

# 诺贝尔奖级科学成就究竟是怎样取得的？ ——绿色荧光蛋白的发现、表达与开发

周程

**摘要:**第二次世界大战结束后不久,大科学开始兴起,科学知识按“指数规律”持续高速增长,但生物学的发展却遇到一个瓶颈:人们无法观察蛋白质在活体细胞中的运动与变化情况。进入20世纪后期,以绿色荧光蛋白为代表的一系列生物荧光标记材料的发现与应用,为生物学的大发展提供了一种全新的工具。此后,科学家们能够很方便地观察活细胞的细微结构和生理过程,为深入研究脑细胞的发育过程以及癌细胞的扩散方式等问题打下了良好的基础。论文基于已有研究,主要依据研发参与者撰写的回忆文章和发表的论文,对多管水母绿色荧光蛋白分子的发现、基因的复制与表达、突变体的开发与应用、类似体的筛选与改进等研究开发关键环节进行考察,揭示荧光蛋白标记法的诞生经纬,解释瑞典皇家科学院将2008年的诺贝尔化学奖授予下村修、马丁·查尔菲和钱永健的主要原因。

**关键词:** 诺贝尔奖; 荧光蛋白; 下村修; 查尔菲; 钱永健

**中图分类号:** G31

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1001-5019(2016)04-0008-14

**基金项目:** 北京市科技计划项目(Z151100002615005)

**作者简介:** 周程,北京大学哲学系暨科学与社会研究中心教授,博士生导师(北京 100871)。

## 引言

回顾科学史不难发现:每当有人发明一种新的技术或方法,使人们的观察视野大为扩展之时,科学就会向前跨出一大步。望远镜的发明,使伽利略(Galileo Galilei, 1564—1642)清楚地看到月球上也有山峰,木星周围也有卫星,于是古希腊的四元素说被彻底颠覆;显微镜的发明,使列文虎克(Antony van Leeuwenhoek, 1632—1723)看到水滴中有许多小生物在蠕动,血液中含有成千上万的红细胞,于是微生物世界的大门被打开。

第二次世界大战结束后不久,大科学开始兴起,科学知识按“指数规律”持续高速增长,但生物学的发展却遇到一个瓶颈,那就是,尽管显微镜的倍数在不断增加,人们仍无法观察蛋白质在活体细胞中的运动与变化情况。蛋白质乃生命活动的主要承担者,如果无法掌握细胞

中蛋白质的动向,人类就无法深入揭示生命活动的奥秘。

20世纪后期,以绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)为代表的一系列生物荧光标记材料的发现与应用,为生物学的大发展提供了一种全新的工具。自此之后,科学家们似乎炼成了火眼金睛,能够很方便地观察活细胞的细微结构和生理过程,为深入研究脑细胞的发育过程以及癌细胞的扩散方式等问题打下良好基础。

GFP无需依赖荧光素酶或其他辅助因子的作用,就可以在生物体内每一个被表达的细胞中“自动”出现。而且,GFP的荧光非常稳定,在激发光照射下,其抗光漂白能力比荧光素强很多。是故,GFP及其变种今日被广泛地用作分子标记。此外,GFP还被用作砷和一些重金属的传感器。正因为如此,瑞典皇家科学院决定将2008年的诺贝尔化学奖授予对GFP的发

现、表达和开发做出杰出贡献的三位科学家: 下村修( Osamu Shimomura, 1928—)、马丁·查尔菲( Martin Chalfie, 1947—) 和钱永健( Roger Yonchien Tsien, 1952—)。

下村修、查尔菲和钱永健三人荣获 2008 年诺贝尔化学奖的消息传开后不久, 国内便涌现出一批介绍他们的研究业绩以及 GFP 的性质与用途之类的文章。这些文章无疑有助于加深人们对三位科学家学术贡献以及对 GFP 的理解。但是, 这些文章并没有深入揭示下村修、查尔菲和钱永健开展 GFP 研究的背景以及他们的研究与其他学者之间的传承关系。实际上, 从绿色荧光蛋白的发现到荧光蛋白标记法的发明应用, 过程相当复杂。可以说, 如果没有众多科学家接力推进, 使之成功穿越横亘在发现与发明之间的“亚马孙丛林”, 荧光蛋白标记法就不可能获得普及。

以下, 笔者拟在马克·季默( Marc Zimmer)<sup>①</sup>、宫脇敦史<sup>②</sup>等人的研究基础上, 主要依据研发参与者撰写的回忆文章和发表的论文, 对 GFP 分子的发现<sup>③</sup>、基因的复制与表达、突变体的开发与应用、类似体的筛选与改进等研发关键环节作一更为深入的考察, 以期能够较为全面地揭示荧光蛋白标记法的诞生经纬, 从而加深人们对诺贝尔奖级科学贡献的理解。

## 一、绿色荧光蛋白分子的发现

GFP 革命的种子是由下村修于 1962 年埋下的。因此, 下村修被认为是 GFP 革命的始祖。但是, 下村当时并没有意识到, 自己在从事基础研究过程中不经意间发现的 GFP 后来竟成为科学家们深入揭示生命活动奥秘的一个非常重要的工具。

下村修的中学时代是在战乱中度过的。战

后初期, 他在长崎医科大学( 长崎大学前身) 附属药学专科部接受了三年的高等教育, 毕业后留校任分析化学实验室实验指导教师。1955 年, 下村被选派到名古屋大学理学院化学系天然有机化学研究室进修。报到当天, 其指导教师就把一个装满干燥海萤( *Cypridina hilgendorfi*) 的真空防潮容器拿给他, 希望能将发光海萤体内的荧光素提取出来并获得结晶, 以便为最终确定荧光素的分子结构奠定基础。由于海萤荧光素遇到氧气后很快就会分解, 这项工作难度极大, 以致普林斯顿大学哈维( Newton Harvey, 1887—1959) 教授带着学生研究多年仍未取得成功。可是这一难题却因下村的一项意外发现而被解决了<sup>④</sup>。

下村修的工作引起了哈维的弟子——普林斯顿大学生物学系教授约翰逊( Frank Johnson, 1908—1990) 的注意。在约翰逊的盛情邀请下, 刚被名古屋大学破格授予理学博士学位的下村于 1960 年 9 月来到普林斯顿, 开始从事为期三年的博士后研究<sup>⑤</sup>。当时, 每到夏季在美国西北海岸的星期五港湾都可看到成群的多管水母( *Aequorea victoria*) , 但是人们不知道这种无色透明的水母为什么会发出绿光<sup>⑥</sup>。约翰逊建议二人间的合作研究就从这种水母入手。由于提取纯化多管水母体内的发光物质看似与自己先前的研究跨度不大, 下村欣然接受了这一提议。

1961 年夏, 下村修如约跟随约翰逊来到华盛顿大学的星期五港湾研究所。令下村没有料到的是, 多管水母的发光机理好像和海萤的完全不同, 无论他和约翰逊采用哪一种降低荧光素酶活性的方法或去氧措施, 都无法让多管水母发光物质提取液停止发光。在无法说服约翰逊放弃原定研究方案的情况下, 下村不得不独

① Marc Zimmer, *Glowing Genes: A Revolution in Biotechnology*, New York: Prometheus Books, 2005.

② 宫脇敦史「GFPをめぐる半世紀の歴史」,『科学』2009 年第 79 卷第 1 期。

③ 笔者曾对下村修发现绿色荧光蛋白的业绩进行过研究, 具体可参见周程《杰出人才是怎样炼成的? ——下村修荣获诺贝尔化学奖案例研究》(《科学学与科学技术管理》2012 年第 4 期)。出于本文整体结构上的需要, 以下只对下村发现绿色荧光蛋白的过程作一简要概述。

④ 下村修:『クラゲの光に魅せられて——ノーベル化学賞の原点』,東京:朝日新聞出版,2009 年。

⑤ O. Shimomura, *Autobiography*, [2010 - 02 - 12], [http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/2008/Shimomura.html](http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2008/Shimomura.html).

