

荧光共振能量转移显微术及其新进展

郑 东

(北京师范大学分析测试中心 北京 100875)

摘 要 本文叙述荧光共振能量转移显微术及荧光寿命成像显微术的原理、方法及特点。同时介绍利用荧光共振能量转移显微术研究信号分子 Rac 蛋白在 3T3 成纤维细胞内的定位及活化过程, 以及利用荧光共振能量转移-荧光寿命成像显微术研究转录因子 CAATT/ 增强子结合蛋白 α 在小鼠垂体细胞内的二聚化现象。

关键词 荧光共振能量转移显微术 绿色荧光蛋白 荧光寿命 荧光寿命成像显微术 荧光共振能量转移-荧光寿命成像显微术

对活细胞内蛋白质进行显微成像分析是生物显微技术的一个重要方面。将绿色荧光蛋白作为活细胞内蛋白质的标记分子, 利用荧光共振能量转移显微术可以研究活细胞内蛋白质之间的相互作用。近年来, 该方法与荧光寿命成像显微术结合形成荧光共振能量转移-荧光寿命成像显微术, 后者是荧光共振能量转移显微术的新进展。本文叙述荧光共振能量转移显微术及荧光寿命成像显微术的原理、方法及特点, 并且给出荧光共振能量转移显微术及荧光共振能量转移-荧光寿命成像显微术的应用实例。

1 荧光共振能量转移

荧光物质分子之间能量转移的方式可以分为辐射能量转移和非辐射能量转移。荧光共振能量转移属于非辐射能量转移。该种方式的能量转移可以发生在不同分子以及同一分子的不同生色团之间¹²。提供能量与接受能量的分子或者生色团分别称为供体与受体。在供体与受体之间产生荧光共振能量转移需要满足三个条件:(1)供体荧光发射光谱与受体吸收光谱之间具有相当程度的重叠;(2)供体与受体偶极具有一定的相对取向;(3)供体与受体之间的距离在 1~10nm 之间。在满足以上条件的情形下, 对供体的激发将导致受体荧光发射。对于含有 Tyr 和 Thr 残基的蛋白质分子而言, 荧光共振能量转移发生在这两个残基之间。当用 280nm 激发光激发时, 蛋白质分子荧光光谱的形状受 Thr 残基的支配。

供体与受体之间能量转移效率 E , 能量转移速率 k_T 以及供体与受体之间的距离 r 满足以下公式²:

$$E = R_0^6 / (R_0^6 + r^6) \quad (1)$$

$$E = 1 - (\tau_{DA} / \tau_D) \quad (2)$$

$$k_T = (1 / \tau_D) (R_0 / r)^6 \quad (3)$$

$$r = R_0 \{ (1 / E) - 1 \}^{1/6} \quad (4)$$

$$R_0 = 0.211 \{ \kappa^2 n^{-4} Q_D J(\lambda) \}^{1/6} \quad (5)$$

其中 τ_D 和 τ_{DA} 分别为受体不存在及存在时供体的荧光寿命; R_0 为 Förster 距离, 当供体与受体之间的距离为 R_0 时, 供体激发能量的 50% 转移至受体; n 为折射率; Q_D 为供体荧光量子产率; κ^2 为相对偶极取向因子。公式(5)中的 $J(\lambda)$ 为光谱重叠积分, 该函数表示供体荧光发射和受体吸收光谱之间的重叠程度:

$$J(\lambda) = \int_0^\infty f_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda / \int_0^\infty f_D(\lambda) d\lambda \quad (6)$$

这里 $f_D(\lambda)$ 为经校正的供体荧光强度函数; $\epsilon_A(\lambda)$ 为受体消光系数。由上述公式可以计算供体与受体之间的距离。

2 绿色荧光蛋白与荧光共振能量转移显微术

在紫外或蓝光激发作用下, 绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)发射绿色荧光。水母(*Aequorea victoria*)GFP 含一条肽链, 相对分子量为 27×10^3 , 由 238 个氨基酸残基组成³。GFP 化学及荧光性质十分稳定。野生型 GFP 生色团由 65~67 位残基(-Ser65-Tyr66-Gly67-) 组成^{3,5}。0.19nm 的晶体结构⁶ 显示, GFP 三维结构为 11 条 β 链折叠形成的一圆柱体, 其折叠类型为 β 罐(β -can)。在该圆柱体轴上存在一条 α 螺旋, GFP 生色团即位于 α 螺旋内。因此, GFP 圆柱体表面将其生色团紧密包埋在分子内部。GFP 可在原核和真核细胞中表达。对与 GFP 的 N 端或 C 端融合的蛋白性质研究表明, 融合蛋白既具有 GFP 的荧光性质又具有配体蛋白的生物功能⁴。GFP 细胞毒性小, 并且可以靶入大部分细胞器⁷。利用荧光显微术等技术可以便捷地检测活细胞内 GFP 融合蛋白。

