

五分钟教你花样玩转荧光蛋白

小鼠是目前研究人类基因功能最重要的模式动物，将荧光蛋白表达元件敲入到小鼠基因组中对目的基因进行标记和示踪是较为普遍的做法。

近年来，**荧光蛋白**（Fluorescent proteins, FPs, 图1）在生物研究领域中的应用呈爆炸式增长。小鼠是目前研究人类基因功能最重要的模式动物，将荧光蛋白表达元件敲入到小鼠基因组中对目的基因进行标记和示踪是较为普遍的做法。

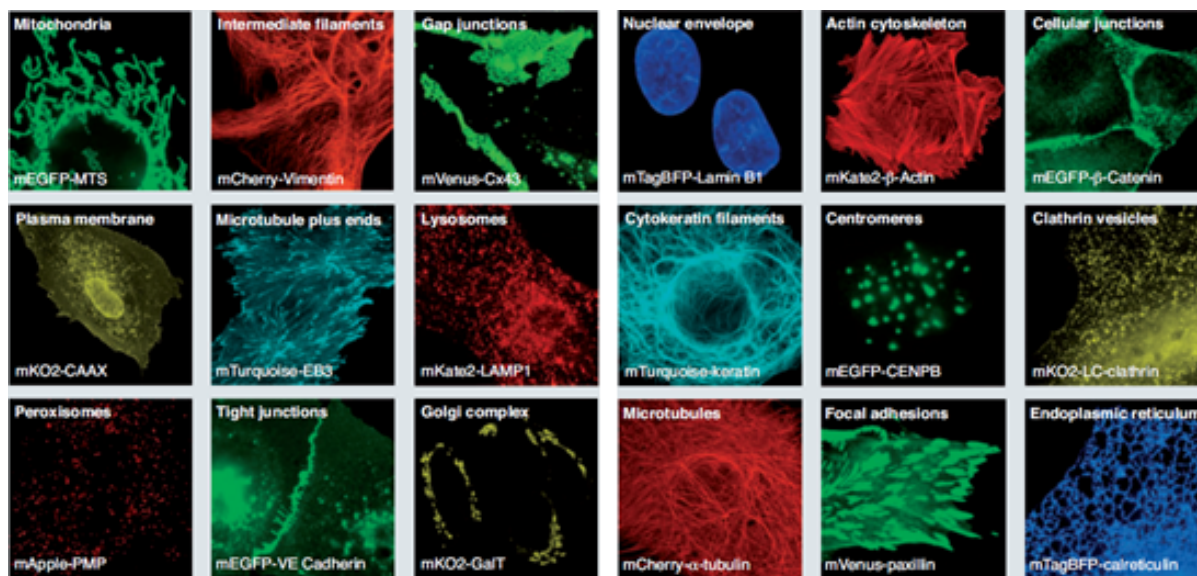


图 1. 各色荧光蛋白生物成像图

开篇我们先了解下这些荧光蛋白由何而来。

1962年，维多利亚水母GFP首次被发现，在1992年被成功克隆，并在1994年首次作为荧光标记用于体内标记。

此后，水母衍生GFP被改造为蓝色（BFP）、青色（CFP）和黄色（YFP）突变体。

此外人们也陆续鉴定了来自其他物种的荧光蛋白，从而将其进一步扩展至橙色，红色和远红外光谱区（图2）。

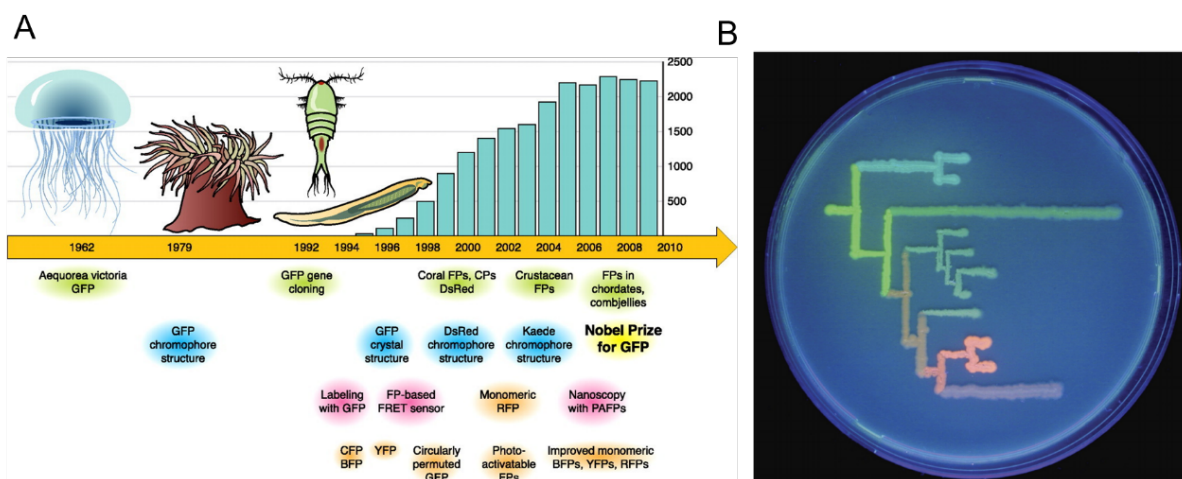


图 2 荧光蛋白发展史 (A) 该领域阶段性成果时间表。(B) FPs的系统发育树。在培养皿上接种表达FPs的细菌，并用A型紫外线照射。

常用的荧光蛋白种类繁多，会使研究者陷入选择困难的境地，小编也经常收到客户关于荧光蛋白选择的咨询，比如哪个最亮，在选择时需要考虑哪些因素等.....

今天，让小编用最短的时间，教你如何在生物实验中玩转荧光蛋白。

你真的了解荧光蛋白吗？

荧光蛋白的发光原理在于其发色基团经一定波长的光（激发光）照射后被激活，并将能量以光能形式释放，这时我们就能在荧光显微镜下看到日思夜想的荧光色啦！

但由于能量不能全以光的形式辐射出来，所以荧光蛋白的发射光（荧光）的波长比激发光长。

那么我们是怎样将荧光蛋白分类的呢？通常，人们按发射波长来分类并定义其颜色（表1）。

FP Color	Emission Wavelength
Blue	424 - 467 nm
Cyan	474 - 492 nm
Green	499 - 519 nm
Yellow	524 - 538 nm
Orange	559 - 572 nm
Red	574 - 610 nm
Far-Red	625 - 659 nm
Infra-Red	≥ 670 nm

表 1. 荧光蛋白颜色分类表

同时呢，小编为大家整理了目前最通用的一些荧光蛋白（表2）。

