

分子与细胞事件的光学可视化 ——解读 2008 年诺贝尔化学奖

储 军 施 华 杨 杰 张智红 骆清铭*

(华中科技大学 - 武汉光电国家实验室(筹)Britton Chance 生物医学光子学研究中心, 武汉 430074)

摘要 绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)及其突变体作为报告基因, 已被广泛应用于基因表达调控、蛋白质空间定位、生物分子之间相互作用、转基因动物以及药物药效评价和作用机理研究等方面, 极大地推动了现代生物学的发展. 随着光电信息技术的不断进步, 基于荧光报告基因的光学分子成像技术将在细胞、细胞网络、组织、器官和个体等不同层次实现分子与细胞事件的实时可视化, 从而在重大疾病的早期诊断和药物研发中发挥重要作用.

关键词 绿色荧光蛋白 GFP, 荧光共振能量转移技术(FRET), 多色标记, 光学分子成像

学科分类号 Q71

2008 年 10 月 8 日, 瑞典皇家科学院在斯德哥尔摩宣布, 将 2008 年诺贝尔化学奖授予三位美国科学家: 美国 Woods Hole 海洋生物学实验室的下村修(Osamu Shimomura), 哥伦比亚大学的马丁·沙菲尔(Martin Chalfie)和加州大学圣地亚哥分校的钱永健(Roger Y. Tsien), 以表彰他们发现和发展了绿色荧光蛋白(“for the discovery and development of the green fluorescent protein, GFP”). 其中, Shimomura 首次从水母(*Aequorea victoria* 来自北太平洋)中分离出 GFP. 他发现该蛋白质在紫外线照射下会发出明亮的绿光, Chalfie 首次发现在无任何底物和辅助因子情况下 GFP 在活细胞内发光, 因此, GFP 可标记细胞和蛋白质, Tsien 则率先提出了 GFP 发光的化学机制, 并发展了不同颜色的 GFP 突变体.

GFP 及其突变体已被广泛应用于基因表达调控、蛋白质空间定位、生物分子之间相互作用、转基因动物等方面^[1]. 基于新型功能荧光蛋白(如光激活荧光蛋白^[2]和光转换荧光蛋白^[3]、氧化还原敏感的 GFP^[4]等)的光学分子成像技术的发展, 为在活细胞乃至活体动物内研究基因表达和蛋白质功能提供了更多的选择空间.

化生物发光蛋白——水母素(aequorin), 除了水母素, 纯化产物中还有一个副产物, 就是后来的绿色荧光蛋白(GFP)^[5]. 纯化后的溶液在日光照射下呈现淡绿色, 而在钨灯下呈现黄色, 在紫外线照射下发射很强的绿色荧光. GFP 纯化后的 30 年中, 并没有太多研究人员关注并开展这方面的研究. 直到 1992 年, 道格拉斯·普雷沙(Douglas Prasher)才克隆出 GFP 的 cDNA 序列^[6], 但可惜的是他并没有继续深入研究. 真正意识到 GFP 应用前景的是 Chalfie, 1994 年他在《科学》(Science)上发表了题为“Green fluorescent protein as a marker for gene expression”的论文, 在该文中首次报道了 GFP 可以在细菌和线虫内发光, 为标记细胞和蛋白质提供了很好的方法^[7]. 与此同时, Tsien 率先提出了 GFP 发光的化学机制^[8], 详细阐述了 GFP 是如何发光的, 并于 1995 年通过单点突变(S65T)技术获得了荧光强度和光稳定性大大增强的 GFP 突变体(GFP-S65T), 该突变体激发峰转移至 488 nm, 而发射峰仍保持在 509 nm^[9]. 此后, Tsien 发展了颜色迥异的 GFP 突变体^[10,11]: 蓝色荧光蛋白 BFP(blue fluorescent

1 GFP 的发现与发展历程

1962 年 Shimomura 从大约 10 000 个水母中纯

* 通讯联系人.

Tel: 027-87792033, E-mail: qluo@mail.hust.edu.cn

收稿日期: 2008-10-13, 接受日期: 2008-10-14

protein)、青色荧光蛋白 CFP (cyan fluorescent protein) 和黄色荧光蛋白 YFP (yellow fluorescent protein). 这些不同颜色荧光蛋白的出现为光学分子成像的发展打下了坚实基础. 1996 年 GFP 晶体结构首次被解析^[11,12], 从此掀起了 GFP 研究的狂潮. 值得一提的是, Tsien 提出的荧光蛋白突变可能会导致荧光特性(光强和光谱等)改变的思想影响了众多科研人员, 后来者寻找新的荧光物种, 并对新荧光蛋白(如 DsRed 和 eqFP578 等)进行突变, 获得了不同于 GFP 的各种红色荧光蛋白^[13~16].

