

14A 美妙的荧光分子与好奇的生物化学家

做出应获诺贝尔奖工作的科学家，几十年默默无闻；

被广泛应用的分子，很少人知其发现者；

原始论文鲜为人知，后继论文倒很热门；

曾失明的人，发现了美丽的发光蛋白；

低调的父亲，出了高调的儿子。

这里简介一项生物化学研究，讲一个科学家的故事，还讨论一个问题：是否活着的科学家中还有因好奇而做科学研究？

本文不是预测诺贝尔奖，而是介绍值得获奖的工作。我不介绍可能获奖、但其工作不值得获奖者。相反，本文的主人公可能被埋没得不到奖，但他的工作很值得介绍。

14A1 生物发光和荧光蛋白

现在研究生物的人，几乎都知道绿色荧光蛋白(GFP)，但常常不知或搞错其发现者。毫无争议的发现者是日裔美国科学家下村修(Osamu Shimomura, 下村脩)和已故美国科学家约翰森(Frank H. Johnson)。他们1961到1974年发现两种发光的蛋白质：水母素(aequorin)和GFP。

生物发光现象，下村修和约翰森之前就有人研究。萤火虫发荧光，是由荧光酶(luciferase)作为酶催化底物分子荧光素(luciferin)，有化学反应如氧化，以后产生荧光。而发现蛋白质本身发光，无需底物，起源于下村修和约翰森的研究。

下村修和约翰森用过几种实验动物，和本故事相关的是学名为 *Aequorea victoria* 的水母。1962年，下村修和约翰森等在《细胞和比较生理学杂志》上报道，他们分离纯化了水母中发光蛋白水母素。据说下村修用水母提取发光蛋白时，有天下班要回家了，他把产物倒进水池里，临出门前关灯后，回头看一眼水池，结果见水池闪闪发光。因为养鱼缸的水也流到同一水池，他怀疑是鱼缸排出的成分影响水母素，不久他就确定钙离子增强水母素发光。1963年，他们在《科学》杂志报道钙和水母素发光的关系。1967年Ridgway和Ashley提出检测钙的新方法：用水母素。钙离子是生物体内的重要信号分子，水母素成为第一个有空间分辨能力的钙检测方法，是目前仍用的方法之一。

1955年Davenport和Nicol发现水母能发绿光，但不知其所以然。1962年下村修和约翰森纯化水母素的文章中，有个注脚，说还发现了另一种蛋白，它在阳光下呈绿色、钨丝灯下呈黄色、紫外光下发强烈绿色。其后他们仔细研究了其发光特性。1974年，他们得到了这个蛋白，当时称绿色蛋白、以后称绿色荧光蛋白(GFP)。Morin和Hastings提出水母素和GFP之间可以发生能量转移。水母素在钙刺激下发光，其能量可转移到GFP，刺激GFP发光。这是在生物中的发现物理化学中已知的荧光共振能量转移(FRET)。

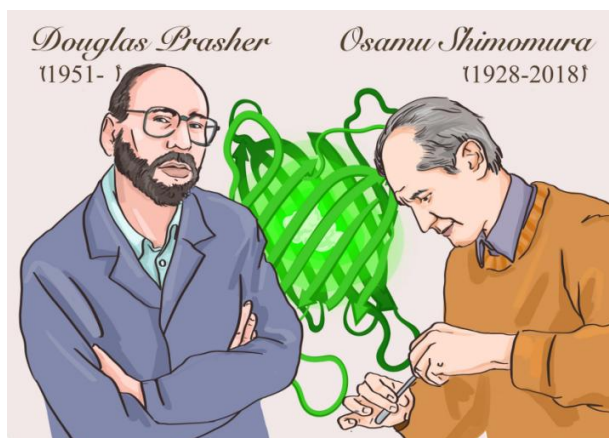


图 14-9 Shimomura 和 Prasher

下村修本人对 GFP 的应用前景不敏感，也未意识到应用的重要性。他离开普林斯顿到 Woods Hole 海洋研究所后，他的同事普瑞舍(Douglas Prasher)非常感兴趣用荧光蛋白做生物示踪分子。1985年普瑞舍和日