⑥ 下村修「GFP 発見の歴史」,宮脇敦史編,『GFPとバイオイメージング』,東京:羊土社,2000 年,第 13~16 页。

自行动。经过数周的苦苦探索后,下村突然意识到:多管水母体内的发光物质很有可能是蛋白质,若确实如此,则可通过改变提取液的pH值来降低蛋白质的活性,进而遏制发光物质发光。之后的实验证明下村的判断是正确的。富有戏剧性的是,当下村做完实验把含有多管水母发光物质的溶液倒进污水池时,污水池里突然蹿出一道蓝光。当时,正巧有人往污水池里排放海水。于是下村推定,引起发光的主因极有可能是海水中的钙离子。这意味着可以通过降低提取液中的钙离子浓度来阻止发光物质发光。实际上,有效遏制多管水母发光物质发光的难题后来就这么简单地解决了<sup>①</sup>。

1961年9月,在星期五港湾辛苦工作了三个多月的约翰逊和下村等人带着冷冻多管水母发光物质提取液回到普林斯顿。第二年春,他们提取到5毫克高纯度多管水母发光物质,对其进行分析后发现,该发光物质确实是一种蛋白质,加微量钙离子后会发蓝光,而且在真空状态下也能发光。下村等人将这种特殊蛋白质命名为“aequorin”,即水母素<sup>②</sup>。在纯化水母素过程中,下村等人还发现一个副产品——一种含量很低、在自然光的照射下发浅绿色荧光的新型蛋白质。在该年投给《细胞和比较生理学学报》的论文脚注中,下村等人首次公开了这项发现。当时,他们将这种新型蛋白质称为“绿色蛋白质”<sup>③</sup>。

尽管下村和约翰逊等人在1962年就发现了多管水母“绿色蛋白质”,但是他们当时还顾不上对这种物质的生化性质展开深入研究,再说他们当初积攒的“绿色蛋白质”数量有限,根

本满足不了实验最低需求。当时,下村和约翰逊最为关心的是,既然水母素对钙离子非常敏感,那么可否利用它的这一特性来测定血清和牛奶中的钙离子含量?1963年初,他们把自己在这方面所做的研究整理成文,美国的《科学》杂志同年6月就刊发了该文<sup>④</sup>。

1963年,35岁的下村修回到日本,就任名古屋大学水质科学研究所副教授。因其对生物发光研究情有独钟,在鱼和熊掌不可兼得的情况下,他于1965年底辞去待遇优厚的日本国立大学的教职,带着夫人和一岁的儿子返回普林斯顿,在约翰逊研究室当起了依靠申请研究经费过活的博士后研究员<sup>⑤</sup>。20世纪60年代后期,下村急于探明的主要是水母素的化学结构与发光机理<sup>⑥</sup>。为获得足量的水母素,他每年夏天都要带上家人到星期五港湾去大量捕捞多管水母。虽然非常辛苦,但他乐此不疲<sup>⑦</sup>。在大量提取水母素的过程中,他也积攒了不少多管水母“绿色蛋白质”,不过他当时并未对其展开实质性的研究。

1969年,哈佛大学的伍迪·哈斯廷(Woody Hasting,1927—)和詹姆斯·莫林(James Morin,1953—)在研究腔肠动物发光蛋白质特性时再次“发现”了多管水母“绿色蛋白质”,并将其命名为“Green Fluorescent Protein”,即绿色荧光蛋白<sup>⑧</sup>。二人在研究过程中还注意到,水母素遇到钙离子后发出来的光是蓝色的,而多管水母受到刺激后发出的却是绿光。此后,水母素发出的蓝光是怎样转变成绿色的,GFP在中间发挥了什么样的作用之类的问题便一直萦绕在他们的脑海里。1971年,他们提出了荧光共振

① 下村修:「イクオリンとGFPの発見」,『バイオサイエンス最前線』1998年第22期。

② 下村修:「イクオリンとGFPの発見」,『バイオサイエンス最前線』1998年第22期。

③ F. H. Johnson, O. Shimomura, Y. Saiga, L. C. Gershman, G. T. Reynolds, J. R. Waters, Quantum Efficiency of *Cypridina* Luminescence, with a Note on that of *Aequorea*, *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, vol. 60, no. 1(1962), pp. 85-103.

④ O. Shimomura, F. H. Johnson, Y. Saiga, Microdetermination of Calcium by Aequorin Luminescence, *Science*, vol. 140(1963), pp. 1339-1340.

⑤ 下村修「発光生物研究40年」,『長葉同窓会会報』1995年第35期。

⑥ O. Shimomura, The Discovery of Aequorin and Green Fluorescent Protein, *Journal of Microscopy*, vol. 217, no. 1(2005), pp. 3-15.

⑦ 下村修:「イクオリンとGFPの発見」,『バイオサイエンス最前線』1998年第22期。

⑧ J. W. Hasting, J. G. Morin, Comparative Biochemistry of Calcium-activated Photoproteins from the Ctenophore, Mnemiopsis, and the Coelenterates *Aequorea*, *Obelia*, *Pelagia* and *Renilla*, *Biological Bulletin*, vol. 137(1969), p. 402.

能量转移理论(FRET),对这类现象进行了解释<sup>①</sup>。依据该理论,水母素生产的蓝光先以无辐射的方式传递给GFP,GFP受到蓝光激发后再以发绿光的方式将能量释放出来。产生荧光共振能量转移必须满足两个条件:(1)供体的发射波长和受体的吸收波长重叠;(2)供体和受体的距离小于3纳米。1974年,下村等人使用自己提纯的水母素和多管水母GFP首次验证了这一理论<sup>②</sup>。

由于水母素分子的发光机理已于1973年被解明<sup>③</sup>,这样多管水母的发光机理问题于1974年被解决之后,弄清GFP分子的发光机理便成为当务之急。遗憾的是,下村等人多年积攒起来的多管水母GFP被约翰逊带去参加学术会议时丢失了<sup>④</sup>。而当时的生物技术还不甚发达,做一次GFP结构分析实验需要上百毫克的GFP。所以,此后数年下村不得不仍旧带着家人去星期五港湾大量捕捞多管水母。由于多管水母中的GFP含量远低于水母素,故直到1979年下村才攒足100毫克GFP<sup>⑤</sup>。是年,下村他们把手中的多管水母GFP全部酶解成肽段,然后逐一检查这些肽段的光反应情况。结果发现,这些肽段均不发光,像GFP一样吸收光的也有一段<sup>⑥</sup>。对纯化后只有0.1毫克的这片肽段展开深入研究后,下村惊奇地发现其吸收光谱峰值和自己20年前在名古屋大学研究海萤荧光素时合成的化合物的吸收光谱峰值非常接近<sup>⑦</sup>。于是他很快就推测出多管水母GFP发光基团的化学结构,并在《欧洲生物化学学会联盟通讯》上公开了这一研究成果<sup>⑧</sup>。

1979年用联想类比法推出多管水母GFP发光基团结构后不久,下村获知刚从佐治亚大学转到罗格斯大学任教的威廉·瓦德(William Ward)也在星期五港湾大量捕捞多管水母,并已重点展开对GFP的研究。经过一番考量,对基因工程兴趣不是很浓的下村决定专注于当时被认为有着广泛应用前景的水母素的研究,不再参与GFP的研究开发竞争<sup>⑨</sup>。

## 二、绿色荧光蛋白基因的分离与复制

1981年,下村修转到位于马萨诸塞州伍兹霍尔(Woods Hole)的海洋生物学实验室就任资深科学家,同时兼任波士顿大学药学院教授。六年后,在佐治亚大学跟随密尔顿·考弥尔(Milton J. Cormier,1948—)教授进行多年水母素克隆研究的道格拉斯·普拉舍(Douglas Prasher,1951—)也来到海洋生物学实验室。在这里,普拉舍成功地从多管水母的DNA中分离出GFP基因,并对其复制与测序,为GFP在异源生物体中的表达奠定了重要的基础。

普拉舍1979年在俄亥俄大学取得生物化学博士学位后,到佐治亚大学跟随细菌遗传学家悉尼·库斯纳(Sidney Kushner)教授做了一期博士后研究。在此期间,普拉舍结识了该校的生物化学系创始人考弥尔<sup>⑩</sup>。考弥尔1958年调入佐治亚大学后,便开始迷上一种大量生活在佐治亚的浅水海湾里、受刺激后能发出绿光的群体无脊椎动物——海肾(*Renilla reniformis*)。在考弥尔的指导下,1977年,一名研究

① J. G. Morin, J. W. Hasting, Energy Transfer in a Bioluminescent System, *Journal of Cellular Physiology*, vol. 77, no. 3 (1971), pp. 313-318.

② H. Morise, O. Shimomura, F. H. Johnson, J. Winant, Intermolecular Energy Transfer in the Bioluminescent System of *Aequorea*, *Biochemistry*, vol. 13, no. 12(1974), pp. 2656-2662.

③ O. Shimomura, F. H. Johnson, Chemical Nature of Light Emitter in Bioluminescence of Aequorin, *Tetrahedron Letters*, vol. 14, no. 31(1973), pp. 2963-2966.

④ M. Zimmer, *Glowing Genes: A Revolution in Biotechnology*.