2 GFP 的结构与化学发光机制

野生型 GFP 由 238 个氨基酸残基组成, 分子质量为 27 ku. GFP 有两个吸收峰, 主峰在 395 nm, 次峰在 470 nm, 分别代表 GFP 生色团(chromophore)的去质子化和质子化状态. Yang 等^[12]的研究表明, GFP 由 11 个 β 折叠组成桶状的疏水中心(图 1), 桶状结构直径约 2.4 nm, 高约 4.2 nm. 该桶状结构非常致密, 使得 GFP 性质非常稳定, 只有在 6 mol/L 盐酸胍盐 90℃ 下或 pH > 12 或 pH < 4 时才会变性. 位于圆桶中央的 α 螺旋含有一个由六肽组成的发光中心, 而生色团是由其中的三肽 Ser65-Tyr66-Gly67 组成, 并经过自身催化环化、氧化后形成(图 2), 因此在严格厌氧条件

下 GFP 不能形成荧光. 生色团通过 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. 对于红色荧光蛋白, 生色团形成必须先经过类

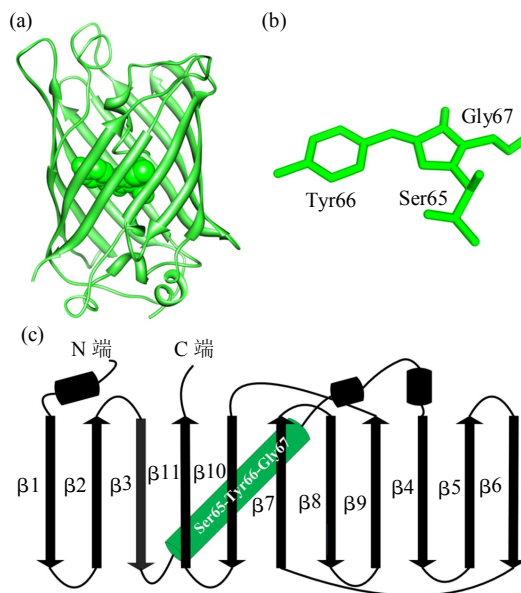


Fig. 1 The structure of GFP

图 1 GFP 的结构

(a) GFP 的晶体结构(PDB ID: 1w7s). (b) GFP 的生色团结构. (c) GFP 的二级结构, 图中带箭头的黑色长条表示 β 折叠. 绿色部分为含生色团的 α 螺旋.

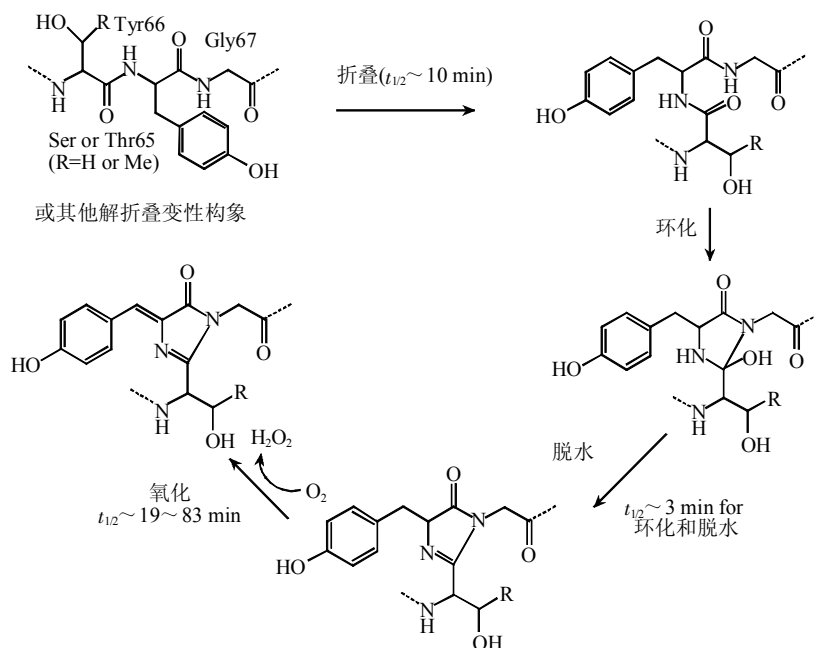


Fig. 2 Proposed mechanism for the chromophore formation in green fluorescent protein^[8]

图 2 GFP 生色团形成机制^[8]

GFP 表达后折叠环化, 在氧存在下, 由 65~67 位的氨基酸残基(Ser-Tyr-Gly)环化, 形成生色团.

