

生物大分子相互作用检测技术新进展

——三色荧光级联荧光共振能量转移技术

刘春春 杭海英*

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET), 是指能量从一种受激发的荧光基团 (fluorophore) 以非辐射的方式转移到另一种荧光基团的物理现象. FRET 的能量转移效率是两个荧光基团间距离的函数, 并对此距离十分敏感, 它的有效响应距离一般在 1~10 nm 之间, 因而可被用于测定原子间及分子间的距离. 这一特点使 FRET 技术在大分子构象变化、大分子之间相互作用、细胞信号通路等研究中发挥重要作用, 成为生物医学研究中的重要方法. 但细胞内的生物学过程常常涉及多于两个的大分子间相互作用, 二色荧光基团的 FRET 技术不能满足这种生物学研究的需求. 最近, 两个研究小组在这方面取得突破, 建立了分别基于共聚焦显微镜和流式细胞仪的三色荧光级联 FRET 技术. 这一技术的出现将会极大地促进生物学及相关研究领域的发展.

关键词 荧光共振能量转移(FRET), 共聚焦显微镜, 流式细胞仪
学科分类号 Q331

虽然荧光共振能量转移 (FRET) 现象早在 20 世纪初即被 Perrin 观察到, 然而其理论描述直到 20 世纪 40 年代末才由 Theodor Förster 完成^[1,2]. FRET 技术是测定原子及分子间距离关系最为敏感的手段之一. 该技术在 20 世纪 70 年代已被广泛应用于化学及生物化学研究中. 在 20 世纪 90 年代, FRET 技术在细胞生物学中的使用得以展开. 在过去 5 年中, 我们见证了 FRET 技术在该领域中应用的高速增长. FRET 技术已成功与色谱分析、电泳、显微镜方法和流式细胞技术结合. 其突出优点在于: 可观察大分子在活细胞中的构象变化和相互作用.

作为一种荧光染色技术, FRET 能适用于从单个生物大分子到细胞在内的各类不同系统^[3]. 对距离变化的高度敏感性, 使其成为一种监控生物大分子内部结构动态及分子内相互作用的有力工具, 并被广泛应用于溶液中生物大分子结构研究^[4]. 2003 年 Watrob 等^[5]对溶液中的三色荧光级联 FRET 技术进行理论和实验的探讨. 有报道运用该技术研究 DNA 酶 (DNAzyme) 的二步折叠^[6], 染色体序列的能量传递^[7]等. 但溶液不是真实的细胞生命环境, 不能揭示大分子在活细胞内真实的结构和分子间相互作用的动态变化. 20 世纪 90 年代中期, 随着绿

色荧光蛋白 (GFP) 等各色荧光蛋白的不断出现^[7,8], FRET 技术开始被广泛应用于活细胞的研究中.

蛋白质组学的发展指出蛋白质在细胞中的相互作用常常不是一对一的, 而是形成高度复杂的网络^[9~11]. 目前广泛使用的两色荧光基团间的 FRET 技术难以准确描述细胞内蛋白质分子间这种相互作用关系. 因应这一需求, 最近两个研究组发展出基于共聚焦显微镜和流式细胞仪的三色荧光级联 FRET 技术^[12,13]. 我们将介绍这两项新发展以及它们的应用前景.

1 生物学研究中 FRET 荧光标记技术简介

荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET), 是指能量从一种受激发的荧光基团 (fluorophore) 转移到另一种荧光基团的物理现象. 前者称为供体 (donor), 后者称为受体 (acceptor), 当发生 FRET 时, 激发态的供体以非辐

* 通讯联系人.

Tel/Fax: 010-64888473, E-mail: hh91@sun5.ibp.ac.cn

收稿日期: 2005-10-14, 接受日期: 2005-12-28

射的方式将部分能量转移到受体, 使受体被激发发射荧光, 而自身的荧光淬灭(quenching)(图 1). 产生 FRET 现象的两种荧光基团必须满足以下两个基本条件: 第一, 供体的发射光谱必须与受体的吸收光谱(又称激发谱)有相当程度的重叠(图 2). 第二, 供体荧光基团与受体荧光基团的距离必须足够近. 这个距离一般约为 1~10 nm, 生物大分子的尺度与之很吻合.

