

一个绿色荧光蛋白 K79R 突变 *gfp* 基因的鉴定与表达*

周俊初 史巧娟 马立新 谢波

华中农业大学, 农业部农业微生物重点实验室, 武汉 430070

摘要 在开展蓝色荧光蛋白基因 *bfp* 的克隆表达研究中, 发现一个发强绿色荧光的大肠杆菌突变株, 从中提取质粒命名为 pHN122. 经酶切鉴定、亚克隆和序列分析测定结果证实其上含有一个 *bfp* 和一个发生了 K79R 突变的 *gfp* 基因. 光谱分析结果表明: GFPK79R 的光谱特性虽与野生型 *gfp* 相同, 但其发光强度提高了 1.25~2.44 倍.

关键词 绿色荧光蛋白 突变基因 *gfp*K79R 光谱特性

绿色荧光蛋白(GFP)是 Shimomura 等于 1962 年在研究水母生物荧光现象时首先报道的^[1], Ward 等对 GFP 的结构和功能进行了研究, 证实 GFP 是分子量为 30ku 的单体蛋白, 其生色基因由丝氨酸、脱水酪氨酸和甘氨酸构成, 当受到 395 nm 近紫外光或 470 nm 蓝色光激发后, 在 Ca^{2+} 激活下能发出 510 nm 的绿色荧光^[2,3]. 1992 年, Prasher 等首次从维多利亚水母(*Aequorea victoria*)的 cDNA 文库中克隆到绿色荧光蛋白基因 *gfp10*^[4], 1994 年, Chalfie 等和 Wang 等两个研究小组分别成功地使 *gfp* 在大肠杆菌、线虫和果蝇中表达^[5,6]. 由于 GFP 具有独特的分子结构、简单的发光机理、稳定的化学性质和可在活体细胞内表达等优点, 并随着相应的原位检测仪器(如激光共聚焦扫描显微镜)的出现, 近年来已出现了 GFP 研究的热潮. Heim 等报道了发蓝色荧光的突变基因 *bfp*^[7]和发青色荧光的 *cfp*^[8], Ormo 等报道了发黄色荧光的突变基因 *yfp*^[9], Cormack 等报道了 S65T, V68L 和 S72A 等 3 个突变 *gfp* 基因^[10], Andersen 等报道了半衰期缩短的、瞬间表达的 *gfp* 突变基因^[11], 马立新等构建了以 *gfp* 为报告基因的启动子探针载体^[12]. 1996 年在美国 Clontech 实验室建立了国际 GFP 信息网, 而且从 1999 年起已召开了两届国际 GFP 学术讨论会.

在构建以 *bfp* 为报告基因的启动子探针载体时, 我们将 pGEMX-P4(pGEMX-2 上克隆有 *bfp* 基因, Amp^R, 美国 California, San Diego 大学 Dr. Heim 惠赠)上的 *bfp* 用 *Bam* H I 和 *Nde* I 进行不完全的双酶切后经 pET-11 再克隆至 pIJ2925(pUC19 衍生质粒, Amp^R, 美国 Indiana 大学 Dr. Janssen 惠赠)得到重组质粒 pHN121, 用于转化 *E. coli* TG1 时发现转化子受长波紫外线激发后, 在大量发蓝色荧光的菌落中有一个十分醒目的发绿色荧光的小菌落, 从该菌落抽提质粒, 命名为 pHN122.

用 *Sal* I, *Bam* H I 和 *Eco* R V 单酶切 pHN122 和 pHN121 分别只产生 4.7 和 3.7 kb 一条带, 用 *Bgl* II 酶切时分别产生 2.7 kb + 2.0 kb 和 2.7 kb + 1.0 kb 两条带, 用 *Xba* I 和 *Eco* R I 酶切时分别产生 3.7 kb + 1.0 kb 和 3.7 kb 酶切带, 证明 pHN122 可能比 pHN121 多一个拷贝的 *gfp* 基因(图 1).

为了进一步证实 pHN122 上确实含有一个 *bfp* 和一个 *gfp* 基因, 用 *Xba* I 和 *Eco* R I 双酶切 pHN122, 回收 1kb 的片段, 连接到相同双酶切的 pIJ2925 上, 将经转化 *E. coli* DH5 α 并利用 α -互补法获得的重组转化子用长波紫外激发检测, 果然发现有发蓝光与发绿光的两种白色菌落. 提取质粒后分别命名为 pHN122EXB 和 pHN122EXG.