似 GFP 的过程, 然后再经过氧化步骤, 即可发红光^[17]. 一般来说, 生色团的 Tyr66 和 Gly67 相对比较保守, 而 Ser65 相对易变, 因此可用其他氨基酸

替换 Ser. Tsien 对生色团氨基酸进行了突变, 并结合其他位置获得了三种不同颜色的 GFP 突变体: BFP、CFP 和 YFP(图 3).

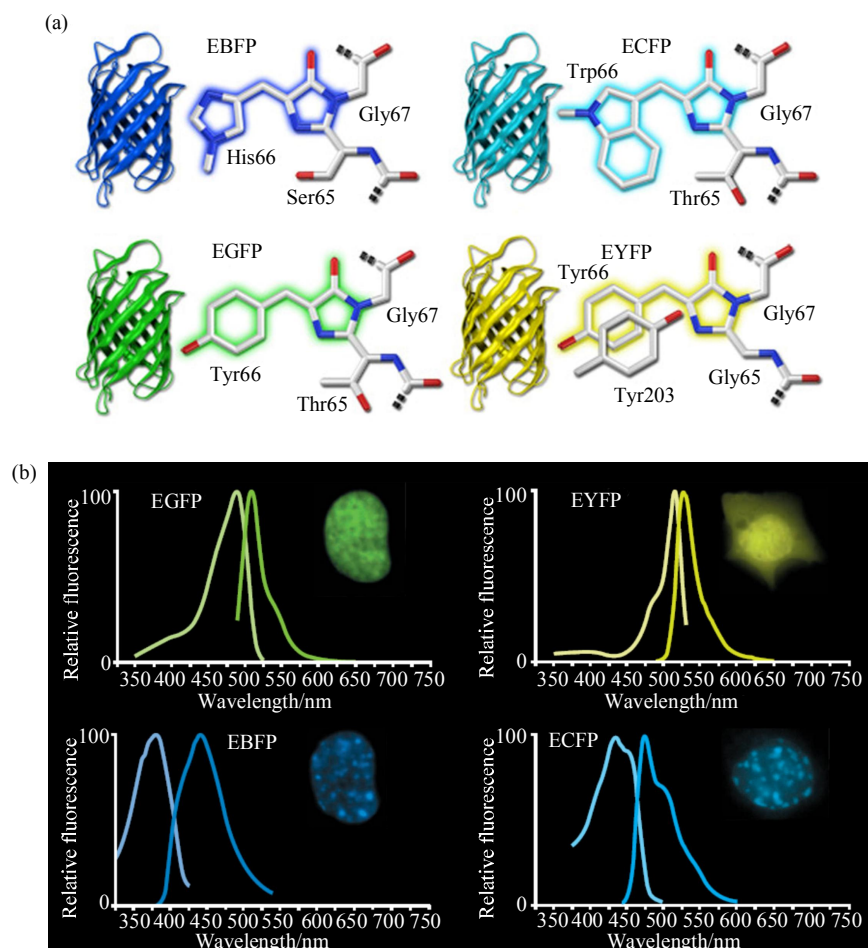


Fig. 3 Chromophore structures and spectra of common *Aequorea* FP derivatives

图 3 GFP 突变体的生色团结构和光谱

(a) GFP 突变体的生色团结构(<http://www.olympusconfocal.com/applications/fpcolorpalette.html>), 都为反式结构. (b) 荧光光谱和细胞图^[18].

3 典型应用

3.1 活细胞内基因表达及蛋白质-蛋白质相互作用的光学成像与可视化

随着人类基因组计划的完成, 蛋白质功能研究已成为生命科学面临的最重要任务之一. 传统的生化方法只能对蛋白质进行体外分析, 这些离体研究不能反映活细胞内蛋白质动力学. GFP 标记技术结合多种光学成像技术很好地回答了上述问题. 其中基于 GFP 的荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 技术是应用最广泛

的^[19], 它可实时动态监测蛋白质时空动力学. FRET 是供体分子和受体分子在近距离范围内 (<10 nm) 所发生的一种非辐射式能量转移现象, 目前在生物和医学中被广泛应用的是 CFP(供体)和 YFP(受体). 国内也开展了基于 FRET 的蛋白质功能研究, 并在蛋白酶活性检测^[20~23]和钙离子浓度^[24]方面取得了较好进展. FRET 除了可研究蛋白酶活性^[25]、蛋白质构象^[26]、蛋白质磷酸化^[27]和钙离子浓度测定^[28]等之外, 蛋白质相互作用的 FRET 检测是目前最受关注的焦点. 细胞内众多生命活动都是通过蛋白质复合体来介导的, 而蛋白质复合体则是多