通用荧光蛋白

FP	Ex λ	Em λ	Brightness	pKa	Maturation(min)	Lifetime(ns)	Photostability t _{1/2} (s)	Oligom erization
mKate2	588	633	25	5.4	20	2.5	84	Monomer
mCherry	587	610	15.84	4.5	15	1.4	68	Monomer
mStrawberry	574	596	26.1	4.5	50	ND	15	Monomer
mApple	568	592	36.75	6.5	30	2.9	4.8	Monomer
tdTomato	554	581	95.22	4.7	60	ND	70	Tandem dimer
mKO2	551	565	39.56	5.5	108	ND	5	Monomer
mOrange	548	562	48.99	6.5	150	ND	6.4	Monomer
YPet	517	530	80.08	5.63	9.7	ND	34	Weak dimer
Citrine	516	529	58.52	5.7	ND	3.6	49	Weak dimer
mVenus	515	527	66.56	5.5	17.6	2.7	ND	Monomer
Venus	515	528	52.55	6	17.6	3	15	Weak dimer
EYFP	513	527	44.89	6.9	9	3.1	60	Weak dimer
mNeonGreen	506	517	92.8	5.7	10	3.1	158	Monomer
ZsGreen	496	506	22.43	ND	ND	ND	ND	Tetramer
mEGFP	488	507	33.6	6	ND	ND	46	Monomer
EGFP	488	507	33.54	6	25	2.6	50.1	Weak dimer
CyPet	435	477	17.85	5.02	ND	ND	41	Weak dimer
mTurquoise	434	474	25.2	4.5	112.2	3.7	ND	Monomer
Cerulean	433	475	26.66	4.7	ND	3.3	36	Weak dimer
mTagBFP	402	457	32.76	2.7	13	2.6	34	monomer
mTagBFP2	399	454	32.38	2.7	12	2.6	53	monomer

