

DOI: 10.11686/cyxb2019020

<http://cyxb.magtech.com.cn>

杨晓玫, 姚拓, 师尚礼. 荧光蛋白标记研究进展. 草业学报, 2019, 28(10): 209—216.

Yang X M, Yao T, Shi S L. Progress in fluorescent protein labeling. Acta Prataculturae Sinica, 2019, 28(10): 209—216.

荧光蛋白标记研究进展

杨晓玫¹, 姚拓^{1,2*}, 师尚礼^{1,2}

(1. 甘肃农业大学草业学院, 草业生态系统教育部重点实验室, 甘肃 兰州 730070; 2. 甘肃省草业工程实验室, 中—美草地畜牧业可持续发展研究中心, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 荧光蛋白标记由于其独特的颜色感官, 在医学、遗传育种和草地植被抗病中占有重要的位置。荧光蛋白分子标记的选择与方法与其特异性的 DNA 有关, 基因的结构是荧光蛋白标记、进行基因交流和促进基因表达的重要部分。荧光蛋白标记技术主要包括热激转导和电击转化两种不同的类型, 需通过大肠杆菌作为载体结合菌株, 不影响其任何生物功能, 是目前大分子示踪检测及研究定殖的主要方法, 研究荧光蛋白标记对病原菌和根际促生菌的定殖和良好利用优良菌株有着重要意义。但是, 荧光蛋白标记是在分子水平, 对研究的方法增加了难度。根据目前国内外已有的部分荧光蛋白标记研究, 评述了标记的原理, 标记的适用性以及标记的不同方法等内容, 并展望了不同标记方法对利用荧光蛋白的可能性, 以期研究荧光蛋白标记提供系统的方法参考和技术借鉴。

关键词: 荧光蛋白; 分子标记; 标记方法; 适用性; 展望

Progress in fluorescent protein labeling

YANG Xiao-mei¹, YAO Tuo^{1,2*}, SHI Shang-li^{1,2}

1. Key Laboratory of Grassland Ecosystem, Ministry of Education, College of Pratacultural Science, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China; 2. Pratacultural Engineering Laboratory of Gansu Province, Sino-U. S. Center for Grazingland Ecosystem Sustainability, Lanzhou 730070, China

Abstract: Fluorescent protein labeling is an important method for research in the fields of medicine, genetic breeding, and grassland vegetation resistance. The selection of, and methods for using, fluorescent protein molecular markers are related to their specific DNA-binding properties. Gene structure affects fluorescent protein labeling, gene communication, and gene expression. Fluorescent protein labeling technology involves two types of transformation; heat shock and electric shock transformation. In both methods, *Escherichia coli* is used as a carrier of the gene construct encoding the fluorescent protein label. Monitoring of fluorescent protein labels is the main method used for macromolecular tracer detection and for observing colonization. Studies involving fluorescent protein labeling have been used for monitoring the colonization of pathogens and rhizosphere bacteria and for optimizing the use of excellent strains. However, it is difficult to study fluorescent protein labeling because the interactions occur at the molecular level. In this paper, we review fluorescent protein labeling in terms of its principles, the applicability of various markers, and different methods of using markers based on published literature. Various fluorescent protein labeling methods are also discussed. This review provides a reference for further studies on fluorescent protein labeling in China.

收稿日期: 2019-01-04; 改回日期: 2019-04-01

基金项目: 省委组织部“微生物肥料关键技术及新产品研发”(LYRC2019-113)资助。

作者简介: 杨晓玫(1992-), 女, 甘肃会宁人, 在读博士。E-mail: yangxiaomeirz@126.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: yaotuo@gsau.edu.cn

Key words: fluorescent protein; molecular marker; marking method; applicability; prospect

荧光蛋白标记(fluorescent protein labeling)是指利用不同颜色荧光质粒通过某种方式结合其他生物,最终携带有颜色荧光且不影响生物正常生理生长的一种方法^[1],因其高灵敏度倍受各位学者的不断研究,成为目前生物大分子检测的主要方法,有着发光强和稳定的优点。荧光标记不需要其他辅助生物发光标记系统,能够简化对定殖的研究,促进植物机理的研究,增加物种研究的可视性。不同颜色的荧光标记结合不同的生物是进一步研究的重要条件,有着重要的影响,因此荧光蛋白标记是分子标记的重要手段与方法。荧光蛋白标记包括热激转导和电击转化两种不同的类型,并且荧光蛋白质粒导入细菌的技术一直在不断完善之中^[2],荧光蛋白无毒性,保持荧光时不影响生物体功能^[3],已在生物学中有重要地位,广泛应用在生物的研究^[4],然而,荧光蛋白标记必然会有一些的难度和相对不稳定性,比如转导不成功或者荧光颜色较暗等问题,但同时会促进动植物之间的转基因效率和检测基因的表达水平等^[5],近年来,荧光蛋白标记已经是分子标记研究中的一个热点领域,并且逐渐形成了较为稳定成熟的标记方法。

