

绿色荧光蛋白及其应用

邓超¹ 黄大昉² 宋福平^{1*}

(1 中国农业科学院植物保护研究所植物病虫害生物学国家重点实验室 北京 100193)

(2 中国农业科学院生物技术研究所 北京 100081)

摘要 随着对绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)研究的不断深入,人们对其结构、荧光产生机理等已有较为全面的认识。近年来利用 GFP 及其它荧光蛋白(FPs)发展了诸如荧光互补技术(FC)、荧光共振能量转移技术(FRET)和超分辨成像(super-resolution imaging)等一系列新技术,极大地促进了生物学、医药科学的研究。主要介绍了荧光蛋白的结构,荧光产生的机理,不同类型的荧光蛋白和基于荧光蛋白产生的新技术等方面的最新研究进展。

关键词 绿色荧光蛋白(GFP) 生色团 荧光产生机理 荧光蛋白的应用

中图分类号 Q946.1

1 绿色荧光蛋白发展简史

1962年, Shimomura等^[1]从维多利亚多管水母(Aequorea victoria)中分离纯化生物发光蛋白质——水母蛋白(aequorin),并观察到一个在紫外光下发出“非常明亮,浅绿色荧光”的副产物。1974年, Shimomura等^[2]纯化得到了这种自发荧光的蛋白(即GFP)。1985年 Prasher等^[3]构建维多利亚多管水母的cDNA文库,用于克隆水母蛋白的编码基因,并得到含有GFP片段的蛋白。1992年 Prasher等^[4]克隆到编码全长GFP的cDNA。但直到此时人们对GFP的应用前景还不甚了解。1994年, Chalfie等^[5]首次在原核的大肠杆菌和真核的秀丽隐杆线虫(Caenorhabditis elegans)中表达了具有荧光性的GFP,证明GFP的荧光产生不需要水母中特异组分的参与。同年,钱永健及其同事^[6]提出GFP中Ser65-Tyr66-Gly67氨基酸残基形成4-对羟基苯甲基-5-咪唑啉酮[4-(p-hydroxybenzylidene)-5-imidazolinone, p-HBI]生色团发光的机制,并表明生色团的形成不需要任何酶或辅助因子的参与,而只需分子氧的存在。此后对GFP的研究进入了高潮,并在1996年解析了其晶体结构^[7-8]。基于已有知识和晶体结构,人们通过突变的方法得到许多不同荧光性质的GFP。同时,受GFP启发,人们开始在其它生物中寻找类似的荧光蛋白,并相继在珊瑚、海葵、水螅、

甲壳类动物甚至低等脊索动物中发现了GFP样蛋白^[9], 荧光谱覆盖蓝色到远红光,使得荧光蛋白的使用范围不断扩大,极大地促进了生命科学和医药科学的发展。2008年,诺贝尔化学奖授予Osamu Shimomura, Martin Chalfie和Roger Tsien(钱永健),以表彰他们因“发现和发展的绿色荧光蛋白”所做的巨大贡献。

2 绿色荧光蛋白的结构

从维多利亚多管水母中分离出来的野生型GFP(avGFP)由238个氨基酸残基组成,分子量约27kDa,二级结构包括11个 β 折叠链(β -sheet strand), 8个螺旋(helix), 3个转折(turn)[图1(a)], 三维结构(PDB登录号1EMA和1GFL, 1GFL为二聚体)为 $42\text{ \AA} \times 24\text{ \AA}$ (高 \times 直径)的 β 圆柱(β -barrel), 圆柱两端由一些较短的 α 螺旋盖住,圆柱中央是几段 α 螺旋,生色团的三肽(Ser65-Tyr66-Gly67)位于圆柱中央[图1(b)~(d)]。该结构性质稳定,圆柱内部的微环境对维持生色团的正确构象从而产生荧光以及保护生色团不被氧气淬灭等都有重要作用^[10][图1(e)]。