⑤ 下村修:「イクオリンとGFPの発見」,『バイオサイエンス最前線』1998年第22期。

⑥ M. Zimmer, *Glowing Genes: A Revolution in Biotechnology*.

⑦ O. Shimomura, Discovery of Green Fluorescent Protein, GFP, Nobel Lecture, 2008-12-08, [2010-02-12], [http://nobel-prize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/2008/Shimomura-lecture.html](http://nobel-prize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2008/Shimomura-lecture.html).

⑧ O. Shimomura, Structure of the Chromophore of *Aequorea* Green Fluorescent Protein, *FEBS Letters*, vol. 104, no. 2(1979), pp. 220-222.

⑨ 下村修:「イクオリンとGFPの発見」,『バイオサイエンス最前線』1998年第22期。

⑩ M. Zimmer, *Glowing Genes: A Revolution in Biotechnology*.

生成功地分离出海肾荧光素酶;紧随其后,一名博士后又提取到海肾 GFP<sup>①</sup>。1979年,考弥尔和其指导的博士后瓦德联名发表的有关海肾 GFP 特性的那篇著名论文就是在此研究基础上形成的<sup>②</sup>。当时的研究表明,海肾与多管水母的发光机理非常相似,但也存在不少差别。为加深对动物发光现象的理解,考弥尔决定做一些有关海肾与多管水母发光机理的比较研究。是故,进入20世纪80年代后,考弥尔把多管水母也列作自己的重点研究对象。由于对生物发光研究产生了浓厚兴趣,故完成一期博士后研究后,普拉舍就转至考弥尔门下,开始从事水母素的克隆研究<sup>③</sup>。

如众所知,20世纪70年代初,重组DNA研究在美国取得重大突破。之后,基因技术获得快速发展,以致进入20世纪80年代后发达国家的不少实验室陆续掌握了使用微生物大量表达外源蛋白质这项前沿技术。考弥尔实验室是其中的一名佼佼者。在考弥尔的指导下,普拉舍和实验室技术员麦坎(Richard O. McCann)合作,于20世纪80年代初就确定了水母素基因在多管水母DNA中的位置。此后,他们再接再厉,又成功地实现了脱辅基水母素(apoaequorin)基因在大肠杆菌中的表达。脱辅基水母素在有氧环境下用腔肠素(coelenterazine)进行处理后可转化为能够发光的水母素,这意味着此后科学家们无需再去美国西北海岸捕捞多管水母就可以大量制取水母素<sup>④</sup>。1985年2月,普拉舍等人公开发表了这一研究成

果<sup>⑤</sup>。遵照考弥尔的建议,普拉舍随后又启动了多管水母 GFP 基因的分离与复制研究<sup>⑥</sup>。因瓦德等人此前已对多管水母 GFP 的组成结构与生化特性展开了一系列探索,故普拉舍以此为基础很快获得一个多管水母 GFP 基因片段的拷贝<sup>⑦</sup>。后因普拉舍转赴伍兹霍尔就任新职,故此项研究被暂时搁置。

1988年,也即在获聘担任海洋生物学实验室助理研究员的第二年,普拉舍获得美国癌症协会提供的为期三年、金额超过20万美元的研究资助,于是他按照资助协议在伍兹霍尔重新启动 GFP 基因的分离与复制研究。毋庸赘言,此项研究是同考弥尔等人合作进行的。尽管此前已获得一个多管水母 GFP 基因片段的拷贝,但它只含有168个氨基酸,而多管水母的 GFP 是由238个氨基酸组成的,这意味着分离出来的 GFP 基因片段少了30%的密码子。为获取完整的 GFP 基因,普拉舍再次远赴星期五港湾捕捞了一批多管水母,并用液氮对其进行速冻处理。返回伍兹霍尔后,普拉舍将从多管水母中提取的 DNA 酶切成140万个片段。普拉舍原以为这些 DNA 片段中含有 GFP 基因的怎么也有成百上千个,可是逐个检测后发现,只有一个片段含有 GFP 基因。幸运的是,费尽千辛万苦分离出来的 GFP 基因是一个完整的 GFP 基因<sup>⑧</sup>。之后,普拉舍使用细菌的质粒作载体对 GFP 基因进行大量复制,并确定了多管水母 GFP 的基因序列。1991年3月,他把这项研究成果整理成文,投给《基因》杂志。次年2月

① M. J. Cormier, Nobel Prize Spotlights Basic Research, *UGA Research Magazine*, spring 2009, [2011-07-18], <http://researchmagazine.uga.edu/aa/spring2009/spotlight.php>.

② W. W. Ward, M. J. Cormier, An Energy Transfer Protein in Coelenterate Bioluminescence, Characterization of the Renilla Green-fluorescent protein, *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 254, no. 3(1979), pp. 781-788.

③ M. J. Cormier, Nobel Prize Spotlights Basic Research, *UGA Research Magazine*, spring 2009, [2011-07-18], <http://researchmagazine.uga.edu/aa/spring2009/spotlight.php>.

④ 下村修:「イクオリンとGFPの発見」,『バイオサイエンス最前線』1998年第22期。

⑤ D. Prasher, R. O. McCann, M. J. Cormier, Cloning and Expression of the cDNA Coding for Aequorin, a Bioluminescent Calcium-binding Protein, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 126, no. 3(1985), pp. 1259-1268.

⑥ M. J. Cormier, Nobel Prize Spotlights Basic Research, *UGA Research Magazine*, spring 2009, [2016-06-16], <http://researchmagazine.uga.edu/aa/spring2009/spotlight.php>.

⑦ M. J. Cormier, Nobel Prize Spotlights Basic Research, *UGA Research Magazine*, spring 2009, [2016-06-16], <http://researchmagazine.uga.edu/aa/spring2009/spotlight.php>; D. C. Prasher, V. K. Eckenrode, W. W. Ward, F. G. Prendergast, M. J. Cormier, Primary Structure of the *Aequorea Victoria* Green-fluorescent Protein, *Gene*, vol. 111, no. 2(1992), pp. 229-233.

⑧ M. Zimmer, *Glowing Genes: A Revolution in Biotechnology*.

《基因》正式刊发了这篇论文<sup>①</sup>。不过,普拉舍并没有实现 GFP 基因在异源生物体中的表达。

实际上,早在 1987 年,普拉舍就产生用多管水母 GFP 做示踪分子来研究细胞内蛋白质活动情况的想法<sup>②</sup>。这主要是因为:(1) 细胞中的蛋白质太小,用最先进的电子显微镜也无法观察。如果能把多管水母 GFP 和目的蛋白质连在一起,无异于在目的蛋白质上装了一个灯泡,人们可以通过观察 GFP 的荧光来了解目的蛋白质的活动情况。(2) 下村修多年前就已揭示多管水母 GFP 是一种非常小的蛋白质,将小蛋白质连接到比较大的目的蛋白质上一般不会对目的蛋白质的功能产生影响。不过,普拉舍以为,多管水母 GFP 发光基团的形成有可能需要体内辅助因子或外源反应底物提供帮助<sup>③</sup>。因为当时的研究表明,即使是在有氧环境下,从生物体中提取的发光物质,如水母素、荧光素等都不可能单独发光。这意味着除非多管水母 GFP 是一个例外,否则人们很难实现其在异源生物细胞中的表达,也即不太可能在其他生物体中观察到多管水母 GFP 发出的荧光。

由于对 GFP 基因在其他生物体中的表达缺乏信心,故普拉舍在美国癌症协会资助的科研经费告罄前都没有将其用 GFP 做示踪分子的想法完全付诸实施。当他下决心启动 GFP 基因表达研究,并向美国国立卫生研究院等机构申请有关资助时,却遭到拒绝,以致他不无遗憾地将揭开 GFP 革命序幕的机会拱手让给了别人<sup>④</sup>。不过,用细菌的质粒大量复制 GFP 基因技术的掌握,使普拉舍等人得以更方便地对

GFP 发光基团的结构展开深入研究,以致 1991 年普拉舍和瓦德等人用实验验证了下村修 1979 年提出的有关 GFP 发光基团化学结构的主要推测,同时提出不少有关 GFP 发光基团分子结构与发光机理的新见解。这些研究成果于 1993 年公开发表在《生物化学》杂志上<sup>⑤</sup>。

申请多管水母 GFP 基因表达研究资助遭拒后,普拉舍接受美国海军研究办公室的资助,开始开发与水银之类的重金属相遇后旋即发光的水母素变种<sup>⑥</sup>。此后,普拉舍因未能通过海洋生物学实验室的终身职位评审而不得不先后转至美国农业部所属的奥的斯植物保护中心、植物遗传资源与生物技术实验室,美国宇航局旗下的 AZ 技术公司等机构从事与 GFP 无甚关联的研究<sup>⑦</sup>。不断抛弃先前的研究积累,展开全新的研究,要做出一番业绩谈何容易! 加上时运不佳,以致普拉舍后来落魄时不得不跑到丰田汽车专卖店当起了班车驾驶员<sup>⑧</sup>。

### 三、绿色荧光蛋白基因的表达

普拉舍放弃开展多管水母 GFP 基因在异源生物细胞中的表达研究时,应哥伦比亚大学从事线虫触觉神经研究的马丁·查尔菲教授的请求,将含有多管水母 GFP 基因的质粒提供给了查尔菲。此后,查尔菲和他的研究生合作,成功实现多管水母 GFP 基因在大肠杆菌和线虫中的表达,从而揭开 GFP 革命的序幕。

查尔菲于 1977 年在哈佛大学获生理学博士学位后,决定接受学友罗伯特·霍维茨(H. Robert Horvitz,1947—)的建议,赴英国剑桥大

① D. C. Prasher, V. K. Eckenrode, W. W. Ward, F. G. Prendergast, M. J. Cormier, Primary Structure of the *Aequorea Victoria* Green-fluorescent Protein, *Gene*, vol. 111, no. 2(1992), pp. 229-233.

