

## 共振能量转移(RET)技术的发展及应用\*

张 宁<sup>1,2</sup> 程葆华<sup>2</sup> 陈 京<sup>2△</sup> 白 波<sup>2△</sup>

(1 曲阜师范大学生命科学院, 山东 曲阜 273165; 2 济宁医学院, 山东 济宁 272067)

**摘 要** 蛋白质间的相互作用是生命活动的基本形式之一, 这种作用对细胞内信号转导, 基因的转录激活等具有重要意义。传统的检测方法存在损伤细胞结构、不能实时动态观察蛋白相互作用的缺点。RET 技术的发展, 解决了上述问题, 为我们更好的研究蛋白质相互作用提供了强有力的工具。本文从 FRET 和 BRET 的基本原理、新型 RET 技术的发展等方面进行介绍, 并将 FRET 和 BRET 进行比较, 以便更好的选择研究蛋白质-蛋白质相互作用的方法。

**关键词** RET; FRET; BRET; 荧光蛋白

**中图分类号:** Q-334 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-9760(2012)04-134-05

随着后基因组时代的来临, 作为生物体结构的重要组成部分和生物性状的体现者, 蛋白质研究越来越多的成为生命科学研究关注的焦点, 尤其是在蛋白质-蛋白质相互作用方面。传统的检测蛋白质-蛋白质相互作用的方法有酵母双杂交、免疫共定位、串联亲和纯化、质谱鉴定和免疫共沉淀等, 它们都对细胞结构有破坏性。荧光共振能量转移 (Fluorescence resonance energy transfer, FRET) 和生物发光共振能量转移 (Bioluminescence resonance energy transfer, BRET), 克服了传统的检测方法的限制, 可以在无损细胞的情况下, 实时监测细胞内蛋白质-蛋白质间的相互作用。FRET 和 BRET 技术的发展, 得益于光学仪器和仪表技术的进步, 以及绿色荧光蛋白 (Green fluorescent protein, GFP) 的“青色”和“黄色”突变体的发展, 后者可以作为 RET 的高效率的伙伴<sup>[1]</sup>。由于 FRET 和 BRET 使用的荧光蛋白不同, 而且反应过程存有差异, 因此, 在使用这两种技术时, 势必要进行分析, 以得到更有效的实验方法。

### 1 FRET

FRET 全称荧光共振能量转移, 其基本原理由 Foster 在 1948 年创立。当两个荧光团足够接近时 (小于 10nm), 荧光能量会通过偶极-偶极作用, 以非辐射性方式从供体转移到受体。在此过程中, 供

体失去能量而荧光强度变小, 受体得到能量荧光强度增加。FRET 的发生必须满足至少 3 个条件: 1) 距离在 1~10nm; 2) 供体和受体的发射偶极子和吸收偶极子的方向具有特异性, 必须保持在一个非 90 度的角度<sup>[1]</sup>, 这是为了防止振动互相抵消而影响 FRET 信号的产生; 3) 供体的发射光谱和受体的激发光谱必须重叠, 而且其重叠要小, 以降低背景荧光的干扰。最常用的荧光对是 CFP (cyan fluorescent protein) 和 YFP (yellow fluorescent protein), 它们分别作为 FRET 供体和 FRET 受体 (图 1)。

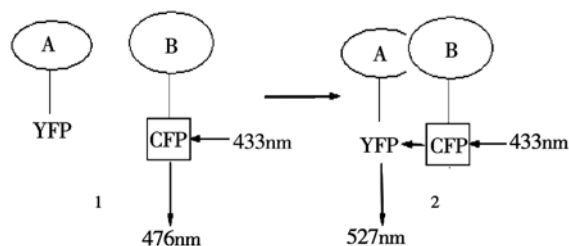


图 1 FRET 原理

FRET 具有广泛的应用前景, 在蛋白质、DNA 以及 RNA 等复合物的研究方面发挥重要作用。近些年, 在蛋白质领域的研究主要集中在蛋白质构象的改变以及 GPCRs (G protein coupled receptors) 的二聚化及寡聚化上。

A. Zurn 等<sup>[2]</sup> 构建不同荧光蛋白标记的  $\alpha_{2a}$ -肾上腺受体, 分析其激活机制, 揭示了不同激动剂诱导的特异性的构象改变。他们分别在受体的 C-末端标记 CFP, 在第 3 个包内环的不同位置标记荧

\* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 30971081; No. 30870932; No. 81070961); 山东省自然科学基金资助项目 (No. Y2007D01; No. ZR2009DZ004)

△ [通信作者] 白波, E-mail: bbai@mail.jnmc.edu.cn;

陈京, E-mail: jing.chen@warwick.ac.uk

光砷化物发夹,最后得出了多巴胺诱导的 FRET 信号比去甲肾上腺素诱导的 FRET 信号弱 1.5 倍的结果。表明不同配体诱导受体的构象改变,在第 3 个包内环的不同位置上的敏感度不一样。

Stephanie B 等<sup>[3]</sup>将 FRET 和全内反射荧光显微镜 (Total internal reflection fluorescence microscopy, TIRF) 结合,描述了  $M_2$ -毒蕈碱受体和  $GABA_B$  受体的异质二联体作用。将 CFP 和 YFP 分别和  $M_2$ -毒蕈碱受体和  $GABA_B$  受体融合,然后直接光漂白 YFP,通过测量光漂白前后的 CFP 发射光的改变,计算出 FRET 的效率。共表达的  $GABA_B$  受体解除了  $M_2$ -毒蕈碱受体对刺激反应的抑制状态,导致毒蕈碱依赖性的 GIRK 通道的激活,或者 cAMP 的抑制,提示  $GABA_B$  受体功能性的改变  $M_2$ -毒蕈碱受体的信号传导。FRET 和 TIRF 的结合使用,为研究 GPCRs 的同聚化和异聚化作用及其对信号传导的影响提供了一条新方法。

FRET-荧光寿命成像技术 (FRET-FLIM) 在检测蛋白相互作用时,其数据的获得可以不依赖荧光团的浓度,而且不需要扣除渗透光谱。由于 FRET-FLIM 只检测供体荧光,所以 FLIM 对受体的亮度无要求,它比较的是在有受体和无受体存在的情况下,供体荧光寿命的变化,从而确定两者间是否发生了能量转移。Hideji Murakoshi 等<sup>[4]</sup>利用 mEGFP 和 REACH (非辐射的 YFP 突变体) FRET 对,使用 FRET-FLIM 技术,在人大脑切片中,高灵敏度的研究了单个树突棘中的蛋白质-蛋白质间的相互作用。

其他 FRET 技术的发展,如时间分辨-FRET (TR-FRET)、各向异性 FRET (AnFRET) 等,都促进了蛋白质-蛋白质相互作用的研究。

## 2 BRET

BRET 首先发现于海洋生物维多利亚水母中,是一种非辐射的能量从供体到受体的转移过程。BRET 有两个融合蛋白,一个融合能量供体荧光素酶,一个融合能量受体荧光蛋白,荧光素酶由加入的腔肠素来激活。腔肠素是疏水的并且是膜渗透性的。当两个融合蛋白发生相互作用,并且距离小于 10nm,供体便会发出能量转移到受体;如果不发生作用,则只能检测到供体氧化底物发出的光。决定 BRET 信号强度的一个重要因素是供体荧光素酶的发射光谱和受体蛋白激发光谱间的重叠

量<sup>[5]</sup>(图 2)。

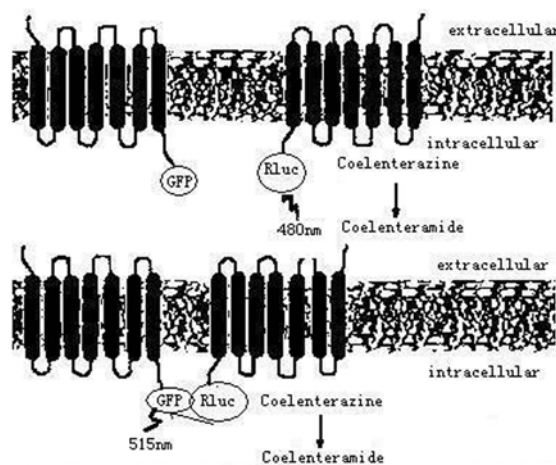


图 2 BRET 原理

BRET 大致可分为  $BRET^1$ ,  $BRET^2$  和延长 BRET (extended BRET) 3 类。这 3 类 BRET 的供体都为海肾荧光素酶 (Renilla luciferase, Rluc), 其差异在于基质和受体的不同。

