

FRET 技术及其在蛋白质-蛋白质分子相互作用研究中的应用*

王进军 陈小川 邢 达**

(华南师范大学激光生命科学研究所, 广州 510631)

摘要 简要综述了 FRET 方法在活细胞生理条件下研究蛋白质-蛋白质间相互作用方面的最新进展. 蛋白质-蛋白质间相互作用在整个细胞生命过程中占有重要地位, 由于细胞内各种组分极其复杂, 因此一些传统研究蛋白质-蛋白质间相互作用的方法, 例如酵母双杂交、免疫沉淀等可能会丢失某些重要的信息, 无法正确地反映在当时活细胞生理条件下蛋白质-蛋白质间相互作用的动态变化过程. 荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 是近来发展的一项新技术, 此项技术的应用, 为在活细胞生理条件下对蛋白质-蛋白质间相互作用进行实时的动态研究, 提供一个非常便利的条件.

关键词 荧光共振能量转移 (FRET), 蛋白质-蛋白质间相互作用, 活细胞

学科分类号 Q6

荧光成像技术在现代生命科学中是一种非常重要的实验研究手段. 近年来生命科学领域出现了一种崭新技术: 荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET), 利用这种技术能够定时、定量、定位、无损伤检测活细胞内蛋白质-蛋白质间相互作用. 而其中以绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 及其突变体的应用最为广泛. GFP 是从维多利亚水母中分离出来的, 受紫外线激发而发出绿色荧光, 由此得名. GFP 的发光基团是环状三肽, 发光时无需辅助因子, 无需作用底物. 又据报道, 与 GFP 融合表达的蛋白质在细胞内仍能行使正常的功能, 所以综合以上优点, GFP 就成了一个极好的体内原位可检测蛋白质-蛋白质间相互作用的报告分子. 近年来发展出了 GFP 多种突变体, 通过引入各种点突变使发光基团的激发光谱和发射光谱均发生变化, 而发出不同颜色的荧光, 有黄色荧光蛋白 (yellow fluorescent protein, YFP), 青色荧光蛋白 (cyan fluorescent protein, CFP) 等. 这些突变体使 FRET 方法用来研究活细胞内蛋白质-蛋白质间相互作用成为可能.

1 FRET 基本原理

荧光共振能量转移是指两个荧光发色基团在足够靠近时, 当供体分子吸收一定频率的光子后被激发到更高的电子能态, 在该电子回到基态前, 通过偶极子相互作用, 实现了能量向邻近的受体分子转移 (即发生能量共振转移). 下面以 GFP 的两个突

变体 CFP 和 YFP 为例简要说明其原理: CFP 的发射光谱与 YFP 的吸收光谱有相当的重叠, 当它们足够接近时, 用 CFP 的吸收波长激发, CFP 的发色基团将会把能量高效率地共振转移至 YFP 的发色基团上, 所以 CFP 的发射荧光将减弱或消失, 主要发射将是 YFP 的荧光. 两个发色基团之间的能量转换效率与它们之间的空间距离的 6 次方成反比, 对空间位置的改变非常灵敏^[1,2]. 例如要研究两种蛋白质 a 和 b 间的相互作用, 可以根据 FRET 原理构建一融合蛋白, 这种融合蛋白由三部分组成: CFP、蛋白质 b、YFP. 用 CFP 吸收波长 433 nm 作为激发波长, 当蛋白质 a 与 b 没有发生相互作用时, CFP 与 YFP 相距很远不能发生荧光共振能量转移, 因而检测到的是发射波长 476 nm 的 CFP 荧光; 但当蛋白质 a 与 b 发生相互作用时, 由于蛋白质 b 受蛋白质 a 作用而发生构象变化, 使 CFP 与 YFP 充分靠近发生荧光共振能量转移, 此时检测到的就是发射波长为 527 nm 的 YFP 荧光 (图 1). 将编码这种融合蛋白的基因通过转基因技术使其在细胞内表达, 这样就可以在活细胞生理条件下研究蛋白质-蛋白质间的相互作用.

