

# 基于荧光蛋白的荧光共振能量转移探针的构建及应用

王 盛 陈典华 蒋驰洲 吴 琼 李 煌 华子春\*

(南京大学生命科学学院, 南京大学医药生物技术国家重点实验室, 南京 210093)

**摘要** 荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)是基于荧光基团供体和荧光基团受体间偶极子-偶极子耦合作用的非辐射方式的能量传递现象。基于荧光蛋白的FRET技术已被广泛用于研究细胞信号通路中蛋白质-蛋白质活体相互作用检测、蛋白质构象变化监测以及生物探针的研制中。基于荧光蛋白的荧光共振能量转移探针使得人们可以在时间和空间层面上研究细胞信号的转导过程。该文简要介绍了四大类基于荧光蛋白的FRET生物探针的设计、研制以及其在生物信号分子检测、活细胞成像以及药物筛选中的应用和进展情况。

**关键词** 荧光共振能量转移; 荧光蛋白; 荧光探针; 活细胞成像; 药物筛选

细胞信号转导中活体蛋白质间的时空相互作用、蛋白质的生物修饰以及生物信号小分子动态调控过程是当前生命科学研究的重大课题。以往人们对细胞信号转导过程的认识很大一部分是建立在非活体细胞的生物化学与分子生物学基础之上的。荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)技术因其可以实现活体、原位条件下的信号分子的动态实时检测而被广泛用于生命科学研究中。基于荧光蛋白的活细胞探针的研制和运用为人类实时、在体可视化细胞信号转导的过程提供了可能<sup>[1-2]</sup>。在过去的五到十年中, 基于绿色荧光蛋白(GFP)及其变体的荧光共振能量转移探针已被用来实时检测和成像诸如离子、蛋白酶、激酶、单糖等多种生物分子的活细胞生物行为<sup>[3-4]</sup>。荧光共振能量转移探针为人类实时研究活细胞甚至动物整体的生物化学以及信号转导过程带来了前所未有的便利, 同时也为人类揭示单细胞内生物分子的活动规律提供了新的视角和窗口。本文介绍了四大类基于荧光蛋白的FRET生物探针的设计、研制以及其在生物信号分子检测和药物筛选应用中的最新进展。

## 1 荧光共振能量转移技术原理

当一个荧光团(供体)处于激发状态时, 通过偶极子-偶极子作用, 会将其能量以非辐射形式传递给相邻的分子(受体), 引起受体的激发, 这个过程被称为Förster共振能量转移(Förster resonance energy transfer)<sup>[5-6]</sup>。通常情况下, 受体也是一个荧光分子, 因此也称为荧光共振能量转移(FRET)。当荧光团供体和

荧光团受体间靠近达到合适的距离发生FRET现象时, 其直观体现是: 如果以供体的激发光激发, 供体的荧光强度比它单独存在时要低得多, 而受体的荧光却大大增强(sensitized emission)。发生FRET一般要满足四个条件: (1)供体和受体距离 $\leq 10$  nm; (2)供体的发射光谱与受体的激发光谱有一定的重叠; (3)供体的量子产率和受体的光吸收系数足够高; (4)供体受体的偶极具有合适的相对取向。FRET是一种距离依赖的物理过程, 其效率与供体荧光基团和受体荧光基团距离的六次方成反比。由于其能量传递效率与供受体之间距离的高度依赖性, 使得人们可以利用FRET现象来分析两个分子间的相互作用或同一分子间构象的变化<sup>[7]</sup>。同时, 基因编码的GFP及其变体在活体标记技术上的发展也极大促进了FRET技术在细胞生物学、分子生物学研究中的运用<sup>[8-9]</sup>。

## 2 绿色荧光蛋白及其变体

1962年, Shimomura等首先从水螅水母类动物 *Aequorea Victoria* 中分离、纯化出一种荧光物质, 并将其定性为蛋白质, 称为绿色荧光蛋白。1992年, 绿色荧光蛋白基因从水母体内克隆, 之后人们从很多的海洋生物物种中克隆到了新的荧光蛋白, 它们能特异地“照亮”生物分子或细胞, 并显示出生物分子