荧光蛋白主要包括绿色、黄色和红色 3 种颜色,绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)最初从水母(*Scyphozoa*)中分离,Matz 等^[6]从不发光的海洋生物群克隆到了 GFP 基因,可在细菌、真菌、植物、动物中广谱表达产生绿色荧光^[7],黄色荧光蛋白(yellow fluorescent protein, YFP)最初来自维多利亚多管水母(*Aequoria victoria*),发射波长为 527 nm,是 GFP 的一种突变体^[8],红色荧光蛋白(red fluorescent protein, RFP)最初从珊瑚虫中分离,发射波长为 583 nm,是 GFP 的同源荧光蛋白^[6,9]。荧光蛋白标记技术可以充分利用不同颜色的荧光稳定特性,能快速标记且检测简单,并能稳定遗传且有最佳的示踪结果^[10],本研究对国内外荧光蛋白标记进行了综述,总结了现有的科研成果,分析研究荧光蛋白标记面临的挑战,同时对其应用研究进行了展望。

1 荧光蛋白标记的原理

不同颜色荧光蛋白的标记条件略有差异,但归纳起来,标记原理都大体一致,主要是利用荧光致发光的现象观察,通过紫外线或 X 射线照射,使得波长进入激发态,发出比入射光波长的出射光。荧光蛋白标记是利用大肠杆菌(*Escherichia coli*)作为辅助菌载体,进行质粒重组,以达到基因定位、基因表达的目的。随着标记技术的发展,打破了单一的单色标记,进行不同颜色荧光蛋白双色或者多色标记,不同颜色的荧光蛋白标记的发展不一,例如绿色荧光蛋白标记,田涛等^[11]在果蝇(*Drosophilidae*)、大肠杆菌等生物体内成功表达 GFP 基因,GFP 标记系统作为分子标记物的历史不长,但如今越来越多的研究人员将其作为一种高效快速的研究工具。

2 荧光蛋白标记的主要内容

2.1 荧光蛋白标记的对象和类型

目前的研究发现大多数质粒标记都能与大肠杆菌结合,通过大肠杆菌的辅助作用得以实现标记,大肠杆菌遗传背景较为清晰,是构造简单的原核生物,比较容易培养,常将质粒通过转化转移到大肠杆菌,质粒为游离在大肠杆菌中细胞染色体外能自主复制的分子量较小的环状 DNA 分子,通过荧光蛋白的标记,可以直接观察菌株的迁移和定殖,为菌株的作用机制研究打下基础。随着分子生物技术的不断发展,蛋白质粒能稳定的导入至细菌中^[12],荧光蛋白在植物、动物、微生物中均有研究,都可被荧光蛋白通过辅助菌帮助标记,胡迎青等^[13]研究证明利用分子生物学鉴定的体外重组表达质粒,在 PCR 反应时对模板纯度的要求不高,比较容易完成荧光蛋白的标记。

2.2 标记方式

国内外荧光蛋白标记的方式主要有转化和转导两种,在研究中质粒都能成功与大肠杆菌结合,近期研究表明转导更高效更稳定^[14]。

2.2.1 转导 最先研究发现的转化现象是在细菌中吸收不同 DNA 基因型改变自身的基因型和表型^[15],革兰

氏阴性细菌和革兰氏阳性细菌均能进行自然转化,转导的过程一般包括感受态的出现、DNA 的结合和进入、DNA 的整合 3 个阶段,感受态提供吸取 DNA 的生理状态,可用 Ca^{2+} 或 Mg^{2+} 诱导细胞产生感受态,转导在大肠杆菌和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)中研究时间较长较深入。

2.2.2 转化 转化是以噬菌体为介质,使供体菌的目的 DNA 转移到受体菌内部的现象。转化分为普遍性转化和局限性转化,在普遍性转化中,任何供体的染色体均可转移至受体细胞,而在局限性转化中,被转化的 DNA 片段仅是一些靠近染色体溶源化位点的基因^[16]。转化的 DNA 位于噬菌体蛋白壳外,不易被水解较为稳定,大部分细菌均具有噬菌体,可进行转化。目前,大肠杆菌在转化中研究最多。

2.3 标记条件

荧光标记需辅助菌的参与,方能进行 DNA 的转移,由于荧光蛋白发光团无物种专一性,且不依靠任何介质发光,所以转入宿主细胞的荧光蛋白基因很稳定,并对大多数宿主细胞无影响,能显示单个或多个基因的表达情况^[17]。