3 绿色荧光蛋白生色团成熟和荧光产生机理

p-HBI生色团的成熟过程经历GFP多肽骨架折叠和生色团形成两个阶段,期间4个保守氨基酸残基发挥着特殊的功能作用^[10]。

收稿日期:2010-10-25 修回日期:2010-11-17

* 通讯作者,电子信箱:fpsong@ippcaas.cn

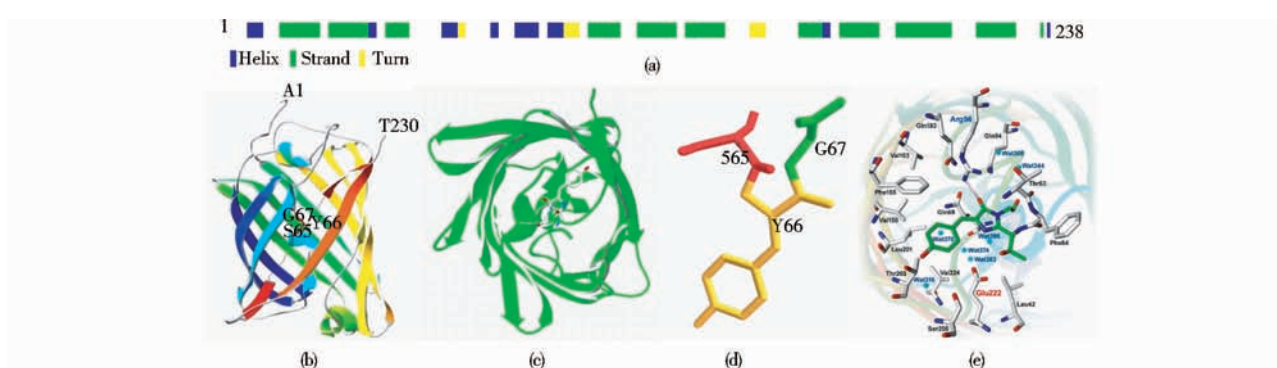


图1 野生型 avGFP 的结构

Fig.1 The structure of wild type avGFP

(a). Secondary structure (UniProt accession P42212); (b). Side view; the tripeptide of chromophore locates in the center of β -barrel; (c). Top view; (d). the tripeptide of chromophore (uncyclized); (e). The microenvironment surrounding the chromophore. (b) ~ (d) are generated from a subunit of wild type avGFP (PDB 1GFL); (e). from ref^[10]

3.1 多肽链的折叠

生色团形成之前, GFP 多肽链需折叠成一个近乎完整的十分稳定的 β 圆柱结构。该结构的微环境对下一步生色团的形成十分重要[图 1(e)]。同时, 多肽链的折叠又受生色团三肽的影响, 折叠过程虽然比较缓慢, 但不是生色团成熟的限速步骤^[10]。

3.2 生色团的形成

生色团的形成有两种可能的机理^[10]: A, 环化、脱水、氧化; B, 环化、氧化、脱水[图 2(a)]。折叠完成后, Gly67 的氨基氮 (N67) 亲核攻击 Ser65 上的羰基碳 (C65), 形成一个不稳定的五元杂环中间体 (中间体 1), 该步骤是可逆的^[11]。中间体 1 可能通过两个途径得以稳定并最终成为有荧光能力的生色团。A: 中间体 1 脱水脱氢形成稳定的中间体 2, 再在分子氧作用下脱去 C β_{66} 上的 1 个氢, 形成成熟的生色团并同时产生 1 分子 H_2O_2 。这是目前最广为接受的 avGFP 生色团形成机理。B: 中间体 1 在分子氧作用下形成稳定的中间体 3, 并同时产生 1 分子 H_2O_2 , 接下来通过脱水失去 C β_{66} 上的 1 个氢, 形成成熟的生色团。Wachter 课题组^[11]对 mGFPsol 的研究极大地支持了机理 B: 通过用氘取代 C β_{66} 上的氢, 发现脱氢并未发生在氧化阶段。

3.3 荧光产生机理

成熟的生色团在 β 圆柱中与周围的氨基酸残基、少量水分子间形成氢键网络结构[图 1(e), 图 2(c)]。该结构有 A, B, I 三种构象[图 2(b)、图 2(c)]。A 构象对应生色团的中性状态, 是野生型 avGFP 的主要存在形式, 激发峰为 395 nm (主激发峰)。B 构象对应生

