

给你一点颜色瞧瞧： 荧光蛋白表达载体

说起荧光蛋白，你是不是马上想到了 GFP，没错，不过它只是其中的一个。如果你对荧光蛋白的认识还只限于 GFP，那就有些 out 了。近几年，表达蛋白的荧光标签种类可在不断增加。它们不但可以标记固定细胞及活细胞中的蛋白，还可以标记不同的细胞类型，甚至可以标记亚细胞器。荧光蛋白因为颜色鲜艳，图像直观，不需要化学染色和底物，是活细胞分析的理想选择。它常用于追踪启动子活性、产生稳定细胞系、标记细胞或细胞器用于体内成像等。现在可选择的荧光标签有那么多种，可能又会让你有些眼花缭乱，怎么选择呢？下面我们就给你介绍一些选择指南。

你想要什么颜色？

颜色是由荧光基团的发射波长决定的。选择哪种颜色，不仅仅是因为它好看，关键是要选择正确的吸收和发射波长。如果你想要做多重实验，就必须确保这几种荧光基团的波长不重叠。另一个就是考虑你的系统。体外实验就无所谓，大部分波长都可以，但对于体内研究如小动物成像，只有那些在远红外区的长波能有效穿透身体组织，发挥作用。

Clontech 公司提供的荧光蛋白载体有几十种之多，应用于多个方面。珊瑚礁荧光蛋白（Reef Coral Fluorescent Proteins）家族包含了青色、绿色、黄色、红色和远红外荧光蛋白（图 1），适于监测启动子活性和多色细胞标记。其中 ZsGreen1 和 AmCyan1 特别亮且稳定，在转染后 8-12 小时后就可以检测。ZsYellow1 是唯一的纯黄色荧光蛋白，如果你想做三色分析的话，将它与绿色和红色搭配会是一个不错的选择。这些荧光蛋白都能被哺乳动物细胞耐受，而且已经证实能产生稳定转染的细胞系和转基因动物。另一系列水果荧光蛋白（Fruit Fluorescent Proteins）不仅颜色好看，名字还非常好听。它们分别以水果命名，叫樱桃、悬钩子、香蕉、橙子和草莓，迟一些还会有番茄。这些水果荧光蛋白发射波长范围

很广（553–649 nm），如果你想做多重实验的话，一定能从中挑选到合适的载体。另外，Clontech 还提供了检测和验证这些蛋白的抗体。

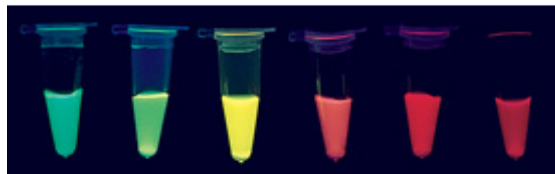


图 1: UV 下的珊瑚礁荧光蛋白 从左到右依次为：AmCyan1、ZsGreen1、ZsYellow1、DsRed1、AsRed2、HcRed1。（图片来自 Clontech 网站）

Evrogen 也提供了一系列的荧光蛋白，从青色到红色，分为两大系列。Turbo 系列包含了翠绿、黄、橙红、红、远红外荧光蛋白。

Evrogen 推荐在需要强荧光信号时使用 Turbo 系列，比如标记细胞或细胞器，追踪启动子活性。而 Evrogen 的 Tag 系列则更适合构建融合蛋白，比如蛋白定位研究和产生稳定的细胞系用于长期培养。Tag 系列包含青色、绿色、黄色、橙红色和远红外。

如果你还没有想好要用什么颜色，那么可以考虑一下 Promega 公司的 HaloTag 系统。HaloTag 技术可以在活细胞或固定细胞中快速、位点特异性地标记蛋白。这项技术是基于蛋白融合标签（HaloTag）能与特定的可交换

的合成配体间有效形成共价键。它与荧光配体形成的共价键就能用于胞内成像研究。具体的原理请看 HaloTag 技术。现在大部分的研究者都在使用 GFP，如果你想要做多重实验或换个颜色，那么就必须再做一次克隆，酶切、连接……。现在有了 HaloTag 技术，只需要构建一次融合表达载体，然后挑选不同的荧光配体，而无需改变基本的遗传构造。有了这项技术，你就可以在多个荧光基团中穿梭自如。

你想要标记什么？

你选择的荧光标记类型也取决于你想标记的东西，也就是说，你要考虑荧光基团的大小。像上面提到的 Evrogen 两种类型的荧光基团中，二聚的 Turbo 系列就更适合标记细胞和细胞器、追踪启动子活性，而单体的 Tag 系列比较小，适于构建融合蛋白，用于蛋白定位研究和产生稳定的细胞系。

如果你想要标记细胞器，Invitrogen 的 Organelle Lights? 荧光蛋白也是一个省心的好选择，连重组蛋白的构建都省了。Organelle Lights 是即用型的荧光蛋白载体，融合了信号肽，能使表达的荧光蛋白定位到亚细胞器中，如核、质膜、内质网、高尔基体和过氧化物酶体等等。颜色有青、绿、黄、橙、红五种。它通过改造的可用于哺乳动物细胞的杆状病毒（BacMam virus）将荧光蛋白导入胞内，不仅安全，而且适合多种细胞类型，包括原代细胞和神经细胞。你只需要将试剂加到细胞中就行了，连质粒纯化、转染都省了，真是很方便。