2.4 检测方法

目前,常用检测荧光标记的方法有以下 6 种:1)用手提蓝光或长波紫外灯直接在黑暗环境下照射菌落或者菌液,可肉眼直观地观察到标记菌发出的荧光,进行快速的平板计数并做记录。2)具有适当滤光片的荧光显微镜,被检测菌落规范的放于载玻片,可观察到单个标记菌体并在相应软件保存照片计数记录。由 Omega 公司开发的 Openlab 图像处理软件可对图像进行必要的处理^[17]。3)以激发光为氩原子 488 nm 激光的共聚焦激光扫描显微镜(confocal laser scanning microscope),能快速准确的分析荧光标记菌在生物膜中的空间定位,具有高分辨率及三维成像的主要功能^[18],为比较实用理想的荧光检测仪。4)使用流式细胞仪快速计算荧光标记菌数量及荧光强度,能对荧光细胞进行定性和定量分析,具有速度快、准确性好和精度高等特点^[19]。5)双光子激光扫描显微镜克服了普通荧光显微镜及 CLSM(激光共聚焦扫描显微镜 methods confocal laser scanning microscope)的光漂白现象,能长时间对荧光标记菌进行分析与追踪^[20-22]。6)根据荧光标记菌的序列大小使用分子杂交、PCR 检测和基因探针等分子生物学的方法进行检测。

在荧光检测中,背景荧光会直接影响荧光信号的强弱。在植物中,影响荧光信号检测的自发荧光源主要是叶绿体和细胞壁^[23],可通过减少进光量或者转换合适的滤光片来解决。Smith^[24]认为在检测荧光基因材料时,荧光信号与背景信号的比值较大的容易得到比较清晰的图像。

3 荧光蛋白标记的研究方法

荧光蛋白标记是检测和示踪侵染最直观、精确且易于操作的方法^[25],不同的荧光蛋白标记方法各有优缺,使用的标准原因各异,但归纳起来,荧光蛋白标记的研究方法主要有以下两种。

3.1 热激转导

热激转导是利用温度水热变化导致质粒之间的转移接合,需要感受态细胞的参与才能顺利进行,具体操作方法较为复杂^[26]。热激转导的方法较为传统,便于控制,试验耗费较低,但国内具有转导所需的所有设备,是一种实验室经过高温变化混合沉淀的过程,实验室的研究大多数皆采用传统热激转化的方法。通过热激转导,众多研究学者均能较直观的跟踪目的基因,不断优化转导条件,李翠等^[27]指出热激蛋白和热激转录因子在热激转化和耐热性的产生过程中发挥了极其重要的作用。培养大肠杆菌的最适温度为 37 °C 水浴 5 min,大肠杆菌感受态细胞最大转化效率的温度为 4 °C 保存 18 h^[28],韩颖等^[29]利用热激法,用大肠杆菌辅助成功构建关键酶基因载体。孙彦等^[30]成功利用热激转化构建白颖苔草(*Carex rigescens*)转录因子的真核表达载体。

3.2 电击转化

电击转化是通过电击仪设定 1700 V 电压和药剂诱导进行质粒之间的转化,具体操作方法需要特定设置^[31]。电击转化因其需要特定耗费较高的实验器材,转化时间较短不易掌握,该方法在植物中的研究甚少,而在昆虫动物等方面研究比较广泛^[32],其原理为通过高温胁迫改变酶活性及蛋白的稳定,使质粒能在辅助菌的作用下表达和利用。

4 应用

近几十年,荧光蛋白在植物和微生物中的应用发展很快,荧光蛋白作为报告基因的特殊性,解决了许多研究中的难题。

4.1 荧光蛋白作为报告基因

荧光蛋白作为报告基因能直接有效的监测基因转移的效率,无须底物的参与。程在全等^[33]用构建的含有编码绿色荧光蛋白的质粒,转入到水稻(*Oryza sativa*)愈伤组织,60 d后取叶片成功分析了绿色荧光蛋白的表达。Chiu等^[34]用突变型GFP(S65T)基因转化烟草(*Nicotiana tabacum*)叶肉组织和拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)得到成功。Más等^[35]、Jach等^[36]用DsRED作为植物报告基因对烟草进行试验,发现DsRED对植物的生长发育无负面影响,孙金钰等^[8]的研究为YFP在生物学领域的广泛应用提供充足的原料来源。其中,绿色荧光蛋白因其研究较深容易检测,在各转化中为常用的报告基因。

4.2 荧光蛋白作为追踪标记基因

荧光蛋白通常分子量较小,能与多种不同的蛋白质端融合且不破坏原始蛋白特性,故荧光蛋白是一种直观性很强的遗传标记物,能特异地对植物细胞器进行定位。Kohler等^[37]的研究发现绿色荧光蛋白可以直接观察到植物发育过程细胞的数目、分配和运动,GFP还能研究高等植物细胞器之间的分子交换。还有应用较广泛的绿色荧光蛋白亚细胞标记物,构建GFP和内质网定位信号KDEL(key developed element length)的融合蛋白,结果观察到转化内质网膜质皮层的网状结构^[38]。

