

大型多管水母的绿色荧光蛋白

罗文新¹, 张 军¹, 杨海杰¹, 谢小燕¹, 覃映雪¹, 逢淑强¹, 李少菁¹, 夏宁邵¹

(1 厦门大学 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 福建 厦门 361005)

摘要: 采用 PCR 扩增和 southern 杂交筛选相结合的方法, 从厦门水域的大型多管水母中分离到了新的绿色荧光蛋白基因 *gfpxm*, 并在大肠杆菌中进行了表达. *gfpxm* DNA 序列编码区长为 1 042 bp, 包含 3 个外显子和两个内含子, cDNA 编码区全长为 717 bp. *gfpxm* cDNA 与已知野生型 *Aeqgfp 10* cDNA 长度一致, 核苷酸同源性为 81.9%, 推导的氨基酸序列全长为 238 个氨基酸, 与 *AeqGFP10* 的氨基酸同源性为 83.6%. 将 *gfpxm* 克隆至 pTO-T7 表达载体, GFPxm 在大肠杆菌 BL21 中的表达量达菌体总蛋白的 50% 左右. 荧光性质和强度分析结果表明, GFPxm 蛋白的激发峰为 476 nm, 发射峰为 496 nm, 荧光量子产率为 1. GFPxm 蛋白的荧光很稳定, 对热、碱性、变性剂和盐等有较强抗性.

关键词: 大型多管水母; 绿色荧光蛋白; 克隆表达; 荧光性质

中图分类号: Q959.131+.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-4193(2002)04-0082-

10

1 引言

海洋生物发光是一个很普遍的生物学现象, 从原生动到脊椎动物的很多种类均有生物发光, 如海萤、细菌、磷虾、腔肠动物等. 早期的海洋生物发光研究大多涉及分类、形态和生态方面, 目前生态研究、生理生化研究是生物发光研究的主要方面. 从不同动物体内提取的荧光蛋白的结构、性质不尽相同, 不同动物品种的荧光发生机理也有很大的差别. 因为大部分海洋生物的遗传背景大都不清楚, 使分子生物学在海洋生物研究中的应用相对滞后于生物学的其他领域. 迄今为止, 对发光物质的基因工程研究开展不多.

目前对腔肠动物门多管水母属的维多利亚多管水母 (*Aequorea victoria*) 的发光系统研究得较为深入. 多管水母体内存在着两种发光蛋白, 即绿色荧光蛋白 (GFP) 和光蛋白 (ae-

收稿日期: 2001-02-26; 修订日期: 2001-04-26.

基金项目: 国家海洋 863 计划领域青年基金资助项目 (819-Q-06); 国家自然科学基金资助项目 (C01040101); 福建省自然科学基金资助项目 (C0010001); 国家海洋局海洋生物工程重点实验室开放基金资助项目 (HY9703).

作者简介: 罗文新 (1970), 女, 湖南省湘潭市人, 助理研究员, 博士, 从事海洋生物研究.

quorin). aequorin 由 apoaequorin 蛋白、分子氧和腔肠动物型荧光素组成. 当与 3 个 Ca^{2+} 结合, aequorin 将发生氧化反应并发射蓝光, 其最大发射波长为 469 nm. GFP 是由 238 个氨基酸残基组成的单链多肽, 分子量约为 27 KD, 被紫外光和蓝光激发后能发出绿色荧光, 最大激发波长为 395 nm, 在 475 nm 处有一个肩峰, 最大发射波长为 508 nm. 当能量从 Ca^{2+} 活化的 aequorin 转移到 GFP 以后, GFP 即发出绿色荧光^[1].

维多利亚多管水母的绿色荧光蛋白和光蛋白基因已得到分离并在多种异源生物中活性表达. GFP 作为监测活细胞内基因表达、蛋白定位、细胞分化发育的良好标记, 已被大量应用于细菌、真菌、植物、低等动物到哺乳动物等多种生命形式的多个领域的研究中^[2~8]. 目前 GenBank 中登录的 *gfp* 基因序列共有 48 条, 其中野生型仅为 4 条, 而且均来自美国西海岸附近水域的维多利亚多管水母, 其余均是根据这几株氨基酸序列加以突变的人工序列.

我国拥有漫长的海岸线, 拥有丰富的海洋生物资源, 仅发光水母就有数十种以上, 其中的大型多管水母(*Aequorea macrodactyla*) 是我国近海常见的暖水种. 本研究试从大型多管水母分离新的绿色荧光蛋白基因, 并在大肠杆菌中进行表达, 进一步对其理化性质进行初步研究, 这些工作的基础将有利于多管水母发光系统的进一步研究, 明确其发光机制, 并且能够将绿色荧光蛋白广泛应用于生命科学研究的多个领域.

2 材料和方法

2.1 材料

2.1.1 大型多管水母

1998 和 1999 年 8 月捕捞自厦门东海域. 它的主要形态特征有: 生殖腺几乎占了整条辐管, 辐管达到 130 根左右, 触手为 30 条左右, 触手球有背龙突, 根据这些特征初步确定为大型多管水母^[9]. 这种水母在受到机械刺激时即在辐管处发出较强的绿色荧光.