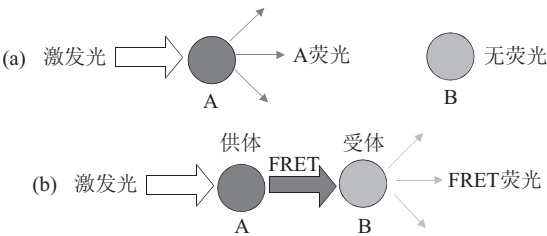


Fig. 1 During the process of FRET between fluorophore A and B, the excitation of A results in the excitation of B with the fluorescence of A decline by quenching

图 1 当两个荧光基团 A 与 B 之间发生 FRET 时, 对荧光基团 A 的激发将能使 B 也被激发而发射荧光. A 的荧光因淬灭而减弱

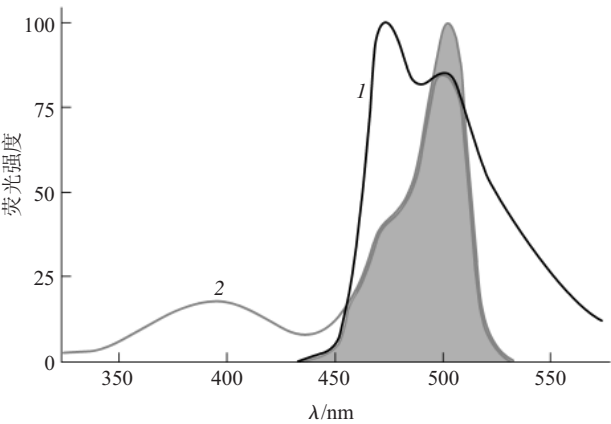


Fig. 2 The overlap of CFP emission spectra and YFP excitation spectra (grey)

图 2 FRET 常用的 CFP (发射谱) 与 YFP (激发谱) 的波谱重叠 (灰色部分)
1: CFP 发射谱; 2: YFP 激发谱.

FRET 最重要的参数是它的效率(E). E 是指受激供体经 FRET 转移到受体的能量占供体释放的总能量的比例. 根据 Förster 理论, E 的数学表达式为:

$$E = \frac{R^6}{R^6 + R_0^6} \quad (R_0 \text{ 为 Förster 距离常数, 由供体受体本身特性决定})$$

可见, FRET 效率 E 依赖于荧光基团之间距离

的六次方, 因而对距离的变化非常敏感, 由此, FRET 也可以作为一种灵敏精确的分子尺, 可测量原子及分子间距离.

在生物学研究中, 通常的荧光标记用于指示被标记分子在细胞内含量和分布. FRET 荧光标记技术除此功能之外, 还能通过荧光基团间能量转移现象来指示被标记分子间的相互作用和分子内部的变化, 而这种能量转移可以很方便地通过荧光信号来检测. 它具有一个难以替代的优点, 即它能实时检测活细胞内生物分子间的相互作用. FRET 也被成功用于测定大分子内不同结构域相对距离的变化, 是研究活细胞内蛋白质构象变化的重要工具. 在信号转导与调控网络的研究中, 包括细胞内自由 Ca^{2+} , cAMP, cGMP 以及 GTP 酶, 蛋白激酶的磷酸化状态, 以及它们间的相互作用等, 都广泛应用了二色荧光 FRET 标记技术^[14~17].

20 世纪 90 年代起, 绿色荧光蛋白 GFP 及其衍生的多色荧光蛋白被发现和创造^[7,8], 它们的基因易与待标记蛋白基因连接, 在胞内表达成融合蛋白, 从而极大促进了二色荧光 FRET 技术在细胞生物学研究中的广泛应用. 这一技术现已比较成熟, 为克服多种细胞背景荧光较强的问题人们已发展出自发荧光校正 FRET 技术(AFRET)^[18]. 关于如何选择合适的 FRET 荧光染料有专文论述^[19], 自动计算 FRET 效率的计算机软件也已开发出来^[20].

2 三荧光级联 FRET

细胞内复杂的生命活动, 常常是通过两个以上的多分子间相互作用实现. 如何检测这种多分子间的动态作用机制是当今分子生物学研究面临的一个难题. 适应这种需求, 研究人员最近提出一种三色荧光的二步级联 FRET (2-step FRET) 技术.