2001-08-27 收稿, 2001-11-09 收修改稿

* 国家“八六三”计划和国家自然科学基金资助项目(批准号: 39770013)

E-mail: zjc42926@public.wh.hb.cn

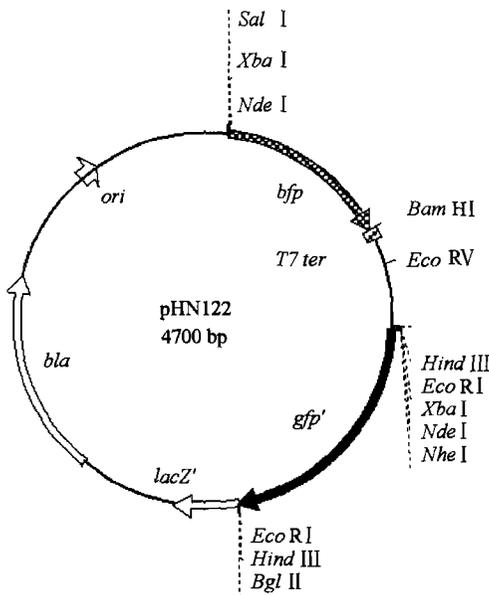


图 1 质粒 pHN122 的物理图谱

分别将质粒 pHN122EXB 和 pHN122EXG 中的 1kb *Bgl* II 片段亚克隆到测序载体 pUC118 上, 并同时 将 pHN122 的 1kb *Nco* I 片段(含 *bfp* 3' 端大部分 序列和 *gfp* 5' 端小部分序列, 见图 2) 也克隆到 pUC118 上进行双向序列分析, 结果见图 2. 测序结 果表明: pHN122 上确实同时存在各一个拷贝的 *gfp* 和 *bfp* 基因.

由于已发现 pHN122 上的 *gfp* 基因使发光强度 明显增强, 将本研究的测序结果与已报道的野生型 *gfp* 基因编码蛋白的一级结构比较, 发现本研究发 现的 *gfp* 基因所编码的氨基酸仅在第 79 位由赖氨 酸(K)变为精氨酸(R)和第 80 位由谷氨酰胺(Q)变 为精氨酸(R)(图 3). 鉴于 Q80R 突变体是已报道的 在从 cDNA 克隆 *gfp* 基因时引入的对其光谱特性和 强度没有影响的突变^[5], 而 K79R 突变在文献中未 报道, 因此将本研究发现的突变基因命名为 *gfp*K79R(GenBank: AF183395).

```

TAATTTTGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAGTAAAGGAGAAGAAGCTTTTCACTGGAGTT
GTCCCAATTCCTTGTGAATTAGATGGTGATGTAATGGGCACAAATTTCTGTCAGTGGAGAGGGTGAA
GGTGATGCAACATACGGAATAACTTACCCCTTAAATTTATTGCACTACTGGAAAACCTCTGTTCCATGGC
NcoI
CAACTCTGTCACCTACTTTCCTCATGGTGTTCATGCTTTTCAAGATACCCAGATCATATGAAACGGCA
TGAATTTTCAAGAGTGCATGCCCGAAGGTTATGTTCAAGGAAAGAACTATATTTTTCAAGATGACGG
GAACTACAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCCCTTGTATAGAAATCGAGTAAAAGG
TATTGATTTAAAGAAGATGGAACATTCTTGGACACAAATGGAATACACTATAACTCACACAATGTAT
ACATCATGGCAGACAAACAAAAGAATGGAAATCAAAAGTTAACTTCAAAATGACACAAACATTGAAGATG
GAAGCGTTCAACTAGCAGACCATATCAACAAAATCTCCAATGGCGATGGCCCTGTCTTTTACCAG
ACAACCAATACCTGTCCACACAATCTGCCCTTTGAAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACCACATGGTC
PvuII BsmHI
CTTCTGAGTTTGTAAACAGCTGCTGGGATTACATGGCATGGATGAACATATAAAAATAAGGATCC
GGCTGCTAAACAAGCCCGAAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAG
CATAACCCCTTGGGGCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGCTGAAAAGGAGGAACATATATC
EcoRV
CGGATATCCCGCAAGAGGCCCGGCAGTACCGGCATAACCAAGCCTATGCCTACAGCATCCAGG
GTGACCGTCCGAGGATGACGATGAGCGCATTTGTTAGATTCATACACGGTGCCTGACTGCGTT
AGCAATTTAACTGTGATAAAGTACCCGATTAAGCTTATCGATGATAAGCTGTCAAACATGAGA
XbaI NdeI NheI
ATTCCTCCAGATCCTCTAGAAATAATTTTGTGTTA ACTTTAAGAAGGAGATATACATATGCTGAGC
AAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCTCAATTTCTGTTGAATTAGATGGTGATGTAATGGGCAC
AAATTTCTGTCAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGAATAACTTACCCCTTAAATTTATTGTC
NcoI
ACTACTGGAATAACTCTGTTCCATGGCCAACTTGTCACTACTTCTCTTATGGTGTTCATGCTTT
NdeI
TCAAGATACCCAGATCATATGAGACGGCATGACTTTTTCAAGAGTGCCATGCCCGAAGGTTATGTACA
GGAAAGAACTATATTTTTCAAGATGACGGGAACTACAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTGAAAGGTG
ATACCCCTTGTATAGAAATCGAGTAAAAGGTTATGATTTAAAGAAGATGGAACATTCTTGGACACAA
ATTGGAATACAACATAACTCACAAATGTATACATCATGCAGACAAACAAAAGAATGGAATCAAAGTT
AACTTCAAAATGACACAAACATTGAAGATGGAAGCGTTCAACTAGCAGACCATATCAACAATAATAC
TCCAATTTGGCGATGGCCCTGTCTTTTACCAGACAACCATTAACCTGTCCACACAATCTGCC
PvuII
CTTTGAAAAGATCCCAACGAAAAGAGACCAATGGTCTTCTTGTGTTTGAACAGCTGCTGGGA
TTACATGGCATGGATGAACATAAAAATAATGATCCAGACTTCCAATTTGACACTAAAAGTGTCCGA
ACAATTAATAAATCTCAGGGTCTCTGGTTAAATCAAGGCTGAGATATTTATATATTTATAGAT
TCATTAATAATGTATGAATAATTTATGATGTTATGATAGAGGTTATTTCTTATTAACAGGCTA
CTTGGAGTGTATTTCTTAATTTATATTAATTACAATTTGATTTGACTTGCTAAAAAGCGGCCGCGG
EcoRI
CGGCCGGAATTCATATCAAGCTT
    
```

