色荧光蛋白,其成熟过程 中形成绿色荧光蛋白的发色团,然后进一步成熟为 红色荧光蛋白,半成熟时间约 6 h,快于野生型 DsRed 的成熟速度.eqFP611 的特征波长分别为 559 nm 和 611 nm. eqFP578 和 eqFP611 具有 76% 的序列同源性.eqFP578 的晶体结构尚未被解析, 而 eqFP611 的结构类似于 DsRed^[13].对这两个蛋白 质进行的一系列分子进化,发展出了远红光 (far-red)二聚体或单体的红色荧光蛋白.尤其从 eqFP578 演化而来的两个荧光蛋白 Katushka 和 mKate,由于其极好的荧光亮度和较长的发射波长 (635 nm),是组织光学成像的理想探针.

2.2.2 对 eqFP578 的分子进化. 野生型的 eqFP578 成熟时间较慢. Merzlyak 等四采用随机突变的方 法,得到一个成熟时间短,亮度比 DsRed2 亮 1.7 倍的一个二聚体突变体,命名为 TurboRFP. TurboRFP 的激发和发射波长分别为 553 nm 和 574 nm, 荧光量子产率为 0.67, 消光系数为 92 000 mol⁻¹•L•cm⁻¹. 参照 eqFP611 的晶体结构,采 用定点突变和随机突变相结合的方法(半随机突 变),得到一个 eqFP578 的单体突变体,命名为 TagRFP, 激发和发射波长分别为 555 nm 和 584 nm, 半成熟时间约 100 min, 亮度约为 mCherry 的 2.8 倍. Shcherbo 等四参照 eqFP611 的晶体结构,对 TurboRFP 发色团附近的 3 个位点(氨基酸位点 148, 165, 181)进行突变筛选, 随后将得到的波长 较长的突变体进行随机突变筛选,最终得到一个波 长长,亮度高的突变体,命名为 Katushka. Katushka 是一个可以形成二聚体的远红光红色荧光 蛋白, 激发和发射波长分别为 588 和 635 nm, 半 成熟时间为 20 min, 其量子产率为 0.34, 消光系数 为 65 000 mol⁻¹·L·cm⁻¹. 参考二聚体 TurboRFP 到 单体 TagRFP 的突变位点,将 Katushka 进行突变得 到单体形式的突变体,命名为 mKate. mKate 作为 长波长的单体红色荧光蛋白比 mPlum 亮约 3.5 倍, 成熟时间更短[27].

2.2.3 对 eqFP611 的分子进化. 野生型 eqFP611 在 生理条件下可以形成较弱的四聚体复合物[28].从 eqFP611 晶体结构[13,29]可知,其四聚体复合物和野 生型的 DsRed 类似, AB 和 CD 界面间相互作用较 弱. Wiedenmann 等四根据 eqFP611 的晶体结构, 将 T122 突变为 R122 或将 V124 突变为 T124,均 可得到二聚体形态的 eqFP611 突变体. 二聚体突变 体 eqFP611(T122R)和 eqFP611(V124T)的激发和发 射波长与野生型 eqFP611 相同,分别为 559 和 611 nm. 在 21℃时,半成熟时间均为 7.5 h. 2008 年, Kredel 等¹⁰¹对 eqFP611 进行了进一步改造,采 用半随机突变的方式获得了能在 37℃ 成熟的一系 列突变体,分别命名为: RFP611, RFP630, RFP618, RFP637, RFP639(RFP 指红色荧光蛋白, 紧接着的数字表示发射波长; eqFP611 和 RFP611 的区别在于后者以及所有标记 RFP 的红色荧光蛋

白可以在 37℃ 成熟),然而这些突变体仍以四聚体 形式存在. Kredel 等根据 Wiedenmann 等的研究结 果,将 RFP611 和 RFP639 引入突变 T122R,发展 了只形成二聚体的突变体,并将两个单体用连接肽 (linker)串联,构建了可以自身二聚化的类单体荧光 蛋白 tdRFP611 和 tdRFP639,并在细胞中验证了这 些突变体作为荧光标签的可靠性.