裔科学家 Satoshi Inouye 分别根据蛋白质序列拿到了水母素的基因(生物学上准确地说是 cDNA)。1992 年,普瑞舍又拿到 GFP 的基因。有了 cDNA,一般生物学研究者就很容易应用,比用蛋白质方便多了。

普瑞舍 1992 年发表 GFP 基因的文章后,离开科学界。原因是他申请美国国家科学基金时,评审者说没有蛋白质发光的先例,就是他找到了这种蛋白,也无价值。他离开学术界去麻省空军国民卫队基地,到农业部动植物服务部工作。当时他如果花几美元,就可以做一个一般研究生都能做,但非常漂亮的工作:将来自水母的 GFP 基因放到其他生物体内(如细菌),看到荧光,可以很强烈地提示 GFP 本身可以发光,无需其他底物、或者辅助分子,也表明可以广泛用 GFP。

将 GFP 表达到其他生物体这项工作,1994 年由两个实验室独立进行:美国哥伦比亚大学做线虫的 Marty Chalfie 实验室,和加州大学圣迭哥分校、Scripps 海洋研究所的两位日裔科学家 Inouye 和 Tsuji。

水母素和 GFP 都有重要的应用。但水母素仍是荧光酶的一种,它需底物荧光素。而 GFP 是蛋白质本身发光,原理上不同。

Chalfie 的文章立即引起轰动,很多生物学研究者纷纷将 GFP 引入自己的研究系统。当时好些并无原创性的文章发表在《自然》、《科学》等刊物,证明哪里表达 GFP,哪里就有绿光,这些后续文章不过是跟风。

1994 年,华裔美国科学家钱永健(Roger Y Tsien)开始改造 GFP,有多项发现。世界上目前使用的荧光蛋白大多是钱永健实验室改造后的变种,有的荧光更强,有的呈黄色、蓝色,有的可激活、可变色。其后,一些人热衷到一些不常用做研究样本的生物中寻找有颜色的蛋白,不过真发现的有用东西并不很多,成功的例子有俄国科学院生物有机化学研究所 Sergey A. Lukyanov 实验室从珊瑚里发现的其他荧光蛋白,包括红色荧光蛋白。

综观整个过程,从 1961 年到 1974 年,下村修和约翰森的研究遥遥领先,但很少人注意。单纯从技术上,其他生化学家也可以得到水母素和 GFP,但需要有想法或兴趣。在 1974 年以后,特别是八十年代后,很多后续工作显而易见,一般研究生可以做。其中例外是钱永健实验室发现变种出现新颜色,这一发现出乎意料。

14A2 GFP 之美丽和妙用

GFP 及其衍生物(各种荧光蛋白),绚丽多彩,非常漂亮。

有些荧光蛋白当浓度足够高时,在日光下可以看到颜色。所以实验室产生了人为可控制颜色的鱼、老鼠。

荧光蛋白广泛应用于生物学研究。可以通过常规的基因操纵手段,将荧光蛋白用来标记其他目标蛋白,这样可以观察、跟踪目标蛋白的时间、空间变化。提供了以前不能达到的时间和空间分辨率,而且可以在活细胞、甚至活体动物中观察到一些分子。荧光蛋白技术也使得人们可以研究某些分子的活性,而不仅仅是其存在与否。

对于有些研究来说,荧光蛋白的作用可以形容为“起死回生”:原来有些方法,需要把生物变成死物才能研究一些现象和过程,而荧光蛋白为主要支柱之一的现代成像技术,使科学家在活的细胞中观察和研究这些过程,使一部分“死物学”变成“生物学”。