2.1.2 菌株和质粒

大肠杆菌 JM101, BL21(DE3) 株为本室保存, 质粒 pTO- T7, pTO- T7EGFP 由本室构建保存, pEGFP, pGFPuv 质粒购自 Clontech 公司.

2.1.3 酶及其他生化试剂

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自美国 Promega 公司, NBT/BCIP, DNA 柱式胶回收试剂盒购于上海华舜生物工程公司, AMV, Random Primer 购自 Takara 公司, Trizol 购自 GIBCO 公司, PCR DIG Labeling mix 购自德国 Boehringer Mannheim GmbH 公司, PCR 用 Taq 酶、dNTP 购自上海生工生物工程公司, FITC 购自美国 Promega 公司.

2.1.4 PCR 引物

PCR 引物由上海博亚生物技术有限公司合成, 见表 1.

2.2 方法

2.2.1 水母的捕捞

从厦门东海域的定置网中捕捞.

表 1 引物名称和序列

引物名称	引物序列(5' 端到 3' 端)
wgF5	5 - CAC AGG ATA ACA AAG ATG- 3
wgF4	5 - GAT AAC AAA GAT GAG TAA AGG AG- 3
wgF3	5 - GTC ACT ACT TTC TCT TAT GG- 3
wgR3	5 - AAA CTT GAC TTC AGC ACG TCA- 3
wgR2	5 - CAA TTG GAG TCT GGA CAT TTA- 3
wgR5	5 - GTG TCA ATT GGA AGT CTG G- 3
wgR4	5 - ATT AGG AAT GCA CTC CAG TAG- 3

2.2.2 水母组织总 DNA 的制备

取 2 cm³ 水母伞缘组织于匀浆器中, 加入 4 cm³ DNA 提取液, 匀浆后用等体积酚抽提, 12 000 r/min 离心 5 min, 吸取上清液, 加入 5 mm³ RNase A (10 mg/cm³), 37 ℃ 静置 2 h, 加入等体积氯仿, 12 000 r/min 离心 5 min, 吸取上清液, 加入乙酸铵 (终浓度 0.3 mol/dm³) 和 2 倍体积无水乙醇, 混匀即可看到丝状 DNA, 将 DNA 绕在玻棒上, 在 70% 乙醇中洗涤一次, 置于一干净 Eppendorf 管中, 烘干后溶于 TE 中。

2.2.3 水母组织总 RNA 的提取及 cDNA 的合成

取伞缘发光组织约 2 cm³ 至匀浆器中, 加入 3 cm³ Trizol 匀浆后, 分装到 1.5 cm³ Eppendorf 管中, 每 1 cm³ 加入 200 mm³ 氯仿, 混匀后静置 10 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液, 加入等体积异丙醇于 -20 ℃ 静置 10 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 沉淀用 70% 乙醇洗涤一次, 真空抽干后溶于 RT-Buffer 备用。以 Random Primer 为引物, 按常规操作将 RNA 反转录成 cDNA。

2.2.4 探针标记和分子杂交

合成特异性引物, 并以 pGFPUV 为模板, dNTP 为地高辛标记的 dNTP Mix, 经 PCR 扩增出 GFPUV 从 181 bp 到 512 bp 的一段 332 bp 的双链 DNA 作为筛选 *gfpxm* 基因的探针, PCR 反应条件为 94 ℃ 5 min, 94 ℃ 40 s, 57 ℃ 35 s, 72 ℃ 35 s, 30 个循环, 72 ℃ 进行 10 min。

southern 杂交及斑点杂交按常规分子生物学方法操作^[10]。

2.2.5 *gfpxm* 基因 DNA 序列的扩增

以水母 DNA 为模板, 在 7 条引物组成的 4 种引物对的套式及半套式 PCR 产物中筛选出了两个 southern 阳性片段。经套式 PCR 扩增出约 900 bp 片段, PCR 扩增条件为: 第 1 次 PCR 引物为 wgF4 和 wgR4, 反应条件 94 ℃ 15 min, 94 ℃ 60 s, 46 ℃ 90 s, 72 ℃ 90 s, 35 个循环, 72 ℃ 10 min, 第 2 次 PCR 引物为 wgF3 和 wgR5, 94 ℃ 5 min, 94 ℃ 50 s, 59 ℃ 50 s, 72 ℃ 60 s, 35 个循环, 72 ℃ 10 min。经半套式 PCR 扩增出约 550 bp 片段, PCR 扩增条件与以上条件相同, 以 wgF5 和 wgR2 为第 1 次 PCR 引物, wgF5 和 wgR3 为第 2 次 PCR 引物。