2.3 源于 Anemonia sulcata 的红色荧光蛋白

Lukyanov 等[3]从 Anemonia sulcata 触角的顶端 分离出一个红色的荧光蛋白 asFP595,为四聚体形 式^[14], 激发与发射波长分别为 572 nm 和 595 nm, 但荧光量子产率非常低,小于 0.001. 当用绿光 (~570 nm)持续激发时, 595 nm 的发射光强度迅速 增强. 当去掉绿光时, 红色荧光缓慢地消失. 若用 蓝光(~450 nm)照射,其荧光迅速淬灭. 当再次用 绿光激发时,红色荧光又迅速增强.红色荧光的强 度和产生速度和绿色激发光强度正相关,其红色荧 光的淬灭速度也与蓝光的强度正相关.因此,这个 红色荧光蛋白又称为光开关(photoswitch)或可点燃 的荧光蛋白(kindling fluorescent protein)^[14,31,32]. 将野 生型 asFP595 的 143 位氨基酸突变,突变体 asFP595(A143S)的荧光量子产率比野生型的高出 12 倍以上, 且当停止绿光照射时, 红色荧光的自 发消失比野生型慢约 35 倍,约需要 400 s,而用蓝 光照射时,红色荧光迅速淬灭^[14]. asFP595(A143S) 用绿光激发,用蓝光淬灭,再用绿光激发,可以循 环 30 多次, 是个很好的荧光开关^[14]. 由于其特殊 的荧光性质, asFP595 可被用于细胞、细胞器或蛋 白质运动的精确追踪[3].

2.4 源于 Heteractis crispa 的红色荧光蛋白

Gurskaya 等¹⁹从 *Heteractis crispa* 中分离到一个 类似于 GFP 的色蛋白(chromoprotein),命名为 hcCP. hcCP 在 570 nm 到 580 nm 范围内有最大光 吸收,但不能发射荧光.突变体 hcCP(C148S)能发 射红色荧光(640 nm),但该突变体和野生型的 hcCP 一样对温度敏感.对 hcCP(C148S)进行随机 突变,筛选到含 A5S 和 P208L 的突变体可以消除 温度敏感,在 37℃可以成熟.进一步随机突变筛 选,最终得到亮度提高 6 倍,发射波长红移 5 nm 且对温度不敏感的一个远红光红色荧光蛋白 hcRed.与野生型 hcCP 相比,hcRed 含有 6 个点突 变,其最大激发和发射波长分别为 592 nm 和 645 nm.凝胶过滤分析表明 hcRed 以四聚体形态 存在.将 hcRed 的 L126 突变为 H126 后,hcRed 以二聚体形式存在^[9,34],光学性质无变化. Clontech 公司将其商品化,命名为hcRed1. 目前hcRed1仍 然为二聚体红色荧光蛋白,尚未进一步改造成单体 荧光蛋白. Fradkov 等^[35]用 4 个氨基酸 linker (Arg-Ser-Pro-Gly)将两个单体hcRed1连接起来,构 建了可以自身二聚化的类单体突变体 tHcRed1.

2.5 源于 Actinia equina 的红色荧光蛋白

Shkrob 等^[36]从 Actinia equina 中分离出一个类 似于 GFP 的色蛋白,命名为 aeCP597. aeCP597 在 597 nm 处有最大的光吸收,然而不能发生荧光. 对 aeCP597 进行一系列突变后,获得一个可以发 射荧光的突变体 AQ14. AQ14 在 595 nm 有最大光 吸收,最大发射波长为 663 nm,是迄今发现的发 射波长最长的远红光红色荧光蛋白. 然而 AQ14 对 光很敏感,即使在暗室和较高温度下,荧光也会 自发消失.对 AQ14 进行随机突变,筛选到了较稳 定的突变体 AQ143. AQ143 的荧光不能自发消失, 其最大激发和发射波长分别为 595 和 655 nm,然 而其亮度较低(荧光量子产率为 0.04,摩尔吸光系 数为 90 000 mol⁻¹·L·cm⁻¹).