色团的阴离子态, 在野生型 avGFP 中比例较少, 激发峰为 475 nm (副激发峰)。虽然 A、B 构象可以相互转化, 但该过程十分缓慢, 需借助一个中间构象 I 进行转化。基态条件下, A 构象与 I 构象之间的转化也十分缓慢, 但当 A 构象吸收光子 (395 nm) 成为激发态 A* 时能快速高效地将生色团上的质子转移给 Glu222, 从而成为 I* 态。该过程中 Glu222 通过 Ser205 和 1 个水分子 (Wat22) 介导, 与生色团中的酚基氧形成氢键网络, 完成质子转移, 称为激发态质子转移 (excited-state proton transfer, ESPT)。大部分 I* 态可以恢复到 I 态并发出波长为 508 nm 的荧光 (主发射峰), 很少一部分 I* 转化为 B* 态 (此步不发荧光, 由于该过程需要 Thr 203 发生旋转, 因此转化较慢), B* 态可以恢复到 B 态同时发出 503 nm 的荧光 (副发射峰), B 态也能吸收光子 (475 nm) 成为 B* 态^[10-12]。

综上所述, avGFP 在 A 态吸收 395 nm 光子成为 A* 态, A* 态通过 ESPT 快速转化为 I* 态, 大部分 I* 态恢复为 I 态的同时发出 508 nm 荧光, 少部分通过一个不发生质子转移且不发射荧光的缓慢过程成为 B* 态。B 态吸收 475 nm 光子成为 B* 态, B* 态恢复为 B 态发出 503 nm 荧光。由于 I* 和 B* 结构相似, 因此二者发射的荧光波长相近。