* 国家重大基础研究前期研究专项 (2002CCC00400) 和广东省自然科学基金团队项目 (015012).

** 通讯联系人.

Tel: 020-85210089, E-mail: xingda@scnu.edu.cn

收稿日期: 2003-04-04, 接受日期: 2003-05-28

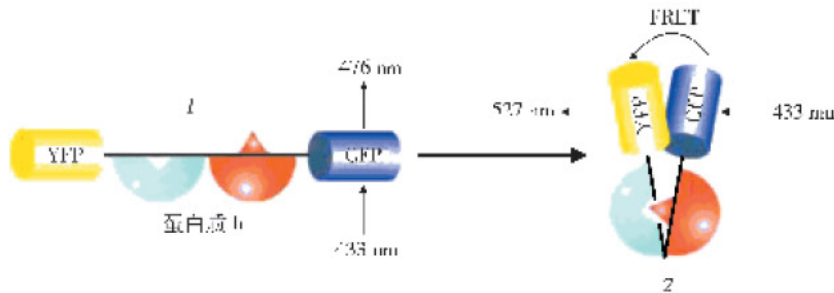


Fig. 1 FRET principle

图1 FRET 原理

根据 FRET 原理构建融合蛋白: CFP (cyan fluorescent protein)、蛋白质 b、YFP (yellow fluorescent protein)。用 CFP 吸收波长 433nm 激发: 1 表明 CFP 与 YFP 相距很远, 检测到的只能是 CFP 发射波长为 476 nm 的荧光; 2 表明分子内发生构象变化, 使 CFP、YFP 充分靠近而发生荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET), 此时检测到的就是发射波长为 527 nm 的 YFP 荧光。检测到的荧光变化反映了分子内构象的变化, 从而反映了蛋白质-蛋白质间的相互作用。

2 FRET 的应用

随着生命科学研究的不断深入, 对各种生命现象发生的机制, 特别是对细胞内蛋白质-蛋白质间相互作用的研究变得尤为重要。而要想在这些方面的研究取得重大突破, 技术进步又是必不可少的。一些传统的研究方法不断发展, 为蛋白质-蛋白质间相互作用的研究提供了极为有利的条件, 但同时这些研究手段也存在不少缺陷: 如酵母双杂交、磷酸化抗体、免疫荧光、放射性标记等方法应用的前提都是要破碎细胞或对细胞造成损伤, 无法做到在活细胞生理条件下实时地对细胞内蛋白质-蛋白质间相互作用进行动态研究。应用 FRET 技术并结合基因工程等技术正好弥补了这一缺陷, 以下是 FRET 技术在相关生命科学领域中的具体应用。

2.1 检测酶活性变化

2.1.1 活细胞内检测蛋白激酶活性: 蛋白质磷酸化是细胞信号转导过程中的重要标志, 研究其中的酶活性是研究信号通路的一个重要方面。以前酶活性测定主要是利用放射性以及免疫化学发光等方法, 但前提都是要破碎细胞, 用细胞提取物测定酶活性, 还无法做到活细胞内定时、定量、定位地观测酶活性变化。而利用 FRET 方法就可以很好地解决这个问题。如 Zhang 等^[3]利用 FRET 原理设计了一种新的探针 (一种融合蛋白)。新探针包含一个对已知蛋白激酶特异性的底物结构域, 一个与磷酸化底物结构域相结合的磷酸化识别结构域。这个探

针蛋白的两端是 GFP 的衍生物 CFP 与 YFP, 利用 FRET 原理工作。当底物结构域被磷酸化后, 分子内部就会发生磷酸化识别结构域与其结合而引起的内部折叠, 两个荧光蛋白相互靠近就会发生能量迁移。如果磷酸酶进行作用将其去磷酸化, 分子就会发生可逆性的变化。