② M. Zimmer, Douglas Prasher, [2011-07-18], <http://www.conncoll.edu/ccacad/zimmer/GFP-ww/prasher.html>.

③ D. C. Prasher, V. K. Eckenrode, W. W. Ward, F. G. Prendergast, M. J. Cormier, Primary Structure of the *Aequorea Victoria* Green-fluorescent Protein, *Gene*, vol. 111, no. 2(1992), pp. 229-233; M. Zimmer, *Glowing Genes: A Revolution in Biotechnology*.

④ M. Zimmer, *Glowing Genes: A Revolution in Biotechnology*.

⑤ C. W. Cody, D. C. Prasher, W. M. Westler, F. G. Prendergast, W. W. Ward, Chemical Structure of the Hexapeptide Chromophore of the *Aequorea* Green-fluorescent Protein, *Biochemistry*, vol. 32, no. 5(1993), pp. 1212-1218.

⑥ M. Zimmer, *Glowing Genes: A Revolution in Biotechnology*.

⑦ Wikipedia, Douglas Prasher, [2011-07-18], [http://en.wikipedia.org/wiki/Douglas\\_Prasher](http://en.wikipedia.org/wiki/Douglas_Prasher); M. Herper, Biotech's Glowing Breakthrough Wins Nobel Prize, *Forbes*, 2008-10-08, [2011-07-18], [http://www.forbes.com/2008/10/08/nobel-chalfie-shimomura-tsiens-biz-healthcare-cx\\_mh\\_1008gfp.html](http://www.forbes.com/2008/10/08/nobel-chalfie-shimomura-tsiens-biz-healthcare-cx_mh_1008gfp.html).

⑧ A. Gouveia, Shuttle Driver Reflects on Nobel Snub, *Cape Cod Times*, 2008-10-11, [2011-07-18], <http://www.capecodonline.com/apps/pbcs.dll/article?AID=/20081011/NEWS/810110328>.

学跟随悉尼·布伦纳(Sydney Brenner, 1927—)教授从事博士后研究<sup>①</sup>。布伦纳于20世纪60年代初期和DNA双螺旋结构发现者之一克里克(Francis Crick, 1916—2004)合作解释了蛋白质翻译的三元码问题之后,开始另辟蹊径专注于秀丽隐杆线虫研究。他用这种身长仅一两个毫米的透明线虫作模式生物和其学生合作开展一系列发育生物学研究。因在揭示器官发育和细胞程序化凋亡的遗传调控机理方面做出创造性的贡献,他和两名学生——霍维茨、苏尔斯顿(John E. Sulston, 1942—)一起被授予2002年度诺贝尔生理学或医学奖<sup>②</sup>。在跟随布伦纳研究线虫期间,查尔菲对这种体细胞总数不到1000,寿命不超过4天,但在生理上与人体有着众多相似之处的线虫产生了浓厚的兴趣,以致1982年到哥伦比亚大学就任教职后一直把线虫作为主要研究对象。

20世纪80年代中期,查尔菲在研究线虫细胞中的基因和基因启动子的作用机理时,只能使用具有糖解作用的 $\beta$ -半乳糖苷酶基因作标记,即将其连接在目的基因或基因启动子后面。采用这种方法存在一个问题,那就是最终必须把线虫杀死,否则无法深入了解线虫细胞内的基因或基因启动子的活动情况<sup>③</sup>。1988年初,在哥伦比亚大学举办的一个以发光生物为主题的讨论班上,查尔菲获悉人们已从多管水母身上提取到一种叫做GFP的荧光物质。他当即意识到可以尝试使用这种荧光物质的基因作报告基因,以解决自己在研究线虫细胞过程中遇到的诸多难题。经过数日的调查,查尔菲了解到普拉舍正在从事多管水母GFP基因的

分离与复制研究。于是他与普拉舍取得联系,并提出希望合作开展多管水母GFP基因在线虫中的表达研究<sup>④</sup>。当时,普拉舍只解读完一个不完整的多管水母GFP基因的碱基对,故谈不上和查尔菲开展相关合作研究。1992年初,普拉舍解读完多管水母GFP基因的全部碱基对后打电话通知查尔菲时,不巧查尔菲正在犹他大学度婚假,因此双方没能联系上。普拉舍当时误以为查尔菲已经离职<sup>⑤</sup>。

1992年9月,一直没有收到普拉舍分离多管水母GFP基因取得成功消息的查尔菲与研究生奥伊斯基兴(Ghia Euskirchen)讨论制定了一份有关使用GFP基因研究透明线虫的计划。他们在进行文献检索时发现,普拉舍和考弥尔等半年前在《基因》杂志上合作发表了一篇有关多管水母GFP一级结构的论文<sup>⑥</sup>。在这篇文章中,普拉舍等人报告了他们从事多管水母GFP基因分离、复制与测序研究所取得的进展,不过在文章的末尾,他们把自己复制出的GFP称作脱辅基GFP<sup>⑦</sup>。言下之意是这种蛋白质不含发光基因,尚不能发光。尽管如此,查尔菲还是满怀希望地联系上普拉舍,并获得普拉舍提供的含有多管水母GFP基因的质粒<sup>⑧</sup>。

收到含有多管水母GFP基因的质粒之后,查尔菲便指示奥伊斯基兴使用刚刚兴起的聚合酶链式反应(PCR)技术扩增GFP基因,然后再用大肠杆菌做GFP基因表达实验。在查尔菲看来,无论这项实验成功与否,它对研究生来讲都是一次很好的锻炼。经过一个月的努力,奥伊斯基兴终于在显微镜中观察到大肠杆菌体内

① M. Zimmer, *Glowing Genes: A Revolution in Biotechnology*.

② 饶毅《三位有趣的生物学家:2002年诺贝尔奖获得者》, [2011-07-18], <http://www.bioon.com/VIP/successway/sciroad/200310/1870.html>.

③ 生化学若い研究者の会『光るクラゲがノーベル賞をとった理由』東京:日本評論社,2009年。

④ 宮脇敦史「2008年ノーベル化学賞 GFPの発見、発現、開発の歴史」,『バリテイ』2008年第23卷第12期。

⑤ M. Herper, *Biotech's Glowing Breakthrough Wins Nobel Prize*, *Forbes*, 2008-10-08, [2011-07-18], [http://www.forbes.com/2008/10/08/nobel-chalfie-shimomura-t sien-biz-healthcare-cx\\_mh\\_1008gfp.html](http://www.forbes.com/2008/10/08/nobel-chalfie-shimomura-t sien-biz-healthcare-cx_mh_1008gfp.html).

⑥ 宮脇敦史「GFPをめぐる半世紀の歴史」,『科学』2009年第79卷第1期。

⑦ D. C. Prasher, V. K. Eckenrode, W. W. Ward, F. G. Prendergast, M. J. Cormier, *Primary Structure of the Aequorea Victoria Green-fluorescent Protein*, *Gene*, vol. 111, no. 2(1992), pp. 229-233.

⑧ M. Herper, *Biotech's Glowing Breakthrough Wins Nobel Prize*, *Forbes*, 2008-10-08, [2011-07-18], [http://www.forbes.com/2008/10/08/nobel-chalfie-shimomura-t sien-biz-healthcare-cx\\_mh\\_1008gfp.html](http://www.forbes.com/2008/10/08/nobel-chalfie-shimomura-t sien-biz-healthcare-cx_mh_1008gfp.html).