三色荧光级联 FRET 即为 3 种荧光基团之间的两个 FRET 过程的连贯发生(图 3). 荧光基团 A 与 B 发生 A→B 的 FRET, 能量由受激的供体 A 转移到受体 B, 若同时存在第三种荧光基团 C, 它与 B 满足发生 FRET 的条件, 这时就可以发生 A→B→C 的二步级联 FRET 现象: 由激发态的 A(供体)经 FRET 转移而来的能量使 B (中介受体) 被激发, 受

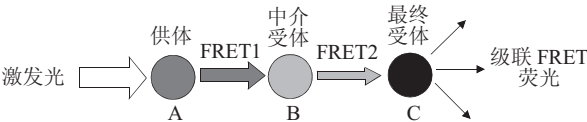


Fig. 3 The scheme of trifluorophore linked FRET system
图 3 三荧光级联 FRET 原理示意图

激的 B 则转而通过 FRET 把能量传递到 C (最终受体), 激发 C 发出荧光。

三色荧光的级联 FRET 标记技术能够检测活细胞内 3 个生物分子间的相互作用, 作为一种新出现的技术, 最近有两篇文献^[12,13]对此进行报道. 这两篇文献均选用 CFP 作为供体, YFP 作为中介受体, mRFP 作为最终受体, 分别基于共聚焦显微镜和流式细胞仪检测 FRET 信号. 并都验证了 mRFP 能作为 CFP → YFP 之间能量转移的有效受体。

He 等^[13]报道基于流式细胞仪的三色荧光级联 FRET 技术, 他们设计了一个六色三激光的流式细胞仪系统的配置, 用以检测级联 FRET 信号. 通过采用 CFP, YFP, mRFP 分别标记 TRAF2 (tumor

necrosis factor receptor-associated factor), 观测到只有在同时转化表达 CFP-TRAF2、YFP-TRAF2 和 mRFP-TRAF2 融合质粒的细胞中才有 CFP → YFP → mRFP 的级联 FRET 信号. 同时, CFP → mRFP 之间能量转移的存在表明, 3 个 TRAF2 分子是以两两相互作用的形成同源三聚体 (图 5), 与 Glasperin 等研究的分子系统不同, 它们不是以线性的方式依次连接. 如果采用二色荧光 FRET 标记进行实验, 只能检测到二色荧光间的一种 FRET 信号, 得到两个 TRAF2 蛋白可相互结合的结论, 不能证明三聚体的形成. 目前而言, 采用传统检测方法, 获得同样的结果非常困难。

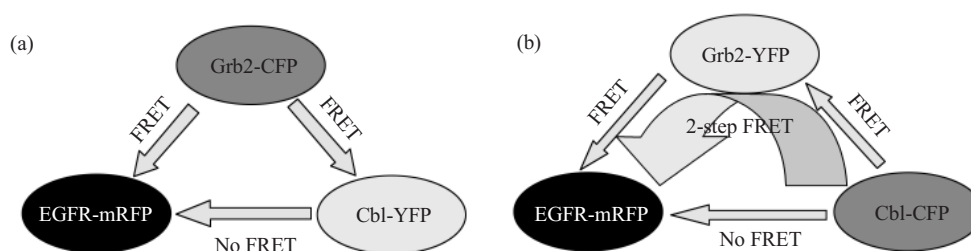


Fig. 4 Linked FRET analyses of the interactions among cbl, Grb2 and EGFR

图 4 用级联 FRET 分析 cbl, Grb2, EGFR 间的相互作用

(a) 同时表达 Grb2-CFP, Cbl-YFP 及 EGFR-mRFP, 不存在 YFP → mRFP 的能量转移. (b) 同时表达 Grb2-YFP, Cbl-CFP, EGFR-mRFP, 可检测到级联的 2-step FRET, 但没有 CFP → mRFP 的能量转移. 结果表明, Cbl 通过 Grb2 间接与 EGFR 作用。

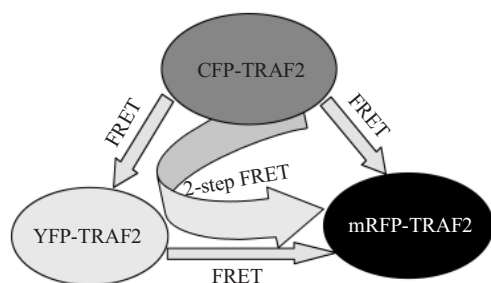


Fig. 5 Trifluorescent FRET detection of TRAF2 polymer

图 5 三色荧光 FRET 检测 TRAF2 分子聚合体

级联 FRET 信号被检测到, 证明 TRAF2 在活细胞内形成同源三聚体, 加上 CFP → mRFP 之间的 FRET 信号, 表明三分子 TRAF2 两两相互连接。

3 讨 论

采用共聚焦显微镜检测 FRET 信号, 最大的优点是能在一定的时间段内直接观察到荧光标记物在

细胞内定位和分布的变化. 但由于级联 FRET 信号较弱, 因此它的信噪比较低, 若采用大功率激发光, 会对细胞造成很大的光毒作用. 采用流式细胞仪检测, 由于细胞被激光照射的时间在 10^{-6} s 的量级, 因此可以使用大功率激发光以获得高信噪比. 流式细胞仪可高通量的定量检测每个细胞的各种荧光信号, 提供具有统计意义的结果, 适合细胞群体测量, 但它无法提供荧光信号的细胞内部分布情况. 因此, 这两种检测技术互补结合, 才能提供更完整的信息。

