

照亮生命科學的地球微光(四)

生物發光與生物螢光的運用與貢獻

文／鄭明倫、圖／Wikimedia Commons (WC)、Flickr Creative Commons (Flickr CC)、Yiu Vor

摘要

自然界中同時具有生物發光與生物螢光能力的多半為海生動物，兩者的生理作用機制通常具有交互作用，生物發光所產生的光會被生物螢光所吸收，最常發出螢光蛋白的光色。在陸生生物中，僅知某些馬陸和螢火蟲有此現象。廣義生物發光在生命科學上有許多不同的運用，例如生物（化學）發光目前運用最廣的工具乃是螢火蟲的發光酶(luciferase)。發光酶-發光素化學發光過程中需要生物能量現金 ATP 參與，而 ATP 只能在生物存在才能合成，因此可以利用此特性檢測環境中是否遭微生物污染與微生物的相對含量。在生命科學或生物醫學上的運用則是將其當作研究基因轉譯過程中的報告基因，即時了解基因的表現時機與部位。至於生物螢光，最常被利用的有從水母發現的綠色螢光蛋白與從珊瑚發現的紅色螢光蛋白。科學家已經充分了解螢光蛋白中的螢光團結構，因此以基因工程將其改造出各種變形，能發出不同光色的螢光，因此運用性更為擴大。由於生物螢光只要照射 UV 光或是利用螢光的光致發光特性，便能觀察到螢光的產生，因此比起生物化學發光的運用限制更少、更便利，例如用以標記不同的細胞、組織，或是某個基因/蛋白質的表現時間、位置與移動等，或是不同蛋白質間是否有交互作用或會融合、連接的路徑等等。三位前後破解螢光蛋白之謎與開啓運用之路的學者也共同獲得 2008 年的諾貝爾化學獎。此一發展過程也使得生物發光與生物螢光在生命科學的研究上更上層樓，成為照亮生命科學的發光利器。

關鍵詞：發光酶、螢光蛋白、機制、運用、微生物、報告基因、生命科學

前三期我們介紹了能發出生物（化學）發光或生物螢光的生物類群、其原理與功能。那麼這兩個廣義生物發光系統在不同的類群間有沒有交集和交互作用呢？有的，而且如果有交集，幾乎都有交互作用。當一個生物同時具有生物發光與生物螢光，其最終的表現幾乎都是生物螢光。

我們舉最著名的生物螢光物質(fluorophore)：綠色螢光蛋白(green fluorescent protein, GFP)為例。1955 年科學家首度描述一種常見的水母(*Aequorea victoria*, 圖 1)會發出綠色螢光。到了 1960 年代初期，日籍科學家下村脩(Osamu Shimomura)從這種水母身上成功分離出發光蛋白質和螢光蛋白，發光蛋白質被稱為水母素(Aequorin)，螢光蛋白原本被稱為綠蛋白(green protein)，但 1969 年有其他學者稱後者為綠色螢光蛋白，是個適切的名字，因此沿用至今。1970 年代初期科學家懷疑 GFP 會吸收 Aequorin 所發出的藍光而轉換為綠光釋出。1980-90 年代科學家逐漸搞清楚 GFP 的結構和螢光原理，也證實 *Aequorea* 水母的發光與螢光在生理機制上有交互作用。後來也發現這樣的機制似乎是通則，尤其是海中的生物。近年則發現陸地上的馬陸也有少數類群同時具有生物發光（圖 2）和 UV 致生物螢光現象（單獨具有 UV 致生物螢光的種類較多），兩者發出的光色很接近（495-500nm 的藍綠光），而且也都是由表皮發出，但是具體的生理機制與是否有交互作用尚不清楚。