4.3 荧光蛋白在生物防治中的应用

目前生物农药的杀虫效果并没有准确的评估,Chao等^[39]通过观察GFP标记AcNPV的荧光表达,可以准确地评估杀虫剂作用下害虫个体变化,为土地资源的最优利用有很重要的意义和应用价值。王延松等^[40]运用农杆菌介导法获得GFP标记菌株,研究病原菌与新疆大枣(*Ziziphus zizyphus*)的互作,直观观察病原菌在寄主体内的侵染过程。邹晓威等^[41]通过构建玉米丝黑穗菌(*Sphacelotheca reiliana*)荧光标记菌株,分析及预防致病相关基因。

4.4 荧光蛋白在微生物领域的应用

利用荧光蛋白来标记根际微生物及代谢物,可直观的追踪和观察出根际微生物的定殖、分布及其变化规律,确定根际微生物与植物的相互作用,有利于促进优良固氮菌、溶磷菌和生防菌的开发利用和推广应用。利用荧光蛋白检测方便,可对活细胞进行实时动态的追踪,在微生物领域是一种比其他检测方法更有优势的定殖方法。殷幼平等^[42]利用GFP标记枯草芽孢杆菌生防菌株CQBS03在柑橘(*Citrus reticulata*)叶片上的定殖规律,研究得出该工程菌株能在柑橘叶片定殖,且接种42 d后仍能检测到工程菌,并对柑橘溃疡菌(*Xanthomonas citri* subsp.)有生防作用,与原始菌株并无明显差异。

5 研究不足及思路

荧光蛋白基础理论研究不足。荧光蛋白独特的发光特性给研究带来了新进展,同时也是一种挑战。采用荧光蛋白标记技术研究受体菌或者定殖时,首先面临的一个挑战就是对荧光蛋白基础理论的深度研究,这样才能有效合理的利用荧光蛋白的特性。目前,国外已对绿色荧光蛋白的研究技术相对成熟,在细胞中能够精确定位,作为标记蛋白保持荧光的同时不影响目标蛋白的活性,在生物体内也能高效表达不影响生物体的功能^[3]。但是,不同颜色的荧光蛋白转化条件和荧光特性各异,不同颜色荧光蛋白之间的通用性较差。国内在研究荧光蛋白时,荧光蛋白基础理论研究未能赶上应用的速度,目前还存在若干问题,除绿色荧光蛋白^[43]外的其他颜色还未能熟悉应用,进而阻碍了双色标记或多色标记的后期研究。

荧光蛋白的荧光时效性短。研究者建议检测荧光强度时不得用过长的时间,这就需要增加检测的灵敏度。因为灵敏度越高,荧光强度越强,检测的时间也就越快,信号转导的越充分。但是灵敏度则与荧光蛋白的基础有颇大的关系,绿色荧光蛋白的光谱较短,灵敏度较好,而其他颜色荧光蛋白灵敏度较差,时效性较短,荧光强度弱,这些都为荧光蛋白标记和转化研究带来了挑战。虽然目前尚无直接证据证明红色荧光蛋白和黄色荧光蛋白

相比绿色荧光蛋白各功能较差,但对植物标记的转化率的影响还是客观存在的^[44]。还有,荧光的个体数量庞大不一,只能判断荧光的有无,而难以对荧光数量用于统计学分析。这些都是影响到荧光蛋白在标记研究中的应用。

分子生物学研究的挑战。尽管分子生物学技术近年来在遗传多样性研究和功能基因多样性中发挥了重要的作用,但国内外文献报道主要集中在荧光蛋白的应用^[45-46],而对荧光蛋白本身的功能多样性和遗传动态的研究报道不是很多^[47]。制约因素主要是试验成本高、技术应用存在局限性、操作过程对试验技术的要求较高^[48]等,使得对于荧光蛋白的功能多样性研究的方法很少。其次,分子标记技术的兴起,熟练有目的利用计算机软件和网络信息对数据的合理分析处理也将成为一项挑战。最后,仅依靠分子生物学技术还不能全面透彻地解决荧光蛋白的发光标记机理等^[49]问题,应与其他方法结合从而促进荧光蛋白研究的发展。

6 展望

荧光蛋白是研究生物细胞遗传等生物现象的标记基因。我国学者已经认识到荧光蛋白研究的重要性,主要集中在绿色荧光蛋白的报告基因、生物传感器、检测 pH 及离子等^[50]。这些研究主要集中在已报道出的荧光蛋白等方面,并没有研究其新型突变体荧光蛋白的标记效果。荧光蛋白检测的荧光强度非线性性质是否有直接影响;新生荧光蛋白要通过折叠和加工才具有活性形式,过程的可获得性较低;紫外激发对一些荧光蛋白有光漂白和光破坏的不良影响;多数生物有自发荧光的现象,是否干扰荧光蛋白的正常检测等,都是影响荧光蛋白标记成功的关键。当前人们对荧光蛋白结构功能的理解比在过去有了很大的提高,但仍有很多谜团和争议急需解决。在现有知识的基础上,可设计和改进已得到新型突变体荧光蛋白^[51]。目前已有一些对荧光蛋白激发态的理论研究,但仍要努力阐明发射荧光的调节机制。