2.2.6 *gfpxm* cDNA 序列的扩增

在 *gfpxm* 基因 DNA 序列的基础上, 设计合成了两条引物: wgF6 5'-GGA TCC ATG AGT AAA GGA GAA GAA C-3'; wgR6 5'-TTA, TTT, GTA, TAG, TTC, ATC, CAT, GCC-3'。采用半套式 PCR 扩增 cDNA 序列, 第 1 次 PCR 引物为 wgF4 和 wgR6, 反应条件为 94 ℃ 10 min, 94 ℃ 50 s, 52 ℃ 50 s, 72 ℃ 60 s, 35 个循环, 72 ℃ 10 min; 第 2 次 PCR 引物为 wgF6 和 wgR6, 反应条件为 94 ℃ 5 min, 94 ℃ 50 s, 58 ℃ 45 s, 72 ℃ 60 s, 35 个循环, 72 ℃ 10 min。结果得到一约为 720 bp 片段, southern 杂交阳性。

2.2.7 质粒 DNA 的提取、DNA 纯化及回收

按常规分子生物学方法操作^[10]。

2.2.8 PCR 产物的克隆

纯化所需片段长度的 PCR 产物, 连接在 pMD 18-T vector 上, 在 E. coli DH5 细胞中扩增, 酶切鉴定、斑点杂交鉴定, 筛选出阳性克隆。

2.2.9 表达质粒的构建和蛋白的表达

用 Nde I/Sal I 双酶切从质粒 pTGF_{Pcxm} 上切下 GFP_{cxm} 720 bp 片段, 克隆至相同酶切

的 pTO-T7 E. coli 表达载体, 得到表达质粒 pTO-T7GFP_{xm}. 用 E. coli BL21 (DE3) 作表达菌株, 挑单菌落于 200 cm³ LB (含 Kan100 g/cm³) 培养基中, 37 振荡培养过夜, 菌液 OD600 值达 0.8 左右, 0.2 mmol/dm³ 的 IPTG 诱导, pTO-T7GFP_{xm} 15 表达 36 h 后收获菌体, 超声破碎, 15 000 r/min 离心 10 min, 沉淀溶于与上清等体积的 20 mmol/dm³ Tris-HCl (pH 值 7.6) 中, 取等量上清和沉淀溶液进行 SDS-PAGE 电泳. 堆积胶浓度为 5%, 分离胶浓度为 12%. 对蛋白质 SDS-PAGE 结果用扫描仪在波长为 560 nm 处扫描分析.

2.2.10 GFP_{xm} 的纯化

菌体超声上清经硫酸铵沉淀, 溶于 1xPBS (pH 值 7.45), 对 1xPBS (pH 值 7.45) 透析, 经 0.22 μm 微孔滤膜过滤. 样品进一步经过高压液相分子筛色谱纯化, 色谱柱为 TSK GEL SW3000 21.5 x60, 洗脱缓冲液为 1xPBS pH 值 7.45, 合并目的蛋白峰, 对 25 mmol Bis-tris pH 值 6.5 缓冲液透析, 所得样品再进行高压液相离子交换色谱纯化, 色谱柱为 Q Hyper D 20, 线性洗脱液为 0~1 mol NaCl/25 mmol Bis-tris pH 值 6.5. 后两步所用高压液相色谱仪为 Beckman System Gold Nouveau HPLC (125NMP/166NMP).

2.2.11 GFP_{xm} 的荧光光谱测定

取 3 cm³ 纯化样品用荧光全谱仪 (俄罗斯 Lumax 公司) 测定激发光谱和发射光谱.

2.2.12 GFP_{xm} 的量子产率测定

用参比法测定荧光量子产率^[11], 参比物质为 FITC. 积分荧光强度用 RF-5000 Recording Spectrofluorophotometer (Shimadzu Corporation, Japan) 测定.

2.2.13 GFP_{xm} 的理化性质初步分析

取 100 mm³ 菌体超声上清, 分别测定温度、pH 值、尿素、盐酸胍、SDS 和 8 种盐对 GFP_{xm} 荧光的影响, 除温度以外的其余反应时间为 30 min, 之后用荧光全谱仪检测 GFP_{xm} 的荧光强度.

2.2.14 DNA 序列分析

DNA 序列开放阅读框架的分析用 dnasis 程序, 蛋白质序列同源性比较用 clustalx 程序.

2.2.15 GenBank 登录号

AEVGFP A M62653, AVGFP1 X83959, AVGFP2 X83960, AEVGFP L29345, *gfpxm* AY013824, *gfpdnaxm* AY013821

3 结果及分析

3.1 *gfpxm* 基因 DNA 序列的分离

最先在 GeneBank 中登录的野生型 *gfp* 是 1992 年 Prasher^[12] 根据 GFP 的氨基酸序列合成相应的寡聚核苷酸片段, 以此为探针从 *Aequorea victoria* 的 cDNA 文库中筛选出的 *gfp* 的几个阳性克隆之一 *gfp10*. 本研究则是根据 *gfp10* 的序列来设计特异性引物, 以大型多管水母的 DNA 为模板, 用 PCR 扩增和 southern 杂交筛选相结合的方法来分离大型多管水母的 *gfpxm* 基因. 将 6 条上游引物和 6 条下游引物进行多种组合形成多种引物对, 在不同条件下进行套式或半套式 PCR 扩增. 以地高辛标记的一段 GFP_{uv} 序列作为探针, 将 PCR 产物进行 southern 杂交, 对扩增片段为阳性者进行测序. 结果在 7 条引物组成的 4 组引物对的套式及半套式 PCR 产物中筛选出了约为 900 和 550 bp 两个 southern 阳性片段.