$BRET^1$  的基质为腔肠荧光素-h (coelenterazine h), 受体为增强型黄色荧光蛋白 (enhanced yellow fluorescent protein, EYFP)。荧光素酶的发射峰为 480nm, EYFP 发射峰为 530nm, 两者间的距离较小, 不能很有效的分开, 结果是背景值过高, 不利于实验结果的观察。

$BRET^2$  使用深蓝 C (DeepBlue C) 取代腔肠荧光素-h, 产生最大峰为 395nm 的发射光, 受体则选择发射峰在 510nm 的 GFP。供体和受体发射峰的距离大于 100nm, 有利于降低背景值, 不过, 深蓝 C 产生的信号与腔肠荧光素产生信号之比约为 1:300<sup>[6]</sup>。 $BRET^2$  需要维持高的基质浓度, 以避免 Rluc 不能有效地激活。

eBRET 的底物是 EnduRen, 它可被内源的酯酶代谢, 提供荧光素酶氧化所需的基质, 基质氧化时间可以持续至少 24h。Abhijit De 等<sup>[7]</sup>利用红色荧光蛋白突变体 (mOrange) 和海肾荧光素酶突变体 (Rluc8) 展现了  $BRET^3$  在光强度的数倍的改进以及最大的光输出红移 (564nm 的波峰), 其光谱分辨率大约维持在 85nm。他们向表达有 mOrange 和 Rluc8 融合蛋白的小鼠体内注射 EnduRen, 观察到了特异性的供体和受体的信号。 $BRET^3$  的发展为未来单细胞活体成像提供了一个新的模型。

### 3 FRET 和 BRET 的比较

FRET 和 BRET 技术有许多方面有相同点, 也存在明显差异。本实验室应用 FRET 和 BRET 技术开展 G 蛋白偶联受体相互作用的研究, 已经成功构建了 pRluc-hKOR-pcDNA3.1 真核重组质粒以及 pEYFP-hApelin-R 真核重组质粒, 并且在 HEK293 细胞中得到表达<sup>[8-9]</sup>。利用 BRET 技术研究了 Apelin 受体和 KOR 受体的异源二聚化作用, 以及激动剂诱导的 Apelin 受体的内化, 并且在 Apelin 受体的 A 型和 B 型划分上得到重要结论。结合以往资料和本实验室的工作, 我们从以下几个方面对 FRET 和 BRET 进行比较。

#### 3.1 供体和受体的选择

FRET 的发生需要两个融合蛋白, 其中一个蛋白融合 CFP(FRET 供体), 另一个蛋白融合 YFP(FRET 受体)。选择 CFP/YFP 作为 FRET 荧光对是由于其荧光强度相对较强, 激发峰和发射峰之间有一定距离, 其 Stokes 位移相对较大, 可以有效地减少光谱的串扰。CFP 在 458nm 处激发, 其发射光为 475 ~ 525nm; YFP 在 514nm 处激发, 发射光为 530nm; FRET 的发生则是 458nm 处 CFP 激发, 经能量转移到 YFP 后, YFP 发出 530nm 的发射光。利用 FRET 成像仪器, 我们可以在两个通道中分别观察黄色荧光蛋白和青色荧光蛋白的表达, 若两个融合蛋白发生反应, 在 FRET 通道中会观察到两种共表达荧光蛋白的 FRET 现象。荧光蛋白的光谱特性, 如耐光性(抵抗光漂白作用)和量子产率(荧光法的效率)在进行 FRET 观察时必须予以考虑。近些年出现的新的荧光蛋白, 都是在荧光亮度、Stokes 位移(激发峰与发射峰之间的距离)、光谱特性、光转换和光激活等方面做的改进<sup>[10]</sup>。

BRET 与 FRET 稍有差异, 其能量供体为发光酶, 受体为一种荧光蛋白, 供体是由额外加入的基质激活的。例如在 BRET<sup>2</sup> 中, 能量供体 Rluc(发射光谱最大值为 395nm), 在底物深蓝 C 中激活, 发出的能量被能量受体 GFP<sup>2</sup> 吸收, GFP<sup>2</sup> 发出最大值为 510nm 的发射光。不过, BRET 中的受体荧光蛋白通常具有一个缺点, 即其 Stokes 位移相对较小, 导致供体和受体的发射光谱不能很好地分离。为了解决这个问题, 人们研发出新的具有高量子产率、大的 Stokes 位移和长的发射波长的 BRET 受体, 如半导体荧光纳米晶体的使用。利用