图 2 pHN122 上 *bfp-gfp* 片段的序列分析结果

图中斜线部分为编码区, 阴影部分是生色基团的位置, ATG 为起始密码, TAA 为终止密码. *gfp* 与 *bfp* 之间约 300bp DNA 序列是当初构建 *bfp* 大肠杆菌表达质粒时引入的 T7 终止子结构

245.012, 可见 K79R 受 399 nm 近紫外光激发后产生的 512 nm 发射峰的荧光强度比 GFP 提高了 1.25 倍(图 5(b)). 当 GFPK79R 的激发波长为 483 nm 时, 最大发射峰位于 508.2 nm, 荧光强度为 612.354; GFP 的激发波长为 483 nm 时, 最大发射峰位于 508.7 nm, 荧光强度为 251.35, 可见 GFPK79R 在 483 nm 副激发峰作用下的荧光强度比 GFP 高 2.44 倍(图 5(c)).

与文献上已报道的来源于定点诱变 *gfp* 突变基因不同, 本研究发现的 K79R 突变体是新的自发突变体, 虽然其突变位点离生色基团稍远而未能改变其光谱特性, 但仍显著提高了 GFP 蛋白的发光强度.

参 考 文 献

- 1 Shimomura O, et al. Extraction, purification and properties of a bioluminescent protein from the luminous hudsonian. *J Cell Comp Physiol*, 1962, 59: 223
- 2 Ward W W. Energy transfer processes in bioluminescence. *Photochem Photobiol Rev*, 1979, 4: 1
- 3 Ward W W, et al. Spectrophotometric identity of the energy transfer chromophores in *Renilla* and *Aequorea* green-fluorescent protein. *Photochem Photobiol*, 1980, 31: 611
- 4 Prasher D C, et al. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, 1992, 111: 229
- 5 Chalfie M, et al. Green-fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 1994, 263: 802
- 6 Wang S, et al. Implication for *bcd* mRNA location from spatial distribution of *exu* protein in *Drosophila oogenesis*. *Nature*, 1994, 369: 400
- 7 Heim R, et al. Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green-fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 12501
- 8 Heim R, et al. Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescent resonance energy transfer. *Curr Biol*, 1996, 6: 178
- 9 Ormo M, et al. Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science*, 1996, 273: 1392
- 10 Cormack B P, et al. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*, 1996, 173: 33
- 11 Andersen J B, et al. New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64: 2240
- 12 马立新, 等. 以绿色荧光蛋白基因为报告基因的广宿主启动子探针载体的构建和应用. *微生物学报*, 1999, 39: 408

“湖泊及流域科学学科发展与优先领域学术研讨会”在南京召开

由国家自然科学基金委员会地球科学部组织、中国科学院南京地理与湖泊研究所承办的“湖泊及流域科学学科发展与优先流域学术研讨会”3月25~28日在南京召开. 国内各主要研究单位及高校的60余位专家学者参加了会议.

经过三天的研讨, 与会专家普遍认为, 作为一门正在发展的科学, 湖泊与流域科学学科体系构建十分重要. 尽管在不同时期, 学科关注和研究的方向会有所偏重, 但是不能因为研究方向的变化而改变基本的学科构架和分支学科的布设. 作为自然科学的组成部分, 物理学、化学和生物学仍然是认识和研究湖泊及流域的基础; 而湖泊独特的水生与沉积环境, 又为开展与生物学、地质学、水文学以及气象与气候学的交叉研究提供了天然实验场地. 从目前发展情况看, 对湖泊化学过程和生物过程研究的比较多, 但对湖泊动力学考虑得不多. 而这种过程恰恰可能和目前最为关注的湖泊环境问题, 如污染物富集、生物演化都有很大关系. 因此, 湖泊动力学、湖泊水文学、湖泊沉积学等都是湖泊科学重要的分支学科. 关于湖泊和流域科学如何定位, 尚需进一步明晰.

鉴于目前的认识, 我们至少可以说湖泊与流域科学是具有地理学性质的科学. 加强湖泊与流域相互作用的研究, 抓住物质输移与平衡的研究, 强调人类活动影响下的湖泊和流域演化特性的研究, 是未来湖泊地理学研究的重要方向.

(供稿: 冷疏影 宋长青)