荧光蛋白研究由于其分子探针和标记基因的特性,难于直接肉眼观察而面临很多的挑战。但是随着科学技术的发展,将分子生物学和荧光蛋白有效的结合,已经应用到众多植物之中^[52]。荧光蛋白标记早在 20 世纪 90 年代就被应用到低等植物研究中,随着荧光蛋白的颜色和突变型荧光的增多,国外已用红色荧光蛋白和黄色荧光蛋白成功研究其根系的定殖等内容。分子生物学技术^[53-56]的发展为荧光蛋白的报告作用提供了新的研究手段,对于荧光蛋白的研究不仅是理性工程,也要将随机诱变和高通量筛选技术相结合以达到荧光蛋白分子有效进化的目的。可通过一些新的克隆或者突变来不断拓宽研究内容,对优良突变体结构进行分析可以确定引起荧光蛋白性质变化的准确位点。因此,将分子生物学技术和荧光蛋白基础研究相结合,可以为荧光蛋白标记作用研究提供很好的研究思路。

荧光蛋白作为当代生物科技研究中最重要工具之一^[57],可时空监测生物体内的基因表达、蛋白质定位、细胞内转运途径等生物现象,用于检测荧光的荧光显微镜也在不断进化硬件和软件的功能^[58],研究学者利用荧光显微镜清晰观察酿酒酵母(*saccharomyce*) GFP 和 RFP 标记定位的目标蛋白^[9]。近年来,荧光蛋白工程和荧光基因工程的迅速发展,使其随着基因工程技术和细胞工程技术的日益成熟,产生更大的应用价值。但是,荧光蛋白是受转化条件的制约,还是受自身条件资源限制,并无系统研究。若能深入了解荧光蛋白发光机理,标记条件与自身资源的关系、荧光蛋白的广用性、不同荧光蛋白的适用结构,就能相应的采取适用颜色的荧光有针对性地进行定位研究,对指导荧光蛋白的精准定位具有重要意义。

参考文献 References:

- [1] Zhou J C, Shi X J, Xie B. Application of green fluorescent protein gene (*gfp*) in the symbiosis between *Mesorhizobium huakuii* and *Astragalus sinicus*. China Science Foundation, 2001, (5): 48-51.
周俊初, 使小娟, 谢波. 绿色荧光蛋白基因(*gfp*)在华葵中生根瘤菌与紫云英共生固氮作用研究中的应用. 中国科学基金, 2001, (5): 48-51.
- [2] Tian W J, Yin X R, Li X, *et al.* Regulation of stress responses by heat stress transcription factors (Hsfs) in plants. Acta Horticulturae Sinica, 2017, 44(1): 179-192.
田尉婧, 殷学仁, 李鲜, 等. 热激转录因子调控植物逆境响应研究进展. 园艺学报, 2017, 44(1): 179-192.
- [3] Ehrenberg M, Luo W X, Xia N S. Green fluorescent protein-discovery, expression and development. Acta Biophysica Sinica,