表 2. 通用荧光蛋白参数表

RFPs（红色荧光蛋白）：

- mCherry具有优异光稳定性，是最通用红色单体（但融合表达时有较弱的齐聚效应）
- tdTomato具有mCherry相同的光稳定性，亮度更强，是追踪表达水平的理想选择，但为串联二聚体，可以在融合标签大小不干扰蛋白质功能的情况下使用
- mStrawberry是最亮的红色单体，但光稳定性要弱于mCherry
- DsRed是细胞毒性最小的RFP

- mApple在蛋白的融合表达中是mCherry理想的替代物，但其光稳定性要远弱于mCherry
- mKate2从参数方面考量是综合亮度、光稳定性和齐聚性的最佳RFP，但目前报道相对较少

OFPs（橙色荧光蛋白）：

- mOrange是最亮的橙色单体

YFPs（黄色荧光蛋白）：

- YPet具有极高的光稳定性且成熟快,亮度极高
- mVenus是亮度极高的黄色单体

GFPs（绿色荧光蛋白）：

- EGFP是目前适用范围最广的FP，综合多个优势属性

CFPs（青色荧光蛋白）：

- mTurquoise是最亮的青色单体
- CyPet是最稳定的CFP

BFPs（蓝色荧光蛋白）：

- mTagBFP2是最稳定，成熟极快、亮度极亮的蓝色单体

荧光蛋白选择八要素

了解FP基本信息后，我们该如何在茫茫荧光蛋白（FPs）中缩小选取范围呢？我们需要考虑以下八大要素：

- **激发波与发射波**——我们选择的光学系统需能够有激发FP合适的激发光，并同时有检测FP发射光的合适通道
- **齐聚度**——融合表达时，选择易齐聚的FP可能会影响其融合蛋白的生物学功能或定位，此时应尽量选择单体FP
- **亮度**——选择足够亮的FP才能提供足够信号以便检测和成像
- **光稳定性**--FP应具有足够的光稳定性以使其稳定成像
- **成熟时间**--FP正确折叠并形成发色基团所需的时间
- **pH稳定性**--某些FP随着pH的变化会改变荧光强度，可用于检测pH变化/胞吐作用
- **分子氧**--许多FP上的发色基团成熟需要氧气，因此该类FP不能在缺氧环境使用
- **温度**--FP的成熟时间和荧光强度会受到温度的影响，需根据实验温度环境选择FP

有了上文提到的八要素评价体系后，我们就该考虑在实际实验中如何运用这些荧光蛋白。

如何运用荧光蛋白

根据FP与目标蛋白连接与否，可将实验分为两类：非融合表达与融合表达。

非融合表达：常用于追踪目的基因表达水平（图3），需要着重考虑FP亮度、光稳定性、环境敏感度等要素。



图3. 荧光蛋白非融合表达示意图

例如，有研究者利用Myh6基因启动子构建了心肌细胞特异性表达Cas9的转基因小鼠，并在Cas9后加上2A-GFP或2A-TdTomato的荧光蛋白元件（图4A），以使其作为报告基因来监测Cas9的表达，结果发现Myh6-Cas9-2A-GFP（图4B）和Myh6-Cas9-2A-TdTomato（图4C）小鼠的心肌细胞中均特异性高表达了Cas9蛋白。