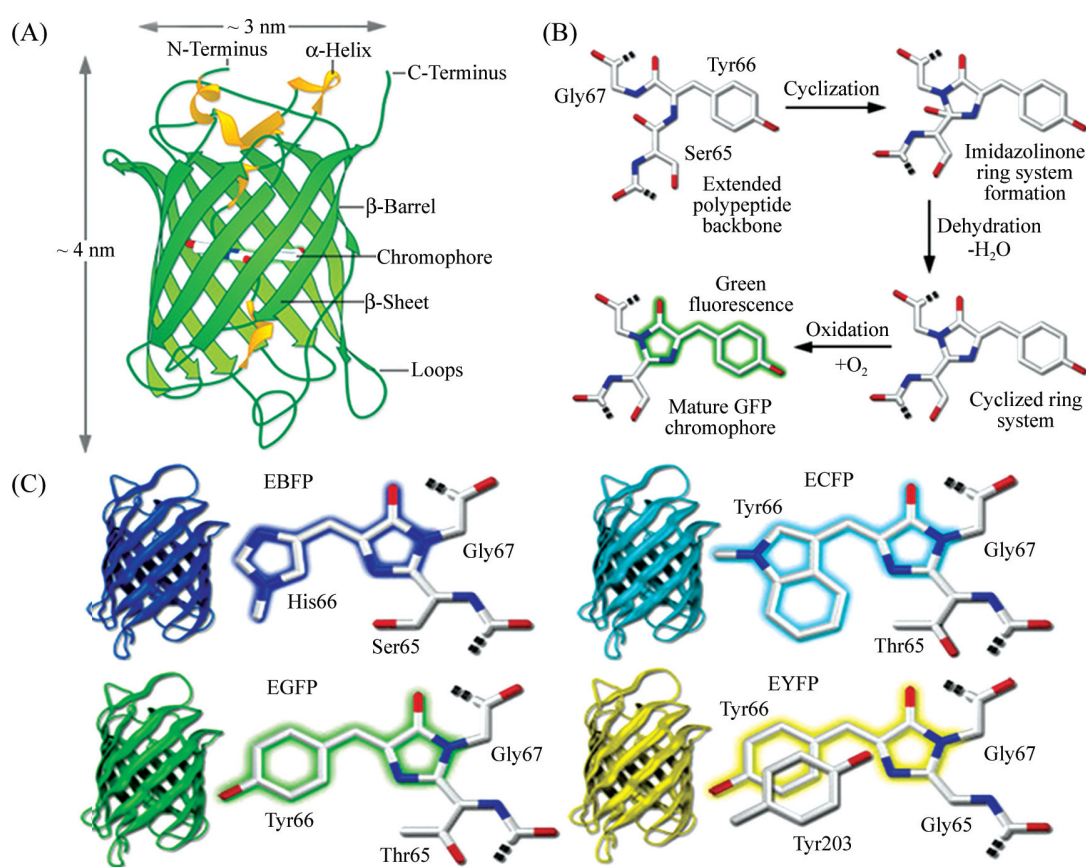
收稿日期: 2012-08-09 接受日期: 2012-09-03

国家自然科学基金(No.50973046, No.81070807)、江苏省自然科学基金(No.BK2010046, No.BZ2010074, No.BK2011573, No.BZ2011048, No.BK2011228)及教育部博士点基金(No.200802840023)资助项目

\*通讯作者。Tel: 025-83324605, E-mail: zchua@nju.edu.cn

的活动情况, 为我们揭示这些分子或细胞的活动规律及本质提供了前所未有的便利。Tsien等<sup>[10]</sup>率先研究并阐述了GFP发光的化学机制。GFP是一个分子量为27 kDa的桶状结构蛋白分子, 由11个 $\beta$ 折叠和一个中心 $\alpha$ 螺旋构成。 $\beta$ 折叠通过相对无序的富含脯氨酸的环连接,  $\beta$ 折叠氨基酸侧链交替从表面投射到蛋白质的内侧或外侧。与大多数可溶性蛋白不同, 许多内侧氨基酸残基带电荷或具有极性, 这些氨基酸残基通过氢键结合许多水分子。如图1, GFP主要的荧光生色基团是位于桶状结构中心的三个氨基酸: 丝氨酸(Ser)65、酪氨酸(Tyr)66和甘氨酸(Gly)67。三个关键氨基酸残基空间位置非常接近, 在这种特殊环境里, Ser65的羧基碳和Gly67的氨基氮反应形成咪唑啉-5-酮环, 并进一步氧化导致咪唑啉环与Tyr66轭合及荧光的成熟。自然GFP的发色基团有两种形成状态: 质子化状态, 在395 nm出现一个激发峰; 非

质子化状态, 在475 nm出现一个激发峰。无论激发光波长多少, 荧光发射最大值为507 nm。Tsien组随后又通过单点突变(S65T)技术获得了荧光强度和光稳定性大大增强的GFP突变体(GFP-S65T)<sup>[11]</sup>, 并进一步通过对GFP荧光生色基团氨基酸的突变和筛选, 获得了蓝色荧光蛋白(blue fluorescent protein, BFP)、青色荧光蛋白(cyan fluorescent protein, CFP)和黄色荧光蛋白(yellow fluorescent protein, YFP)。随后, 研究人员又从珊瑚和海葵等物种中克隆出光谱红移的红色荧光蛋白(red fluorescent protein RFP), 大大拓展了荧光蛋白多色成像的应用<sup>[12-13]</sup>。绿色荧光蛋白及其荧光变体在培养细胞以及整个动物体的基因表达研究中作为报告基因特别有用, 在活细胞成像中经常用于追踪蛋白质及细胞器的定位。除了通常被用作报告基因外, 基于荧光蛋白构建的荧光共振能量转移探针还可以对活细胞中的实时信号转导过程