- 2008, (6): 422—429.
- Ehrenberg M, 罗文新, 夏宁邵. 绿色荧光蛋白—发现、表达和发展. 生物物理学报, 2008, (6): 422—429.
- [4] Zhao D, Xue C, Lin S. Notch signaling pathway regulates angiogenesis via endothelial cell in 3D Co-culture model. *Journal of Cellular Physiology*, 2017, 232(6): 1548—1558.
- [5] Tsien R Y. Rosy dawn for fluorescent proteins. *Nature Biotechnology*, 1999, 17(10): 956—957.
- [6] Matz M V, Fradkov A F, Labas Y A. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nature Biotechnology*, 1999, 17(10): 969—973.
- [7] Tian T, Qi X C, Wang Q, *et al.* Colonization study of GFP-tagged *Bacillus strains* on wheat surface. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2004, 4(4): 346—351.
- 田涛, 亓雪晨, 王琦, 等. 芽孢杆菌绿色荧光蛋白标记及其在小麦体表定殖的初探. *植物病理学报*, 2004, 4(4): 346—351.
- [8] Sun J Y, Zheng Y F, Wu Q M, *et al.* Comparison of circularly permuted yellow fluorescent protein from *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. *Journal of Fuzhou University (Natural Science Edition)*, 2014, 42(5): 796—800.
- 孙金钰, 郑屹峰, 巫启明, 等. 环状排列黄色荧光蛋白在大肠杆菌及毕赤酵母中表达的比较研究. *福州大学学报(自然科学版)*, 2014, 42(5): 796—800.
- [9] Cao C L, Cao Z F, Zhao Y Y. Application of fluorescence microscopy in the research of *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Genomics and Applied Biology*, 2018, 37(4): 1539—1546.
- 曹春蕾, 曹正锋, 赵运英. 荧光显微技术在酿酒酵母细胞研究中的应用. *基因组学与应用生物学*, 2018, 37(4): 1539—1546.
- [10] Yang X M, Zhou T, A Y, *et al.* Establishment and nodular nitrogen fixation effect of green fluorescent protein labeled strains of alfalfa rhizobia. *Grassland and Turf*, 2018, 38(1): 44—56.
- 杨晓玫, 周彤, 阿芸, 等. 苜蓿根瘤菌 GFP 荧光标记株的构建及对结瘤固氮的影响. *草原与草坪*, 2018, 38(1): 44—56.
- [11] Tian T, Wang Q. The application of green fluorescent protein GFP as molecular marker in microbiology. *Journal of Microbiology*, 2005, 1(25): 68—73.
- 田涛, 王琦. 绿色荧光蛋白作为分子标记物在微生物学中的应用. *微生物学杂志*, 2005, 1(25): 68—73.
- [12] Mintahag. A dish of plasmid *Escherichia coli* K12 synthesis of ovalbumin. *Busswecetal Science*, 1978.
- [13] Hu Y Q, Zhang W S. Construction and identification of the expression plasmid recombinant with the receptor-associated protein gene. *Journal of Nantong Medical College*, 1998, 18(2): 145—146.
- 胡迎青, 张卫苏. 大鼠肾皮质受体相关蛋白克隆基因重组表达质粒的构建及分子生物学鉴定. *南通医学院学报*, 1998, 18(2): 145—146.
- [14] Chen L Y, Zhang S Q, Li J F, *et al.* Effect of the fluorescence marked rhizobias on alfalfa seeding growth. *Grassland and Turf*, 2013, 6(5): 1—8.
- 陈力玉, 张淑卿, 李剑峰, 等. 接种荧光标记根瘤菌对苜蓿幼苗生长的影响. *草原与草坪*, 2013, 6(5): 1—8.
- [15] Chu Y Y, Tian H Q, Xu H J L, *et al.* Progress in researches of plant multigene transformation. *China Biotechnology*, 2016, 36(12): 111—116.
- 初易洋, 田慧琴, 许蕙金兰, 等. 植物多基因转化研究进展. *中国生物工程杂志*, 2016, 36(12): 111—116.
- [16] Bie X M, She M Y, Du L P, *et al.* Research progress on multigene transformation in plant. *China Agricultural Science and Technology Herald*, 2010, 12(6): 18—23.
- 别晓敏, 余茂云, 杜丽璞, 等. 植物多基因转化研究进展. *中国农业科技导报*, 2010, 12(6): 18—23.
- [17] Tao J M, Zhuang Z M, Zhang Z, *et al.* Advances in research on genetic transformation in grapevine. *Journal of Fruit Science*, 2003, 20(5): 384—387.
- 陶建敏, 庄智敏, 章镇, 等. 葡萄基因转导研究进展. *果树学报*, 2003, 20(5): 384—387.
- [18] Kudla G, Murray A W, Tollervey D. Coding-sequence determinants of gene expression in *Escherichia coli*. *Science*, 2009, 324: 255—258.
- [19] Shu X, Royant A, Lin M Z, *et al.* Mammalian expression of infrared fluorescent proteins engineered from a bacterial phytochrome. *Science*, 2009, 324: 804—807.
- [20] Gregory J, Buda, Tal Isaacson. Three-dimensional imaging of plant cuticle architecture using confocal scanning laser microscopy. *The Plant Journal*, 2009, 60: 378—385.
- [21] Eberl L, Schulze R. Use of green fluorescent protein as a marker for ecological studies activated sludge communities. *FEMA Microbiollett*, 1997, 149: 77—83.
- [22] Potter S M, Wang C M. Intravital imaging of green fluorescent protein using two-photon laser-scanning microscopy. *Gene*, 1996, 173: 25—31.
- [23] Johnson G A, Mantha S V, Day T A. A spectrofluorometric survey of UV-induced blue-green fluorescence in foliage of 35

species. *Plant Physiology*, 2000, 156: 242–252.