将两个片段分别克隆至 pMD-18 T 载体中, 克隆质粒 pTG900, pTG550 经斑点杂交鉴定为阳性. 质粒测序结果表明, 这两个片段分别为新分离的 *gfp* 基因的前一部分和后一部分, 两者在中间有 200 多个碱基完全相同. 因此, 我们得到了来自于厦门港大型多管水母的 *gfp* 基因的 DNA 序列(图 1), 称之为 *gfp_{xm}*. *gfp_{xm}* DNA 序列(Genbank 登录号 AY013821) 包括 3 个外显子和两个内含子, 编码区总长为 1 042 bp, 而维多利亚多管水母 *Aequifp* 10DNA 序列中相应片段的长度达 2 300 bp. *gfp_{xm}* 基因 3 个外显子的长度分别为 206, 295 和 216 bp, 与 *Aequifp* 10DNA 中 3 个外显子之间的核苷酸同源性分别为 84.0%, 84.1%, 76.9%. *gfp_{xm}* 和 *Aequifp* 10 DNA 中两个内含子序列之间存在着极大的差异, *GFP_{xm}* 第 1 和第 2 内含子长度分别为 182, 139 bp, *Aequifp* 10 第 1 和第 2 内含子长度则分别为 532, 1 067 bp.

```

1  ATGAGTAAAGGAGAAGAACCTTTCTACTGGGATTGTCCAGTTCTCATTGAGTTAGACGGT
   M S K G E E L F T G I V P V L I E L D G
61  GATGTCCATGGACATAAATCTCTGTCCAGAGGAGAAGGGGAAGCGCATGCAGATTATGGA
   D V H G H K F S V R G E G E G D A D Y G
121 AAACCTGAAATCAAATTCATTTGCACTACTGAAAAGCTACCAGTTCCATGGCCAACACTT
   K L E I K F I C T T G K L P V P W P T L
181 GTTACTACATTCTCTTATGGCATCCA gtaagtggttctetactaatcaatttgacgtcct
   V T T F S Y G I Q
241 gtgcttactgggtagggtgtaaccaaaccgattccagageatcatcttaacatatgctga
301 tgacgggagagaagatttaaaaagttgaaaaagccctggaacgtggtctgtaattcaact
361 ataaatgatttttcaactgtttgttag ATGTTTCGCAAGATACCCAGAACACATGAAAA
                                     C F A R Y P E H M K M
421 TGAATGACTTCTTCAAGAGTGCATGCCTGAGGGTTACATTCAAGAAAGAACCATCTTTT
   N D F F K S A M P E G Y I Q E R T I F F
481 TCCAAGATGATGAAAATACAAGACACGTGGTGAAGTCAAGTTTGAAGTGATACTCTTG
   Q D D G K Y K T R G E V K F E G D T L V
541 TTAACAGAATTGAGCTCAAAGTATGGACTTTAAAGAAGATGGCAATATCCTTGGACACA
   N R I E L K G M D F K E D G N I L G H K
601 AGTTGGAGTACAATTTAACTCACATAATGTATACATTATGCCGGACAAAGCCAATAATG
   L E Y N F N S H N V Y I M P D K A N N G
661 GACTCAAAGTCAATTTCAAATTT gtgagtaaatatagttttaccatatgtacgaggta
   L K V N F K I
721 cattttcttacatttttactggaaaataaattttaaaaattacagagttacaccgtcatac
781 aactgcccgtgaattattttagaactgggtgattttttttcag AGACACAATATCGAAGGT
                                     R H N I E G
841 GGTGGTGTCCAACCTTGCTGATCATTACCAAACAATGTTCCTCCCTTGAGACGGTCCCTGTC
   G G V Q L A D H Y Q T N V P L G D G P V
901 CTTATACCAATCAATCACTACCTATCCACGCAAACAGCCATTTCAAAGATCGAAATGAG
   L I P I N H Y L S T Q T A I S K D R N E
961 ACGAGAGATCATATGGTGGTTTCTGGAATTTTCTCAGCTGTGGACATACATGGCATG
   T R D H M V F L E F F S A C G H T H G M
1021 GATGAACTATACAAATAAATGT
      D E L Y K *

```

图 1 厦门大型多管水母 *gfp_{xm}* 基因 DNA 序列及推测的氨基酸序列

3.2 *gfpxm* 基因 cDNA 序列的获得

在 *gfpxm* 基因 DNA 序列的基础上, 重新设计合成了两条引物, 通过半套式 PCR 扩增及 southern 杂交鉴定, 结果得到一约为 720 bp 片段, 克隆至 pMD-18T 载体得到质粒 pTGF-P_{cxm}, 测序结果表明这一片段即为 *gfpxm* 基因的 cDNA 序列 (Genbank 登录号 AY013824), 编码区全长为 717 bp, 与已知野生型 *Aeqgfp10* 基因 cDNA 长度相等, 但其中有 130 个碱基出现差异, 两者之间的序列同源性为 81.9%。*gfpxm* cDNA 与另外 3 种野生型 QEVGFP, AVGFP1, AVGFP2 的核苷酸同源性分别为 81.6%, 81.1% 和 80.8%。