A: 绿色荧光蛋白筒状结构示意图; B: 绿色荧光蛋白发光基团形成步骤; C: EBFP、ECFP、EGFP、EYFP发光基团。

A:  $\beta$ -barrel architecture and approximate dimensions; B: steps in the formation of the EGFP chromophore; C: chromophore structures of EBFP, ECFP, EGFP and EYFP.

图1 GFP结构、EGFP发光基团产生步骤和GFP变体发光基团结构

Fig.1 Structure of the GFP  $\beta$ -barrel, EGFP chromophore formation and GFP variants' chromophore structures

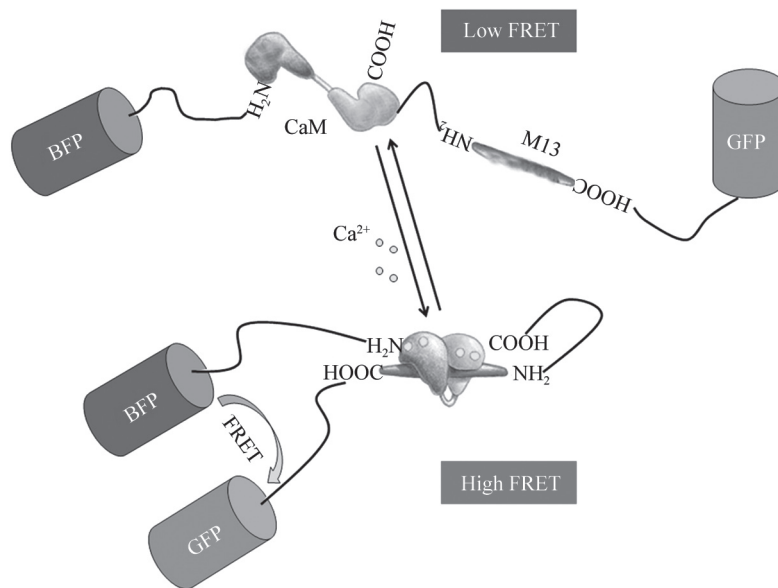
及小分子进行检测和成像<sup>[14-16]</sup>。通常用于探针构建的FRET荧光蛋白供体和受体包括: BFP/GFP、CFP/YFP、GFP/RFP、Cerulean/Venus、Cerulean/Citrine等。

### 3 基于荧光蛋白的分子内荧光共振能量转移活细胞探针

#### 3.1 金属离子类FRET探针

金属离子类FRET探针的典型代表是基于荧光蛋白的钙离子成像探针Cameleon。1997年,日本科学家Miyawaki及其同事<sup>[17]</sup>将钙调素(CaM)与其结合小肽M13通过基因工程方式构建在一起并在其融合蛋白两端再分别连入蓝色荧光蛋白(BFP)和绿色荧光蛋白(S65T GFP),构建成功了最初的钙离子检测探针Cameleon1(图2)。这种探针的工作原理是基于分子内FRET现象。探针质粒在细胞中表达后,如果细胞内钙离子浓度在受到信号刺激后上升,细胞中的钙离子就会与探针融合蛋白中的钙调素结合,使钙调素发生结构变化,并与其相连的M13小肽结合,从而导致融合蛋白结构整体的变化,使得原先分子内相距较远的FRET供体荧光基团BFP和FRET受体

荧光基团GFP相互靠近,分子内FRET效率在结合钙离子后显著上升,通过检测钙离子结合前和钙离子结合后绿色荧光与蓝色荧光强度比例的变化来反映细胞中钙离子浓度的变化。Cameleon1虽然可以在活细胞内检测钙离子浓度的动态变化,但其仍然有很多缺点,比如供体BFP荧光蛋白的激发光在紫外范围,会对细胞造成伤害,而且Cameleon1的灵敏度较低,钙离子结合后,其荧光比例变化范围(dynamic range)较小。之后的十多年间,全世界不同实验室对Cameleon1进行了优化。比如用更利于活细胞成像的CFP/YFP荧光蛋白替代了原先的BFP/GFP荧光蛋白<sup>[18]</sup>。针对EYFP荧光蛋白易于受到细胞中酸碱度和氯离子影响的问题,人们又将FRET受体置换为更稳定的黄色荧光蛋白变体Citrine或Venus,从而大大提高了Cameleon在活细胞生理状态下运用的性能<sup>[19]</sup>。2004年,为了提高Cameleon的灵敏度,Nagai等<sup>[20]</sup>又用环化重排黄色荧光蛋白cpVenus173替代通常的Venus荧光蛋白作为FRET钙离子探针受体,并将供体ECFP的C末端11个氨基酸去掉,研制成功了钙离子探针Yellow Cameleon 3.6(YC3.6)。YC3.6极