发出的绿光<sup>①</sup>。这意味着多管水母 GFP 无需任何辅助因子和反应底物,就可以自行形成发光基因。这项研究使查尔菲深受鼓舞。

查尔菲此前从未接触过多管水母 GFP 基因,而且其实验室里并未配备与荧光蛋白研究有关的专用仪器设备。在这种情况下,向美国国家科学基金会等机构申请 GFP 基因表达研究资助很难通过同行评审,即使侥幸通过,那也是半年后的事。深谙科技界竞争规则的查尔菲没有缘木求鱼,他果断地决定先用自主经费启动多管水母 GFP 基因在更为复杂的生物体——线虫中的表达研究<sup>②</sup>。当克服重重困难把多管水母 GFP 基因插入线虫目的基因及其启动子之间后,他们在线虫的神经细胞内观察到多管水母 GFP 发出的荧光,并确认多管水母 GFP 对线虫神经细胞无毒副作用。1994 年 2 月,美国《科学》杂志刊发了这一里程碑性的研究成果,并在封面上刊登了查尔菲提供的带有多个绿色荧光点的线虫配图<sup>③</sup>。

其实,当时不只是查尔菲团队在从事多管水母 GFP 基因的表达研究。不过,其他团队大都未能在异源生物体上观察到 GFP 发出的荧光。很多从事生物发光研究的学者研究受挫后都以为 GFP 和此前发现的所有发光物质一样需要特定的辅助因子或反应底物参与作用才能发光,因此都没有去深究 GFP 基因未能在异源生物体中获得表达是否是因剪切 GFP 基因时出了问题<sup>④</sup>。换言之,从事生物发光研究的学者主要是从化学方面,而非从生物方面寻找败因。查尔菲是从事发育生物学研究的,他对生物发光研究界流行的生物体内的发光物质独自

不能发光的观点认识有限,因此他果敢地向被生物发光研究学者认为不可能的事发起了挑战<sup>⑤</sup>。查尔菲团队研究后发现,很多团队之所以在异源生物体中观察不到多管水母 GFP 发出的荧光,主要是因为他们基于普拉舍的研究,用限制性剪切酶剪切 GFP 基因时未将多余的碱基切除,以致多管水母 GFP 基因未能在细胞中获得表达<sup>⑥</sup>。

不过,1994 年 3 月,《欧洲生物学化学会联盟通讯》刊发了一篇与多管水母 GFP 基因表达有关的论文,它是由当时正在加州大学圣地亚哥分校斯克里普斯海洋学研究所访问研究的日本窒素肥料株式会社的井上敏(Satoshi Inouye)与该所的研究员、日裔学者辻(Frederick I. Tsuji)合作完成的<sup>⑦</sup>。这是第二个在异源生物细胞中表达多管水母 GFP 基因取得成功的团队。1984 年,他们俩还与日本九州大学的几位学者一起独立地克隆出水母素基因,但论文的发表日期比普拉舍和考弥尔的相关论文也晚了一个月<sup>⑧</sup>。

尽管美国《科学》杂志 1994 年 2 月刊发的查尔菲等人的论文正文不足两页,但它标志着科学家们已打开了用 GFP 对活细胞进行示踪研究的大门。十年后,查尔菲也因此而荣幸地当选美国国家科学院院士。

#### 四、绿色荧光蛋白突变体的开发

普拉舍退出 GFP 克隆研究前,还将其获得的含有多管水母 GFP 基因的质粒无偿地提供给加州大学圣地亚哥分校的钱永健。此后,钱永健对多管水母 GFP 的结构与功能展开了一

① M. Zimmer, *Glowing Genes: A Revolution in Biotechnology*.

② M. Zimmer, *Glowing Genes: A Revolution in Biotechnology*.

③ M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward, D. C. Prasher, Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression, *Science*, vol. 263, no. 5148(1994), pp. 802-805.

④ 宫脇敦史「2008 年ノーベル化学賞 GFP の発見、発現、開発の歴史」、『パリティ』2008 年第 23 卷第 12 期。

⑤ W. W. Ward, Fluorescent Proteins: Who's Got 'Em and Why? *Bioluminescence and Chemiluminescence: Progress & Current Applications*, eds. by P. E. Stanley, L. J. Kricka, Singapore: World Scientific, 2002, pp. 123-126.

⑥ M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward, D. C. Prasher, Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression, *Science*, vol. 263, no. 5148(1994), pp. 802-805.

⑦ S. Inouye, F. I. Tsuji, *Aequorea* Green Fluorescent Protein: Expression of the Gene and Fluorescence Characteristics of the Recombinant Protein, *FEBS letters*, vol. 341, no. 2-3(1994), pp. 277-280.

⑧ S. Inouye, M. Noguchi, Y. Sakaki, Y. Takagi, T. Miyata, S. Iwanaga, T. Miyata, F. I. Tsuji, Cloning and Sequence Analysis of cDNA for the Luminescent Protein Aequorin, *PNAS*, vol. 82, no. 10(1985), pp. 3154-3158.

系列卓有成效的研究,并进而开发出一批发光效率更高、性能更加稳定、颜色更为丰富的新型荧光蛋白,为科学家们提供了一个将不同的蛋白质或细胞“染上”不同的颜色,借以跟踪研究其活动过程的工具箱。

出生于美国纽约的钱永健乃钱学森的堂侄。钱永健在哈佛大学获得化学与物理学专业的学士学位后,转赴英国剑桥大学留学。在剑桥大学,他一开始迷上分子生物学,后来转向海洋学,最后又转向生理学,并于1977年获博士学位。之后,他留在英国从事一段时间的博士后研究。1981年,钱永健返回美国就任加州大学伯克利分校教职,1989年转任加州大学圣地亚哥分校药理学教授以及化学与生物化学教授。

早在剑桥大学从事博士后研究期间,钱永健就发明一种可检测细胞内钙离子浓度的染料。当时,测量细胞内钙离子浓度的方法还相当原始,即便使用下村修发现的水母素,也需要将其注射到细胞内,这样很容易对研究用细胞造成伤害。为此,钱永健发明了一种有机染料,这种染料分子无需注射即可穿透细胞壁。1981年获得加州大学伯克利分校的教职后,钱永健又对自己发明的钙染料进行改进,使其使用更方便,适用性更广<sup>①</sup>。

1989年转到圣地亚哥分校后,钱永健的关注点由细胞内的钙离子转向细胞内的环腺苷酸(cAMP)。环腺苷酸被称作细胞内的第二信使,它通过激活蛋白激酶来实现对细胞功能的调节。根据这一性质,钱永健团队开发了一种荧光染料<sup>②</sup>。将蛋白激酶染上这种荧光染料后,再将其注入细胞内,这样人们便可以通过观察蛋白激酶被激活的程度来了解环腺苷酸的活动情况。显然,使用这种方法甚为不便。因此,1992年4至5月间钱永健看到普拉舍和瓦德等人在《基因》杂志上发表的那篇文章后,顿觉眼前一亮,他仿佛看到了用多管水母GFP取代

化学荧光染料开展荧光标记研究的曙光<sup>③</sup>。

钱永健联系上普拉舍后,得到可以免费获取多管水母GFP基因的答复。与长期从事线虫触觉神经研究的查尔菲不同,主要从事化学荧光染料开发的钱永健并不擅长基因重组操作,而且其团队中当时并无这方面的专才,因此其团队并没有马上开展GFP表达研究,以致率先实现多管水母GFP基因在异源生物细胞中的表达之功被查尔菲团队抢走。1992年9月,一位受过分子遗传学训练,名叫海姆(Roger Heim)的瑞士籍博士后研究人员加盟钱永健实验室。以此为契机,钱永健启动了对GFP的研究<sup>④</sup>。其团队在研究过程中发现,多管水母GFP在有氧情况下才会发光,于是他们推断,氧分子是其发光的唯一辅助物。由于氧气无处不在,故他们进一步推断多管水母GFP基因可以在任何有机生物的细胞中获得表达。

因野生型多管水母GFP有两个激发峰,光稳定性不好,而且荧光强度弱,需要紫外线照射的时间长,故钱永健决定优先从解决野生型多管水母GFP的诸多不足处入手,以促进GFP标记技术的应用与普及。这样,对多管水母GFP结构进行解析与改造自然而然成为钱永健团队的研究重点。当钱永健团队正在为如何下手才能快速有效地改良多管水母GFP发光性质而苦恼时,传来了凯利·穆利斯(Kary Mullis 1944—)因发明PCR技术、迈克尔·史密斯(Michael Smith 1932—2000)因发明对DNA特定位置实行定点突变的方法而获1993年诺贝尔化学奖的消息。穆利斯虽然在1984年就完成PCR技术的发明,但这项技术直到其同事于1988年从温泉中分离出一株嗜热杆菌之后才获得推广应用。PCR技术的推广应用又为史密斯于1978年初次提出、1985年进一步完善的基因定点突变方法的普及奠定了基础<sup>⑤</sup>。不难看出,1993年诺贝尔化学奖实际上奖励的是

① 郭晓强《生命内部世界变得五颜六色——绿色荧光蛋白质改进者钱永健简介》,《化学教育》2009年第4期。

② S. R. Adams, A. T. Harootunian, Y. J. Buechler, S. S. Taylor, R. Y. Tsien, Fluorescence Ratio Imaging of Cyclic AMP in Single Cells, *Nature*, vol. 349, no. 6311(1991), pp. 694-697.