有個常聽到的誤區必須要澄清。在媒體、上課或解說中常會聽到說螢火蟲發出的螢光是如何如何，就科學定義來說這是不精確的陳述，講者指的實際上是人眼可見的自發性生物（化學）發光而非被動的 UV 致螢光。但是螢火蟲能不能發出螢光？最近的海外田野探查中我們觀察到此現象，而且很可能普遍存在某些螢火蟲成蟲與幼蟲身上（圖 3），但並非所有螢火蟲都有。我們已經撰寫科學報告投稿。

最後來談談生物發光與生物螢光的運用與貢獻。大家可能從很小就都聽過螢火蟲的發光反應中只有極低的熱能被損耗，95%的能量是以光能形式放出，因此若能將原理用於照明將會非常節能（圖 4）。但是幾十年過去了，這個理想至今並未實現，因為反應過程需要有生物能量現金 ATP 參與（參見館訊 358 期），人類並沒有辦法合成，需要仰賴生物本身來反應，這就限制了運用生物發光於照明的可能性。但也是因為這個特性，其運用契機也就浮現了。由於生物發光的亮度與 ATP 含量呈正相關，因此可以利用生物發光的亮度去快速檢測某些環境中的微生物量，特別是與衛生有關的環境，例如食品加工或運輸管線中有無被細菌感染（圖 5）。ATP 與環境中的微生物量呈正相關，因此透過相對單位發光量(relative light units)可以快速估算總細菌量(total bacterial count)，不需要依賴實驗室做細菌

培養，而能在幾分鐘內得到解答。這在 1990 年代末期發展出來的檢測已經在例如牛奶產業被廣泛運用。此一方法也被運用在醫院的器械與衛生檢測，但是因為生物發光只能偵測好氧細菌，尚無法完全取代傳統的微生物培養。近 20 年來，生物發光在生命科學/醫學/生物化學等方面的運用上更為廣泛，特別是源自北美的美東核斑螢(*Photinus pyralis*)的發光酶(luciferase)基因，科學家以基因工程結合欲研究的基因(標的基因)，做為後者活動時的報告基因(reporter gene)，當標的基因開始活動(製造 RNA)時也同時製造發光酶，因而能偵測到生物發光，而且由於發光酶基因的低表達和高敏感度(不會產生高濃度的發光蛋白，卻能靈敏地反應發光)，不會干擾到原本的細胞生理行為，所以被廣泛運用在偵測基因的轉錄(transcription)中，使我們了解許多基因的作用機制與功能。

至於生物螢光，特別是綠色螢光蛋白與後續從珊瑚發現的紅色螢光蛋白(RFP)(圖 6)，其運用更為廣泛。它的優點正是只需照光就能產生螢光，因此可以運用於體內或體外。在下村脩純化出綠色螢光蛋白和破解其化學結構後，直到 1992 年 Martin Chalfie 才首度利用基因工程技術讓 GFP 在不同生物上表現。錢永健(Roger Tsien)進一步解答了 GFP 螢光的生化機制，發現其第 65-67 三個胺基酸互相作用生成螢光團(圖 7)，不須藉由其他酵素或化合物來發光。因此他以基因工程的方式改造 GFP，使之能發出各種不同色，而且更持久與強烈的螢光(圖 8)。這 3 個前後研究形成的路徑，開啓了生命科學研究的新紀元，科學家可以輕鬆在顯微鏡底下即時(real-time)觀察細胞乃至生物體內各種功能。例如將螢光蛋白與某個蛋白質結合，從而得知其表現部位、時機和在體內的移動，或是標誌特定的細胞或組織，如幹細胞、癌細胞，或是發育中的胚胎，以得知其發展、分化或轉移(圖 9)；或是不同的蛋白質間的交互作用或是物質傳遞方向(例如腦神經細胞的連結路線)，原理是當兩個各帶不同顏色的螢光報告基因的蛋白質靠近到某個距離時，會藉由螢光共振能量轉移(FRET)使收受者接收到發授者的能量而激發自身的螢光(圖 10)。不同色的螢光蛋白也可標定不同的標的物，使我們了解整體的過程。也是因為 GFP 在生醫等各大領域的重大貢獻，研究 GFP 結構、運用與作用機制並加以改良的下村脩、Martin Chalfie 與錢永健三位學者同時獲得 2008 年諾貝爾化學獎的殊榮。在他們與其他眾多學者的努力下，將生物發光與生物螢光的地球微光導向超乎我們原本想像的方向與方式，成為照亮生命科學的耀眼光芒。