个蛋白质动态且有序相互作用的结果。最近发展起来的三色 FRET 技术^[29](three-chromophore FRET)可追踪这些复合体内蛋白质在活细胞内是如何、何时、何地发生相互作用的。研究人员通过基因工程技术将不同颜色的荧光蛋白(CFP/YFP/RFP)分别标记三种不同蛋白质(Grb2/Cbl/EGFR), 因此, 细胞中存在三对可能的 FRET 对: Grb2-CFP/Cbl-YFP、

Grb2-CFP/EGFR-RFP 和 Cbl-YFP/EGFR-RFP, 采用 FRET 技术对每对荧光蛋白成像, 发现 EGFR/Grb2 和 Grb2/Cbl 可直接发生相互作用, 而 Cbl 则是通过和 Grb2 结合后与 EGFR 间接相互作用(图 4)。三色 FRET 技术不仅有助于理解细胞信号传导流机制, 而且有助于开发抑制蛋白质相互作用药物。

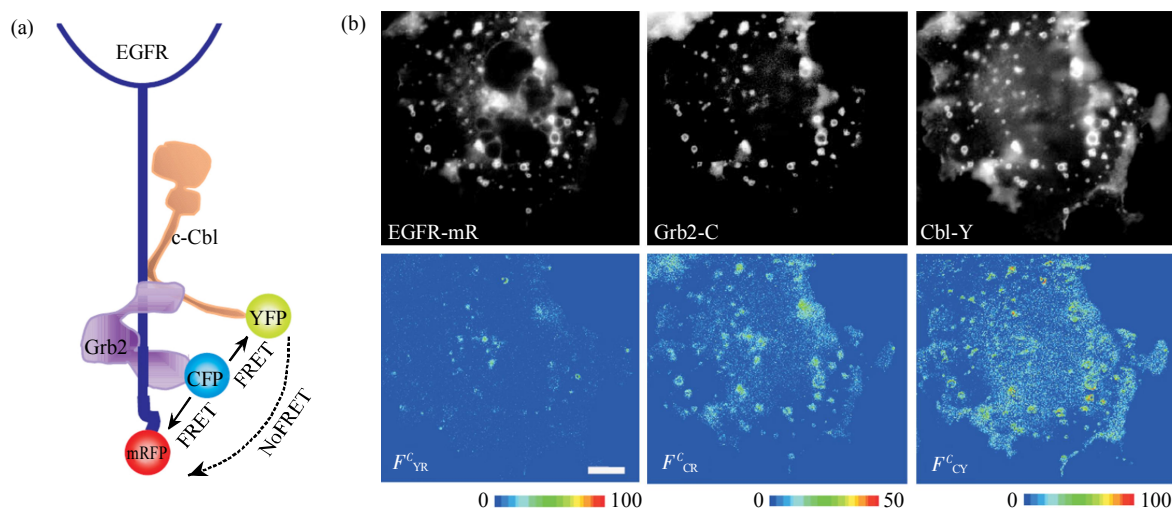


Fig. 4 3-FRET analysis of EGFR-mRFP interactions with a pair of Cbl-YFP and Grb2-CFP, or a pair of Cbl-CFP and Grb2-YFP^[22]

图 4 3-FRET 检测 EGFR、Cbl 和 Grb2 之间的相互作用^[22]

(a) 3 对蛋白质相互作用示意图。(b) 共转染后的 FRET 荧光图。FRET 效率用伪彩色表示, 越红说明蛋白质相互作用越强。标尺为 10 μm 。

3.2 不同神经元的多色标记与光学成像

结合其他颜色荧光蛋白, 比如红色荧光蛋白, 可对同一个细胞的不同细胞器^[30]和不同细胞^[31,32]进行标记。其中最具代表性的实验莫过于 2007 年的“脑虹”(brainbow)^[31](图 5)。“脑虹”是一种脑细胞彩色成像技术。哈佛大学的研究人员通过转基因技术将不同光谱的荧光蛋白基因(CFP/YFP/RFP)整合进实验老鼠的基因组, 并且只让它们在老鼠脑神经元表达。当神经元内的 Cre 重组酶表达后可激活荧光蛋白表达, 从而使得神经元内同时存在三种以及三种以上的荧光蛋白。由于研究人员采用类似显示器彩色原理, 三种不同荧光蛋白颜色可形成多种颜色, 因此不同的神经元呈现出不同的颜色。利用“脑虹”, 研究者可对老鼠大脑内部的不同部位或不同发育阶段脑神经进行标记, 从而能够追踪神经元在神经系统中的活动, 获得对神经系统的组织和功能的新理解。“脑虹”技术, 利用丰富的色彩, 极其清楚地显示出老鼠大脑细胞的结构。这在极大程