3 红色荧光蛋白的应用

红色荧光蛋白的发现以及不懈的体外分子进化 尝试,产生了各种具有不同特点的红色荧光蛋白 (表 1). 这些红色荧光蛋白的广泛应用极大地促进 了多个领域的生命科学研究. 红色荧光蛋白主要有 以下两大方面的应用.

3.1 用于标记个体、组织、细胞、亚细胞、病毒颗粒及蛋白质定位

作为荧光标签,目前已有的单体红色荧光蛋白 所具备的优良特性可以和 GFP 系列荧光蛋白相媲 美,用于细胞,亚细胞及病毒颗粒的标记.而在个 体或组织水平荧光标记中,红色荧光蛋白(尤其是 远红光红色荧光蛋白)所具有的较长激发和发射波 长更成为其特有的优势.此外,红色荧光蛋白还可 以和 GFP 系列荧光蛋白共用,进行多色标记,扩 展了人们的视野.

红色荧光蛋白有较长的特征波长,许多还具有高的量子产率和荧光亮度,有利于个体或组织的荧光标记与成像.如用 DsRed2,tdTomoto,mCherry及mPlum标记小鼠体内的多种肿瘤细胞,从个体水平研究肿瘤的生长、肿瘤组织和正常组织间的关系、肿瘤组织周围新血管的形成以及肿瘤的转移^[37~40].将 Katushka 用于爪蟾的整体成像时,甚

荧光蛋白	λ(激发)/nm	λ(发射)/nm	消光系数 /(mol ⁻¹ •L•cm ⁻¹)	荧光量子产率	相对亮度"	半成熟时间(t _{0.5} = h)	参考文献
DsRed1	558	583	52 000	0.68	1.00	~ 11	[6]
DsRed2	561	587	43 800	0.55	0.68	~ 6.5	[20]
DsRed. T1	554	586	30 100	0.42	0.36	0.70	[21]
tDimer2	552	579	120 000	0.68	2.31	~ 2	[22]
tdTomato	554	581	138 000	0.69	2.69	1	[24]
mRFP1	584	607	50 000	0.25	0.35	<1	[22]
mOrange	548	562	71 000	0.69	1.39	1	[22]
mStrawberry	574	596	90 000	0.29	0.74	0.83	[22]
mCherry	587	610	72 000	0.22	0.45	0.25	[24]
mRaspberry	598	625	86 000	0.15	0.36	~ 0.9	[25]
mPlum	590	649	41 000	0.1	0.12	\sim 1.7	[25]
TurboRFP	553	574	92 000	0.67	1.74	n.a.	[7]
TagRFP	555	584	100 000	0.48	1.36	1.7	[7]
Katushka	588	635	65 000	0.34	0.63	0.33	[27]
mKate	588	635	45 000	0.33	0.42	1.25	[27]
RFP611	559	611	120 000/151 000 ²⁾	0.48	1.63/2.052)	1.83	[30]
tdRFP611	558	609	70 000/144 0002)	0.47	0.93/1.912)	3.75	[30]
RFP637	587	637	72 000/ 141 300 ²⁾	0.23	0.47/0.922)	n.a.	[30]
RFP639	588	639	69 000/110 400 ²⁾	0.18	0.35/0.562)	1.5	[30]
td-RFP639	589	631	90 400/110 000 ²⁾	0.16	0.41/0.502)	n.a.	[30]
hcRed	592	645	70 000	0.05	0.10	n.a.	[34]
tHcRed1	590	637	160 000	0.04	0.18	n.a.	[35]
AQ14	595	663	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	[36]
AQ143	595	655	90 000	0.04	0.10	n.a.	[36]

Table 1	Optical properties of different red fluorescent protein	IS
	表 1 不同红色荧光蛋白的光学性质	

¹亮度值为消光系数和量子产率的乘积,相对亮度以 DsRed1 为标准进行计算.²不同浓缩方法所测值.n.a., 未获得数据(Not available).

至可以观察到爪蟾深部的心脏[27,41].