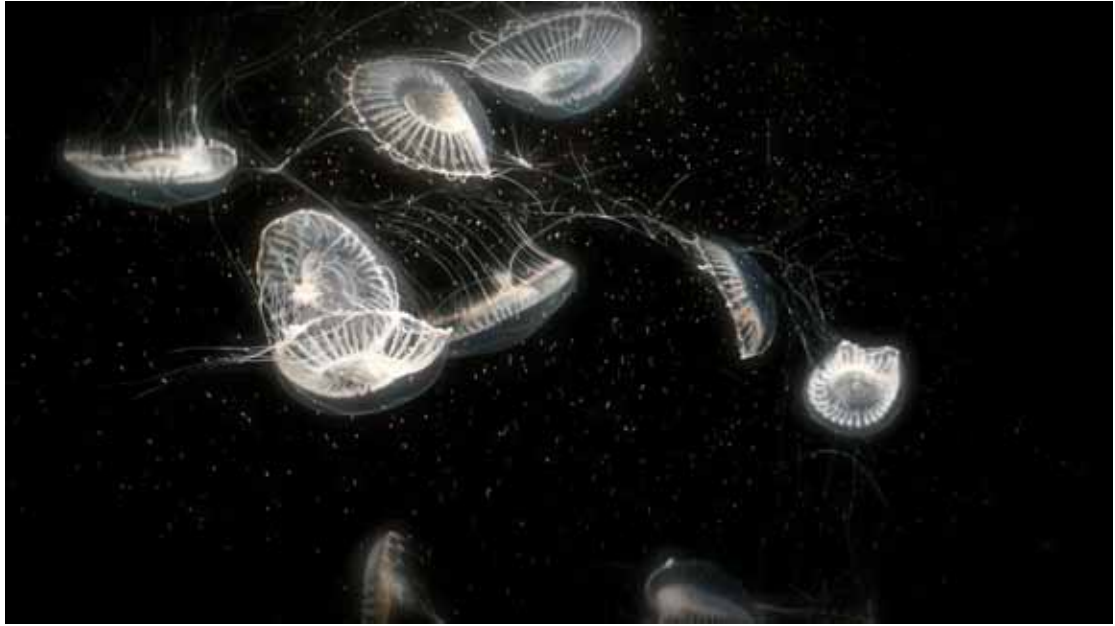


圖 1. *Aequorea victoria* 水母。1962 年首度自該水母分離出 GFP，成為重要的生命科學研究利器(Denise Allen, Flickr CC)



圖 2. 北美的馬陸 *Motyxia sequoiae* 能發出藍綠光(Eden Janine and Jim, Flickr CC)



圖 3. 某些螢火蟲在 UV 光照下能發出明亮的藍綠色螢光(Yiu Vor 攝)



圖 4. 有可能利用生物發光做為人工照明嗎？目前似乎還很遙遠(Klim Levene, Flickr CC)