度上能够帮助科学家在基因的图谱上, 更快地建立大脑神经网络详尽图表。同时, “脑虹”技术也为人类认知并治愈疾病打开了一扇大门, 通过“脑虹”成像, 科学家开始研究孤独症、智力障碍、狂躁症、抑郁症以及学习障碍等可能和大脑的神经元回路(neuronal circuit)问题相关的疾病。

3.3 小动物体内恶性肿瘤生长过程及药物作用效果的实时光学成像监测

转移是恶性肿瘤的生物学特性之一, 已成为绝大多数肿瘤患者治疗失败和死亡的主要原因之一。通过在老鼠体内复制人类肿瘤, 可在体研究肿瘤的发生发展过程并阐明肿瘤转移机制。基于荧光蛋白的整体荧光成像(whole-body imaging)是一种非侵入的小动物成像技术, 可揭示肿瘤发生发展的细胞和分子机制, 非侵入性在体评价抗肿瘤药物疗效^[33](图 6), 其分辨率可达到活体的单个荧光细胞^[34]。国内也开展了小动物肿瘤生长和治疗研究^[35]。目前肺癌、前列腺癌、黑色素瘤、结肠癌、胰腺癌、乳

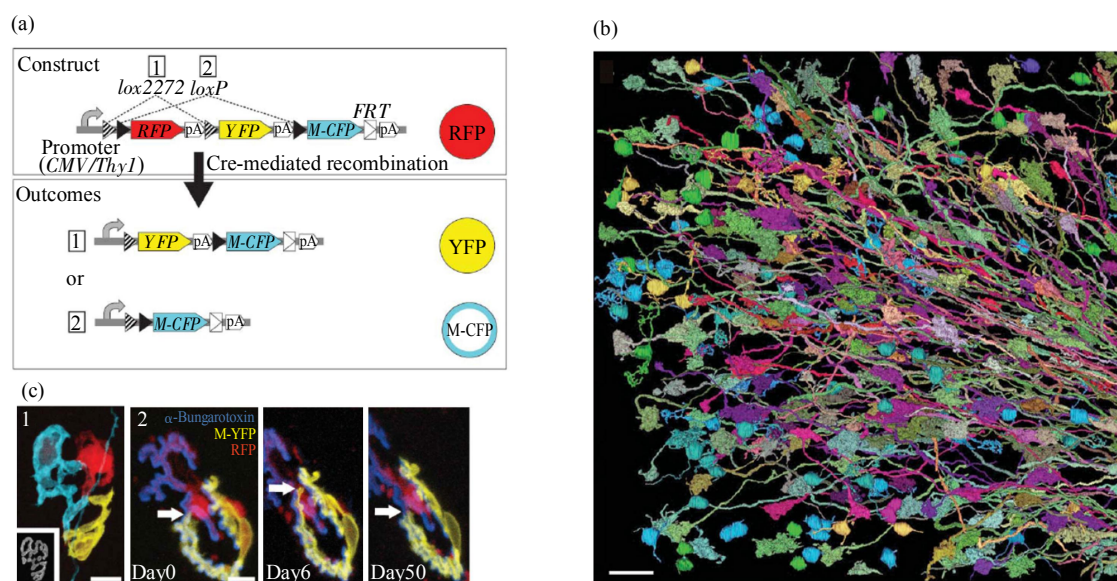


Fig. 5 Brainbow system and application in nervous system^[31]

图 5 脑虹系统和在神经系统应用^[31]

(a) 脑虹系统的载体。在重组酶 Cre 没有激活前, 只有 RFP 表达。Cre 激活后, 可激活 YFP 和 M-CFP, 使其表达。(b) 脑虹系统对小脑小叶(Cerebellar flocculus)标记。图为小叶部分区域(341 个神经轴突和 93 个颗粒细胞, $160 \mu\text{m}^2 \times 65 \mu\text{m}$)的三位重构图。标尺为 $15 \mu\text{m}$ 。(c) 神经胶质细胞的发育图。子图 1 中三个 Schwann 细胞(蓝色、黄色和红色)在神经肌肉接头处。子图 2 反映了这三个细胞随着脑发育的变化。标尺为 $10 \mu\text{m}$ 。