3.4 在生色团成熟过程和荧光产生中有特殊功能的氨基酸残基

avGFP 生色团的成熟和荧光产生需要一个适宜的微环境, Tyr66、Gly67、Arg96 和 Glu222 4 个保守氨基酸残基在其中有特殊的功能。

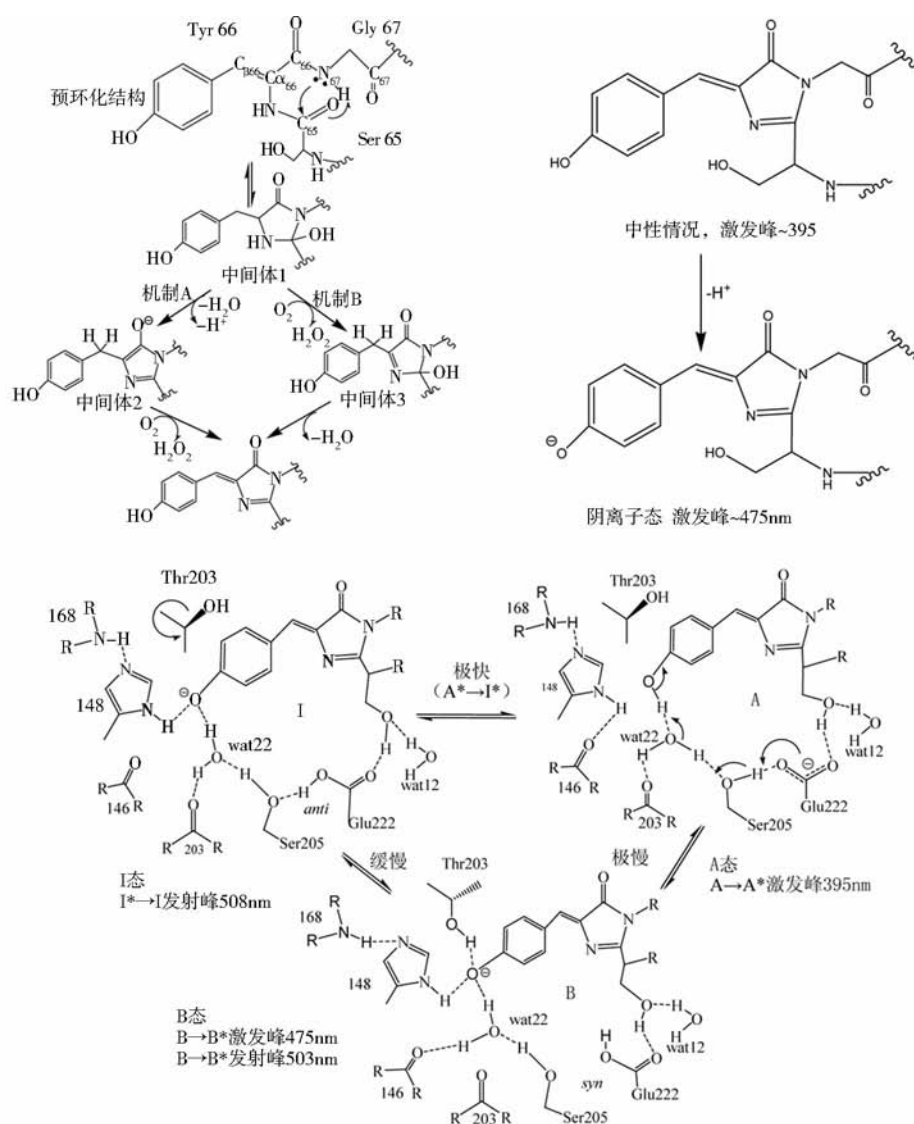


图2 生色团的成熟与荧光产生

Fig. 2 The maturation and photophysics of chromophore

(a). Two proposed mechanisms for chromophore maturation; (b). The different excitation peaks of chromophore; (c). The mechanism of fluorescence; (a), (b) adapted and redrawn from ref.^[10]; (c) from ref.^[10] and^[12]

Tyr66 在所有已知 avGFP 样蛋白中都保守,将其突变为某些氨基酸后生色团仍能成熟,只是可能会引入如侧链脱水、脱羰基、多肽骨架断裂等副反应^[10]。Gly67 在所有 avGFP 及突变体中都保守(也是生色团 3 个氨基酸中最保守的),对 Gly67 的点突变会导致多肽链折叠效率和生色团成熟效率大大降低。Arg96 在 avGFP 中具有许多不同的功能,如形成保守氢键、作为一个广义碱在生色团成熟脱水步骤中发挥作用^[13]。Glu222 作为一个广义碱在生色团成熟和荧光产生过程中与许多质子转移反应相关^[13]。

4 不同类型的荧光蛋白

通过定点突变和随机突变得到了不同突变型的 avGFP 样蛋白,珊瑚类荧光蛋白的发现使人们发展出更多性质各异的荧光蛋白,发射谱覆盖 420 ~ 655 nm,应用范围不断扩大^[14-15]。部分荧光蛋白及基本性质见表 1 所示。

4.1 蓝色荧光蛋白

蓝色荧光蛋白(blue fluorescent protein, BFP)激发峰约 381 nm(统计一些常见荧光蛋白的平均值,下同),

发射峰约 445 nm。其激发光接近于紫外光,在操作中 胞的自荧光现象^[14]。
易对细胞产生伤害,且较短的发射光波长还易导致细

表 1 部分荧光蛋白及其基本性质
Table 1 Properties of selected FPs

荧光蛋白	激发峰 /nm	发射峰 /nm	摩尔消光系数 (/10 ⁻³ M ⁻¹ cm ⁻¹)	量子产率	四级结构	相对亮度 /EGFP%	来源
EBF P	383	445	29	0.31	Monomer ^{a)}	27	Aequorea
mTagBFP	399	456	52	0.63	Monomer	98	Anthozoa
ECF P	439	476	32.5	0.4	Monomer ^{a)}	39	Aequorea
AmCyan	458	489	44	0.24	Tetramer	31	Anthozoa
EGF P	488	507	56	0.6	Monomer ^{a)}	100	Aequorea
mWasabi	493	509	70	0.8	Monomer	167	Anthozoa
EYF P	514	527	83.4	0.61	Monomer ^{a)}	151	Aequorea
TurboYFP	525	538	105	0.53	Monomer	169	Anthozoa
mOrange	548	562	71	0.69	Monomer	146	Anthozoa
DsRed	558	583	75	0.79	Tetramer	176	Anthozoa
mStrawberry	574	596	90	0.29	Monomer	78	Anthozoa
mCherry	587	610	72	0.22	Monomer	47	Anthozoa
mKate	588	635	31.5	0.28	Monomer	26	Anthozoa
Katushka	588	635	65	0.34	Dimer	67	Anthozoa

* signifies a weak dimer. The relative brightness (EGFP%) were derived from the product of the molar extinction coefficient and quantum yield, then divided by the value for EGFP. Data form ref^[14].