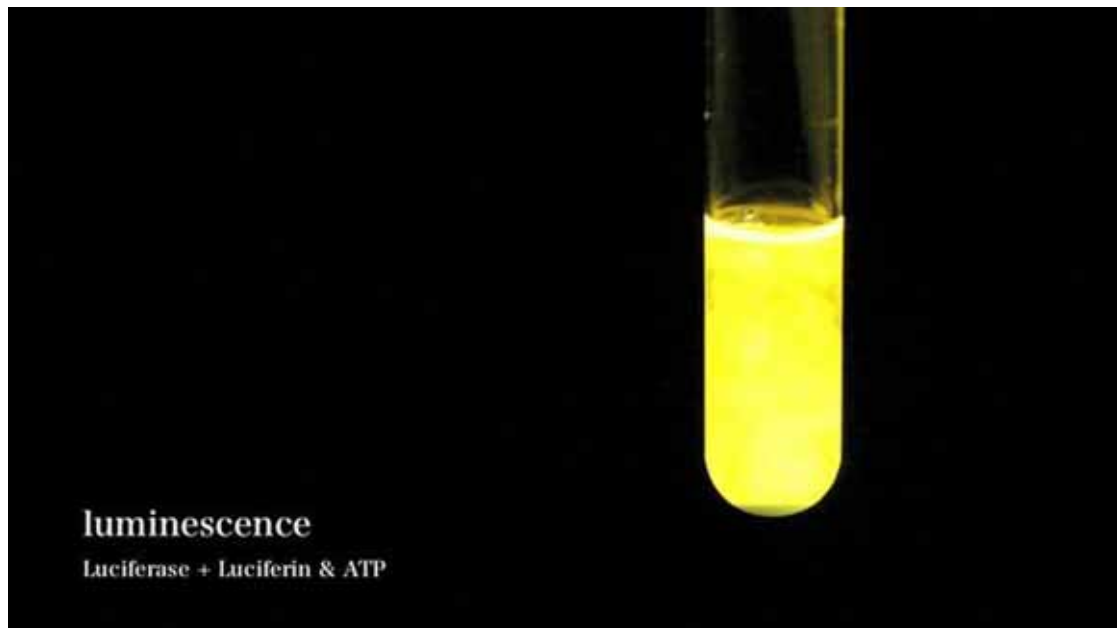


圖 5. 日本龜甲萬 (Kikkoman) 公司發展的測試微生物的產品 “Photalite” (Vimeo, WC)



圖 6. 從珊瑚發現的 RFP 與從水母發現的 GFP 並列生物螢光工具雙雄 (Nicole K Michiels et al., WC, 本圖經過裁切)

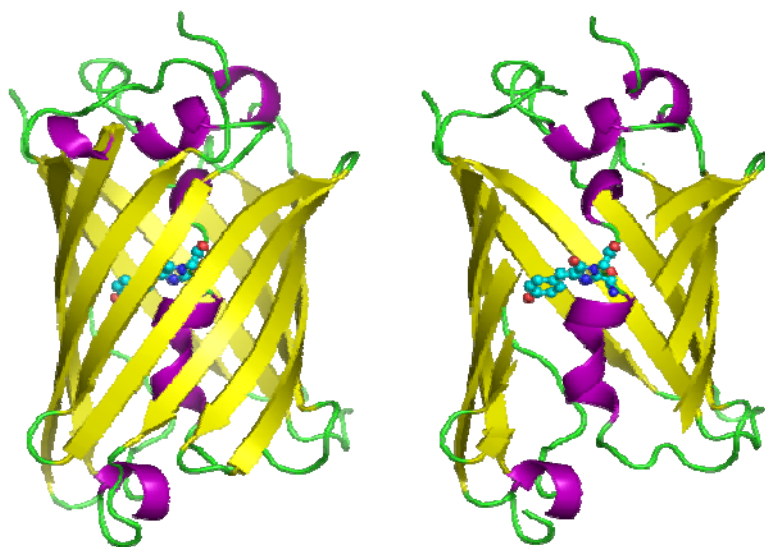


圖 7. GFP 的立體結構(左)，當中由三個胺基酸所組成的螢光團(右圖剖面中央的藍—紅分子結構)是產生螢光的所在(Raymond Keller, WC)