该研究小组^[3,4]用几组嵌合体来研究 4 种已知蛋白激酶的活性: PKA (protein kinase A)、Src、Abl、EGFR (epidermal growth factor receptor)。他们将构建的报导探针转入细胞, 根据 FRET 来检测激酶活性变化。对细胞进行生长因子处理后, 几种酪氨酸激酶都在几分钟内被激活, 检测到 25% ~ 35% 的活性变化。用 forskolin 激活 PKA 能增强 FRET 25% ~ 50% 的变化, 激酶在整个细胞质范围内被激活。如果将报导探针加上核定位信号使之定位于核中, 则 FRET 变化被极大地延迟, 这也说明了 PKA 作用的区域性。由此可见, 利用 FRET 方法可以很好地观察活细胞内酶活性变化, 并且能做到定时、定量、定位, 是一种非常有效的研究手段。

2.1.2 关于细胞凋亡的研究: 细胞凋亡过程大致可以分为三个不同的阶段。起始期, 细胞通过不同途径接受多种与凋亡有关的信号; 整合期, 多种信号在此整合, 细胞做出生存或死亡的决定; 执行期, 一旦做出死亡的决定, 即将进入一个不可逆转的程序。天冬氨酸特异的半胱氨酸蛋白酶 (cysteiny aspartate-specific protease, Caspase) 在细胞凋亡的执行期发挥关键作用, 近年来对其研究成

为细胞凋亡领域的一个热点. 而 FRET 技术的出现对此研究提供了更为有利的条件. Reiko 等^[5]利用 FRET 技术研究了 Caspase8 与 Bid 蛋白之间的相互作用, Caspase8 活化后作用 Bid 蛋白, 使其裂解成两个片段, 然后羧基片段转移到线粒体使其释放细胞色素 c 诱发细胞凋亡. 研究者将 Bid 蛋白两端分别与 CFP 与 YFP 融合, 精心设计使其在没有被裂解前刚好可以发生 FRET, 当 Bid 蛋白被裂解后 FRET 效应自然消失. 所以是一种很好的检测 Caspase8 酶活性方法, 而且当 Bid 蛋白与 CFP 与 YFP 融合之后仍能行使正常的功能, 当融合物在细胞内被裂解后, 连接 CFP 的片段转移到线粒体, 通过 CFP 荧光可以很清楚地观测到其在细胞内的定位. 另外 Markus^[6]与 Kiwamu^[7]等利用 FRET 技术设计了可以反映 Caspase3 酶活性变化的融合报告蛋白, 通过此报告蛋白证实了在细胞凋亡过程中 Caspase3 酶活性变化是一个非常迅速的过程.

2.2 关于膜蛋白的研究

2.2.1 受体激活效应在细胞膜上的横向扩散:膜蛋白的研究一直都是信号通路研究中的重点和难点. 当细胞膜局部受外界刺激后, 相应受体被激活然后向细胞内传导信号, 可是在这之前是否会有细胞膜上的横向效应呢? 近来 Peter 等^[8]报道, 细胞膜局部受刺激后, 膜受体活化效应可迅速扩展到整个细胞膜. 他们将膜受体 EGFR (epidermal growth factor receptor) 与 GFP 融合, 抗活化后的 EGFR 抗体用 Cy3 染料标记, 刺激因子 EGF (epidermal growth factor) 用 Cy5 染料标记, 这样可以很明显地看到 EGF 在细胞膜上的局部分布. 当 EGF 作用细胞后, EGFR 活化并与其抗体结合, 于是 GFP 与 Cy3 染料充分接近, 发生 FRET. 利用此方法可以很明显地观测到细胞膜局部受刺激后, 受体活化效应迅速扩散到整个细胞膜.