单体红色荧光蛋白或串联的二聚体红色荧光蛋白广泛应用于在细胞及亚细胞水平成像,如用 eqFP611标记细胞内的线粒体和过氧化物酶体⁽⁴²⁾, mRFP标记酵母高尔基体⁽⁴³⁾, TagRFP标记线粒 体^[7]等.

红色荧光蛋白用于标记病毒颗粒,研究病毒和 宿主细胞之间的相互作用.如用 mRFP^[44, 45]或 mCherry^[44]标记 HIV 病毒颗粒,研究 HIV 和宿主细 胞间的相互作用以及 HIV 侵染宿主细胞的过程. 用 mRFP^[46]标记腺病毒颗粒,研究腺病毒在小鼠体 内的复制过程.tdtomato^[47]用于狂犬病毒标记,研 究病毒在细胞内的运动行为等.

红色荧光蛋白还被广泛应用于细胞内蛋白质的 定位.如mCherry用于定位细胞内的微管蛋白^[24] 和细菌内的类肌动蛋白Mre B^[48]及Mre C^[49]以及核 仁蛋白^[50].tHcRed1^[35]和TagRFP^[7]用于定位核仁纤 维肌动蛋白及微管肌动蛋白.此外,红色荧光蛋白 还可以和GFP系列荧光蛋白共用,检测活细胞内 的基因表达^[51].

3.2 用于研究活细胞内蛋白质相互作用

荧光共振能量转移技术(FRET)^[52]是目前研究活 细胞内蛋白质相互作用的常用技术之一.常用于该 技术的供体和受体荧光蛋白对 CFP/YFP 在体内蛋 白质相互作用研究中取得了极大成功,然而这组荧 光蛋白仍有其不足之处,如 CFP 的发射光谱和 YFP 的激发光谱很近,有严重的串扰(cross-talk)现 象^[53], CFP 的激发波长过短,会导致细胞较高水平 的自发荧光,此外,这组荧光蛋白有可逆的光漂白 现象^[54].将红色荧光蛋白引入 FRET 技术,极大地 改善了这些不足,并且当使用长波长的供体和受体 荧光蛋白组合时,FRET 的效率也极大地提高^[55].

目前有红色荧光蛋白参与的 FRET 荧光蛋白组 合有 CFP/DsRed, CFP/mRFP, CFP/mCherry, CFP/ tdTomato, CFP/tHcRed1, GFP/DsRed, GFP/mRFP, GFP/mCherry, GFP/tdTomoto, GFP/tHcRed1, mOrange/mCherry, mKO/mRFP1, mKO/mCherry 和 YFP/tHcRed1. Goedhart 等^[55]和 van der Krogt 等^[56] 系统地研究了有红色荧光参与的各项 FRET 技术指 标,并进行了一系列比较,推荐了较为理想的组 合: GFP/mRFP, GFP/mCherry, GFP/tdTomato, mKO/ mCherry, mOrange/mCherry.

红色荧光蛋白还被开发成双分子荧光互补 (BiFC)系统,用于体内蛋白质相互作用研究.Jach 等^[57]将 mRFP1 进化出一个较亮的红色荧光蛋白 mRFP-Q66T,并将其开发为红色的 BiFC 系统,在 植物细胞内研究了植物转录因子 CPC 和 GL3 之间 的相互作用.Fan 等^[58]将 mCherry 开发为 BiFC 系 统,在哺乳动物细胞内可视化研究了 SV40 大 T 抗 原(LTag)与 P53 蛋白间相互作用,并与基于 venus 的黄色 BiFC 系统共用,实现了同一细胞内 LTag 与 p53 蛋白以及早幼粒细胞白血病蛋白(PML)和 sp100 两组蛋白质间相互作用的同步共检测.

4 结 语

许多红色荧光蛋白已经具备了优良的性质,并 广泛应用于生命科学研究. 但即使是性能优良的 红色荧光蛋白,仍然有较大的定向改造余地. 例 如,发展高亮度、远红外发射的单体荧光蛋白,将 在深部组织成像方面有重要意义.