14A3 为了好奇

下村修 1928 年生于京都,长于长崎。1945 年他 16 岁时,原子弹在他故乡爆炸,他曾失明数周。1951 年,他毕业于长崎医科大学药学专门部,1960 年获名古屋大学有机化学博士。1960 年他到美国普林斯顿大学约翰森实验室做博士后,63 年至 65 年回日本名古屋大学任副教授,65 年回普林斯顿继续在约翰森实验室,直到 1980 年。估计是约翰森退休后下村修不能待在普林斯顿了,所以 1980 至 2001 年他到麻省 Woods Hole 海洋生物学研究所工作、并有波士顿大学兼职教授之软差。

下村修 1961 年 33 岁做出重要发现(1962 年发表),到 1974 年 46 岁时,全部关键实验完成。但到 80 岁的今年,他几乎是默默无闻。他多年没有实验室,在约翰森实验室做了近 20 年博士后,不是为了功。他也没有当选美国科学院院士,不是为了名。GFP 后来带来了相当的收益,但下村修没得,也不是为了利。

下村修加入生物发光研究是 1955 年在日本做研究生时,导师让他到另外一个实验室去开阔眼界,而那个实验室的导师介绍他做荧光素。1959 年导师逝于癌症,1960 年他到约翰森实验室。约翰森给他看水母发光,要他做,可是第一次演示根本没有发光。但下村修被约翰森感染了,决定做这个课题。1961 年约翰森开了七天的车、每天 12 小时,带下村修横跨美国到西海岸华盛顿州的“星期五港”实验室,那里当时盛产水母,有很多原料,他们在 1961 年夏做出主要发现。

下村修开始做研究时不知其重要性，只是对生物发光好奇。发光的生物学意义，至今尚不清楚；而发光蛋白应用的重要性，下村修不仅当时不知道，而且以后相当时间不清楚。水母素应用于检测钙，是1967年由Ridgway和Ashley提出。最初下村修和约翰森只为提取水母素，而GFP是副产物。现在，这个副产物的用途比原来的正产物还大。GFP作为示踪蛋白是普瑞舍极力鼓吹。广泛应用在1994年以后。从1974年获得GFP到1994年，下村修并未大力推动GFP的应用。

下村修乐于做这项工作，只需很基本的条件。2001年退休后，他继续做研究，把家里的地下室作为“光蛋白实验室”，2008年80岁的他，还用家庭地址发表文章。

14A4 科学界并不公平

下村修有非常重要的科学贡献。但是科学界多半不知道他，只知道后续工作，社会的认可就更少。

在普林斯顿，他二十年没有独立实验室，在别人领导下工作。到Woods Hole后，是很小的几组。他80岁了，也没有当选哪里的院士。最近几年开始获些不知名的奖。非常热衷于国民获诺贝尔奖的日本，到近年才有少数专家知道下村修。

下村修虽然做了非常原创性的工作，很多人用他发现的GFP，有些生物学杂志每期都有文章用GFP，有些生物杂志每期20%的文章用了GFP，但绝大多数人并不知道发现者是下村修。下村修和约翰森1962年发现水母素的文章迄今被377次引用，1974年纯化GFP的文章被引用169次，Chalfie等1994年《科学》文章被引用3349次，Inouye和Tsuji的1994年文章被引用256次。说明大多数科学工作者并不知道所用的东西怎么来的。简单引用率更不能代替对领域的真正了解。

不仅下村修没有被广泛认可，其他一些人也遭忽略。1990年，他的合作者约翰森82岁去世时，《纽约时报》的悼文没有提GFP。普瑞舍拿到GFP基因但缺经费。Chalfie文章引用率高但专利搞砸了没多少收益。

这个领域，最重要的工作显然是下村修和约翰森做的。钱永健在两个方面做出了重要的贡献，如果钱与下村修合得奖也很合理。第三重要的是普瑞舍。他承前启后，有助于推广应用下村修发现。