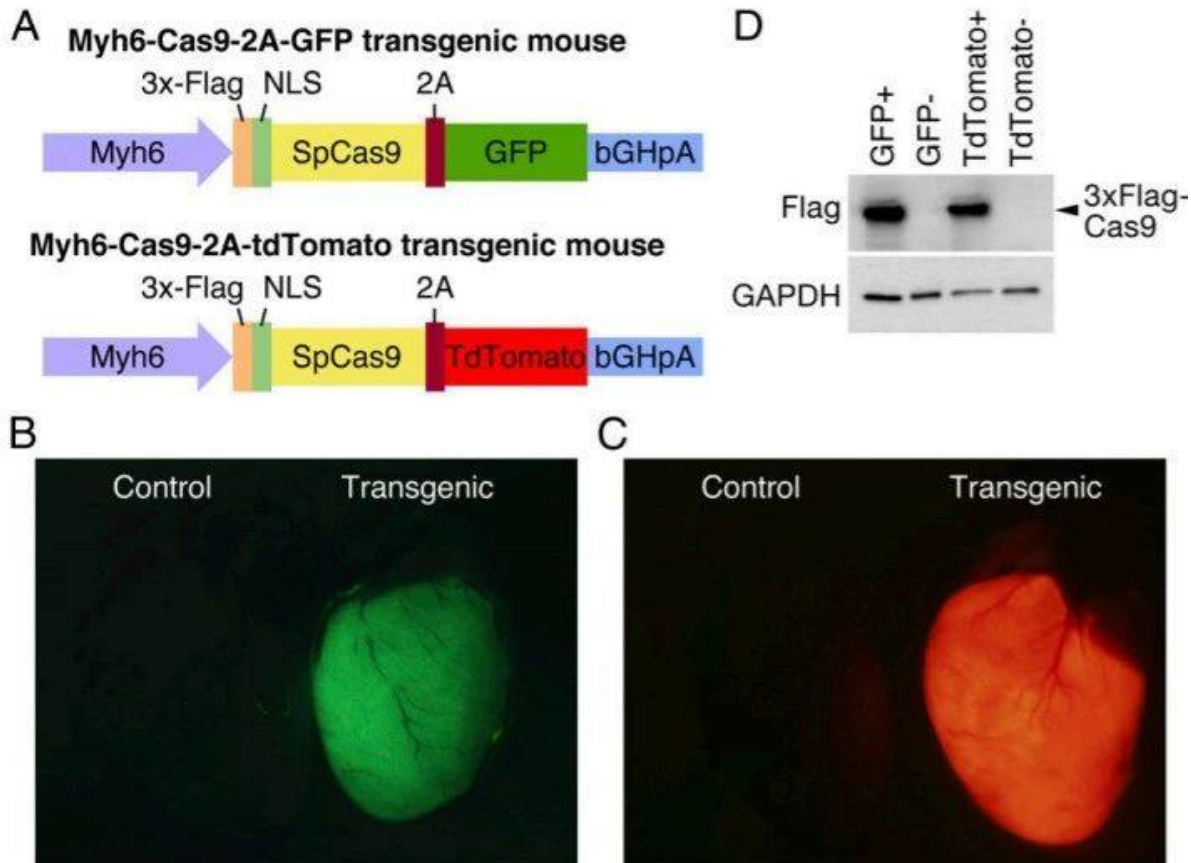


图4. Myh6-Cas9转基因小鼠品系构建。(A) Myh6-Cas9-2A-GFP和Myh6-Cas9-2A-TdTomato转基因小鼠构建策略。(B)荧光显微镜证实GFP在Myh6-Cas9-2A-GFP转基因小鼠的心脏中高表达，同窝阴性对照（左）。(C)荧光显微镜证实TdTomato在Myh6-Cas9-2A-TdTomato转基因小鼠的心脏中高表达，同窝阴性对照（左）。(D) Western blot证实了在Myh6-Cas9-2A-GFP和Myh6-Cas9-2A-TdTomato小鼠中均有带有Flag标签的Cas9蛋白表达。

融合表达：常用于目标蛋白的亚细胞定位、迁移示踪或蛋白互作探究（图5）。融合表达中，选择FP需要考虑的因素更为复杂，不合适的FP可能会影响融合目标蛋白的定位和功能，因此FP的选择将视具体情况而定。