QD BRET (Semiconductor fluorescent nanocrystals or quantum dots BRET) 技术, 使用半导体荧光纳米晶体作为 BRET 受体, Zuyong Xia 等<sup>[5]</sup>成功地完成了小鼠血清浆液和肺泡细胞中的间质金属蛋白酶的活性的检测, 其检测敏感度可以达到纳克每毫升。

#### 3.2 检测灵敏度

FRET 系统使用两种荧光蛋白, 其中能量供体必须由外源光激发, 有可能导致不必要的受体的激发, 从而降低信噪比。由于各种信号会串扰 FRET 检测, 我们必须尽可能地减少其串扰, 还应注意 FRET 背景的去除。实验过程中, 由通道 B 激发单转的 CFP 质粒, 通道 A 激发单转的 YFP 质粒, 我们可以在扣除背景的情况下计算出系数 B(代表 FRET 通道中, 观察的供体信号被污染的度)和系数 A(代表 FRET 通道中, 观察的受体信号被污染的度)。进而在 FRET 通道中计算出 FRET 的比率。

BRET 系统和 FRET 不同, 它的供体可被底物激活, 不需要外源光的活化, 同时也避免了供体的光漂白和细胞自发荧光的问题。BRET 和 FRET 实验过程相比较, 比较好的一点是 BRET 不需要背景的扣除。Dacres H 等<sup>[11]</sup>利用 BRET 和 FRET 来监测凝血酶浓度。他们通过监测凝血酶裂解对凝血酶-蛋白酶敏感性的多肽的浓度变化, 得出了 BRET<sup>2</sup> 监测凝血酶浓度的敏感性是 FRET 的 50 倍的结论。此外, BRET<sup>2</sup> 技术比 FRET 更适合检测低浓度的反应, 虽然有设备方面的限制, 他们的试验结果仍然表明 BRET<sup>2</sup> 更适合距离检测。

#### 3.3 检测精度

在 FRET 系统中, CFP 和 YFP 可以共转到一个细胞中, 由于成像系统的进步, 可以在显微镜下找到单个共转染的细胞, 进而进行 FRET 的成像及数据的分析。Deepak Kumar Saini 等<sup>[12]</sup>利用 FRET 技术, 在单细胞中观察 G 蛋白偶联受体的激活实验。常态下,  $\alpha_0$ -CFP 和 YFP- $\beta\gamma$  以异质三联体形式存在, 此时可检测到 FRET 信号。当受体激活后, 激活的受体会使异质三联体分离, FRET 信号便会消失。这种 FRET 信号的消失也证明了 GPCRs 在活细胞中的激活。

目前, 单细胞水平的 BRET 成像还很不完善。虽然单细胞-BRET 实验已经有了实施, 但是信号检测却只能在整个细胞水平进行, 而不能定位到亚

细胞区域。此外,由于 BRET 技术需要供体和蛋白质融合,所以不适合研究内源性蛋白质的相互作用。

### 3.4 数据和图像处理

FRET 仪器配有高分辨率的摄像装置,它可以在不同的激发光下观察到彩色的图片。在显微镜视野中,可以寻找不同的细胞进行观察,甚至可以观察到单细胞中重组质粒的表达情况。FRET 结果可以用供体 FRET 比率以及 FRET 强度表示。FRET 图像的获得,可以更加形象和直观的验证蛋白质间的相互作用。

BRET 和 FRET 有很大不同,它的结果不能以图像形式在电脑上呈现。BRET 实验中,需要将所测细胞加入到 96 孔板,然后导入到 BRET 仪器中进行测试。BRET 数值是一个比率数,不是一个绝对数,因而可以消除细胞数目、细胞类型及其他掺杂因素的影响。

## 4 RET 技术在其他生物大分子检测中的应用

FRET 和 BRET 技术不仅可以用于蛋白质间相互作用的研究,它还可以用来研究 DNA 甚至是 RNA 间的相互作用。

Kazutoshi Yoshitake 等<sup>[13]</sup>构建了一对融合的锌指结构蛋白,它们是一种具有 N 端二聚化序列和 C 端 GFP 突变体的荧光传感蛋白。他们分别在锌指结构的末端标记 GFP 的突变体 CFP 和 YFP,将这一对锌指结构蛋白混合,并且加入特异性的双链 DNA,结果观察到了 FRET 现象。随后加入非特异性的双链 DNA,没有观察到 FRET 明显的改变,表明了特异性的双链 DNA 发生了二聚化作用。