4.2 青色荧光蛋白

青色荧光蛋白 (cyan fluorescent protein, CFP) 激发峰约 449 nm,发射峰约 482 nm。将 AmCyan FP 编码基因按照人的密码子偏好性进行优化后在哺乳动物系统中表达活性得到了提高,该蛋白目前已实现商业化,商品名为 AmCyan1 (Clontech 公司)^[14]。

4.3 绿色荧光蛋白

绿色荧光蛋白是最早发现并得以应用的荧光蛋白,激发峰约 486 nm,发射峰约 506 nm。GF PS65T 突变体 (S65 突变为 T,下同) 荧光强度比野生型 GFP 强 5 倍,进一步进行 F64L 突变得得到 37℃ 下高效成熟的 EGFP^[16],是目前应用最广泛的荧光蛋白之一,其不足在于对 pH 稍敏感,有较弱的二聚体倾向。最近从温水珊瑚 *Cyphastrea microphthalma* 中分离得到一个绿色荧光蛋白 VFP (趋向于形成二聚体),通过突变得到两个单体蛋白 mVFP、mVFP1 和二聚体蛋白 dVFP,其亮度至少是 EGFP 的两倍,具有很大的潜在应用价值^[17]。

4.4 黄色荧光蛋白

黄色荧光蛋白 (yellow fluorescent protein, YFP) 激发峰约 518 nm,发射峰约 531 nm。改造自 avGFP 的 EYFP,是荧光最强、使用最广泛的荧光蛋白之一,但它对酸性十分敏感,pH6.5 条件下其荧光强度丧失 50%,同时其对氯离子也十分敏感,与许多来自水母的荧光

蛋白相比光稳定性也较差,但也可以利用此性质作为检测细胞内 pH 和氯离子浓度的生物传感器^[14]。

许多来自于珊瑚的荧光蛋白本身就发射长波荧光 (橙色、红色),很好地补充了荧光蛋白发射谱,拓宽了荧光蛋白的应用范围。

4.5 橙色荧光蛋白

橙色荧光蛋白 (orange fluorescent protein, OFP) 激发峰约 554 nm,发射峰约 578 nm。对 DsRed 定点突变和随机突变发展出许多有用的 DsRed 系列荧光蛋白。此外还有 mOrange、mOrange2 等橙色荧光蛋白。

4.6 红色荧光蛋白

红色荧光蛋白 (red fluorescent protein, RFP) 是另一类广泛使用的荧光蛋白,激发峰约 576 nm,发射峰约 607 nm。在众多红色荧光蛋白中最值得注意的是“mFruit”系列蛋白,mFruit 由 mRFP1 发展而来,而 mRFP1 则改造自 DsRed 蛋白。目前应用最广泛的 mFruit 蛋白是 mCherry 和 mStrawberry,其中 mCherry 的光稳定性更好因而更受青睐。

4.7 远红光荧光蛋白

由于长波能量低,不易引起细胞自荧光,穿透力强,不易被细胞吸收 (哺乳动物中的血红素对低于 600nm 的可见光有强烈吸收),因此远红光荧光蛋白 (far-red fluorescent proteins) 具有巨大的应用前景。常

见的远红光荧光蛋白包括由 eqFP578 发展而来的 Katushka、mKate、mKate2 和由 dsRed 发展而来的 mPlum 等^[18]。最近报道了一种由 DsRed-Express2 突变而来 E2-Crimson^[19], 激发峰 611 nm, 发射峰 646 nm, 对细胞无毒性, 在流式细胞和受激发射减损 (stimulated emission depletion, STED) 显微镜中有独特的应用。

4.8 具有特殊光学性质的荧光蛋白

除以上常规荧光蛋白外, 人们还发展了一系列有特殊光学性质的“光学荧光笔”(optical highlighters)^[14,20]。这类蛋白包括光活化荧光蛋白(photoactivatable FPs, PA-FPs)、光转化荧光蛋白(photoconvertable FPs, PC-FPs)和光开关荧光蛋白(photoswitchable FPs, PS-FPs)等。PA-FPs 生色团成熟需特殊波长的光进行诱导(可逆或不可逆); PC-FPs 能随激发光波长地改变发出不同颜色的荧光; PS-FPs 可以根据特定波长光照的改变在荧光态和非荧光态之间转化。显然这一类荧光蛋白能更好地实现人工控制, 目前这类蛋白荧光谱还较窄, 且大部分荧光强度有限, 限制了其应用, 但其在超分辨成像(super-resolution imaging)上的应用十分值得关注。此外还有一类发射谱随时间变化的荧光蛋白, 称为“荧光时钟”(fluorescent timers)^[21], 可能在组织发育、蛋白成熟和转移等研究方面有潜在应用价值。