那么，有没有通用的设计思路呢？下面，让小编带大家整理一套简便的荧光融合蛋白（Fluorescent fusion protein, FFP）设计方案。

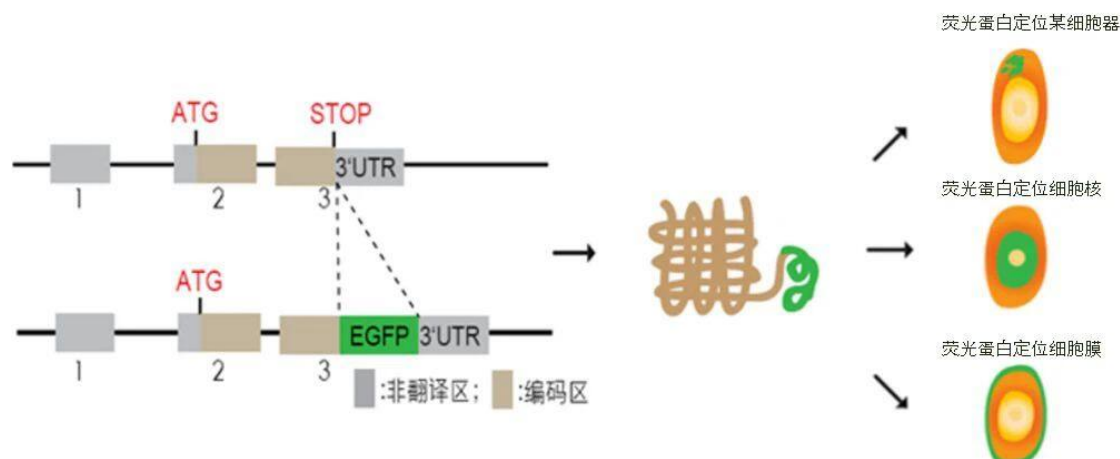


图5. 荧光蛋白融合表达示意图（以3'端融合为例）

Step 1 选择目的蛋白与荧光蛋白的融合方式。依据目标蛋白的功能与定位信号是否已知，可以分别实施以下两个策略：

• **策略一（适用于目的蛋白的功能域和靶向域未知）：**

为构建出功能完善且针对性强的FFP，我们应设计两种结构，分别将FP放在目标蛋白的N端和C端。这是因为有些目的蛋白的折叠包括其N端或C端，若我们把FP放在目的蛋白折叠端，将观察不到荧光信号。

此外，有些目的蛋白在翻译后修饰过程中存在一端被剪切现象，如果荧光蛋白处于被剪切的一端，那么就不能获得目的蛋白准确的定位信息。

因此对于已知信息有限的新蛋白，建议构建N端和C端两种融合方式的细胞或小鼠以便后续确定最优解。

• **策略二（适用于目的蛋白的功能域和靶向域已知）：**

根据已知信息，将FP插入最佳位置（即FP不干扰靶向结构域或蛋白质折叠的位置）。

以内质网蛋白（ERs）为例，ER蛋白通常包含两个具有靶向信息的关键序列：N端的信号肽和C端的ER驻留信号序列。其中，信号肽对于新生肽靶向到内质网腔中至关重要。因此，FP必须放置在信号序列之后，但是具体应放在哪呢？

如果蛋白功能域位于C末端附近，则将FP置于信号序列之后比较合理（图6A）。具体来说，应将FP置于预测的信号序列切割位点的下游2至10个氨基酸，以提高信号肽切割效率与FFP向ER转运的效率。

如果蛋白功能域靠近N端，则应将FP置于C端附近（图6B）。具体来说，ER驻留信号序列是KDEL，可将FP置于KDEL序列前。

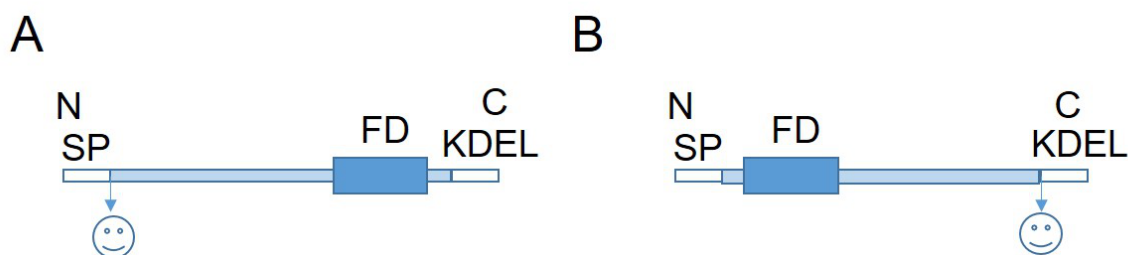


图6 荧光融合蛋白(FFP)构建示例。目标蛋白序列中FP融合的优选位点用笑脸表示。(A) ER蛋白包含N端信号肽(SP)，靠近C端的功能域(FD)和C端驻留信号序列(KDEL)。将FP插入在SP之后，可最大程度减少干扰目的蛋白的功能。(B) ER蛋白包含N端信号肽(SP)，靠近N端的功能域(FD)和C端驻留信号序列(KDEL)。将FP插入在KDEL之前，可最大程度减少干扰目的蛋白的功能。

Step 2 选择适合的FP进行融合表达。我们需要重点考虑FP形成低聚物的概率(齐聚度)，实际分子大小和蛋白质电荷(大型或带电的FP融合物可能会改变目标蛋白的折叠与亚细胞定位)等。