从生物学应用的角度来看, 三色荧光级联 FRET 技术并不是二荧光 FRET 技术的简单延伸. 由于缺少第三色荧光, 二色荧光 FRET 标记难以应用于 3 个生物大分子相互作用的情形. 另外, 即使 3 个生物大分子之间能两两相互作用, 并分别用二色荧光 FRET 单独检测到, 但也不能就此判断它们三者就能直接相互作用, 只有检测到级联 FRET 信

号, 才能说明这一点.

三色荧光发生级联 FRET 的过程中, 中介受体同时还是向下游转移能量的供体, 因此级联 FRET 具有灵活的应用策略. 检测分子间的相互作用时, 它不但可以标记 3 个分子共同相互作用, 还可以方便地解析它们之间的各种关系. 例如, 考虑 3 个蛋白质分子 A, B, C 相互结合的情形, 并假定 A 与 C 不能直接相互结合, 采用 CFP→YFP→mRFP 的级联 FRET 标记检测:

(1) 若 A 与 B 的结合抑制 B 与 C 结合, 可以通过下面 3 步实验证明: a. 表达 CFP-A, YFP-B, 存在 CFP→YFP 的 FRET 信号. b. 表达 YFP-B, mRFP-C, 存在 YFP→mRFP 的 FRET 信号. c. 表达 CFP-A, YFP-B, mRFP-C, 不存在 CFP→YFP→mRFP 的级联 FRET 信号.

(2) 若 A 与 B 的结合是 B 与 C 结合的前提, 则: a. 表达 CFP-A, YFP-B, 存在 CFP→YFP 的 FRET 信号. b. 表达 YFP-B, mRFP-C, 不存在 YFP→mRFP 的 FRET 信号. c. 表达 CFP-A, YFP-B, CFP-A, YFP-B, 存在 CFP→YFP→mRFP 的级联 FRET 信号.

(3) 若 A 与 B 的结合既不抑制也不促使 B 与 C 的结合, 即 A-B, B-C, A-B-C 共存时, 则: a. 表达 CFP-A, YFP-B, 存在 CFP→YFP 的 FRET 信号. b. 表达 YFP-B, mRFP-C, 存在 YFP→mRFP 的 FRET 信号. c. 表达 CFP-A, YFP-B, CFP-A, YFP-B, 三种 FRET 信号都存在.

传统方法检测这样的多分子间相互作用往往会遇到很大的困难, 而采用 FRET 荧光标记方法, 则实验方便, 结果非常清楚明了. 在活的细胞中, 蛋白质分子间的相互作用是动态的过程, 受细胞生存状态的影响及内外信息的调控, 我们预期, 三色荧光级联 FRET 技术将会在大分子间动态相互作用的研究中获得广泛应用.

近来, 有研究人员报道开发出新的荧光蛋白, 相比于原有荧光蛋白, 它能使 FRET 效率提高近 6 倍^[21], 这使得实现活细胞的“四色荧光三级联 FRET”成为可能. 我们预期, 该技术最先可能会在流式细胞仪上获得突破, 因为其高功率激发光能提高效率较低的多步级联 FRET 信号的信噪比.

多荧光标记使我们能在同一时间直接观测多种分子在细胞内的含量和分布的变化, 是促进生物学研究发展的技术基石之一. FRET 现象的运用, 又使多荧光标记深入了一大步, 使我们能进一步地观

测活细胞内分子间复杂的动态相互作用, 乃至大分子本身结构上的动态变化, 因此它能挖掘出更丰富的、更深和更高层次的信息. 基因组学、蛋白质组学、大分子结构、信号转导与调控网络、生物探针技术以及临床诊断等等领域都将有它的用武之地. 相信多荧光 FRET 标记技术定能促进分子生物学研究的发展.