3.3 GFP_{xm} 蛋白氨基酸序列推测

由 *gfpxm* 基因的 cDNA 序列推测其氨基酸序列, 蛋白全长为 238 个氨基酸, 分子量约为 27 KD。与 AeqGFP10 的氨基酸序列进行比较 (图 2), 显然两者存在很大的差异, 其中有 39 个氨基酸不同, 两者的同源性为 83.6%。已知的 4 条野生型 *gfp* 基因的核苷酸同源性在 96% 左右, 238 个氨基酸中只有 8 个位点存在变异。GFP_{xm} 氨基酸序列与 AVGFP1, AVGFP2, AEVGF 氨基酸序列的同源性分别为 82.4%, 81.5%, 81.9%。

AeqGFP10	MSKGEELFTGVVPI1LVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLT1KFICTTGKLPVWPPTL
GFP _{xm}	MSKGEELFTGIVPVL1ELDGDVHGHKFSVRGEGEGDADYGKLEIKFICTTGKLPVWPPTL *****;*:*:*****;***** ***** ***** :*****
AeqGFP10	VTTFSYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERT1FFKDDGNYKTRAEVKFEQDITLV
GFP _{xm}	VTTFSYGIQCFARYPEHMKMNDFFKSAMPEGYIQERT1FFQDDGKYKTRGEVKFEQDITLV *:*:;*:*:*:*:*:*:*:*****:*****:***:***:*****
AeqGFP10	NRIELKGLIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLAD
GFP _{xm}	NRIELKGMDFKEDGNILGHKLEYNFNHNVYIMPDKANGLKVNFKIRHNIEGGVQLAD *****:*****:*****:***:***:*****:*,*****
AeqGFP10	HYQQNTP1IGDGPVLLPDNHYLSTQSALSCKDPNEKRDMVLEFLTAAGITTHGMDELYK
GFP _{xm}	HYQTNVPLGDGPVLLIPINHYLSTQTAISKDRNETRDHVMVLEFFSACGHTHGMDELYK ***:***:*****:*****:***:*** *****:***:*** *****

图 2 GFP_{xm} 氨基酸序列和 AeqGFP10 氨基酸序列比较

3.4 GFP_{xm} 在大肠杆菌中的表达

将 *gfpxm* 基因克隆至 pTO-T7 E. coli 表达载体, 得到表达质粒 pTO-T7GFP_{xm} (图 3)。pTO-T7 由本实验室在 pET24(+) 的基础上构建, 在调控表达区带有一个增强子序列, 使表达效率获得显著提高^[13]。pTO-T7GFP_{xm} 在 BL21 菌株中进行表达, 结果 (见图 4) 表明表达的 GFP_{xm} 蛋白达菌体总蛋白量的 50% 左右, 而其中约有 90% 的蛋白存在于包涵体中, 上清中可溶性的 GFP_{xm} 蛋白只占 10% 左右。

3.5 GFP_{xm} 蛋白的纯化和荧光性质初步分析

将上述 pTO-T7GFP_{xm} 表达的超声上清经过 HPLC 纯化, 得到 GFP_{xm} 的纯度为 95% 以上

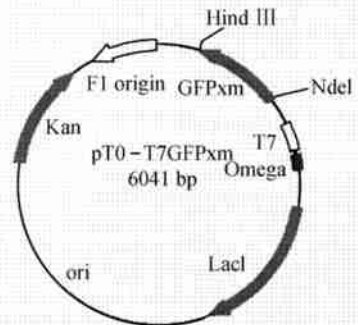


图 3 pTO-T7GFP_{xm} 质粒

(图4). 用荧光全谱仪测定纯化 GFP_{xm} 的荧光光谱, 结果表明(图5), GFP_{xm} 蛋白的激发峰为 476 nm, 发射峰为 496 nm. 以 FITC 作为参比标准, 用参比法测定, 测得 GFP_{xm} 的荧光量子产率为 1