例如，有研究人员将非单体型的EGFP与ER膜蛋白融合表达后发现EGFP的存在导致滑面ER形成了组织状结构，而单体型EGFP(mGFP)则没有影响ER结构(图7A,B)；而将mRFP与膜蛋白融合表达时，在细胞中观察到了鲜红色的聚点状信号，这是由于mRFP与膜蛋白的融合减少了该蛋白的旋转扩散趋势，从而形成了聚集体(图7C)。

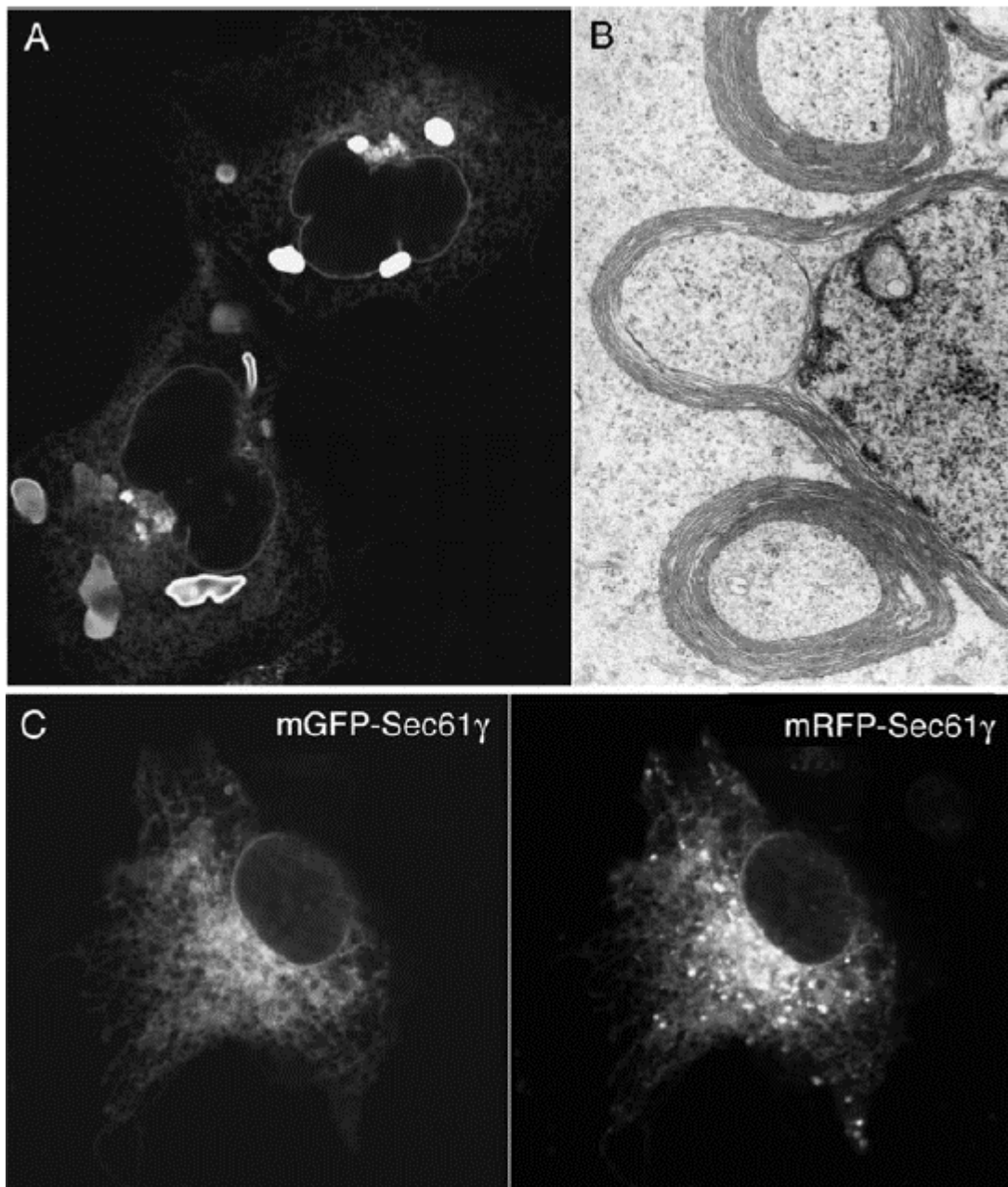


图7 荧光蛋白与天然蛋白的融合可能会改变天然蛋白的正常定位模式，或导致聚集体的形成。(A) 非单体化EGFP与内质网(ER)膜蛋白的融合诱导了滑面ER组织状结构的形成。(B) 单体化EGFP(mGFP)与相同蛋白质的融合则不会显著改变ER结构。(C) Cos-7细胞表达两种荧光融合蛋白(FFP)，mGFP和mRFP均定位到内质网。但由mRFP标记的蛋白产生的图像显现许多亮点信号，为mRFP聚集体。