参 考 文 献

- 1 Först T. Energiewanderung und fluoreszenz. *Naturwissenschaften*, 1946, **6**: 166~175
- 2 Först T. Zwischenmolekulare energiewanderung und fluoreszenz. *Ann Phys (Leipzig)*, 1948, **2**: 55~75
- 3 Watrob H M, Pan C P, Barkley M D. Two-step FRET as a structural Tool. *J Am Chem Soc*, 2003, **125**: 7336~7343
- 4 Liu J W, Lu Y. FRET study of a trifluorophore-labeled DNase. *J Am Chem Soc*, 2002, **124**: 15208~15216
- 5 Ohya Y, Yabuki K, Hashimoto M, *et al.* Multistep fluorescence resonance energy transfer in sequential chromophore array constructed on oligo-DNA assemblies. *Bioconjugate Chem*, 2003, **14**: 1057~1066
- 6 Kawahara S, Uchimaru T, Murata S. Efficiency enhancement of long-range energy transfer by sequential multistep FRET using fluorescence labeled DNA. *Nucleic Acids Symp Ser*, 1999, (42): 241~242
- 7 Heim R, Prasher D C, Tsien R Y. Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **99**: 12501~12504
- 8 Tsien R Y, Bacskaï B J, Adams S R. FRET for studying intracellular signaling. *Trends in Cell Biology*, 1993, **3** (7): 242~245
- 9 Bradshaw R A, Burlingame A L. From proteins to proteomics. *IUBMB Life*, 2005, **57** (4~5): 267~272
- 10 Vorm O, King A, Bennett K L, *et al.* Protein-interaction mapping for functional proteomics. *Trends in Biotechnology*, 2000, **18** (Suppl 1): 43~47
- 11 Kabuyama Y, Resing K A, Ahn N G. Applying proteomics to signaling networks. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2004, **14** (5): 492~498
- 12 Galperin E, Verkhusha V V, Sorkin A. Three-chromophore FRET microscopy to analyze multiprotein interactions in living cells. *Nature Methods*, 2004, **1** (3): 209~217
- 13 He L S, Wu X L, Simone J, *et al.* Determination of tumor necrosis factor receptor-associated factor trimerization in living cells by CFP→YFP→mRFP FRET detected by flow cytometry. *Nucleic Acids Research*, 2005, **33** (6): e61
- 14 Zhang J, Campbell R E, Ting A Y, *et al.* Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2002, **3**: 906~918
- 15 Zacharias D A, Baird G S, Tsien R Y. Recent advances in technology for measuring and manipulating cell signals. *Current Opinion in Neurobiology*, 2000, **10** (3): 416~421

- 16 Kerr R, Lev-Ram V, Baird G, *et al.* Optical Imaging of calcium transients in neurons and pharyngeal muscle of *C. elegans*. *Neuron*, 2000, **26** (3): 583~594
- 17 Tsien R Y. Building and breeding molecules to spy on cells and tumors. *FEBS Letters*, 2005, **579** (4): 927~932
- 18 Sebestyén Z, Nagy P, Horváth G, *et al.* Long wavelength fluorophores and cell-by-cell correction for autofluorescence significantly improves the accuracy of flow cytometric energy transfer measurements on a dual-laser benchtop flow cytometer. *Cytometry*, 2002, **48**: 124~135
- 19 Horváth G, Petrás M, Szentesi G, *et al.* Selecting the right fluorophores and flow cytometer for fluorescence resonance energy transfer measurements. *Cytometry Part A*, 2005, **65A**:148~157
- 20 Szentesi G, Horváth G, Boria I, *et al.* Computer program for determining fluorescence resonance energy transfer efficiency from flow cytometric data on a cell-by-cell basis. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 2004, **75**: 201~211
- 21 Nguyen A W, Daugherty P S. Evolutionary optimization of fluorescent proteins for intracellular FRET. *Nature Biotechnology*, 2005, **23** (3): 355~360

A Progress in Detection of Interactions Between Macromolecules: Linked FRET Using Three Color Fluorophore

LIU Chun-Chun, HANG Hai-Ying*

(Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract Fluorescence resonance energy transfer (FRET) is the energy transfer from an activated donor fluorophore to a receiving fluorophore. The efficiency of the energy transfer is the function of the distance between the two fluorophores, and is very sensitive to the distance. Its effective response distance is between 1~10 nm, thus it can be used to measure the distance between atoms or molecules. The feature of FRET is very useful in researches on conformational changes, interaction between macromolecules and signal transductions within live cells, and FRET has become a powerful tool in biomedical investigations. However, biological processes often involve interactions between more than two macromolecules, and FRET using two color fluorophores cannot meet the research demand. Recently, two research groups made breakthrough, establishing a novel FRET technique using three color fluorophores based on confocal microscopy and flow cytometry, respectively. The invention will significantly advance researches in biological and related fields.

Key words fluorescence resonance energy transfer (FRET), confocal microscopy, flow cytometry

*Corresponding author . Tel/Fax: 86-10-64888473, E-mail: hh91@sun5.ibp.ac.cn

Received: October 14, 2005 Accepted: December 28, 2005