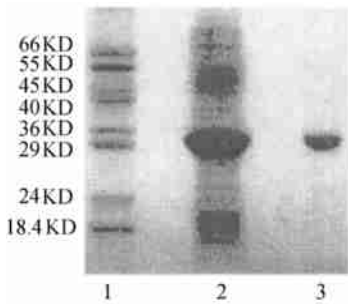


图4 GFP_{xm} 在 *E. coli* 中的表达

1 分子量对照 2 GFP_{xm} 的表达 3 纯化的 GFP_{xm} 蛋白

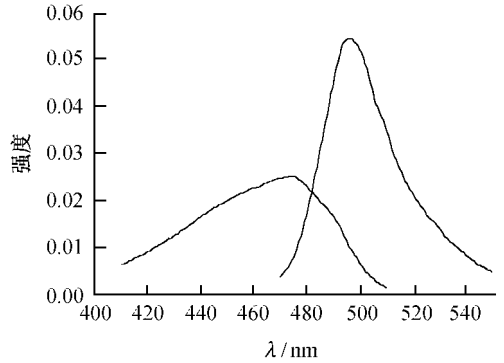


图5 GFP_{xm} 蛋白的荧光光谱

3.6 GFP_{xm} 蛋白的理化性质初步分析

检测不同温度和时间处理对 GFP_{xm} 蛋白荧光的影响, 由图 6 a 可知, 在 63 °C 水浴 3 h

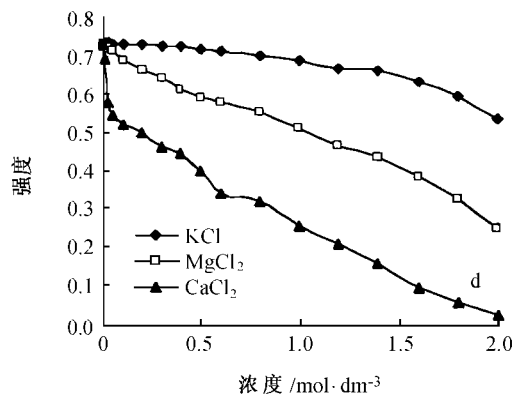
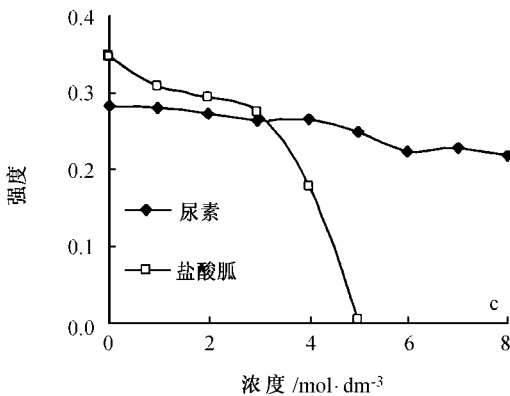
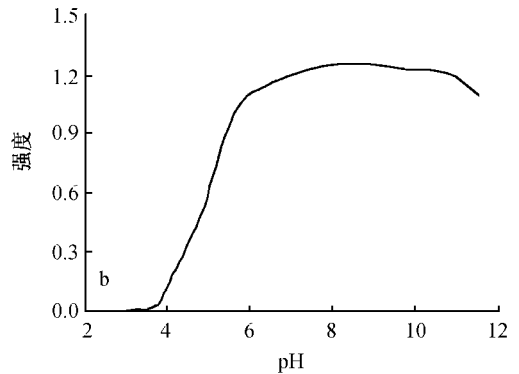
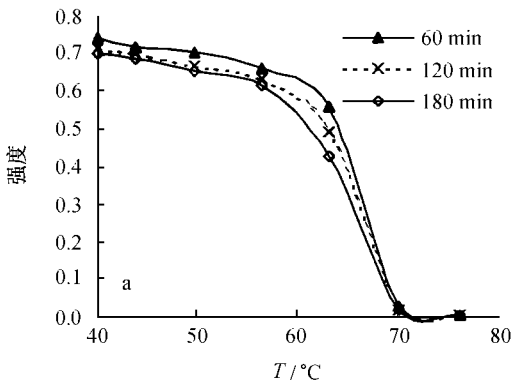


图6 GFP_{xm} 蛋白的理化性质测定

a. 温度的影响 b. pH 值的影响 c. 尿素和盐酸胍的影响 d. KCl, MgCl₂ 和 CaCl₂ 的影响

后, 荧光强度下降 37%, 而在 56 ℃ 以下水浴 3 h 对荧光强度仍无明显影响. 可知 GFP_{xm} 蛋白具有较强的抗高温能力(见图 6a). GFP_{xm} 蛋白荧光在 pH 值 6~ 11.5 之间稳定, 而在 pH 值小于 6 及 11.5~ 12 时开始受影响, pH 值为 5.0 时荧光下降 50%, pH 值达到 3.5 则荧光完全消失(见图 6b), 然而当 pH 值恢复到碱性条件时, GFP_{xm} 蛋白荧光强度亦能回到原来水平. GFP_{xm} 蛋白荧光在高浓度尿素(8 mol/dm³)中仍保持稳定, 而在 3 mol/dm³ 盐酸胍中受到较小的影响, 当盐酸胍浓度大于 3 mol/dm³ 时, 荧光下降显著(见图 6c). 此外, 高浓度的巯基乙醇不影响其荧光, 而 0.3% 的 SDS 使 GFP_{xm} 蛋白荧光下降 50%.

检测 8 种盐的不同浓度对 GFP_{xm} 蛋白荧光的影响, 结果发现当 LiCl 浓度达到 2 mol/dm³ 时仍不影响其荧光, 而当 CuCl₂ 浓度仅为 5 mmol/dm³ 时荧光即完全消失, 高浓度的 KCl, NH₄Cl 和 NaCl 对 GFP_{xm} 蛋白荧光影响不大. CaCl₂ 和 MgCl₂, MnCl₂ 的影响相对较大, 3 者浓度分别为 0.6, 1.8, 0.1 mol/dm³ 时, GFP_{xm} 蛋白荧光下降 50%(见图 6d). 在后 3 种盐中消失的荧光, 当盐浓度降低后又能重新恢复.