14A5 钱永健的贡献

钱永健是取得重要成就的科学家。他在成像技术中，有两项重要工作都与下村修有一定关系。

一项是钙染料。1980年钱永健发明检测钙离子浓度的染料分子，1981年改进将染料引入细胞的方法，以后发明更多、更好的染料，被广泛应用。检测钙的方法有三种：选择性电极、水母素、钙染料。在钱永健的钙染料没有出现以前，具有空间检测能力的只有水母素，但当时水母素需要注射到细胞内，应用不方便，而钱永健的染料可以通透到细胞里面去。水母素和钙染料各有优缺点，目前用染料的人多。钱永健还发明了多种染料用于研究其他分子。

钱永健的第二项工作是GFP。1994年起，钱永健开始研究GFP，改进GFP的发光强度，发光颜色(发明变种，多种不同颜色)，发明更多应用方法，阐明发光原理。世界上应用的FP，多半是他发明的变种。他的专利有很多人用，有公司销售。

钱永健的工作，从八十年代一开始就引人瞩目。他可能有一段时间是世界上被邀请给学术报告最多的科学家，因为化学和生物界都爱听他的报告，既有技术应用、也有一些很有趣的现象。很多人多年认为钱永健会得诺贝尔奖，可以是化学、也可以是生理奖。值得指出，钱永健非常肯定下村修的工作，钱较早公开介绍下村修发现。

钱永健是钱学森的堂侄。他家多科学家和工程师。他中学时获得过西屋天才奖第一名，大学在哈佛念化学和物理，20岁毕业，后获英国剑桥大学生理学博士。他哥哥钱永佑(Richard W Tsien)是神经生物学家，曾任Stanford大学生理系主任。两兄弟分别获Rhodes和Marshall学者奖，到英国留学，九十年代双双成为美国科学院院士。钱学森回国后，国内教育体系在他的子女应该上大学时受到极大破坏，使钱的子女钱永刚、钱永真没有得到他们堂兄弟那样的发展环境。钱永刚出生于1948年，文革后才念大学。但愿钱永健在钱学森先生在世的时候获奖，告慰他们全家。

14A6 科学界还会有下村修吗？

这个问题可以分几个方面讨论。

当然可以问是否现代科学工作者，比较功利，能否象他那样抱着一个不知道重要性的东西，不追求资源、不追求认可，持之以恒，自得其乐。

然后也可以问，如果碰到这样的人，谁会支持他？下村修和钱永健相差很大。钱永健是人们很快就有聪明资质的天才，支持他的人很多，他的工作出来马上为人所知。下村修基本是反例。没人认为他是天

才，他不知道自己工作的重要性，别人也不容易在早期判断他的工作。普林斯顿就没有重视他，否则不会在约翰森退休后，让他走。实际上，当时的校长既不重视他，也不重视生物，当时一批普林斯顿的生物教授因此跑到旧金山加州大学。斯坦福和哈佛很会靠自己的名声和经费实力招已经做出了可以得奖工作的人，但没有发现下村修。

只有少数人会欣赏下村修，支持他做事。如果要委员会投票表决是否支持他，大概多数委员会难以让他过关。但在科学界，需要有些人、有些机构、有些时候敢于承担风险，支持少数下村修这样的科学家，做些开始看来稀奇古怪、不着边际的工作。成本其实相当低，主要是支持者不怕其他人的批评。其中多数这种人最后没什么结果，但是只要很少一些支持对了，对科学界的作用可以很大。

对于学生来说，赶热门比较容易，但如果注意力不被大流所驱赶，而在如1970年GFP研究状态时加入这种领域，其实是很安全的重要课题，那时已经知道有绿色蛋白，主要是提纯。当然，能做1961年的工作更好，不过那要求就高很多。