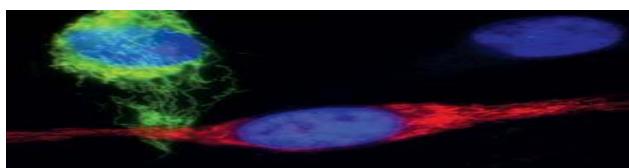


图 2 用 Organelle Lights Mito-GFP（绿色）和 Mito-OPF（橙色）来标记 HeLa 细胞

的线粒体。细胞核通过 Hoechst 33342 来染色。（图片来自 Invitrogen 网站）

如果你的细胞适合转染，Clontech 的亚细胞定位载体（Subcellular Localization Vectors）也是一个好选择。这些载体可标记的细胞器多达 9 种，细胞器的种类和颜色请看图 3。有了它们，你可以在荧光显微镜下直观地看到 1 个或多个亚细胞结构，并实时研究细胞骨架及细胞器的结构和功能，监测细胞的生长、分裂和凋亡。

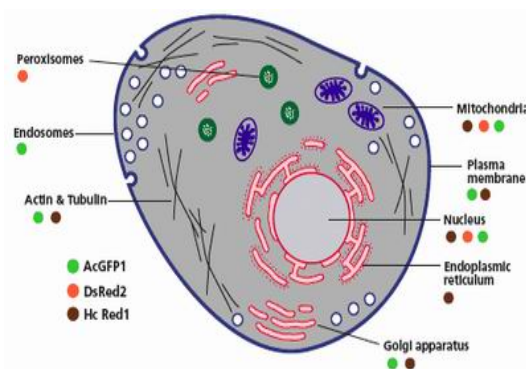


图 3 Subcellular Localization Vectors 标记的细胞器（图片来自 Clontech 网站）

BD Pharmingen 也有一套 8 个载体，用于标记特定的细胞器，而且在固定及活的哺乳动物细胞成像中验证过。载体表达的融合蛋白包含绿色或红色荧光蛋白，以及不同细胞器的定位蛋白。这个系列包含定位细胞核、线粒体、内质网和过氧化物酶体的红色荧光蛋白载体，和定位细胞核、线粒体、肌动蛋白和高尔基体的绿色荧光蛋白载体。

融合还是不融合？

无论是否融合，你都可以轻松找到理想的载体。Clontech 的 Living Colors IRES2 载体是双顺反子载体，包含了一个内部核糖体结合位点（IRES），可以将目的基因和荧光蛋白（绿色或红色）共表达。每一个蛋白独立翻译，但是属于同一个启动子，这样你就可以了解转

染效率，目的基因大概的表达水平，并通过流式细胞仪富集表达目的基因的细胞。这样，荧光蛋白就只是作为目的蛋白转录和翻译的指示剂，而不形成融合蛋白。这对很多研究者而言都是一个福音，因为融合蛋白有可能会改变蛋白本身的结构或功能。如果你的细胞不好转染，也没关系，这个载体还有一个反转录病毒版本 **Retro-X? Living Colors?** 融合载体。

如果你想要将目的蛋白与荧光蛋白融合，**Invitrogen** 提供了 **Vivid Colors** 荧光蛋白载体。它们能将目的蛋白 **C** 端或 **N** 端融合荧光蛋白（颜色有绿色和黄色）。**Vivid Colors** 载体是 **CMV** 启动子的，可以在哺乳动物细胞中高效表达。如果你想要在大肠杆菌中表达，也有蓝色或青色的 **pRSET**。**Clontech** 则提供了另一个慢病毒载体-**Lenti-X Living Colors** 载体，可以将目的基因高效导入难转染的细胞，而且安全性高。绿色或红色的荧光蛋白也是融合在目的基因的 **N** 端或 **C** 端。**Lenti-X** 载体可以更高水平表达目的蛋白，让荧光指示剂更有效。

上述的载体大多是以 **CMV** 作为启动子，在哺乳动物细胞中表达荧光蛋白。那如果想在

大肠杆菌中表达荧光蛋白呢？当然也有对应的载体，而且颜色还不少。**Clontech** 的 **Basic Fluorescent Protein Vectors** 就是以 **lac** 为启动子的，颜色有青、绿、黄、红几种。你可以将目的蛋白插入 **5'MCS** 中与荧光蛋白一起融合表达，也可以把这个载体作为一个源载体，在需要荧光蛋白时把它酶切下来。

Clontech 还有一个特别有意思的载体是 **Fluorescent Timer Vector**，它的荧光会随时间变化，从绿色变为红色。**Fluorescent Timer** 是 **DsRed** 荧光蛋白的突变体，在它刚开始合成时，发出绿色荧光，随着时间的推移，荧光基团发生变化，波长慢慢变长，等到它最终成熟时，发出明亮的红光。而且这个载体是没有启动子的，你可以将感兴趣的启动子克隆上去，研究它在体内的活性，或者在发育的不同时期检测启动子活性的变化。

现在你知道荧光蛋白不光只有 **GFP** 了吧。我们期待作为 **Tag** 的荧光蛋白突变得越来越小，向 **His Tag** 的方向去努力。也希望有越来越多的颜色涌现，那么我们的实验也将不再枯燥，变得五彩斑斓起来。

（生物通 余亮）