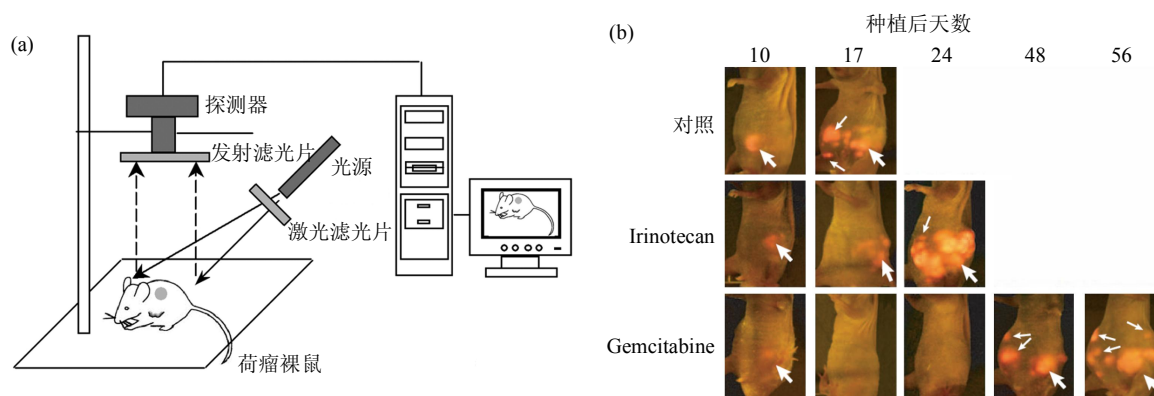


Fig. 6 Whole-body imaging to monitor tumor cell growth and treatment efficacy

图 6 整体成像监测肿瘤细胞的生长和治疗效果

(a) 整体荧光成像系统示意图。(b) 整体荧光成像监测 Mia-PaCa-2 胰腺癌细胞(表达红色荧光蛋白)的生长以及治疗效果^[31]。肿瘤细胞种植后 10, 17, 24, 48 和 56 天分别进行成像。粗箭头表示原位灶, 细箭头表示转移灶。与对照组进行比, Irinotecan 药物部分抑制原位灶和转移灶的生长, 而 Gemcitabine 药物则在一个月之内大大抑制肿瘤的生长, 但是一个月之后, 继续治疗也不能抑制其加速生长和向远部转移。

腺癌、卵巢癌和脑癌的原位 GFP 肿瘤的整体荧光成像模型已建立^[36], 并利用已建立的转移鼠(MetaMouse®)和血管鼠(AngioMouse®)进行抗肿瘤生长、转移和血管生成的在体药物筛选和评价(Anticancer Inc. <http://www.metamouse.com/>)。

4 展 望

尽管遗传编码的荧光蛋白已被广泛应用于生物医学的基础研究、疾病诊断(特别是恶性肿瘤的早期发现)和药物研发, 并取得了重大进展, 但是荧光蛋白本身仍然存在一些缺陷。比如, 有些荧光蛋

白在细胞内容易漂白, 不适合长时间或者时间序列成像, 而有些荧光蛋白易受环境(pH 和离子)影响, 很难在细胞内酸性细胞器(内质网和内涵体)研究蛋白质功能. 另外, 目前很多光学分子成像技术也或多或少存在一些问题, 比如时间和空间分辨率不是很高. 因此迫切需要生物学家和物理学家开发性能更好的荧光蛋白和光学成像系统.

目前为止, 大约有几十种不同特性的荧光蛋白可供选择使用, 这些蛋白质的荧光光谱几乎覆盖了整个可见区^[1]. 一个好的荧光蛋白需具备以下几个特点: 抗酸、抗漂白、亮度高(消光系数与量子产率乘积)、成熟快及单体结构. 目前大部分突变都集中在光谱、亮度、成熟和单聚体方面, 而对于光稳定性(抗漂白性)研究几乎没有. 考虑到荧光蛋白的生物应用方向和意义, 笔者认为目前荧光蛋白有三个方向值得重点深入研究: a. 利用 Tisen 的新方法继续筛选其他耐漂白的荧光蛋白. 2008 年 Tsien 首次提出新方法筛选出最耐漂白的单体荧光蛋白(TagRFP-T)^[37]. b. 开发红移的荧光蛋白, 尤其是近红外蛋白(Near Infrared fluorescent protein), 为小动物荧光成像提供更深的成像深度(根据生物组织中的光子传输规律, 近红外光传输路径相对较长). 2007 年俄罗斯 Lukyanov 小组报道了远红色荧光蛋白(far-red fluorescent protein)-Katushka(发射波长为 635 nm)^[16], 该蛋白质是目前在大于 620 nm 范围内最亮的荧光蛋白, 适合小动物荧光成像, 但仍然不是最佳的. c. 筛选 stokes 位移大的荧光蛋白. 虽然 FRET 已经被广泛应用于生物和医学各个领域, 但 FRET 仍然存在串扰(cross-talk)问题, 准确的 FRET 需要校正才能获得, 这在一定程度上会限制其发展. 而 stokes 位移大的蛋白质可以避免这些问题. 2008 年 Tsien 以前的学生 Campbell 通过大量的筛选获得了非常理想的荧光蛋白 mAmetrine(激发和发射波长分别为 406 nm 和 526 nm)^[38], 为多色 FRET 提供了很好的平台.