特异性序列的 RNA 可以利用 BRET 技术检测。Walls ZF 等<sup>[14]</sup>将耐热性的海肾荧光素酶的突变体 RL8 和绿色荧光蛋白的突变体 GFP<sup>2</sup> 分别连接到不同功能的反义寡聚核苷酸链上,这两个反义寡聚核苷酸链与目的 RNA 上的不同片段互补。当目的 RNA 出现时,这两个酶会共定位,并且发生 BRET 现象;如果没有目的 RNA 的出现,则只会检测到 RL8 发出的光。这项技术可以很好的用来检测目的 RNA 的表达。

RET 技术不仅可以用来检测正常蛋白质间的相互作用,还可以用来检测某些疾病中蛋白质的突变。Raphael Roduit 等<sup>[15]</sup>利用 BRET 技术研究常染色体隐性色素性视网膜炎发病的关联因子。

NR2E3 是一种孤儿核受体,它在光感受器的决定和分化方面起着重要作用;CRX (cone-rod homeobox) 是一种重要的转录因子。NR2E3 和 CRX 通过它们各自的 DNA 结合区域相互作用。他们研究由多种 DNA 结合区域蛋白质突变引起的 NR2E3 的突变对 CRX 和 NR2E3 二聚化的影响。分别表达等量的 CRX-Rluc 和 NR2E3 突变体-GFP<sup>2</sup>,利用 BRET<sup>2</sup> 技术,观察到几乎所有的突变体和 CRX 相互作用的能力都有显著降低。其结果证明:突变后的 DNA 结合区域蛋白质 p. G56R 会和 CRX 结合,隐藏 CRX 的和 NR2E3 发生异源二聚化的 DNA 结合区域,从而抑制翻译的发生。CRX 的活性受到损伤,会造成常染色体隐性色素性视网膜炎严重的临床表现。

FRET 和 BRET 不仅能够研究蛋白质间的相互作用,还能研究 DNA 或者 RNA 间的相互作用;不仅能够研究分子间的相互作用,还能研究分子内的相互作用。然而,生物体内的生化反应过程十分精确而又复杂,单纯的一种技术已经不能满足观察这种生化反应过程的需要。

为了得到更有效的研究蛋白质-蛋白质相互作用的实验方法,将 BRET 和 FRET 技术组合便是 SRET (sequential BRET-FRET)。SRET 中有 3 个不同的蛋白质,用来研究寡聚化现象。在 SRET 实验中,底物被 Rluc 氧化,氧化的底物激活受体 GFP<sup>2</sup>,最后能量转移到受体 YFP。Cabello N 等<sup>[16]</sup>利用 SRET 技术成功的研究了谷氨酸 mGlu5 受体,多巴胺 D<sub>2</sub> 受体和腺苷 A<sub>2A</sub> 受体高阶寡聚化作用。SRET 结合了 BRET 和 FRET 两者的优点,可以研究超过两个蛋白质间的相互作用,与生物体内环境的物质间的相互作用更相似,更有利于我们研究体内复杂的生物化学反应体系。

## 5 展望

传统的检测方法虽然可以验证蛋白质-蛋白质相互作用,但不能提供其在活体细胞中的详细信息。FRET 和 BRET 技术,可在活体细胞中观察蛋白质活动,打破了传统技术的限制。FRET 和 BRET 成像系统已经有了迅速的发展,其中在 GPCRs 的同源/异源二聚化和寡聚化中的应用最为广泛。虽然 FRET 和 BRET 技术日臻成熟,但其缺陷也越来越明显,例如背景对 FRET 信号的污染,受体过表达对供体信号的串扰,基质浓度对 BRET 信号的干扰等。光学仪器的进步,新的荧光

蛋白变体的发现,将会降低各种因素对 FRET 和 BRET 技术的干扰,从而得到更高分辨率和更准确的实验数据。我们有必要将现有的技术融合、筛选,开发出更稳定、更精确、更容易操作的新型 RET 成像仪器。FRET 和 BRET 技术的发展对观察细胞信号转导时的蛋白相互作用有重要意义,它们能相当精确的分析出蛋白质构象的改变、蛋白质寡聚化作用和蛋白亚基配比,甚至是 DNA 与组蛋白的相互作用。FRET 和 BRET 技术的发展和进步,必将对人们更深入的了解各种生命活动现象起着巨大的推动作用。