2.2.2 膜蛋白的定位修饰:我们知道膜蛋白是定位在细胞膜上不同的亚区域中, 例如脂筏 (lipid rafts) 和小窝 (caveolae), 小窝包含着丰富胆固醇、鞘磷脂和信号蛋白. 那么这些蛋白质怎样到达它们的目的地呢? Zacharias 等^[9]报道, 酰基化足以使这些蛋白质定位在脂筏. 他们的研究是通过 FRET 技术, 用 GFP 的突变体 CFP 和 YFP 来进行. 因为这些蛋白质并没有细胞内定位序列, 所以研究者将各种酰基化修饰的敏感序列加在这些蛋白质上, 研究它们在细胞膜上的分布. 因为分布的微结构域非常小, 所以当 CFP 和 YFP 共分布在同一个

微结构域时, 就可以用 FRET 来观测到. 研究者最初是用激酶 Lyn 的酰基化序列加在这些荧光蛋白上, 使 myristoyl 和 palmitoyl 侧链链接在 CFP 和 YFP 的氨基端. 结果发现产生的 FRET 信号非常强, 用能去除胆固醇而使小窝和脂筏消失的 MCD (5-methyl- β -cyclodextrin) 处理也不能使荧光消失, 所以这说明荧光蛋白已经非常牢固地结合在一起. 然后研究者用荷电的基团代替荧光蛋白上疏水基团时, 发现聚体形成被抑制了.

2.2.3 细胞膜受体之间相互作用:外界刺激因素向细胞内的信号传递一般认为通过其在胞膜上的受体, 当配体与受体结合后, 引起受体构象变化或化学修饰, 介导信号传递. 但是最近关于 Fas 及其同源物 TNFR (均为胞膜上的三聚体受体) 的研究发现^[10,11], 它们都可以在无配体存在的情况下自发组装, 并介导信号传递, 引发细胞凋亡. 其中在鉴定 Fas 发生三聚体化的实验中使用了 FRET 技术, 将 Fas 分别与 CFP、YFP 融合, 利用此项技术可以很方便地观测到 Fas 单体是否发生聚合.

Rocheville 等^[12,13]研究两种递质多巴胺与抑生长素. 发现 SSTR5 (type 5 somatostatin receptor) 与 D2R (type 2 dopamine receptor) 共同分布在大鼠脑中的一些神经元中, 他们将两者共表达, 发现加入多巴胺能的激活剂能增强 SSTR5 与 somatostatin 的亲水性, 加入多巴胺拮抗剂能抑制 SSTR5 的信号传递, 表达 D2R 能恢复 SSTR5 突变体与腺苷环化酶的偶联. 这不由得使人们想到, 两种受体之间是否存在某种联系呢? 终于, 应用 FRET 技术 (SSTR5 用红色染料标记, D2R 用绿色染料标记) 发现了两者之间的直接相互作用. 而且当两受体的配体都存在时才出现 FRET, 说明两受体被激活时才发生相互作用.

2.3 细胞内分子之间相互作用

Rho 家族的小 G 蛋白通过调节肌动蛋白的多聚化调控着重要的生理功能, 象其他信号分子一样, 这些 GTPase 的效应在时间和空间上都非常集中, 那么如何检测它们活性的时空动力学呢? Kravnov 等^[14]报道了一种新的 FLAIR 技术 (fluorescence activation indicator for Rho proteins) 可很好地解决这个问题. 他们将 PAK1 能结合并激活 Rac-GTP 的 domain PDB 与荧光染料 Alexa 标记, 微注射入表达 GFP 与 Rac 融合蛋白的细胞中. 这样, 当 Rac 与 PDB 相互作用时, GFP 和 Alexa 就会足够接近以致发生 FRET. 这种方法能够实时地检测到在一个活

的细胞中 Rac 的定位改变与 Rac 激活之间的关系。

Matsuda 等^[15]报道了关于细胞内 Ras 和 Rap1 激活,也是用了 FRET 技术。他们将 Ras 和 Raf 的 Ras 结合结构域 (RafRBD) 与 GFP 的突变种 YFP 和 CFP 进行融合构建。他们将 Ras 和 YFP 融合, RafRBD 与 CFP 融合,当两分子靠得足够近时,它们之间就会激发 FRET。当设计好的融合蛋白与特异性的 GEFs (guanine-nucleotide exchange factors) 和 GAPs (GTPase-activating proteins) 共表达时,可清楚地显示 FRET 的增加和减少与 Ras 的激活和抑制有关。此外他们还用同样原理观测了 Rap1 激活。