根据以上特点, GFP 作为活细胞内蛋白质标记分子在荧光共振能量转移显微术中得到重要应用。在体外将 GFP 基因与所研究蛋白基因进行融合, 然

后将融合基因转染细胞。在细胞表达 GFP 融合蛋白且产生荧光后,便可以利用荧光显微术对所研究蛋白进行检测。在荧光共振能量转移显微术中,GFP 融合蛋白通常作为荧光共振能量转移过程的供体分子,而受体分子则是与配体蛋白相互作用的其它蛋白分子,包括配体蛋白本身以及配体蛋白的靶蛋白等。在通过基因工程方法所产生的 GFP 变种中,蓝绿色荧光蛋白(cyan fluorescent protein,CFP)和黄色荧光蛋白(yellowish fluorescent protein,YFP)之间可以发生荧光共振能量转移现象。因此利用 CFP 和 YFP 可以对供体及受体分子进行偶联双标⁸。此外,亦可以利用其它荧光染料标记受体蛋白。在细胞仅表达 GFP 融合蛋白时,利用荧光共振能量转移显微术可以对配体蛋白进行原位定位,所获得的像为 GFP 融合蛋白像,简称 GFP-Pro 像。当供体和受体蛋白同时存在时,所获得的像为荧光共振能量转移像,简称 FRET 像。FRET 像反映供体蛋白与受体蛋白之间的相互作用。通过比较 GFP-Pro 像和 FRET 像,可以获得所研究蛋白在活细胞内所处的状态及其与靶蛋白等受体相互作用随时间和空间变化的信息。荧光共振能量显微术可以提供 nm 量级的分辨率^{9,10}。由于供体与受体蛋白之间通常存在着特异性相互作用,荧光共振能量转移显微术具有较高的特异性和灵敏性。

3 荧光寿命成像显微术

荧光寿命 τ 定义为荧光分子处于激发态的平均时间。在实际中,荧光寿命可以表示为荧光强度衰减至初始强度的 $1/e$ 时所需的时间 t ,即 $I=I_0\exp(-t/\tau)$, I 和 I_0 分别为时刻 t 以及激发后初始时刻的荧光强度。通常荧光显微术测量的是细胞内不同区域的荧光强度,所获得的数据为荧光强度像。在荧光寿命成像显微术中,通过测量细胞内的荧光强度,可以计算出细胞内不同区域的荧光寿命分布,从而获得所谓荧光寿命像。

3.1 仪器

在荧光寿命成像显微系统中,主要设备为高速脉冲激光器和高速门控像探测装置等,以获取高信噪比的时间分辨荧光强度像。Periasamy 等人建立的荧光寿命成像显微系统¹¹主要由以下 4 部分组成:

(1)倒置 Nikon TE300 荧光显微镜:配备透射光照明和表面荧光装置,使用 100W Hg 灯作为表面荧光激发光源,以选择表达 GFP 融合蛋白并产生荧光的细胞;

(2)脉冲激光器:Coherent 的 Verdi 激光器(532nm;

5W)泵浦的 Ti:蓝宝石脉冲红外激光器,脉冲频率 76MHz,波长范围 700~1000nm。将波长调谐至 880nm,然后经倍频器倍频,获得 440nm 的激发光,激发活细胞;

(3)LaVision 超快门控多通道板像增强器耦合 CCD 相机:门控宽度为 300ps 至 1ms,最高频率为 110MHz。CCD 活性区面积 640×480,像素大小为 10 μ m,动态范围 12bit,读取速率为 12.5MHz;