- [24] Smith H. Phytochromes and light signal perception by plants an emerging synthesis. *Nature*, 2000, 407: 585–591.
- [25] Naohiro K. Dominique pontier spectral profiling for the simultaneous observation of four distinct fluorescent proteins and detection of protein-protein interaction via fluorescence resonance energy transfer in tobacco leaf nuclei. *Breakthrough Technologies*, 2002, 129: 931–942.
- [26] Yang X M, Shi S L. Gene expression of red, yellow and green fluorescence plasmid stability after transferred in *Escherichia coli*. *Journal of Gansu Agricultural University*, 2018, 6(3): 193–198.
杨晓玫, 师尚礼. 红、黄、绿三种颜色荧光质粒导入大肠杆菌中的稳定性表达. *甘肃农业大学学报*, 2018, 6(3): 193–198.
- [27] Li C, Hou L, Ren L, *et al.* Cloning and expression analysis of *AhHSP70* and *AhHSF* genes in *Arachis hypogaea* L. *Shandong Agricultural Sciences*, 2015, 47(4): 1–7.
李翠, 侯蕾, 任丽, 等. 花生热激蛋白 *AhHSP70* 与热激因子 *AhHSF* 基因的克隆及表达分析. *山东农业科学*, 2015, 47(4): 1–7.
- [28] Wang P, Yin C Y, Ying L. Study on the transforming efficiency of escherichia coli and grobacterium transformed by different methods. *Journal of Huaihai Institute of Technology (Natural Science Edition)*, 2007, 2(16): 56–58.
王萍, 殷春燕, 盈磊. 不同方法转化大肠杆菌和农杆菌转化效率的研究. *淮海工学院学报(自然科学版)*, 2007, 2(16): 56–58.
- [29] Han Y, Zhao S J, Yang Y, *et al.* Construction of RNA interference expression vector containing key aging enzyme *Zmlox-2* in *Zea mays*. *Journal of South China University of Technology (Natural Science Edition)*, 2016, 3(44): 136–140.
韩颖, 赵寿经, 杨瑜, 等. 玉米陈化关键酶基因 *Zmlox-2* 的 RNA 干扰载体的构建. *华南理工大学学报(自然科学版)*, 2016, 3(44): 136–140.
- [30] Sun Y, Guo X M, Zhou H, *et al.* Construction of eukaryotic expression vector bearing the heat shock factor in *Carex rigescens*. *Pratacultural Science*, 2012, 4(29): 544–548.
孙彦, 郭校民, 周禾, 等. 白颖苔草热激转录因子(HSF1)真核表达载体的构建. *草业科学*, 2012, 4(29): 544–548.
- [31] Takekazu K, Takeo K. Invitogene transfer into the adult honey bee brain by using electroporation. *Biochemicaland Biophysical Research Communication*, 2004, 318: 25–31.
- [32] Wu C C, Rong S, Ren J, *et al.* Transferring adenovirus vector-mediated enhanced green fluorescent protein gene into rabbit bone marrow mesenchymal stem cells: Effectiveness and toxicity. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, 2018, 22(17): 2650–2655.
武成聪, 荣树, 任静, 等. 腺病毒介导增强型绿色荧光蛋白基因转染兔骨髓间充质干细胞的效率及毒性. *中国组织工程研究*, 2018, 22(17): 2650–2655.
- [33] Cheng Z Q, Ding Y M, Zeng L Q. The application of GFP as a reporter gene in rice genetic transformmation. *Acta Botanica Yunnanica*, 2002, 24(3): 342–351.
程在全, 丁玉梅, 曾黎琼. 绿色荧光蛋白基因作为报告基因在水稻基因转化中的应用研究. *云南植物研究*, 2002, 24(3): 342–351.
- [34] Chiu W L, Niwa Y, Zeng W. GFP as a vital reporter in plants. *Current Biology*, 1996, 6: 315–324.
- [35] Más P, Beachy R N. Role of microtubules in the intracellular dis-tribution of tobacco mosaic virus movement protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(22): 12345–12349.
- [36] Jach G, Binot E, Sabine F. Use of red fluorescent protein from *Discosoma* sp. (DsRED)as a reporter for plant gene expression. *Plant Journal*, 2001, 28(4): 483–491.
- [37] Kohler R H, Cao J, Zipfel W R. Exchange of protein molcules through connections between higher plant plastids. *Science*, 1997, 276: 2039–2042.
- [38] Haseloff J. The uses of GFP in plants. New York: Wiley Liss, 1998: 191–220.
- [39] Chao Y C, Chen S L, Li C F. Pest control by fluorescence. *Nature*, 1996, 380: 396–397.
- [40] Wang Y S, Wang P C, Guo J L, *et al.* Construction of a GFP-labeled strain of black spot pathogen of Jujube, *Zizyphus Jujuba*. *Journal of Tarim University*, 2018, 30(2): 8–11.
王延松, 王鹏程, 郭俊玲, 等. 枣黑斑病菌绿色荧光蛋白标记菌株的构建. *塔里木大学学报*, 2018, 30(2): 8–11.
- [41] Zou X W, Xia L, Wang N, *et al.* Application of green fluorescent protein (eGFP)-tagged strains of *Sporisorium*. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2018, 48(4): 567–571.
邹晓威, 夏蕾, 王娜, 等. 玉米丝黑穗病菌绿色荧光蛋白标记菌株的构建与应用. *植物病理学报*, 2018, 48(4): 567–571.
- [42] Yin Y P, Yuan X E, Li Q, *et al.* Construction of green fluorescent protein gene tagged biocontrol bacteria *Bacillus subtilis* CQBS03 and its colonization on the citrus leaves. *Scientia Agricultura Sinica*, 2010, 43(17): 3555–3563.
殷幼平, 袁训娥, 李强, 等. 生防菌枯草芽孢杆菌 CQBS03 的绿色荧光蛋白基因标记及其在柑橘叶片上的定殖. *中国农业*