③ 李名扬《为生命上色:诺贝尔化学奖得主——钱永健》,《科学人》2010年第3期。

④ 李名扬《为生命上色:诺贝尔化学奖得主——钱永健》,《科学人》2010年第3期。

⑤ 隋广超、张庭芳《基因工程技术的重大突破——1993年诺贝尔化学奖》,《大学化学》1994年第9卷第3期。

刚刚兴起的两项分子生物学技术。受这两项新兴技术的影响,钱永健团队决定采用随机诱变的方式来改组 GFP 基因,进而筛选出激发峰和荧光强度等都得到优化的 GFP 衍生物。

钱永健团队先后制作 6000 种突变点不尽相同的多管水母 GFP 基因模型,并从其表达物中发现若干激发峰由紫外区移至蓝光区、绿色荧光强度明显增大的多管水母 GFP 变种,以及一种发蓝色荧光和一种发青色荧光的多管水母 GFP 突变体。进一步的研究表明,蓝色荧光蛋白是因多管水母 GFP 中的第 66 位氨基酸——酪氨酸被转换成组氨酸造成的;如果第 66 位的酪氨酸被色氨酸取代后则发青色的荧光。1994 年 12 月,钱永健团队公开发表了这些研究成果<sup>①</sup>。翌年 2 月,该团队又在英国的《自然》杂志上发文重点介绍一种单点突变后形成的增强型 GFP——S65T。这种荧光蛋白与野生型多管水母 GFP 相比,光稳定性和荧光强度获得大幅度的改善,激发峰的波长也提高到更方便使用的 488 纳米<sup>②</sup>。

多管水母 GFP 的发光性质是由其结构决定的。尽管普拉舍等人已经测出组成多管水母 GFP 的 238 个氨基酸的排序,并且阐明其发光基团的一级化学结构,但是人们对多管水母 GFP 的晶体结构,也即三维结构仍知之不详。这显然不利于使用定点突变的方法改进 GFP 的发光性能。为此,钱永健和俄勒冈州立大学的詹姆斯·雷明顿(S. James Remington)等人合作,使用 X 射线晶体衍射分析法于 1996 年解析出多管水母 GFP 的 S65T 突变体的晶体结构<sup>③</sup>。同年,莱斯大学的乔治·飞利浦(George Phillips)团队也使用相同方法,独立解析出野生型多管水母 GFP 的晶体结构<sup>④</sup>。结果表明,多管水母 GFP 是一个由 11 条  $\beta$ -折叠绕成的

圆筒状结构,一条  $\alpha$  螺旋的肽链沿圆筒中轴线分布。由第 65 至 67 位的三个氨基酸(丝氨酸-酪氨酸-甘氨酸)组成的发光基团嵌在  $\alpha$  螺旋上,几乎被包埋在圆筒的中心。

弄清多管水母 GFP 的三维结构后,人们便不难理解为何将第 66 位的氨基酸——酪氨酸转换成组氨酸或色氨酸后,所获得的突变体便会发出蓝色或青色的荧光,因为 GFP 发光基团的分子结构已经被改变了。那么,使用定点突变的方法改变多管水母 GFP 发光基团周围的氨基酸结构,是否能制造出科研所需的新的 GFP 衍生物?顺着这条思路,钱永健团队利用与雷明顿合作所取得的有关多管水母 GFP 晶体结构数据,通过使用计算机辅助设计,最终获得一种新的 GFP 衍生物——黄色荧光蛋白。黄色荧光蛋白是钱永健团队采用定点突变方法将位于多管水母 GFP 发光基团正下方的第 203 位氨基酸——苏氨酸换成酪氨酸制成的<sup>⑤</sup>。

蓝色、青色、黄色荧光蛋白的获得,不仅为同时追踪多种蛋白质分子在细胞内的活动情况提供了方便,而且还为依据荧光共振能量转移理论研究不同蛋白质之间的相互作用提供了一个有效工具。但是,在查尔菲用多管水母 GFP 作示踪分子取得成功后的最初几年里,无论钱永健等人如何努力,都无法基于多管水母 GFP 分子结构改造出应用范围更广的红色荧光蛋白。在各种可见荧光中,红光的穿透性最强,如果有了红色荧光蛋白,人们便可以更方便地观察非透明动物的细胞,乃至细胞内的蛋白质活动情况。而红色荧光蛋白的发现乃钱永健团队于 1996 年“设计”出黄色荧光蛋白三年后之事。

## 五、绿色荧光蛋白类似物的筛选与改进

1999 年,俄罗斯科学院舍米亚金和奥夫钦

<sup>①</sup> R. Heim, D. C. Prasher, R. Y. Tsien, Wavelength Mutations and Post-translational Autooxidation of Green Fluorescent Protein, *PNAS*, vol. 91, no. 26(1994), pp. 12501-12504.

<sup>②</sup> R. Heim, A. B. Cubitt, R. Y. Tsien, Improved Green Fluorescence, *Nature*, vol. 373, no. 6516(1995), pp. 663-664.

<sup>③</sup> M. Ormö, A. Cubitt, K. Kallio, L. Gross, R. Tsien, S. Remington, Crystal Structure of the *Aequorea Victoria* Green Fluorescent Protein, *Science*, vol. 273, no. 5280(1996), pp. 1392-1395.

<sup>④</sup> F. Yang, L. C. Moss, G. N. Jr. Phillips, The Molecular Structure of Green Fluorescent Protein, *Nature Biotechnology*, vol. 14, no. 10(1996), pp. 1246-1251.

<sup>⑤</sup> F. Yang, L. C. Moss, G. N. Jr. Phillips, The Molecular Structure of Green Fluorescent Protein, *Nature Biotechnology*, vol. 14, no. 10(1996), pp. 1246-1251.

尼科夫(Shemyakin - Ovchinnikov)生物有机化学研究所(前身为天然化学产物研究所)的谢尔盖·卢科亚诺夫(Sergey Lukyanov, 1963—)团队,从珊瑚虫中发现了六种特性与多管水母GFP相似的蛋白质,即GFP类似物(GFP-like proteins,缩写为GFPs)。其中的四种发绿色荧光,一种发黄绿色荧光,一种发红色荧光。在此之前,没有一个人尝试从珊瑚虫中寻找多管水母GFP类似物,因为珊瑚虫并非发光生物。红色荧光蛋白的发现标志着荧光蛋白标记技术的发展又跃上一个新台阶。

钱永健团队在全力开发多管水母GFP突变体时,另外一些团队则在设法找寻多管水母GFP类似物。如前所述,早在20世纪70年代,瓦德和考弥尔就从发光海肾中提取到多管水母GFP类似物。之后,人们又从其他发光生物中提取到数种多管水母GFP类似物<sup>①</sup>。这些GFP类似物与多管水母GFP一样,担负着第二级发射器的使命,也即负责接收体内发光蛋白质生产出的频率较高的光能,然后把它转换成频率较低、波长更长的光能并将其发射出去<sup>②</sup>。由于现有的GFP类似物和多管水母GFP一样都是从发光生物中提取出来的,而且其发光机理与多管水母GFP也很相似,所以那些试图寻找新型GFP类似物的团队大多以发光生物为研究重点。尽管他们的筛选研究并非毫无收获,但是历经千辛万苦寻获的几种GFP类似物都没有太大的应用价值。筛选研究之所以收效甚微,主要是因为这些团队被多管水母GFP及其类似物都是从发光生物中提取出来的表象迷惑了。此外,由于像多管水母这样的发光生物是无色透明的,所以都以为多管水母GFP及其类似物的存在与生物本身的颜色无关,关键是生物要能够发光<sup>③</sup>。