参考文献

- Prasher D C, Eckenrode V K, Ward W W, et al. Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein. Gene, 1992, 111(2): 229~233
- 2 Tsien R Y. The green fluorescent protein. Annu Rev Biochem, 1998, $67: 509 \sim 544$
- 3 Patterson G, Day R N, Piston D. Fluorescent protein spectra. J Cell Sci, 2001, 114(Pt 5): 837~838
- 4 Rizzo M A, Springer G H, Granada B, *et al.* An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET. Nat Biotechnol, 2004, 22(4): 445~449
- 5 Griesbeck O, Baird G S, Campbell R E, et al. Reducing the environmental sensitivity of yellow fluorescent protein. Mechanism and applications. J Biol Chem, 2001, 276(31): 29188~29194
- 6 Matz M V, Fradkov A F, Labas Y A, et al. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. Nat Biotechnol, 1999, 17(10): 969~973
- 7 Merzlyak E M, Goedhart J, Shcherbo D, et al. Bright monomeric red fluorescent protein with an extended fluorescence lifetime. Nat Methods, 2007, 4(7): 555~557
- 8 Wiedenmann J, Schenk A, Rocker C, et al. A far-red fluorescent protein with fast maturation and reduced oligomerization tendency from *Entacmaea quadricolor* (Anthozoa, Actinaria). Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(18): 11646~11651
- 9 Gurskaya N G, Fradkov A F, Terskikh A, et al. GFP-like chromoproteins as a source of far-red fluorescent proteins. FEBS Lett, 2001, 507(1): 16~20

- 10 Verkhusha V V, Lukyanov K A. The molecular properties and applications of *Anthozoa* fluorescent proteins and chromoproteins. Nat Biotechnol, 2004, **22**(3): 289~296
- Shu X, Shaner N C, Yarbrough C A, *et al.* Novel chromophores and buried charges control color in mFruits. Biochemistry, 2006, 45(32): 9639~9647
- 12 Yarbrough D, Wachter R M, Kallio K, *et al.* Refined crystal structure of DsRed, a red fluorescent protein from coral, at 2.0Å resolution. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, **98**(2): 462~467
- 13 Petersen J, Wilmann P G, Beddoe T, et al. The 2.0Å crystal structure of eqFP611, a far red fluorescent protein from the sea anemone Entacmaea quadricolor. J Biol Chem, 2003, 278(45): 44626~44631
- 14 Andresen M, Wahl M C, Stiel A C, et al. Structure and mechanism of the reversible photoswitch of a fluorescent protein. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(37): 13070~13074
- 15 Wilmann P G, Petersen J, Pettikiriarachchi A, *et al.* The 2.1Å crystal structure of the far-red fluorescent protein HcRed: inherent conformational flexibility of the chromophore. J Mol Biol, 2005, 349(1): 223~237
- 16 Baird G S, Zacharias D A, Tsien R Y. Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(22): 11984~11989
- 17 Tubbs J L, Tainer J A, Getzoff E D. Crystallographic structures of *Discosoma* red fluorescent protein with immature and mature chromophores: linking peptide bond trans-cis isomerization and acylimine formation in chromophore maturation. Biochemistry, 2005, 44(29): 9833~9840
- 18 Wall M A, Socolich M, Ranganathan R. The structural basis for red fluorescence in the tetrameric GFP homolog DsRed. Nat Struct Biol, 2000, 7(12): 1133~1138
- 19 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 lett, 2000, 479(3): 131~135
- 20 Yanushevich Y G, Staroverov D B, Savitsky A P, *et al.* A strategy for the generation of non-aggregating mutants of *Anthozoa* fluorescent proteins. FEBS lett, 2002, **511**($1 \sim 3$): $11 \sim 14$
- 21 Bevis B J, Glick B S. Rapidly maturing variants of the *Discosoma* red fluorescent protein (DsRed). Nat Biotechnol, 2002, 20(1): 83~
 87
- 22 Campbell R E, Tour O, Palmer A E, et al. A monomeric red fluorescent protein. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(12): 7877~ 7882
- 23 Gross L A, Baird G S, Hoffman R C, *et al.* The structure of the chromophore within DsRed, a red fluorescent protein from coral. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(22): 11990~11995
- 24 Shaner N C, Campbell R E, Steinbach P A, *et al.* Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma sp.* red fluorescent protein. Nat Biotechnol, 2004, **22**(12): 1567~1572
- 25 Wang L, Jackson W C, Steinbach P A, *et al.* Evolution of new nonantibody proteins *via* iterative somatic hypermutation. Proc Natl