目前, 基于荧光显微镜(包括激光共聚焦显微成像、多光子激发荧光显微成像、随机扫描多光子显微成像系统^[39]等)的荧光漂白后恢复(fluorescence recovery after photobleaching, FRAP)、荧光漂白后损失(fluorescence loss in photobleaching, FLIP)、荧光关联谱(fluorescence correlation spectroscopy, FCS)、荧光寿命成像(fluorescence lifetime imaging, FLIM)以及 FRET^[19]和新发展起来的双分子荧光互补(bimolecular fluorescence complementation,

BiFC)技术^[40], 都已经成为活细胞内研究蛋白质运动和功能的强有力工具. 然而, 能满足细胞网络、组织、器官和个体等水平的成像检测系统还不成熟, 需要在深入研究光与生物体相互作用规律的基础上, 利用现代光电技术, 发展性能更加优势的光学成像系统, 包括提高成像对比度(高灵敏地辨识不同的分子事件)和时间与空间分辨率.

需要特别强调的是, 要实现分子与细胞事件的可视化, 除发展前面提到的高性能荧光蛋白外, 还需要建立合适的生物学模型, 例如肿瘤模型、神经性疾病模型等. 在此基础上, 运用现代光电信息技术, 针对不同层次生物学模型的成像需求, 搭建多模式高分辨光学成像系统, 如显微成像系统、高分辨组织结构与功能成像系统、小动物扩散光学层析成像系统等. 基于高分辨光学成像所测量的荧光数据, 通过信息整合和模拟, 最终实现上述生物学模型中所发生的分子与细胞事件的可视化. 因此, 探针、生物学模型、成像系统和信息整合是分子与细胞事件可视化的四个方面, 互相制约, 应该全面协调发展.

参 考 文 献

- 1 Muller-Taubenberger A, Anderson K I. Recent advances using green and red fluorescent protein variants. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, **77**(1): 1~12
- 2 Patterson G H, Lippincott-Schwartz J. A photoactivatable GFP for selective photolabeling of proteins and cells. *Science*, 2002, **297**(5588): 1873~1877
- 3 Chudakov D M, Verkhusha V V, Staroverov D B, *et al.* Photoswitchable cyan fluorescent protein for protein tracking. *Nat Biotechnol*, 2004, **22**(11): 1435~1439
- 4 Hanson G T, Aggeler R, Oglesbee D, *et al.* Investigating Mitochondrial Redox Potential with Redox-sensitive Green Fluorescent Protein Indicators. *J Biol Chem*, 2004, **279**(13): 13044~13053
- 5 Shimomura O, Johnson F H, Saiga Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol*, 1962, **59**: 223~229
- 6 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
- 7 Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, *et al.* Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 1994, **263**(5148): 802~805
- 8 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
- 9 Heim R, Cubitt A, Tsien R Y. Improved green fluorescence. *Nature*, 1995, **373**(6516): 663~664