5 荧光蛋白的应用

作为最有效的活细胞标记物质, 荧光蛋白可用于研究基因表达调控、生物大分子相互作用、胚胎发育以及发展生物传感器等。两种基于荧光蛋白的技术——荧光互补技术和荧光共振能量转移为研究生物大分子相互作用提供了十分有效的手段, 而基于“光学荧光笔”的超分辨成像技术突破了传统光学成像的衍射极限, 更具有重要意义。

5.1 荧光互补技术

荧光互补技术(fluorescence complementation, FC)是将荧光蛋白的编码基因分割为几个(一般为两个)不发荧光、互不重叠的部分, 分别与诱饵蛋白及猎物蛋白编码基因重组, 并共同转化到同一寄主细胞中进行表达, 若基因编码蛋白之间有相互作用到达合适的位置和距离时, 荧光蛋白各部分会组装成为完整的荧光蛋白从而产生荧光信号。由于技术手段有限, 目前应用最广泛的是双分子荧光互补技术(bimolecular fluorescence complementation, BiFC)^[22]。近年来出现了三分子荧光互补技术(trimolecular fluorescence

complementation, TriFC), 为研究更为复杂的多分子间相互作用提供了更多的方法^[23]。值得注意的是, 荧光互补技术依赖于荧光蛋白的自身性质, 并非所有荧光蛋白都能用于该项技术。

5.2 荧光共振能量转移技术

荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)的定量理论最早由 Förster 报道^[24]。当一个荧光分子(如荧光蛋白, 作为供体)的发射谱与另一个荧光分子(作为受体)的吸收谱有重叠时, 若这两个荧光分子距离靠近, 则会通过供体和受体之间电磁偶极相互作用发生非辐射的能量转移, 即发射光谱发生“红移”。由于要发生能量转移要求供体和受体之间的距离小于 $80 \sim 100 \text{ \AA}$ ^[14], 因此可用于研究分子的空间关系及相互作用。现已经发展了数十种不同吸收、发射谱的荧光蛋白, 已有许多实用的荧光蛋白组合^[25], 使得基于荧光蛋白的 FRET 成为应用最广泛的荧光技术之一。而且随着更多长波荧光蛋白的出现, 发射谱在不断拓宽, 又发展出了多色荧光共振转移技术^[25-26], 进一步拓展了该技术的应用。

此外, 人们还发展了荧光互补-荧光共振能量转移联用技术^[27], 用于研究更复杂的分子间相互作用关系。

5.3 基于“光学荧光笔”的超分辨成像技术

传统光学显微镜受衍射极限限制, 横向分辨率可用瑞利判据 $d_{xy} = 0.61\lambda / (n \sin\theta)$ 判断(λ 为波长, n 为物镜折射率, θ 为最大接收半角)。根据该判据, 可见光源或普通荧光分子标记条件下的成像分辨率一般为 200 nm 左右。虽然可通过降低波长提高分辨率, 但短波对细胞伤害大、穿透力差, 不适用于大部分生物学研究。为突破以上限制, 可以采用单分子定位(single-molecule localization)的方法: 将靶位点用可“开关”的荧光分子标记, 在某一时刻保证只有少数几个离散分子发射荧光, 从而避免高密度荧光分子同时发射荧光之间的衍射, 对这些荧光分子成像后漂白, 再让邻近的其它荧光分子发射荧光、成像、再漂白, 如此重复, 并将同一位置不同时刻的图像进行叠加处理, 便能得到超分辨率的图像。^[28-29]“光学荧光笔”由于可以很好地实现荧光“开”、“关”控制, 因而在基于单分子定位的超分辨成像方面具有重要的应用。将其应用到光敏定位显微镜(photoactivated localization microscopy, PALM)和荧光激活定位显微镜(fluorescence photoactivation localization microscopy, FPALM)等技术中, 已经得到分辨率达到几十纳米的图像, 极大地突破了传统光学成

像系统的衍射极限。^[28-30]

5.4 应用实例

de Jong 等^[31]将 GFP 与启动子融合,利用荧光延时显微技术和流式细胞技术对枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)一系列磷酸转移相关蛋白基因表达进行研究,为枯草芽孢杆菌芽孢形成中复杂的基因表达调控网络提供了直观的证据。通过选择合适的荧光蛋白,可以对细胞进行双色或多色标记。Milev 等^[23]利用 BiFC 和 TriFC 技术研究了 HIV-1 Gag 与细胞内双链 RNA 结合蛋白 Staufen1 之间的相互作用。Pandey 等^[32]利用 FRET 技术研究了 DNA 复制过程,提出了在复制过程中前导链和后随链同时完成的机制。Kwaaitaal 等^[27]利用 BiFC-FRET 联用技术研究了植物叶表皮细胞中的三元可溶性 *N*-乙基马来酰亚胺敏感因子附着受体复合物(ternary soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor attachment receptor complexes),拓宽了研究植物活细胞蛋白间相互作用的技术。人们还利用荧光蛋白发展了许多生物传感器^[33],用于酶活检测、离子浓度检测、pH 检测等。