Acad Sci USA, 2004, **101**(48): 16745~16749

- 26Weissleder R. A clearer vision for *in vivo* imaging. Nature Biotechnology, 2001, **19**(4): 316~317
- 27 Shcherbo D, Merzlyak E M, Chepurnykh T V, et al. Bright far-red fluorescent protein for whole-body imaging. Nat Methods, 2007, 4 (9): 741~746
- 28 Wiedenmann J, Vallone B, Renzi F, et al. Red fluorescent protein eqFP611 and its genetically engineered dimeric variants. J Biomed Opt, 2005, 10(1): 14003
- 29 Nienhaus K, Vallone B, Renzi F, et al. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the red fluorescent protein eqFP611. Acta Crystallographica, 2003, 59(Pt 7): 1253~1255
- 30 Kredel S, Nienhaus K, Oswald F, et al. Optimized and far-redemitting variants of fluorescent protein eqFP611. Chem Biol, 2008, 15(3): 224~233
- 31 Lukyanov K A, Fradkov A F, Gurskaya N G, et al. Natural animal coloration can Be determined by a nonfluorescent green fluorescent protein homolog. J Biol Chem, 2000, 275(34): 25879~25882
- 32 Chudakov D M, Feofanov A V, Mudrik N N, et al. Chromophore environment provides clue to "kindling fluorescent protein" riddle. J Biol Chem, 2003, 278(9): 7215~7219
- 33 Chudakov D M, Belousov V V, Zaraisky A G, et al. Kindling fluorescent proteins for precise in vivo photolabeling. Nat Biotechnol, 2003, 21(2): 191~194
- 34 Wilmann P G, Petersen J, Pettikiriarachchi A, et al. The 2.1Å crystal structure of the far-red fluorescent protein HcRed: inherent conformational flexibility of the chromophore. J Mol Biol, 2005, 349(1): 223~237
- 35 Fradkov A F, Verkhusha V V, Staroverov D B, *et al.* Far-red fluorescent tag for protein labelling. Biochem J, 2002, **368** (Pt 1): $17 \sim 21$
- 36 Shkrob M A, Yanushevich Y G, Chudakov D M, et al. Far-red fluorescent proteins evolved from a blue chromoprotein from *Actinia equina*. Biochem J, 2005, **392**(Pt 3): 649~654
- 37 Seitz G, Warmann S W, Fuchs J, et al. Visualization of xenotransplanted human rhabdomyosarcoma after transfection with red fluorescent protein. J Pediatr Surg, 2006, 41(8): 1369~1376
- 38 Yang M, Jiang P, Yamamoto N, *et al.* Real-time whole-body imaging of an orthotopic metastatic prostate cancer model expressing red fluorescent protein. Prostate, 2005, **62**(4): 374~379
- 39 Seitz G, Warmann S W, Fuchs J, et al. Imaging of cell trafficking and metastases of paediatric rhabdomyosarcoma. Cell Prolif, 2008, 41(2): 365~374
- 40 Winnard P T, Jr Kluth J B, Raman V. Noninvasive optical tracking of red fluorescent protein-expressing cancer cells in a model of metastatic breast cancer. Neoplasia (New York), 2006, 8(10): 796~ 806
- 41 Hoffman R M. A better fluorescent protein for whole-body imaging. Trends Biotechnol, 2008, 26(1): 1~4
- 42 Forner J, Binder S. The red fluorescent protein eqFP611: application in subcellular localization studies in higher plants. BMC Plant Biol,