(4)电子学控制部分:包括激发脉冲与多通道板像增强器耦合 CCD 相机门控同步电路,延迟电路,超快门控装置和 CCD 相机控制电路。

3.2 数据收集与处理方法

在上述系统中,利用脉冲激光作为激发光源,并且将门控多通道板像增强器耦合的 CCD 相机与脉冲激光同步。在脉冲激光激发细胞荧光后,经 1ns 时间延迟,门控多通道板像增强器开始检测细胞荧光,门控宽度 ΔT 为 2ns,即光子检测累积时间为 2ns。根据所测量的生色团寿命,门控宽度可由 ps 量级至 ns 量级改变。经像增强器放大的信号由 CCD 相机检测,累积时间为 300ms~1s,由细胞荧光信号强度决定。由此可获取第 1 个门控像 D_0 。然后将延迟时间改为 1.5ns,再次进行检测,便可获取第 2 个门控像 D_1 。依次类推,获取其它门控像 D_2 及 D_3 。由于荧光强度随时间衰减,门控像 D_0 至 D_3 为强度依次递减的时间分辨像,时间分辨率可达 ps 量级。对于荧光强度单指数衰变情形,仅需获取 D_0 及 D_1 。在双指数衰变时,则需要获取 4 个门控像 D_0 ~ D_3 。

由高信噪比的时间分辨强度像 D_0 ~ D_3 可以计算细胞内生色团荧光寿命像。荧光寿命等参数的计算方法¹²如下:

对于单指数衰减

$$\tau = -\Delta T \ln(D_1^2 / D_0^2) \quad (7)$$

$$k = 2D_0^3 \ln(D_1 / D_0) / [(D_1^2 - D_0^2) \Delta T] \quad (8)$$

这里 τ 为样品或者供体的荧光寿命, k 是指数量系数。由强度像 D_0 和 D_1 中对应像素点的强度可以计算出该点的寿命,逐一对所有像素点进行计算则可得寿命像。对于双指数衰减时的计算公式,限于篇幅所限,此处从略(感兴趣的读者,请参阅参考文献 12)。

3.3 特点

由于采用高速脉冲激光器以及高信噪比的超快门控成像检测器,利用荧光寿命成像显微术可以获取时间分辨荧光强度像,从而获得活细胞内生色团的荧光寿命,时间分辨率及寿命测量可以分别达到 ps 和 ns 量级水平。由于荧光寿命与生色团所处的微环境密切相关,利用荧光寿命成像显微术测量细胞不同区域内生色团荧光寿命的变化,可以更多

地获取活细胞内蛋白质动态变化和相互作用的信息。时间分辨荧光寿命测量方法受激发光强度、荧光探针浓度以及光散射等因素干扰较少,从而避免了稳态荧光强度测量中的一些不利因素²¹³。

4 荧光共振能量转移—荧光寿命成像显微术

在荧光共振能量转移过程中,供体和受体之间的能量转移发生在 ns 量级的时间范围内。虽然荧光共振能量转移显微术可以提供 nm 量级的空间分辨率,但却无法给出 ns 量级的时间分辨信息。将荧光寿命成像显微术用于研究荧光共振能量转移过程,可以同时获得高时间和空间分辨率,从而跟踪活细胞内蛋白质相互作用的动态过程。由于供体的荧光寿命在荧光共振能量转移过程中将缩短,所以通过测量供体单独存在以及供体和受体同时存在时供体的荧光寿命,可以确定供体和受体之间是否发生共振能量转移。如果供体的荧光寿命发生变化,则两者之间存在共振能量转移,反之则不然。两种显微技术的结合形成所谓的荧光共振能量转移—荧光寿命成像显微术。该方法是荧光共振能量转移显微术的新进展。通过对供体的荧光寿命像进行双指数衰变分析,可以获得供体与受体之间距离分布的范围。然而,荧光共振能量转移显微术则无法提供两者距离分布的信息。

5 应用举例

5.1 细胞内 Rac 蛋白活化的动态过程¹⁴

Rac 蛋白是 Ras 蛋白超家族的一个成员,具有 GTP 酶活性¹⁵。该蛋白与 GTP 结合时处于活化状态,而与 GDP 结合时则失活。在细胞形态控制、肌动蛋白动态变化、转录活化以及凋亡信号转导等过程中,Rac 蛋白与许多下游靶蛋白分子相互作用¹⁶,如 p21 蛋白活化的激酶 1(PAK1)。Kraynov 等人利用荧光共振能量转移显微术定量研究了 3T3 成纤维细胞内 Rac 蛋白的分布及活化过程¹⁴。为了检测 Rac 蛋白的核苷酸状态,在表达 GFP-Rac 融合蛋白的细胞中,经显微注射引入由荧光探针 Alexa 546 标记的 PAK1 片段¹⁷,该片段含 p21 结合结构域(PBD)。PAK1 为 GTP-Rac 的特异性靶蛋白,该蛋白仅与 Rac 的活化状态 (Rac-GTP) 结合。在这一体系中,GFP-Rac 融合蛋白中的 GFP 为能量供体,标记 PBD 的荧光探针 Alexa 546 为能量受体。活细胞内 Rac 蛋白的定位由 GFP-Rac 融合蛋白的荧光强度像给出,而荧光共振能量显微像则显示 Rac-GTP 的分布,即处于活化状态的 Rac 蛋白亚细胞分布。由