#### 参考文献:

- [1] Alvarez-Curto E, Pediani JD, Milligan G. Applications of fluorescence and bioluminescence resonance energy transfer to drug discovery at G protein coupled receptors[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 398(1):167-180.
- [2] Zurn A, Zabel U, Vilardaga SP, et al. Fluorescence resonance energy transfer analysis of alpha 2a-adrenergic receptor activation reveals distinct agonist-specific conformational changes[J]. *Mol Pharmacol*, 2009, 75(3):534-541.
- [3] Boyer SB, Slesinger PA. Probing novel GPCR interactions using a combination of FRET and TIRF[J]. *Commun Integr Biol*, 2010, 3(4):343-346.
- [4] Murakoshi HS, Lee J, Yasuda R. Highly sensitive and quantitative FRET-FLIM imaging in single dendritic spines using improved non-radiative YFP[J]. *Brain Cell Biol*, 2008, 36(1-4):31-42.
- [5] Xia Z, Rao J. Biosensing and imaging based on bioluminescence resonance energy transfer[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2009, 20(1):37-44.
- [6] Hamdan FF, Percheahncier Y, Breton B, et al. Monitoring protein-protein interactions in living cells by bioluminescence resonance energy transfer(BRET)[J]. *Curr Protoc Neurosci*, 2006, Chapter 5:Unit 5 23.
- [7] De A, Ray P, Loening AM, et al. BRET<sup>3</sup>: a red-shifted bioluminescence resonance energy transfer (BRET)-based integrated platform for imaging protein-protein interactions from single live cells and living animals[J]. *Faseb J*, 2009, 23(8):2702-2709.
- [8] 李雅林, 白波, 陈京, 等. pRluc- hKOR- pcDNA3.1 真核重组质粒的构建及在 HEK293 细胞中的表达[J]. *中国病理生理杂志 Chinese Journal of Pathophysiology*, 2009, 25(10):2078-2080.
- [9] 陈京, 李雅林, 路海, 等. pEYFP-hApelin-R 重组真核表达载体的构建及在 HEK293 细胞中的表达[J]. *济宁医学院学报*, 2010, 33(5):305-308.
- [10] 杨杰, 张智红, 骆清铭. 荧光蛋白研究进展[J]. *生物物理学报*, 2010, 26(11):1025-1035.
- [11] Dacres H, Dumancic MM, Home I, et al. Direct comparison of fluorescence- and bioluminescence-based resonance energy transfer methods for real-time monitoring of thrombin-catalysed proteolytic cleavage[J]. *Biosens Bioelectron*, 2009, 24(5):1164-1170.
- [12] Saini DK, Gautam N. Live cell imaging for studying g protein-coupled receptor activation in single cells[J]. *Methods Mol Biol*, 2010, 617:191-207.
- [13] Yoshitake K, Waki S, Ueda H. Dimerization-based homogeneous fluorosensor proteins for the detection of specific dsDNA[J]. *Nucleic Acids Symp Ser(Oxf)*, 2007, (51):307-308.
- [14] Walls ZF, Gambhir SS. BRET-based method for detection of specific RNA species[J]. *Bioconjug Chem*, 2008, 19(1):178-184.
- [15] Roduit R, Escher P, Schorderet DF. Mutations in the DNA-binding domain of NR2E3 affect in vivo dimerization and interaction with CRX[J]. *PLoS One*, 2009, 4(10):73-79.
- [16] Cabello N, Candia S, Bertatelli DC, et al. Metabotropic glutamate type 5, dopamine D2 and adenosine A2a receptors form higher-order oligomers in living cells[J]. *J Neurochem*, 2009, 109(5):1497-1507.

(收稿日期 2012-03-06)

• 读者 • 作者 • 编者 •

## 本刊对来稿中表、图的要求

来稿中的表、图均须置于正文中,切勿单独放于文后。每幅表、图应有言简意赅的题目。

统计表格一律采用“三线表”格式,不用纵线、斜线。要合理安排纵表的横标目,并将数据的含义表达清楚;若有合计或统计学处理行(如 F 值、P 值等),则在该行上面加一条分界横线;表内数据要求同一指标保留的小数位数相同。

图片应清晰,不宜过大。图的宽×高为 7cm×5cm,最大宽度半栏图不超过 7.5cm,通栏图不超过 17.0cm,高与宽的比例应掌握在 5:7 左右。

本刊编辑部