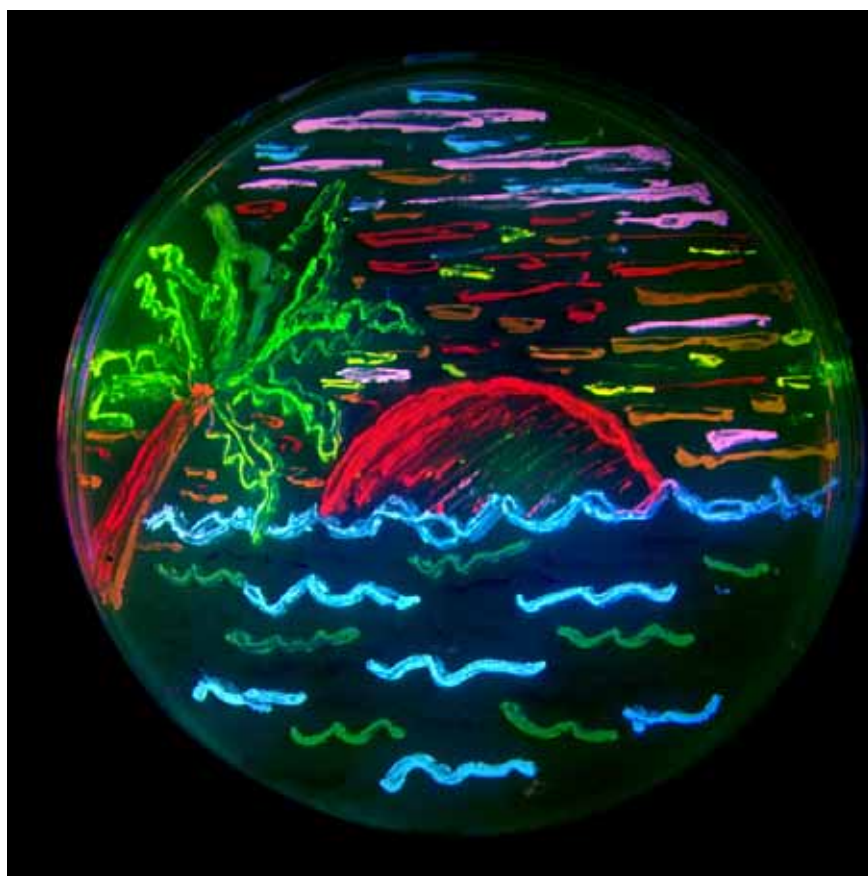


圖 8. 利用植入不同光色螢光蛋白基因的細菌所創作的聖地牙哥海岸圖(Nathan Shaner, WC)



圖 9. 在 UV 光照下藉由 GFP 表現特定基因的白鼠(I. Moen et al., WC)

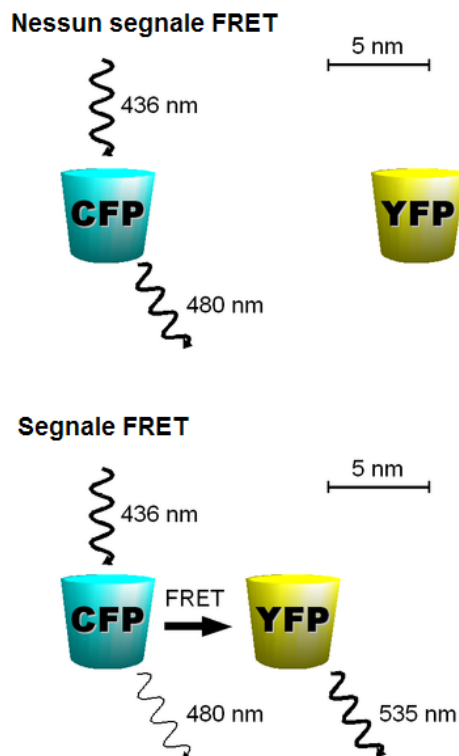


圖 10. FRET 原理示意。當兩個帶有不同螢光蛋白的蛋白質接近到 5nm 以內時，帶有藍色螢光蛋白(CFP)者會藉由共振能量傳遞，使帶有黃色螢光蛋白(YFP)的蛋白質發出黃色螢光，藉此得知兩個標的蛋白質有交互作用或結合現象(Sven Jähnichen, WC)。