于荧光共振能量显微像的强度正比于 Rac 结合 GTP 的水平,因而可以对 Rac 蛋白活化状态进行定量研究。经计算,位于 PBD 氨基端的 Alexa 546 染料与 GFP 中荧光生色团之间的距离 $r=5.2\text{nm}$ 。

3T3 成纤维细胞在血清或血小板生长因子 (PDGF) 作用下,经 Rac 蛋白活化启动膜皱和转录¹⁸¹⁹。在血清或 PDGF 刺激作用前后不同时刻,获取活细胞的 GFP-Rac 和 FRET 像,可以对 Rac 及 Rac-GTP 的分布及动态变化进行研究。在刺激作用之前,GFP-Rac 荧光像显示 Rac 主要分布在核内。激光共焦像和去卷积像显示核内 Rac 集中分布在核膜处。与此相反,荧光共振能量转移显微像显示,Rac-GTP 分布在细胞膜周边区域。这表明核内的 Rac 蛋白未活化。刺激作用 2min 后,细胞膜边缘含 GFP-Rac 的区域出现皱膜现象。FRET 像所显示的核内和膜皱中 Rac 蛋白活化状态的差异可能与 Rac 蛋白在信号转导过程中的调控机制相关。

5.2 活细胞内转录因子 CAATT/ 增强子结合蛋白 α 二聚化¹¹

转录因子 CAATT/ 增强子结合蛋白 α (C/EBP α) 在细胞分化中起重要作用,控制编码垂体前叶生长激素和催乳素等基因的转录²⁰。C/EBP α 为具有碱性区域—亮氨酸拉锁结构的转录因子,2 个 C/EBP α 单体经亮氨酸残基相互作用形成 2 聚体,通过碱性区域与特定的 DNA 序列结合。Elangovan 等人利用荧光共振能量转移—荧光寿命成像显微术研究了 C/EBP α 单体在小鼠垂体细胞核内形成 2 聚体的现象¹¹。通过基因融合及转染方法,使小鼠垂体细胞表达融合蛋白 CFP-C/EBP α 和 YFP-C/EBP α 。CFP-C/EBP α 和 YFP-C/EBP α 分别为荧光共振能量转移的供体和受体。如果 CFP-C/EBP α 和 YFP-C/EBP α 单体形成 2 聚体并导致荧光共振能量转移,供体 CFP-C/EBP α 的荧光寿命将比其单独存在时的缩短。由细胞核内一感兴趣区域(约 $1\mu\text{m}\times 1\mu\text{m}$)的荧光寿命像及其直方图可得,CFP-C/EBP α 单独存在时的平均荧光寿命 $\tau_D=2.2\text{ns}$,而在受体 YFP-C/EBP α 存在时,CFP-C/EBP α 的平均荧光寿命 $\tau_{DA1}=1.6\text{ns}$ 。这说明 CFP-C/EBP α 和 YFP-C/EBP α 单体形成 2 聚体。在考虑双指数衰减时,除 τ_{DA1} 以外,还可以获得 CFP-C/EBP α 的第 2 个平均荧光寿命 $\tau_{DA2}=0.5\text{ns}$ 。相关分析表明 τ_{DA1} 与 τ_{DA2} 之间相关。在受体 YFP-C/EBP α 存在时,供体 CFP-C/EBP α 具有 2 个荧光寿命值可能与供体和受体生色团之间的距离分布在一定范围内有关。此外,在细胞核内不同区域(约 $1\mu\text{m}\times 1\mu\text{m}$),能量转移效率以及供体和受体之间的距离有所不同,这显示 CFP-C/EBP α 和 YFP-C/EBP α 单体在不同区域