年逾80的下村修，无疑应该获诺贝尔奖。但他是否能得到，却有较大疑问。首先诺贝尔奖委员会出错频率不低，近年也出过好几次。其次，诺贝尔化学奖委员会有时横炮打到生物里，或没搞懂全貌、或只从化学出发，把奖发给一个领域的某个人，而忽略了领域里其他人，甚至更重要的人。一类工作被奖后，其他奖的委员会一般不愿再给同类工作发奖，这样造成一个领域最重要的人没得奖，而其他人得奖。这种现象，在下村修身上发生的可能性不小。过去十年，发过好几个与GFP相关的奖，都没有下村修。只有很少几个不出名的奖近年给下村修。他是否能得诺贝尔奖，反映的不是他的水平，而是诺贝尔奖委员会的水平。化学和生理两个委员会，是否能比平时水平高一点，还得拭目以待。人的评判无绝对客观，诺贝尔奖委员会也不例外。

下村修的儿子下村努(Tsutomu Shimomura)是下村修1964年回日本期间出生于名古屋。后随父母回美国，长于普林斯顿，上普林斯顿高中。在加州理工学院念大学时，跟过Richard Feynman。曾任职于加州大学圣迭戈分校的物理系和圣迭戈超级计算中心。下村努90年代协助联邦调查局抓住了一个有名的黑客，让那人坐了牢。1995年，他和记者以此为基础合写一本书Takedown(中文“骇客追缉令”)，书被改编成电影。传说他小时候有逆反心理，后来也可能是黑客，在国会作证时，有联邦调查局探员在身旁，他也黑国会的通讯系统。

14A7 对科学的幻灭和对科学家的悲观失望

以前，一些崇拜科学的人，常把科学家看得比实际更伟大。而得了诺贝尔奖的科学家，也有隐去实情，在得奖后大谈对科学的热爱，刻意淡化自己对获奖的重视。

现在，做科学研究的人很多，认识科学工作者的人更多。人们发现科学界很多人并不崇高。原来一些得奖的人不仅热衷于获得认可，而且为了得奖去做很多学术政治，有的不断和评选委员会拉关系，有的到评奖机构蹲点“合作研究”，有的贬低其他人工作。还有些科学工作者做研究纯粹为了利益，对学术不感兴趣，甚至造假。诸如此类，不一而足。

一些水平相当于低年级研究生的人，对科学研究和科学家群体非常悲观，自认为看破科学界的红尘，愤世嫉俗，走向反面，认定为好奇而做科学的人早已灭绝，断言已经没有纯粹为科学而科学的科学家。

有些科学工作者一辈子看不见科学的美，看不到科学家追求美的品味和探索真理的高尚，这不仅影响他们自己的科学研究、动力、动机，而且描黑整个科学界，甚至成为科学界的不良分子。

如果一般将科学研究的动力归为三类：好奇、敬业和求胜。为了勉励青年学子，既说明确实很多科学家做科学的动力比较通俗，但也有科学家是好奇驱动。下村修的故事，有助于年轻人明了每十年中生命科学都有几项非常重要的、大家公认的和发明，从愤世嫉俗中觉悟过来，潜心寻求好的研究方向，自强不息。

14A8 任尔东西南北风

人生不遇到困难，不太可能。

90年代美国生物学家普腊舍研究做得正当其时，但是他运气不好，这个世界会愚蠢地给他当头一棒，国内同行评议不给他研究经费，研究所内同行不欣赏他，使无法继续工作。以后一连串不幸，最后，一个做出了诺贝尔奖工作的科学家，以开公车勉强度日。

今年10月6日《美妙的生物荧光蛋白与好奇的生物化学家》一文介绍了下村修、约翰森、钱永健、查尔菲、Inouye等人的研究工作。8日下村修、钱永健、查尔菲获化学奖。

写此文一方面认为是认为，在诺贝尔奖发奖时间附近，介绍科学和科学家是一种公众服务，也是促进科学的一种努力。另一方面，我比较担心下村修和普腊舍会被埋没和遗忘。结果出来，下村修终于在几十年后，得到了认可。一个不为名利的科学家，80高龄得到社会的推崇，是个美丽的故事。