4 讨论

本研究采用 PCR 扩增和 southern 杂交筛选相结合的方法, 从厦门水域的大型多管水母中分离到了新的绿色荧光蛋白基因 *gfpxm* 的全长 DNA 和 cDNA 序列, 并在大肠杆菌中进行了表达, 得到了具有生物学活性的 GFP_{xm} 蛋白.

常用的分离新基因的方法是构建 DNA 或 cDNA 文库, 然后采用 PCR 扩增、Southern 杂交、cDNA 文库差示筛选或减法杂交等技术, 工作量大且假阳性出现的比例较高, 基因分离速度缓慢. mRNA 差异显示技术虽具有简单、快速等优点, 但由于该技术采用较短的随机引物和较低的退火温度进行 PCR 扩增, 所获得的差异 cDNA 片段中假阳性的比例很高, 从而增加了差异显示后续工作的难度, 而直接以 DNA 或 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 同样存在假阳性率高的不足. 我们也试图以 DNA 和 cDNA 为模板, 采用低复性温度直接 PCR 扩增新的 *gfpxm* 序列, 结果得到了很多大小不同的片段, 其中包括一些与预计片段大小一致的片段, 选择与预期大小相等的片段克隆测序, 得到的却是不正确的序列. 通过改进, 用 southern 杂交方法从 PCR 产物中筛选特异性片段, 具有简便、快速、灵敏度高等优点, 避免了构建文库的繁重工作, 大大加快了新基因分离的速度.

早在 1962 年, Shimomura 等就发现在多管水母中存在绿色荧光蛋白. Morise 等^[14] 纯化出 GFP 并得到其晶体. 此后 Ward 等^[15, 16] 对其结构和性质进行了不断的深入研究, 而取得突破性进展的是 Prasher 等^[12] 克隆到其 cDNA, Chalfie 等^[17] 对其进行了异源表达. 目前已知的 4 条野生型 *gfpxm* 基因均来自维多利亚多管水母, 其核苷酸同源性在 96% 左右, 238 个氨基酸中只有 8 个位点存在变异. 而本研究得到的 *gfpxm* 基因是来自中国厦门港海域的大型多管水母, *gfpxm* DNA 序列和 *Aeqgfpxm10* DNA 中相对应的两个内含子的序列和长度都相差很大, 且 *gfpxm* cDNA 序列与 4 种野生型 *gfpxm* cDNA 序列的同源性仅为 81% 左右, 相应的氨基酸序列的同源性则为 82% 左右, 说明新分离的 *gfpxm* 基因与已知的 4 条野生型 *gfpxm* 基因存在较大的差异.

野生型 GFP 的激发峰为 395 nm, 在 475 nm 有一肩峰, 发射峰为 508 nm, 量子产率为 0.79, 而 GFP_{xm} 的激发峰为 476 nm, 发射峰为 496 nm, 量子产率为 1. 已知第 64~ 69 位的 6

个氨基酸组成 GFP 的发色团结构,其中 65~ 67 位的 3 个氨基酸能够形成一种独特的丝氨酸-脱氨酪氨酸-甘氨酸(Ser65-dehydroTyr66-Gly67) 环化结构,这一结构使得 GFP 具有氧化环境下较强的荧光性^[12]. 与野生型 GFP 的第 65~ 69 位的 6 个氨基酸相比较, GFP_{xm} 的第 68 位为 I,而在 GFP 中相应氨基酸为 V,这一差异可能是导致其荧光性质不同的主要原因之一. 此外两者还存在 38 个氨基酸的差异,这些差异将导致发色团的环境氨基酸的改变,由此亦将引起荧光性质的改变.

几个研究小组已通过随机突变从表达 *gfp* 的大肠杆菌中筛选出了多种不同的 *gfp* 变异型,包括荧光强度增强、光谱迁移、促进构象形成、增加水溶性、消除构象形成的温度敏感性等几类,这些变异型 GFP 与野生型 GFP 只有几个氨基酸的差别^[18~ 21]. GFP_{xm} 氨基酸序列上相对于野生型 GFP 存在众多的变化,这些变化为 GFP 基因改造提供了丰富的资源. 基于 *gfp-pxm* 基因的改造如 DNA shuffling 将有可能获得性能大大优越于现有 GFP 的全新 GFP,使 GFP 的应用更为深入和广泛.

国家海洋局第三海洋研究所张金标研究员帮助分类鉴定多管水母,特此致谢!