6 总结与展望

荧光蛋白具有生色团自我成熟、活细胞内表达、荧光颜色众多、低细胞毒性等其它荧光物质无法比拟的优点。在应用过程中除要选择合适的荧光强度、激发和发射波长(特别是 FRET 和多色标记时)、生色团成熟时间(如胚胎早期发育研究中),还要注意密码子偏好性和物种差异,细胞所处环境(温度、pH、离子强度和种类等)。荧光蛋白的寡聚可能会影响融合蛋白的正确定位和迁移(几乎所有荧光蛋白都有寡聚趋势,通过对有相互作用的侧链氨基酸进行突变可消除这种趋势^[9])。此外,一些潜在的细胞毒性也值得我们注意(如蓝色荧光蛋白激发光接近紫外光,一些珊瑚类荧光蛋白细胞毒性已有报道^[9])。

荧光蛋白发展至今,人们对其在研究生物大分子相互作用及时空变化中的重要作用已没有质疑,但对于复杂的生命来说,荧光蛋白还不足以解决许多问题。因此要求我们发展更多、更有效的荧光蛋白和荧光蛋白技术,如发展适用于特定物种的荧光蛋白,发展波长更长的远红光荧光蛋白,发展有效的方法用于研究多分子间相互作用,发展荧光蛋白与其它技术的联用技术等。同时我们也应该认识到,荧光蛋白的应用不应局限于分子标记、生物大分子相互作用的研究,开

发各种基于荧光蛋白的生物传感器也是值得我们探索的课题。

致谢:感谢中国科学院遗传与发育生物学研究所吴乃虎研究员为本文的修改所提出的宝贵意见。

参考文献

- [1] 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: 223-239.
- [2] Shimomura O, Johnson F H, Morise H. Mechanism of the luminescent intramolecular reaction of aequorin. *Biochemistry*, 1974, 13(16): 3278-3286.
- [3] Prasher D, McCann R O, Cormier M J. Cloning and expression of the cDNA coding for aequorin, a bioluminescent calcium-binding protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 1985, 126(3): 1259-1268.
- [4] 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.
- [5] Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 1994, 263(5148): 802-805.
- [6] Heim R, Prasher D C, Tsien R Y. Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci*, 1994, 91(26): 12501-12504.
- [7] Ormrod M, Cubitt A B, Kallio K, et al. Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science*, 1996, 273(5280): 1392-1395.
- [8] Yang F, Moss L G, Phillips G N Jr. The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat Biotechnol*, 1996, 14(10): 1246-1251.
- [9] Wiedenmann J, Oswald F, Nienhaus G U. Fluorescent proteins for live cell imaging: opportunities, limitations, and challenges. *IUBMB Life*, 2009, 61(11): 1029-1042.
- [10] Craggs T D. Green fluorescent protein: structure, folding and chromophore maturation. *Chem Soc Rev*, 2009, 38(10): 2865-2875.
- [11] Zhang L, Patel H N, Lappe J W, et al. Reaction progress of chromophore biogenesis in green fluorescent protein. *J Am Chem Soc*, 2006, 128(14): 4766-4772.
- [12] Brejc 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*, 1997, 94(6): 2306-2311.
- [13] Sniegowski J A, Lappe J W, Patel H N, et al. Base catalysis of chromophore formation in Arg96 and Glu222 variants of green fluorescent protein. *J Biol Chem*, 2005, 280(28): 26248-26255.
- [14] Day R N, Davidson M W. The fluorescent protein palette: tools