2007, **7**: 28

- 43 Matsuura-Tokita K, Takeuchi M, Ichihara A, et al. Live imaging of yeast Golgi cisternal maturation. Nature, 2006, 441 (7096): 1007~ 1010
- 44 Campbell E M, Perez O, Melar M, et al. Labeling HIV-1 virions with two fluorescent proteins allows identification of virions that have productively entered the target cell. Virology, 2007, 360(2): 286~ 293
- 45 Lampe M, Briggs J A, Endress T, et al. Double-labelled HIV-1 particles for study of virus-cell interaction. Virology, 2007, 360(1): 92~104
- 46 Le L P, Le H N, Dmitriev I P, et al. Dynamic monitoring of oncolytic adenovirus in vivo by genetic capsid labeling. J Natl Cancer Inst, 2006, 98(3): 203~214
- 47 Klingen Y, Conzelmann K K, Finke S. Double-labeled rabies virus: live tracking of enveloped virus transport. J Virol, 2008, 82 (1): $237 \sim 245$
- 48 Russell J H, Keiler K C. Peptide signals encode protein localization. J Bacteriol, 2007, 189(21): 7581~7585
- 49 Divakaruni A V, Loo R R, Xie Y, et al. The cell-shape protein MreC interacts with extracytoplasmic proteins including cell wall assembly complexes in *Caulobacter crescentus*. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, **102**(51): 18602~18607
- 50 Fujioka Y, Utsumi M, Ohba Y, et al. Location of a possible miRNA processing site in SmD3/SmB nuclear bodies in Arabidopsis. Plant Cell Physiol, 2007, 48(9): 1243~1253
- 51 Rafalska-Metcalf I U, Janicki S M. Show and tell: visualizing gene expression in living cells. J Cell Sci, 2007, **120**(Pt 14): 2301~2307
- 52 Jares-Erijman E A, Jovin T M. Imaging molecular interactions in living cells by FRET microscopy. Curr Opin Chem Biol, 2006, 10 (5): 409∼416
- 53 Piston D W, Kremers G J. Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly. Trends Biochem Sci, 2007, **32**(9): 407~414
- 54 Sinnecker D, Voigt P, Hellwig N, et al. Reversible photobleaching of enhanced green fluorescent proteins. Biochemistry, 2005, 44 (18): 7085~7094
- 55 Goedhart J, Vermeer J E, Adjobo-Hermans M J, *et al.* Sensitive detection of p65 homodimers using red-shifted and fluorescent protein-based FRET couples. PLoS ONE, 2007, 2(10): e1011
- 56 van der Krogt G N, Ogink J, Ponsioen B, et al. A comparison of donor-acceptor pairs for genetically encoded FRET sensors: application to the Epac cAMP sensor as an example. PLoS ONE, 2008, 3(4): e1916
- 57 Jach G, Pesch M, Richter K, *et al.* An improved mRFP1 adds red to bimolecular fluorescence complementation. Nat Methods, 2006, 3 (8): 597~600
- 58 Fan J Y, Cui Z Q, Wei H P, *et al.* Split mCherry as a new red bimolecular fluorescence complementation system for visualizing protein-protein interactions in living cells. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 367(1): 47~53

Optical Spectra Diversity and *in vitro* Molecular Evolution of Red Fluorescent Proteins*

FAN Jin-Yu^{1,2}, CUI Zong-Qiang², ZHANG Xian-En ^{2)**}

(¹⁾ College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China; ²⁾ State Key Laboratory of Virology, Wuhan Institute of Virology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China)

Abstract Red fluorescent proteins (RFPs) produced from a number of *Anthozoa species* have been subjected to a series of *in vitro* molecular evolution, resulting in various emission spectra ranging from 570 nm to 655 nm and thus providing powerful tools for cellular imaging or even body imaging. This article briefly reviewed the optical properties, structures and mutagenesis of RFPs and their applications.

Key words red fluorescent protein, molecular evolution, optical property

- *This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (90606028, 30700169).
- **Corresponding author.
- Tel: 86-27-87199492, E-mail: x.zhang@wh.iov.cn
- Received: February 12, 2008 Accepted: April 12, 2008