参考文献:

- [1] WARD W W, CODY C W, HART R C, et al. Spectrophotoelectric identity of the energy transfer chromophores in *Renilla* and *Aequorea* green fluorescent proteins[J]. *Photobiochem Photobiol*, 1980, 31: 611-615.
- [2] KAIN S R, ADAMS M, KONDEPUDI A, et al. Green fluorescent protein as a reporter of gene expression and protein localization[J]. *Biotechniques*, 1995, 19: 650-655.
- [3] WANG S, HAZELRIGG T. Implications for bed mRNA localization from spatial distribution of in drosophila oogenesis[J]. *Nature*, 1994, 369: 400-403.
- [4] BARTHMAIER P, FYRBERY E. Rapid communication monitoring development and pathology of drosophila indirect flight muscles using green fluorescent protein[J]. *Dev Biol*, 1995, 169: 770-774.
- [5] SCALES S J, PEPPERKOK R, KREIS T E. Visualization of ER-to-Golgi transport in living cells reveals a sequential mode of action for COPII and COPI[J]. *Cell*, 1997, 90: 1137-1148.
- [6] ULLMAN E F, MARSHALL W F, SEDAT J W, et al. Mitosis in living budding yeast: anaphase A but no metaphase plate[J]. *Science*, 1999, 277: 574-578.
- [7] HU W, CHENG C L. Expression of *Aequorea* green fluorescent protein in plant cells[J]. *FEBS Letters*, 1995, 369: 331-334.
- [8] MOSS J B, ROSENTHAL N. Analysis of gene expression patterns in the embryonic mouse myotome with the green fluorescent protein[J]. *J Cell Biochem*, 1994, 180: 489-495.
- [9] 许振祖, 张金标. 奥东-闽南近海的浮游水螅水母类, 管水母类和钵水母类[J]. *厦门大学学报(自然科学版)*, 1978, 17(4): 32.
- [10] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 EF, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆操作指南(第二版)[M]. 金冬雁, 黎孟枫等译. 北京: 科学出版社, 1992.
- [11] 陈国珍, 黄贤智, 许金钩, 等. 荧光分析法(第二版)[M]. 北京: 科学出版社, 1990. 16-17.
- [12] PRASHER D C, ECKENRODE V K, WARD W W, et al. Primary structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein[J]. *Gene*, 1992, 111: 229-233.
- [13] 罗文新, 张军, 夏宁邵, 等. 一种带增强子的原核表达载体的构建及初步应用[J]. *生物工程学报*, 2000, 16(5): 578-581.
- [14] MORISE J G, SHIMOMURA O, JOHNSON F H, et al. Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*[J]. *Biochemistry*, 13(194): 2656-2662.

- [15] WARD W W . Properties of the coelenterate green fluorescent proteins[A] . Deluca M , Mcelroy W D . Bioluminescence and chemiluminescence: basic chemistry and analytical application[M] . New York: Academic Press Inc, 1981. 235-242.
- [16] WARD W W , BOKMAN S H . Reversible denaturation of aequorea green fluorescent protein: physical separation and characterization of the renatured protein[J] . Biochemistry, 1982, 21: 4535-4540.
- [17] CHALFIE M , TU Y , EUSKIRCHEN G , et al . Green fluorescent protein as a marker for gene expression[J] . Science, 1994, 263: 802-808.
- [18] HEIM R , CUBITT A , TSIEN R Y . Improved green fluorescence[J] . Nature, 1995, 373: 663-664.
- [19] HEIM R , PRASHER D C , TSIEN R Y . Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green fluorescent protein[J] . Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91: 12501-12504.
- [20] HEIM R , TSIEN R Y . Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer[J] . Curr Biol, 1996, 6: 178-182.
- [21] MIRO R D , SILVA C M , YOU VAN D C . Fluorescence resonance energy transfer between blue-emitting and red-shifted excitation derivatives of the green fluorescent protein[J] . Gene, 1996, 173: 13-17.

Green fluorescent protein of the jellyfish

Aequorea macrodactyla

LUO Wen-xin¹, ZHANG Jun¹, YANG Hai-jie¹, XIE Xiao-yan¹, QIN Ying-xue¹,
PANG Shu-qiang¹, LI Shao-jin¹, XIA Ning-shao¹

(¹ Ministry of Education, Cell Biology and Tumor Cell Engineering Laboratory, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: A new green fluorescent protein gene *gfp_{xm}* was isolated from jellyfish *Aequorea macrodactyla* in the coastal region of East China Sea by the method of combination of PCR amplification and southern hybridization analysis. The *gfp_{xm}* gene contains three exons and two introns spread over 1042 bp of genomic DNA, the entire coding region of cDNA is 717 bp, being identical to the wild-type *gfp-Aeqgfp10* cDNA in length. The amino acid sequence of GFP_{xm} deduced from the nucleotide sequence is 238-amino-acid residue, sharing homology of 83.6% with that of AeqGFP10. The entire coding sequence was cloned into the pTQ-T7 expression vector and expressed in *E. coli*. The expression yield of GFP_{xm} was amounted to 50% of the total protein. Compared with GFP of *A. victoria*, the expressed GFP_{xm} exhibited an excitation peak at a higher wave length of 476nm and an emission peak at a lower wave length 496 nm with a higher quantum yield of 1.0. The fluorescence of GFP_{xm} is significant stable, showing strong resistant to heat, alkaline, denaturants and salts.

Key words: *Aequorea macrodactyla*; green fluorescent protein gene; cloning and expression; fluorescent property