内所形成的 2 聚体之间的差异。

6 结论

随着绿色荧光蛋白及其变种作为融合蛋白标记的应用,荧光共振能量转移显微术成为研究活细胞内蛋白质相互作用的重要手段。高速脉冲激光器以及高灵敏度的超快门控像探测器的出现,促进了荧光寿命成像显微术的发展。将荧光共振能量转移显微术与荧光寿命成像显微技术结合产生荧光共振能量转移-荧光寿命成像显微术,该方法具有 ps 和 nm 量级的时间和空间分辨率,可以实时跟踪活细胞内蛋白质相互作用的动态变化过程。

参考文献

- 1 Wu P, Brand L. Review-Resonance energy transfer. *meth Appl Biochem*,1994,218: 1~13
- 2 Lakowicz J R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2nd edn. New York: Plenum Press.,1999
- 3 Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*,1994,263: 802~805
- 4 Heim R, Prasher D C, Tsien R Y. Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci USA*,1994,91: 12501~12504
- 5 Reid B G, Flynn G C. Chromophore formed in green fluorescent protein. *Biochemistry*,1997,36: 6786~6791
- 6 Ormo M, Cubitt A B, Kallio K, et al. Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science*, 1996, 273: 1392~1395
- 7 Chalfie M, Kain S. *GFP: Green Fluorescent Protein Strategies and Applications*. New York: Wiley & Sons,1998,11~80
- 8 Miyawaki A., Griesbeck O., Heim R, et al. Dynamic and quantitative Ca²⁺ measurements using improved cameleons. *Proc Natl Acad Sci USA*,1999,96: 2135~2140
- 9 Gordon G W, Berry G, Liang X H, et al. Quantitative fluorescence resonance energy transfer measurements using fluorescence microscopy. *Biophys j*,1998,74: 2702~2703
- 10 Kenworthy A K, Petranova N, Edidin M. High-resolution FRET microscopy of cholera toxin B-subunit and GPI-anchored proteins in cell plasma membranes. *Mol Biol Cell*,2000,11: 1645~1655
- 11 Elangovan M, Day R N, Periasamy A. nanosecond fluorescence resonance energy transfer-fluorescence lifetime imaging microscopy to localize the protein interactions in a single living cell. *J Microsc*, 2002,205,pt1: 3~14.
- 12 Sharman K K, Asworth H, Snow N H, et al. Error analysis of the rapid lifetime determination (RLD) method for double exponential decays: Evaluating Different window systems. *Anal Chem*,1999,71: 947~952
- 13 Herman B, Wodnicki P, Kwon S, et al. Recent developments in monitoring calcium and protein interactions in cells using fluorescence lifetime microscopy. *J Fluoresc*,1997,7: 85~91
- 14 Kraynov V S, Chamberlain C, Bokoch G M, et al. Localized Rac activation dynamics visualized in living cells. *Science*, 2000,290: 333~337
- 15 Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*,1998, 279: 509~514
- 16 Kjoller L, Hall A. Signaling to Rho GTPases. *Exp Cell Res*, 1999,253: 166~179
- 17 Subauste M C, Von Herrath M, Benard V. Rho family proteins modulate rapid apoptosis induced by cytotoxic T lymphocytes and Fas. *J Biol Chem*,2000,275: 9725~9733
- 18 Ridley A J, Paterson H F, Johnston C L, et al. The Small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell*,1992,70: 10~40
- 19 Hawkins P T, Eguinoa A, Qiu R G, et al. PDGF stimulates an increase in GTP-Rac via activation of phosphoinositide-3 kinase. *Curr Biol*,1995,5: 393~403
- 20 Jacobs K K, Stanley F M. CCAAT/enhancer-binding protein alpha is a physiological regulator of prolactin gene expression. *Endocrinology*,1999,140: 4542~4550

Fluorescence resonance energy transfer microscopy and its recent development

Zheng Dong

(Analytical and Testing Center, Beijing Normal University, Beijing 100875)

Abstract The principles, methods and characteristics are described in this paper for fluorescence resonance energy transfer microscopy and fluorescence lifetime imaging microscopy. Two examples for the applications of these techniques, localizations of the Rac Activation and the C/EBP α dimerization in the living cells, are also given.

Key words Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy Green fluorescent protein (GFP) Fluorescent lifetime Fluorescence lifetime imaging (FLIM) microscopy Fluorescence resonance energy transfer-fluorescence lifetime imaging (FRET-FLIM) microscopy