- for cellular imaging. *Chem Soc Rev*, 2009, 38 (10): 2887-2921.
- [15] Piatkevich K D, Verkhusha V V. Advances in engineering of fluorescent proteins and photo-activatable proteins with red emission. *Curr Opin Chem Biol*, 2010 14(1): 23-29.
- [16] Heim R, Cubitt A B, Tsien R Y. Improved green fluorescence. *Nature*, 1995, (6516): 663-664.
- [17] Ilagan R P, Rhoades E, Gruber D F, et al. A new bright green-emitting fluorescent protein engineered monomeric and dimeric forms. *FEBS J*, 2010, 277(8): 1967-1978.
- [18] Lin M Z, McKeown M R, Ng H L, et al. Autofluorescent proteins with excitation in the optical window for intravital imaging in mammals. *Chem Biol*, 2009, 16 (11): 1169-1179.
- [19] Strack R L, Hein B, Bhattacharyya D, et al. A rapidly maturing far-red derivative of DsRed-Express2 for whole-cell labeling. *Biochemistry*, 2009, 48(35): 8279-8281.
- [20] Sample V, Newman R H, Zhang J. The structure and function of fluorescent proteins. *Chem Soc Rev*, 2009, 38 (10): 2852-2864.
- [21] Pletnev S, Subach F V, Dauter Z, et al. Understanding blue-to-red conversion in monomeric fluorescent timers and hydrolytic degradation of their chromophores. *J Am Chem Soc*, 2010, 132 (7): 2243-2253.
- [22] Kerppola T K. Visualization of molecular interactions using bimolecular fluorescence complementation analysis: characteristics of protein fragment complementation. *Chem Soc Rev*, 2009, 38 (10): 2876-2886.
- [23] Milev M P, Brown C M, Mouland A J. Live cell visualization of the interactions between HIV-1 Gag and the cellular RNA-binding protein Staufen1. *Retrovirology*, 2010 (1): 41.
- [24] Förster T. Zwischenmolekulare energiewanderung and fluoreszenz. *Ann. Physik*. 1948, 437(1-2): 55-75.
- [25] Shcherbo D, Souslova E A, Goedhart J, et al. Practical and reliable FRET/FLIM pair of fluorescent proteins. *BMC Biotechnol*, 2009, 9: 24.
- [26] Galperin E, Verkhusha V V, Sorkin A. Three-chromophore FRET microscopy to analyze multi-protein interactions in living cells. *Nat Methods*, 2004, 1(3): 209-217.
- [27] Kwaaitaal M, Keinath N F, Pajonk S, et al. Combined bimolecular fluorescence complementation and Förster resonance energy transfer reveals ternary SNARE complex formation in living plant cells. *Plant Physiol*, 2010, 152(3): 1135-1147.
- [28] Huang B, Bates M, Zhuang X W. Super-resolution fluorescence microscopy. *Annu Rev Biochem*, 2009, 78(1): 993-1016.
- [29] Patterson G, Davidson M, Manley S, et al. Superresolution imaging using single-molecule localization. *Annu Rev Phys Chem*. 2010(61): 345-367.
- [30] Lippincott-Schwartz J, Patterson G H. Photoactivatable fluorescent proteins for diffraction-limited and super-resolution imaging. *Trends Cell Biol*. 2009, 19(11): 555-565.
- [31] de Jong I G, Veening J W, Kuipers O P. Heterochronic phosphorelay gene expression as a source of heterogeneity in *Bacillus subtilis* spore formation. *J Bacteriol*, 2010, 192 (8): 2053-2067.
- [32] Pandey M, Syed S, Donmez I, et al. Coordinating DNA replication by means of priming loop and differential synthesis rate. *Nature*, 2009, 462(7275): 940-943.
- [33] Ibraheem A, Campbell R E. Designs and applications of fluorescent protein-based biosensors. *Curr Opin Chem Biol*, 2010, 14(1): 30-36.

Green Fluorescence Protein and its Application

DENG Chao¹ HUANG Da-fang² Song Fu-ping¹

(1 State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection,
Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

(2 Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract The structure and fluorescence mechanism of green fluorescent proteins (GFP) have been well understood after decades of study. Based on these knowledge, scientists discovered and developed a range of novel fluorescent proteins (FPs) with a wide emission spectrum covering from 424 ~ 655 nm. With the colorful palette of FPs, new technologies such as fluorescence complementation (FC) fluorescence resonance energy transfer (FRET) and super-resolution imaging have been developed and act as powerful tools in biological and medical studies. The latest progress about the structure, chromophore maturation and fluorescence mechanism of GFP, as well as the extensive FP families and the new technologies based on them were provided.

Key words Green fluorescent proteins (GFP) Chromophore Fluorescence mechanism Application of fluorescence proteins