但是，还有一个故事，比较悲惨：普腊舍。

普腊舍最早认识到绿色荧光蛋白可以用作生物示踪分子的重要性，他因此依据下村修获得蛋白质的序列，拿到了绿色荧光蛋白的基因。1992年，他将文章发表在《基因》杂志，一个读者不多的科学刊物。其后，因为他没有得到美国国立健康研究院的研究经费，不能继续做实验，而且不能在科学界待下去，他离开 Woods Hole 海洋生物学研究所，到空军基地一个美国农业部动植物服务处去工作。那是他1994年文章的地址。其他几个实验室问他要基因，他给了他们，他们表达了 GFP，看到荧光。1994年钱永健和查尔菲的文章上，普腊舍也是共同作者。

这几年，有人在提名诺贝尔奖时，试图找到普腊舍，但是没有成功。

诺贝尔奖宣布后，美国记者找到了普腊舍。原来他不断失去几个工作，最后在偏僻的阿拉巴马州汉茨威尔市的车行，在车行和停车场之间开摆渡车。他家经济状况相当不好，入不敷出，存款几乎耗尽。

他对今年诺贝尔奖的反应是：钱和查尔菲做的工作，我没法做，我已经没有研究经费了。“他们如果来汉茨威尔，应该带我出去用餐晚饭”。

发生在很多人预期比较好的美国，发生在很多人预期比其他很多行业更公平的科学界，发生在很多人比较尊重的诺贝尔奖。当然，人的评论，从来带有主观，美国的经费评审也好，诺贝尔奖委员会也好，都是人。诺贝尔化学奖评生物相关的奖出错频率比较高，也是事实。只是好些事情都发生在一个人身上，比较可惜。

感想：我们每个人对其他人应该公平，也应该为社会公平努力。但是自己心理也许有准备比较好，不要对社会公平预期太高，这样，也许失落可以少些。

也许，对有些事情，心理预期低，才能不怕外界出现问题，才能永远保持乐观。

参考文献

- Shimomura O, Johnson FH and Saiga Y (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, *Aequorea*. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 59:223-239.
- Shimomura O, Johnson FH and Saiga Y (1963). Microdetermination of calcium by aequorin luminescence. *Science* 140:1339-1340.
- Morise H, Shimomura O, Johnson FH and Winant J (1974). Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*. *Biochemistry* 13:2656-62.
- Prasher D, McCann RO and Cormier MJ (1985). Cloning and expression of the cDNA coding for aequorin, a bioluminescent calcium-activated protein. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 126:1259-1268.
- Inouye S, Noguchi M, Sakaki Y, Takagi Y, Miyata T, Iwanaga S, Miyata T and Tsuji, FI (1985). Cloning and sequence analysis of cDNA for the luminescent protein aequorin. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 82:3154-3158.
- Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ. (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111:229-33.
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW and Prasher DC (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263:802-805.
- Inouye S and Tsuji FI (1994) *Aequorea* green fluorescent protein. Expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein. *FEBS Lett.* 341: 277- 80.
- Heim R, Prasher DC and Tsien RY (1994). Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91:12501-12504.
- Matz MV, Fradkov AF, Labas YA, Savitsky AP, Zaraisky AG, Markelov ML and Lukyanov SA (1999). Fluorescent proteins from nonbioluminescent anthozoa species. *Nature Biotechnol.* 17:969-973.
- Tsien RY (1980). New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry* 19:2396-2404.
- Tsien RY (1981). A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. *Nature* 290:527-528.
- Brooks S (2005). The discovery of aequorin and green fluorescent protein. *Journal of Microscopy* 217:1-2.
- Shimomura O (2005). The discovery of aequorin and green fluorescent protein. *Journal of Microscopy* 217:3-15.