3 展 望

FRET 技术的应用非常广泛,也是非常有价值和发展前途的一种研究手段。今后目标主要是以活体细胞和动物为载体,在其生理条件下实时动态地阐明分子间的相互作用规律,提高对生命活动基本规律的认识。另外结合转基因等技术,将其应用到细胞分子水平的高通量药物筛选中去,也是很有发展前途的。随着 FRET 技术应用及研究的不断深入,必将对现代生命科学的研究发展起着重大推动作用。

参 考 文 献

- 1 Pollok B A, Heim R. Using GFP in FRET-based applications. *Trends Cell Biol*, 1999, **9** (2): 57 ~ 60
- 2 Lakowicz J R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. New York: Plenum Press, 1983. 305 ~ 337

- 3 Zhang J, Ma Y L, Taylor S S, *et al.* Genetically encoded reporters of protein kinase A activity reveal impact of substrate tethering. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98** (26): 14997 ~ 15002
- 4 Ting A Y, Kain K H, Klemke R L, *et al.* Genetically encoded fluorescent reporters of protein tyrosine kinase activities in living cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98** (26): 15003 ~ 15008
- 5 Reiko O, Nagasaki A, Kawasaki H, *et al.* Confirmation by FRET in individual living cells of the absence of significant amyloid β -mediated caspase 8 activation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99** (23): 14716 ~ 14721
- 6 Markus R, Dussmann H, Janicke R U, *et al.* Single-cell fluorescence resonance energy transfer analysis demonstrates that caspase activation during apoptosis is a rapid process. *J Biol Chem*, 2002, **277** (27): 24506 ~ 24514
- 7 Kiwamu T, Nagai T, Miyawaki A, *et al.* Spatio-temporal activation of caspase revealed by indicator that is insensitive to environmental effects. *J Cell Biol*, 2003, **160** (2): 235 ~ 243
- 8 Peter J, Wouters F S, Reynolds A R, *et al.* Quantitative imaging of lateral ErbB1 receptor signal propagation in the plasma membrane. *Science*, 2000, **290** (5496): 1567 ~ 1570
- 9 Zacharias D A, Violin J D, Newton A C, *et al.* Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science*, 2002, **296** (5569): 913 ~ 916
- 10 Richard M S, John K F, Zacharias D A, *et al.* Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science*, 2000, **288** (5475): 2354 ~ 2357
- 11 Francis K M C, Hyung J C, Zheng L, *et al.* A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science*, 2000, **288** (5475): 2351 ~ 2354
- 12 Rocheville M, Lange D C, Kumar U, *et al.* Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity. *Science*, 2000, **288** (5463): 154 ~ 157
- 13 Rocheville M, Lange D C, Kumar U, *et al.* Subtypes of the somatostatin receptor assemble as functional homo- and heterodimers. *J Biol Chem*, 2000, **275** (11): 7862 ~ 7869
- 14 Kraynov V S, Chamberlain C, Bokoch G M, *et al.* Localized Rac activation dynamics visualized in living cells. *Science*, 2000, **290** (5490): 333 ~ 337
- 15 Mochizuki N, Yamashita S, Kurokawa K, *et al.* Spatio-temporal images of growth-factor-induced activation of Ras and Rap1. *Nature*, 2001, **411** (6841): 1065 ~ 1068

Fluorescence Resonance Energy Transfer Assay: Applications in The Study of Protein-protein Interaction *

WANG Jin-Jun, CHEN Xiao-Chuan, XING Da **

(Institute of Laser Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

Abstract Protein-protein interactions play a central role in numerous processes in the cell. Given the complex organization of cell, it is very likely that the molecular behavior of proteins in a test tube is different from that in living cells. For this reason, the conventional approaches used to study protein-protein interactions, including two-hybrid yeast assay, immunoprecipitation assay, etc, may not represent the physiological nature in living cells. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) is a recently developed laser technique, which offers a unique opportunity to monitor real-time protein-protein interactions or protein conformational changes within a living cell and to follow the time course of the changes in FRET corresponding to cellular events. The observation of such dynamic molecular events in its natural environment provides vital insight into the protein-protein interactions within the cell. The applications of this approach to study the protein-protein interactions *in vivo* are briefly reviewed.