- 10 Heim R, Tsien R Y. Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence energy transfer. *Curr Biol*, 1996, **6**(2): 178~182
- 11 Ormo M, Cubitt AB, Kallio K *et al.* Crystal structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein. *Science*, 1996, **273** (5280): 1392~1395
- 12 Yang F, Moss L G, Phillips G N. The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat Biotech*, 1996, **14**(10): 1246~1251
- 13 Campbell R E, Tour O, Palmer AE, *et al.* A monomeric red fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**(12): 7877~7882
- 14 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
- 15 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
- 16 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
- 17 Miyawaki A, Karasawa S. Memorizing spatiotemporal patterns. *Nat Chem Biol*, 2007, **3**(10): 598~601
- 18 Patterson G, Day R N, Piston D. Fluorescent protein spectra. *J Cell Sci*, 2001, **114**(Pt 5): 837~838
- 19 Lippincott-Schwartz J, Snapp E, Kenworthy A. Studying protein dynamics in living cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, **2**(6): 444~456
- 20 Yang J, Zhang Z, Lin J, *et al.* Detection of MMP activity in living cells by a genetically encoded surface-displayed FRET sensor. *Biochim Biophys Acta*, 2007, **1773**(3): 400~407
- 21 Zhang Z, Lin J, Chu J, *et al.* Activation of caspase-3 noninvolved in the bystander effect of the herpes simplex virus thymidine kinase gene/ganciclovir (HSV-tk/GCV) system. *Journal of Biomedical Optics*, 2008, **13**(3): 031209
- 22 Lin J, Zhang Z, Yang J, *et al.* Real-time detection of caspase-2 activation in a single living HeLa cell during cisplatin-induced apoptosis. *Journal of Biomedical Optics*, 2006, **11**(2): 024011
- 23 Lin J, Zhang Z, Zeng S, *et al.* TRAIL-induced apoptosis proceeding from caspase-3-dependent and -independent pathways in distinct HeLa cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, **346**(4): 1136~1141
- 24 Liu X, Gong H, Li X, Zhou W. Monitoring calcium concentration in neurons with cameleon. *J Biosci Bioeng*, 2008, **105**(2): 106~109
- 25 Takemoto K, Nagai T, Miyawaki A, *et al.* Spatio-temporal activation of caspase revealed by indicator that is insensitive to environmental effects. *J Cell Biol*, 2003, **160**(2): 235~243
- 26 Sharma S, Chakraborty K, Müller B K, *et al.* Monitoring protein conformation along the pathway of chaperonin-assisted folding. *Cell*, 2008, **133**(1): 142~153
- 27 Offterdinger M, Georget V, Girod A, *et al.* Imaging Phosphorylation Dynamics of the Epidermal Growth Factor Receptor. *J Biol Chem*, 2004, **279**(35): 36972~36981
- 28 Palmer A E, Tsien R Y. Measuring calcium signaling using genetically targetable fluorescent indicators. *Nat Protoc*, 2006, **1**(3): 1057~1065
- 29 Galperin E, Verkhusha V V, Sorkin A. Three-chromophore FRET microscopy to analyze multiprotein interactions in living cells. *Nat Methods*, 2004, **1**(3): 209~217
- 30 Kogure T, Karasawa S, Araki T, *et al.* A fluorescent variant of a protein from the stony coral *Montipora* facilitates dual-color single-laser fluorescence cross-correlation spectroscopy. *Nat Biotechnol*, 2006, **24**(5): 577~581
- 31 Livet J, Weissman T A, Kang H, *et al.* Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system. *Nature*, 2007, **450**(7166): 56~62
- 32 Hutter H. Five-colour *in vivo* imaging of neurons in *Caenorhabditis elegans*. *J Microsc*, 2004, **215**(Pt 2): 213~218
- 33 Hoffman R M. The multiple uses of fluorescent proteins to visualize cancer in vivo. *Nat Rev Cancer*, 2005, **5**(10): 796~806
- 34 Yamauchi K, Yang M, Jiang P, *et al.* Development of real-time subcellular dynamic multicolor imaging of cancer-cell trafficking in live mice with a variable-magnification whole-mouse imaging system. *Cancer Res*, 2006, **66**(8): 4208~4214
- 35 Xiong T, Zhang Z, Liu B F, *et al.* *In vivo* optical imaging of human adenoid cystic carcinoma cell metastasis. *Oral Oncol*, 2005, **41**(7): 709~715
- 36 Hoffman R. Green fluorescent protein imaging of tumour growth, metastasis, and angiogenesis in mouse models. *Lancet Oncol*, 2002, **3**(9): 546~556
- 37 Shaner N C, Lin M Z, McKeown M R, *et al.* Improving the photostability of bright monomeric orange and red fluorescent proteins. *Nat Methods*, 2008, **5**(6): 545~551
- 38 Ai H W, Hazelwood K L, Davidson M W, *et al.* Fluorescent protein FRET pairs for ratiometric imaging of dual biosensors. *Nat Methods*, 2008, **5**(5): 401~403
- 39 Zeng S, Lv X, Bi K, *et al.* Analysis of the dispersion compensation of acousto-optic deflectors used for multiphoton imaging. *Journal of Biomedical Optics*, 2007, **12**(2): 024015
- 40 Kerppola T K. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells. *Annu Rev Biophys*, 2008, **37**: 465~487

Optical Visualization of Molecular and Cellular Events: To Decode 2008 Nobel Prize in Chemistry

CHU Jun, SHI Hua, YANG Jie, ZHANG Zhi-Hong, LUO Qing-Ming*

(Britton Chance Center for Biomedical Photonics, Huazhong University of Science and Technology-Wuhan

National Laboratory for Optoelectronics, Wuhan 430074, China)

Abstract Green Fluorescent Protein (GFP) and its mutants, as reporter genes, are widely applied in the regulation of gene expression, spatial location of protein, interaction between biological molecules, transgenic animal, evaluation of drug effect, and study of drug action mechanism, infinitely promoting the development of modern biology. With the constant progress of optoelectronic information techniques, optical molecular imaging techniques, based on the fluorescent report genes, will lead to the real time visualization of molecular and cellular events in the different levels such as cell, cell network, tissue, organ, and body, and thus play an important role in the early diagnosis of dread disease as well as drug discovery and development.

Key words GFP, FRET, multi-color label, optical molecular imaging

*Corresponding author.

Tel: 86-27-87792033, E-mail: qluo@mail.hust.edu.cn

Received: October 13, 2008 Accepted: October 14, 2008