和其他团队一样,卢科亚诺夫团队一开始也打算从发光生物入手,以期能够从中筛选出具有较高应用价值的新型GFP类似物,尤其是红色荧光蛋白。卢科亚诺夫1985年毕业于莫斯科大学胚胎学系,1994年在俄罗斯科学院生物有机化学研究所获博士学位后,留在该所再生基因实验室担任资深科学家,主要从事选择性抑制PCR技术的改良研究和蝶螈、涡虫再生基因的克隆与测序研究。后者主要是在该所博士生米哈伊尔·马兹(Mikhail Matz)的协助下展开的<sup>④</sup>。由于GFP类似物的筛选研究与其先前从事的研究相近,故卢科亚诺夫决定抓住机遇及时启动自身拥有一定竞争优势的GFP类似物筛选研究。

但是,卢科亚诺夫和马兹的GFP类似物筛选研究计划遭到俄罗斯科学院生态与进化研究所主要从事生物发光系统进化研究的专家尤里·拉巴斯(Yulii A. Labas, 1933—2008)的质疑。拉巴斯向前来听取意见的卢科亚诺夫和马兹指出:被他们列作筛选对象的发光生物大都和多管水母没有近缘关系,且大都出现得比较晚。虽然发光生物体内都含有发光蛋白质,但是多数发光生物体内未必有GFP类似物。GFP类似物是荧光蛋白,它和光能的生产无关。因此,不发光的生物体内未必没有GFP类似物。一些珊瑚虫自身并不发光,但却能发出绿色的荧光。为什么不发挥想象力,试一试这类自身并不发光的荧光生物?<sup>⑤</sup>拉巴斯的建议对卢科亚诺夫和马兹的触动很大。之后,二人便开始将那些颜色鲜明并能发出荧光的珊瑚类物种确定为优先筛选对象。

筛选研究过程中,若采用下村修当年所使用的方法,即先将荧光蛋白设法从生物体中分离出来,然后再进行纯化、分析,那么筛选研究

① M. Chalfie, Green Fluorescent Protein, *Photochemistry and Photobiology*, vol. 62, no. 4(1995), pp. 651-656.

② M. V. Mata, Y. A. Labas, J. Ugalde, Evolution of Function and Color in GFP-like Proteins, *Green Fluorescent Protein: Properties, Applications and Protocols*, Second Edition, eds. by M. Chalfie, S. R. Kain, New Jersey: John Wiley & Sons Inc., 2006, pp. 139-162.

③ M. V. Mata, K. A. Lukyanov, S. A. Lukyanov, Family of the Green Fluorescent Protein: Journey to the End of the Rainbow, *Bioessays*, vol. 24, no. 10(2002), pp. 953-959.

④ Laboratory of Molecular Technologies, Sergey A. Lukyanov, [2011-09-25], [http://www.ibch.ru/lgr/cv/cv\\_luk.htm](http://www.ibch.ru/lgr/cv/cv_luk.htm).

⑤ M. V. Mata, K. A. Lukyanov, S. A. Lukyanov, Family of the Green Fluorescent Protein: Journey to the End of the Rainbow, *Bioessays*, vol. 24, no. 10(2002), pp. 953-959.

将会非常耗时,而且好不容易提取到的蛋白质未必就是想要的 GFP 类似物。因此,卢科亚诺夫团队只能另辟蹊径。在生物化学领域积累了丰富研究经验的卢科亚诺夫经过一番分析后意识到,如果珊瑚中确实有 GFP 类似物,那么它的大小应该和多管水母 GFP 差不多,而且一些重要部位的结构,譬如发光基团和  $\beta$ -折叠拐点处的氨基酸排序应该和多管水母 GFP 相同。这意味着可以尝试采用普拉舍当年分离、复制多管水母 GFP 基因时所使用的技术,来解决从珊瑚中提取 GFP 类似物之难题<sup>①</sup>。研究技术路线确定之后,接下来就是付诸行动了。

当时俄罗斯尚未从苏联解体后的混乱中恢复过来,和西方同行相比科研经费谈不上充裕的卢科亚诺夫团队一开始并没有跑到远离莫斯科的热带海洋去采集荧光珊瑚。他们用来研究的第一批荧光珊瑚是从莫斯科市内的水族馆商店廉价买来的。几个月后,他们从一种被称为海葵的荧光珊瑚中找到了 GFP 基因,并成功地对该基因进行了克隆<sup>②</sup>。这项成就的取得证明拉巴斯的推测是正确的,卢科亚诺夫确定的研究技术路线是可行的。此后,卢科亚诺夫团队士气大增,他们远赴印度洋、西太平洋采集了多种色泽鲜明的珊瑚虫。在莫斯科的实验室里将这些珊瑚虫中与颜色有关的 DNA 分离出来,并进行扩增之后,他们找出了重要部位的氨基酸排序与多管水母 GFP 相同的六种蛋白质。进一步研究表明,这六种蛋白质的荧光性质与多

管水母 GFP 有着惊人的相似之处,且能在青蛙和哺乳类动物细胞中获得高效表达。其中,一种发红色荧光,一种发黄色荧光,剩下的四种则发绿色荧光。1999年10月,《自然—生物技术》杂志刊发了这一研究成果<sup>③</sup>。

2000年,已担任生物有机化学研究所分子技术实验室(前身为再生基因实验室)主任的卢科亚诺夫,率领团队使用错配 PCR 技术筛选发光速度更快、亮度更高的红色荧光蛋白突变体时意外地发现,有一种突变体,它一开始发出的荧光呈绿色,之后在24小时内逐渐转变为黄色、橘黄色和红色。利用这一特性,他们开发出一种荧光钟,借以了解基因启动子的活性随时间变化的情况<sup>④</sup>。而且,有人据此推测 GFP 是红色荧光蛋白受损后固化下来的产物。后来人们发现,红色荧光蛋白中的第83位氨基酸被替换之后,它就只能发绿色荧光<sup>⑤</sup>。这项研究为上述推测提供了一个再好不过的注脚。此外,2000年,卢科亚诺夫团队还从非荧光生物沟迎风海葵(*Anemonia sulcata*)中提取到紫色的 GFP 类似物<sup>⑥</sup>。这样,与彩虹两侧同色的 GFP 类似物都被卢科亚诺夫团队找到了。

由于波长较长的红色荧光蛋白的应用前景非常广,所以它引起人们的高度关注。2000年10月,马兹就和雷明顿团队合作完全解析清楚了它的晶体结构<sup>⑦</sup>。与此同时,美国的另一个团队也独立地解明了红色荧光蛋白的晶体结

① M. Zimmer, *Glowing Genes: A Revolution in Biotechnology*.

② K. A. Lukyanov, D. M. Chudakov, A. F. Fradkov, Y. A. Labas, M. V. Mata, S. A. Lukyanov, *Discovery and Properties of GFP-like Proteins from Nonbioluminescent Anthozoa*, *Green Fluorescent Protein: Properties, Applications and Protocols*, Second Edition, pp. 121–138.

③ M. V. Matz, A. F. Fradkov, Y. A. Labas, A. P. Savitsky, A. G. Zaraisky, M. L. Markelov, S. A. Lukyanov, *Fluorescent Proteins from Nonbioluminescent Anthozoa Species*, *Nature Biotechnology*, vol. 17, no. 10(1999), pp. 969–973.

④ A. Terskikh, A. Fradkov, G. Ermakova, A. Zaraisky, P. Tan, A. V. Kajava, X. N. Zhao, S. Lukyanov, M. Matz, S. Kim, I. Weissman, P. Siebert, “Fluorescent Timer”: Protein that Changes Color with Time, *Science*, vol. 290, no. 5496(2000), pp. 1585–1588.

⑤ M. Zimmer, *Glowing Genes: A Revolution in Biotechnology*.

⑥ K. A. Lukyanov, A. F. Fradkov, N. G. Gurskaya, M. V. Matz, Y. A. Labas, A. P. Savitsky, M. L. Markelov, A. G. Zaraisky, X. Zhao, Y. Fang, W. Tan, S. A. Lukyanov, *Natural Animal Coloration Can Be Determined by a Nonfluorescent Green Fluorescent Protein Homolog*, *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, no. 34(2000), pp. 25879–25882.

⑦ D. Yarbrough, R. M. Wachter, K. Kallio, M. V. Matz, S. J. Remington, *Refined Crystal Structure of DsRed, a Red Fluorescent Protein from Coral, at 2.0-Å Resolution*, *PNAS*, vol. 98, no. 2(2001), pp. 462–467.