Key words fluorescence resonance energy transfer (FRET), protein-protein interactions, living cell

* This work was supported by grants from The National Major Fundamental Research Project of China (2002CCC00400) and The Team Project of Natural Science Foundation of Guangdong Province (015012).

** Corresponding author. Tel: 86-20-85210089, E-mail: xingda@senu.edu.cn

Received: April 4, 2003 Accepted: May 28, 2003

第七届全国酶学学术讨论会
第一轮通知

第七届全国酶学学术讨论会定于 2004 年 5 月 15 ~ 17 日在云南省昆明市举行。届时该领域的著名专家、学者，将与会议代表欢聚一堂，共同交流酶在以基因组学和蛋白质组学为标志的现代分子生物学中的最新研究成果及研究方法与技术，探讨新世纪我国酶学研究领域的发展方向与应用前景。届时将由两位著名专家做精彩的大会报告。

组织委员会

主任委员：许根俊院士，中国生物化学与分子生物学会理事长

副主任委员：周筠梅教授，中国科学院生物物理研究所

张克勤教授，云南大学

周海梦教授，清华大学理学院

会议时间
2004 年 5 月 15 ~ 17 日

会议地点
云南省昆明市，具体地点请见第二轮通知

主办单位
中国生物化学与分子生物学会，酶学专业委员会

承办单位
中国科学院生物物理研究所，云南大学生命科学院

会议主题
酶的构象变化与功能关系，作用机制；酶的催化动力学；酶与信号传导、细胞凋亡、疾病；酶在药物设计及工农业中的应用；酶与蛋白质折叠，蛋白质组学。

日程安排
5 月 14 日报到，5 月 15 ~ 16 日学术报告，5 月 17 日上午学术报告，5 月 17 日下午离会

会议注册
会议正式代表注册费 600 元/人，博士、硕士研究生 300 元/人，餐费 10 元/天/人，交通费、住宿费自理。

论文摘要
会前将编印《第七届全国酶学学术讨论会论文摘要集》，欢迎大家踊跃投稿。版面格式：统一使用 A4 纸，上下页边距为 2.54 cm，左右页边距为 3.17 cm。语种：中英文均可。标题：字号 4 号，中文黑体，英文 New Roman (以下同)。姓名/单位：字号 5 号，中文楷体，请在出席会议的作者名下画横线。正文：字号小 4 号，中文宋体。关键词：字号 5 号，中文黑体。摘要截止日期：2004 年 4 月 20 日。请在规定时间内用大信封（勿折，以便复印）将论文摘要按下面的通讯地址寄给刘江红女士，同时请用 E-mail 提供电子版。

会议回执

请于 2004 年 2 月 15 日之前将第一轮通知回执寄回。联系人：田玉兰，刘江红 女士。电话：010-64888485；010-64888489。传真：010-64872026。E-mail: tyl@sun5.ibp.ac.cn; nlboff@sun5.ibp.ac.cn

会后参观

5 月 18 ~ 19 日，会务组协助联系、安排去丽江游览，自愿参加。

第七届全国酶学学术讨论会组织委员会
二〇〇三年十月三十日

第七届全国酶学学术讨论会
第一轮通知回执

姓 名		性别	A. 男 B. 女	
职务/职称			年龄	
单 位				
通讯地址				
邮政编码		传真		
联系电话				
E-mail				
论文摘要题目				
备注	是否参加游览：A 是 B 否			

回执请寄：
100101 北京市朝阳区大屯路 15 号
中国科学院生物物理研究所
田玉兰 女士 收