Step 3 评估FFP的表达情况。在构建FFP后，我们必须评估表达的FFP是否发荧光，是否以类似于细胞内天然蛋白的模式定位(例如，通过将目的蛋白免疫荧光分布和荧光融合蛋白的荧光分布进行对照)，是否保留了天然蛋白质的功能(由研究者自己的测定方法确定)。

荧光蛋白用于多色实验

无论在融合表达还是非融合表达实验中，我们时常会面临需要选择多个FP进行共成像的实验需求，例如追踪多基因表达水平、亚细胞定位、研究蛋白互作和细胞筛选等（图8）。

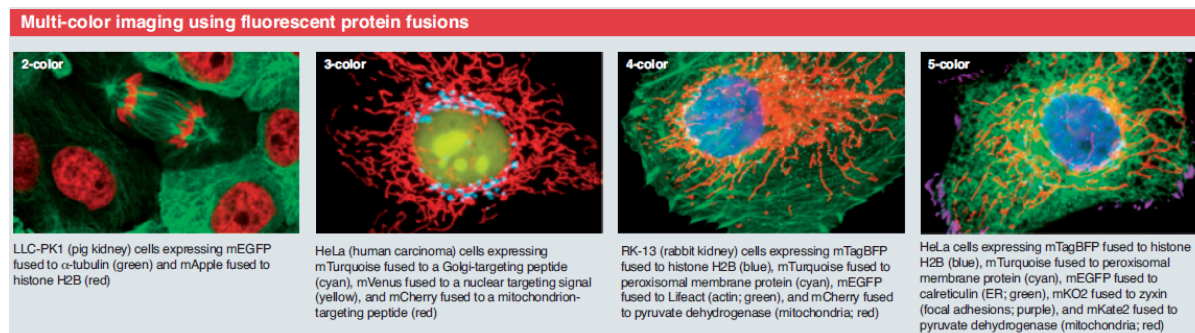


图8. 荧光蛋白用于多色实验

选择FPs进行多色实验时除了考虑上述提到的基本八要素，还要兼顾荧光蛋白的兼容性。其中，选择兼容FPs遵守的原则是：选择不同荧光的峰值激发波长和峰值发射波长都应分开50-60 nm以上。

例如，CFP (ex 430 nm / em 474 nm) 和YFP (ex 514 nm / em 527 nm) 可以一起成像，但CFP和GFP (ex 488 nm / em 507 nm) 在显示时会存在一些串扰。

目前一些比较常用的多色FPs组合：

双荧光（绿-红）：

- EGFP+mCherry,
- EGFP+tdTomato
- EGFP+mKate2

双荧光（青-黄）：

- CyPet+YPet

三荧光（蓝绿红/青黄红）：

- mTagBFP2+EGFP+mCherry
- mTagBFP2+EGFP+tdTomato

- mTagBFP2+EGFP+mKate2
- CyPet+YPet+mCherry
- CyPet+YPet+mKate2

希望今天的干货分享对每一位荧光蛋白的使用者有所帮助，在选择荧光蛋白时，不再迷茫！

参考文献：

- 1 Shaner, N C, Steinbach P A, Tsien R Y. A guide to choosing fluorescent proteins[J]. Nature Methods, 2005, 2(12), 905-909.
- 2 Kremers G J , Gilbert S G , Cranfill P J , et al. Fluorescent proteins at a glance[J]. Journal of Cell Science, 2011, 124(2):157-60.
- 3 Carroll K J, Makarewich C A, McAnally J, et al. A mouse model for adult cardiac-specific gene deletion with CRISPR/Cas9. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2015, 113(2), 338-343.
- 4 Snapp E. Design and use of fluorescent fusion proteins in cell biology[J]. Current Protocols in Cell Biology, 2005, 27(1).
- 5 Addgene: eBooks