构,而且还抢先一个月发表了成果<sup>①</sup>。虽然红色荧光蛋白的晶体结构与多管水母 GFP 的晶体结构极其相似,但它通常都以四聚体形态出现。这样,用其标记目的蛋白质时,很容易引起目的蛋白质性质的变化。2002年,钱永健团队成功地开发出单体形态的红色荧光蛋白突变体<sup>②</sup>。此后,红色荧光蛋白就和多管水母 GFP 一样,可以很方便地用于标记研究。由于红色荧光蛋白基因是从生活在热带海洋中的珊瑚虫里提取的,所以它在室温下的表达速度比从生活在北太平洋的多管水母中提取的多管水母 GFP 基因更快。

## 六、结 论

通过上述考察,我们可以得出如下结论:

1. 1962年,在普林斯顿大学做博士后研究的下村修在开展多管水母发光物质研究时,首次发现“绿色蛋白质”。

2. 1969年,哈佛大学的伍迪·哈斯廷和詹姆斯·莫林在研究腔肠动物发光蛋白质特性时,再次“发现”了多管水母“绿色蛋白质”,并将其命名为“Green Fluorescent Protein”,即绿色荧光蛋白。

3. 1979年,下村修在研究多管水母绿色荧光蛋白分子的发光机理过程中,受海萤研究的启发,推测出多管水母绿色荧光蛋白分子发光基团的化学结构。

4. 1991年,道格拉斯·普拉舍在美国伍兹霍尔海洋生物学实验室工作期间,用实验验证了下村修推测出的结构。同年,他还成功地分离出多管水母绿色荧光蛋白基因,并使用细菌的质粒作载体对其进行复制,确定了多管水母绿色荧光蛋白的基因序列。

5. 1993年,在美国哥伦比亚大学执教的马丁·查尔菲使用普拉舍提供的含有多管水母绿色荧光蛋白基因的质粒,做绿色荧光蛋白基因表达实验时取得成功,先后从大肠杆菌的体内和线虫的神经细胞内观察到多管水母绿色荧光

蛋白发出的荧光,实现绿色荧光蛋白在异体内的表达。

6. 1994年,加州大学圣地亚哥分校的钱永健基于普拉舍等人的研究,采用刚刚兴起的随机诱变方法改组绿色荧光蛋白基因时,获得一种光稳定性和荧光强度都好于野生型的多管水母绿色荧光蛋白 S65T 突变体,以及一种发蓝色荧光和一种发青色荧光的多管水母绿色荧光蛋白突变体。

7. 1996年,钱永健和俄勒冈州立大学的詹姆斯·雷明顿等人合作,解析出多管水母绿色荧光蛋白 S65T 突变体的晶体结构。同年,莱斯大学的乔治·飞利浦团队也完整地解析出野生型多管水母绿色荧光蛋白的晶体结构。

8. 1996年,钱永健团队利用与雷明顿合作所取得的有关绿色荧光蛋白晶体结构数据,通过使用计算机辅助设计,成功地开发出一种新的绿色荧光蛋白衍生物——黄色荧光蛋白。绿色、蓝色、青色、黄色荧光蛋白的获得,为同时追踪多种蛋白质分子在细胞内的活动情况提供了方便。

9. 1999年,俄罗斯的卢科亚诺夫团队在筛选具有较高应用价值的新型绿色荧光蛋白类似物,尤其是红色荧光蛋白的过程中,从珊瑚虫中发现四种发绿色荧光、一种发黄色荧光和一种发红色荧光的绿色荧光蛋白类似物。第二年,该团队又从非荧光生物沟迎风海葵中提取到紫色的绿色荧光蛋白类似物。

10. 2002年,钱永健团队成功地开发出单体形态的红色荧光蛋白突变体,解决了红色荧光蛋白通常以四聚体形态出现,用其标记目的蛋白质时容易引起蛋白质性质变化的难题。更适合作为标识的红色荧光蛋白的问世,标志着荧光蛋白标记法的应用与普及步入一个新时代。

很明显,自下村修 1962 年发现多管水母绿色荧光蛋白,到查尔菲 1993 年实现多管水母绿色荧光蛋白在异源生物体中的表达,整整经历

<sup>①</sup> M. A. Wall, M. Socolich, R. Ranganathan, The Structural Basis for Red Fluorescence in the Tetrameric GFP Homolog DsRed, *Nature Structural Biology*, vol. 7, no. 12(2000), pp. 1133-1138.

<sup>②</sup> R. E. Campbell, O. Tour, A. E. Palmer, P. A. Steinbach, G. S. Baird, D. A. Zacharias, R. Y. Tsien, A Monomeric Red Fluorescent Protein, *PNAS*, vol. 99, no. 12(2002), pp. 7877-7882.

了31年。在这31年里,尽管下村修推测出多管水母绿色荧光蛋白分子发光基团的化学结构,普拉舍成功地对多管水母绿色荧光蛋白基因进行分离与复制,并确定其基因序列,从而深化人们对多管水母绿色荧光蛋白结构与性质的认识,使人们无须大量捕捞野生多管水母就可以批量制备多管水母绿色荧光蛋白,但是,在此期间,人们始终未能为多管水母绿色荧光蛋白找到应用之途,科学发现始终未能转化为技术发明。

多管水母绿色荧光蛋白的研究由基础研究阶段迈入应用研究阶段的标志,是查尔菲成功地实现了多管水母绿色荧光蛋白在异源生物体中的表达。查尔菲1993年进行活细胞示踪实验时,能够从大肠杆菌的体内和线虫的神经细胞内观察到多管水母绿色荧光蛋白发出的荧光,无疑与下村修、普拉舍等人开展的基础研究有关。没有众多科学家的前期研究积累,便不会有查尔菲的重大研究突破。查尔菲实现多管水母绿色荧光蛋白在异源生物体中的表达,既是一项科学发现,也是一项技术发明。说其是科学发现,是因为查尔菲用实验证明多管水母绿色荧光蛋白无需任何辅助因子和反应底物,就可以自行形成发光基团。说其是技术发明,是因为查尔菲用实验证明可以使用多管水母绿色荧光蛋白来进行生物分子示踪。这种新方法的发明,为生物学的大发展提供了一种全新的工具,开启了使用生物荧光材料进行生物分子示踪研究的先河。

尽管查尔菲首创了使用多管水母绿色荧光蛋白进行生物分子示踪研究的新方法,但多管水母绿色荧光蛋白并非理想的生物荧光标记材料,而且只有绿色荧光蛋白时,人们无法同时进行多细胞跟踪研究。这样一来,如何进一步改进绿色荧光蛋白示踪效果,研制更多颜色的荧光蛋白,就成为摆在科学家面前的一项重要课题。针对这一需求,钱永健团队自1994年起使用刚刚兴起的随机诱变方法,开发出多种不同

颜色的多管水母绿色荧光蛋白突变体。但是,这些突变体的荧光激发波长都小于绿色荧光蛋白。因此,在多管水母绿色荧光蛋白的晶体结构被完全解明之后,钱永健1996年又通过改造多管水母绿色荧光蛋白的分子结构,“设计”出一种荧光激发波长更长的黄色荧光蛋白。钱永健在1994—1996年的三年里所开展的绿色荧光蛋白改良研究,可以说是在应用方向已经相当明确的情况下开展的一种旨在满足分子生物学发展需求的技术开发活动。

由于在可见光中,红色荧光蛋白的荧光激发波长最长,所以更适合作示踪材料。问题是如何开发这种能够更好满足生物研究需求的红色荧光蛋白。经过不断探索,俄罗斯科学家卢科亚诺夫最终独辟蹊径,于1999年从非发光生物——珊瑚虫中分离出红色荧光蛋白基因。但是,使用从珊瑚虫中分离出的红色荧光蛋白基因制备的红色荧光蛋白通常都以四聚体形态出现,仍然不适合做生物荧光标记材料。因此,研制单体形态的红色荧光蛋白成为当务之急。最终成功解决这一难题的仍然是钱永健,时间是2002年。此后,科学家们便可以很方便地将不同的蛋白质或细胞“染上”不同的颜色,借以跟踪研究其活动过程。

要而言之,尽管很多科学家都参与了多管水母绿色荧光蛋白的研究开发竞争,而且很多参与者都做出了原创性的贡献,但是做出具有里程碑意义的开创性贡献的只有两人,一是下村修,二是查尔菲。不过,如果没有钱永健的研究贡献,使用生物荧光标记材料进行蛋白质或细胞示踪研究便不可能快速地获得广泛普及,分子生物学也就不可能获得像今日这样突飞猛进的发展。因此,瑞典皇家科学院决定将2008年的诺贝尔化学奖授予对多管水母绿色荧光蛋白的发现、表达和开发做出杰出贡献的三位科学家下村修、马丁·查尔菲和钱永健,乃理所应当。

责任编辑:余 沉