- 科学, 2010, 43(17): 3555—3563.
- [43] Li K Y, Wu Y J, Liu L L, *et al.* The light of green fluorescent protein-teaching reformation and exploration of comprehensive experiment for biotechnology major. *Life Chemistry*, 2018, 38(4): 667—672.
李科友, 武永军, 刘林丽, 等. 绿色荧光蛋白之光—生物技术综合大实验课程教学的改革与探索. *生命的化学*, 2018, 38(4): 667—672.
- [44] Wachter R M, Watkins J L, Kim H. Mechanistic diversity of red fluorescence acquisition by GFP-like proteins. *Biochemistry*, 2010, 49(35): 7417—7427.
- [45] Valdivia R H, Fallkow S. Bacterial genetics by flow cytometry: Rapid isolation of *Salmonella typhimurium* acid-inducible promoters by differential fluorescence induction. *Microbial Cell Factories*, 1996, 22: 367—377.
- [46] Webb C D, Decatur A. Use of green fluorescent protein for visualization of cell-specific gene expression and subcellular protein localization during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Bacteriol*, 1995, 177: 5906—5911.
- [47] Errampalli D, Okamura H. Green fluorescent protein as a marker to monitor survival of phenanthrene-mineralizing *Pseudomonas*-sp. UG14Gr in creosote contaminated soil. *Fems Microbiology Ecology*, 1998, 26: 181—191.
- [48] Dong Q Y, Liang X F, Zhang W, *et al.* Fluorescent labeling of colletotrichum fructicola nuclei based on a reporter gene knock-in strategy. *Mycosystema*, 2018, 37(2): 166—174.
董秋月, 梁晓飞, 张玮, 等. 基于报告基因敲入构建果生刺盘孢细胞核荧光标记菌株. *菌物学报*, 2018, 37(2): 166—174.
- [49] Wu P Q, Ba X G, Hu H, *et al.* Research progress and application of green fluorescent protein. *Journal of Biomedical Engineering Research*, 2009, 28(1): 83—86.
吴沛桥, 巴晓革, 胡海, 等. 绿色荧光蛋白 GFP 的研究进展及应用. *生物工程医学研究*, 2009, 28(1): 83—86.
- [50] Subach O M, Gundorov I S, Yoshimura M, *et al.* Conversion of red fluorescent protein into a bright blue probe. *Nature Chemical Biology*, 2008, 15: 1116—1124.
- [51] Yoshihiro K, Yosuke T, Shoko T, *et al.* Localized expression of arbuscular mycorrhiza-inducible ammonium transporters in soybean. *Plant & Cell Physiology*, 2010, 51(9): 1411—1415.
- [52] Wang S F, Yang Z Y, Wei W, *et al.* Construction of retrovirus integrase eukaryotic expression vectors and interaction of integrase with Brd2. *Journal of Pathogen Biology*, 2018, 13(7): 699—703.
汪速飞, 杨梓艺, 魏巍, 等. 荧光蛋白标记逆转录病毒整合酶及 Brd2 真核表达载体的构建. *中国病原生物学杂志*, 2018, 13(7): 699—703.
- [53] Sun R, Wang G X, Chang L L, *et al.* Development and application of molecular marker technique in strawberry. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2018, 26(9): 1588—1600.
孙瑞, 王桂霞, 常琳琳, 等. 草莓分子标记技术发展与应用. *农业生物技术学报*, 2018, 26(9): 1588—1600.
- [54] Jin M N, Chen Z F, Qiu S J, *et al.* Development and application of HRM-based molecular marker specific for the *Pi2* gene for rice blast resistance. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2018, 26(3): 365—373.
金名捺, 陈竹锋, 丘式浚, 等. 基于 HRM 体系的稻瘟病抗性基因 *Pi2* 特异性分子标记的开发及应用. *农业生物技术学报*, 2018, 26(3): 365—373.
- [55] Song J H, Ma H L, Weng Q Y, *et al.* Genome-wide identification and analysis of HSP70 gene family in Maize. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2017, 31(7): 1245—1254.
宋晋辉, 马海莲, 瓮巧云, 等. 玉米 HSP70 基因家族的全基因组鉴定与分析. *核农学报*, 2017, 31(7): 1245—1254.
- [56] Zou L, Yang K, Xu X L, *et al.* Cloning and functional analysis of halophyte *Halogeton glomeratus* *HgNHX1* promoter. *Acta Prataculturae Sinica*, 2017, 26(11): 57—68.
邹兰, 杨轲, 徐先良, 等. 盐生草 *HgNHX1* 基因启动子的克隆及功能验证. *草业学报*, 2017, 26(11): 57—68.
- [57] Su X F, Shao Q J. Impact of biotechnology on future aquaculture. *Feed Research*, 2003, (7): 39—42.
苏小凤, 邵庆均. 生物技术对未来水产养殖业的影响. *饲料研究*, 2003, (7): 39—42.
- [58] Bindels D S, Haarbosch L, Van Weeren L, *et al.* MScarlet: A bright monomeric red fluorescent protein for cellular imaging. *Brief Communications*, 2017, 14(1): 53—56.