将钙调素蛋白(CaM)与其钙离子依赖性结合肽M13融合表达,并在融合蛋白的N末端和C末端分别连入蓝色荧光蛋白(BFP)和绿色荧光蛋白(GFP),构建成探针Cameleon1。当环境中处于低钙离子状态时候,Cameleon1整体结构成舒展状,此时BFP和GFP相对距离较远,分子内FRET效率很低;而当环境中钙离子浓度升高,钙离子与CaM结合,CaM构象改变并与M13小肽结合,从而使得Cameleon1整体结构由舒展变成紧缩,使得BFP和GFP相对距离靠近,分子内FRET效率上升。

Cameleon1 consist of tandem fusions of blue and green fluorescence protein, Calmodulin, the Calmodulin-binding peptide M13. Binding of  $\text{Ca}^{2+}$  makes Calmodulin wrap around the M13 domain, increasing the intramolecular FRET between the flanking BFP and GFP.

图2 Cameleon1结构图(根据参考文献[17]修改)

Fig.2 Schematic representation of Cameleon1(modified from reference [17])

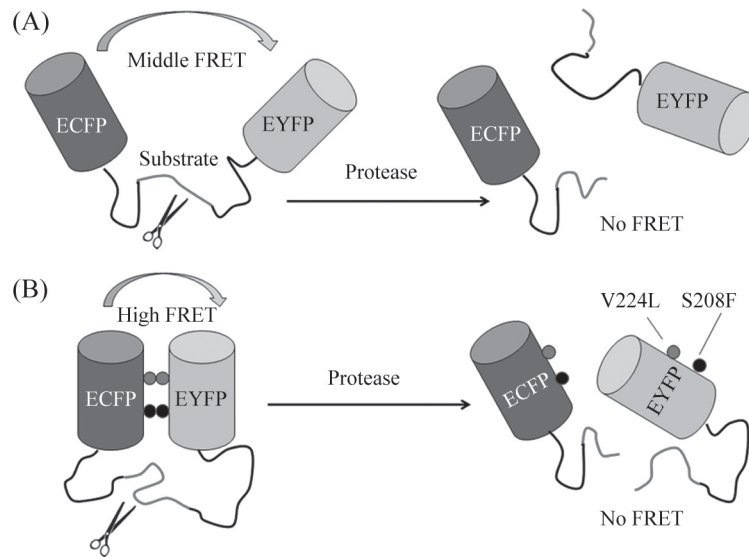


大地提高了原先Cameleon探针的动态范围(dynamic range)。这里用到的cpVenus173荧光蛋白的构建方式是在原Venus蛋白基础上将荧光蛋白C-端的174-238位氨基酸与荧光蛋白N-端的1-173位氨基酸通过首尾互换重新连接形成新的N-端和C-端<sup>[21]</sup>。这个事例说明可以通过改变荧光蛋白供受体荧光基团发生FRET时的相对取向来提高分子内FRET发生的效率<sup>[22]</sup>。2010年, Horikawa等<sup>[23]</sup>又通过优化CaM和M13分子间的连接肽进一步提高了Cameleon的灵敏度, 并将高灵敏度的yellow Cameleon-Nano用于斑马鱼胚胎上钙离子的成像。钙离子FRET探针除了基于钙调素蛋白的Cameleon系列外, 还有另一类是基于钙离子结合蛋白TroponinC(TnC)的探针<sup>[24-25]</sup>。TroponinC是一类骨骼肌和心肌细胞中特有的钙离子结合蛋白, 将荧光蛋白ECFP和cpCitrine分别构建在TroponinC蛋白的N-端和C-端。探针结合钙离子后, TroponinC蛋白会发生结构变化, 从而使得分子内ECFP和cpCitrine的FRET效率提高。通过实时监测cpCitrine黄色荧光和ECFP青绿色荧光强度的比例, 就可以得知细胞内钙离子浓度变化。由于TroponinC蛋白只在高度分化的骨骼肌和心肌细胞中存在, 所以基于TroponinC蛋白的钙离子探针就比Cameleon更适合于神经细胞中钙离子的成像。钙离子活细胞探针比起原先的经典的化学小分子钙离子探针(例如: Quin-2、Fura-2、Indo-1、Fluo-3以及Rhod-2)的优势在于这类探针是基因编码的, 易于导入细胞, 生物相容性较好, 并且可以很方便地通过基因工程的方式在探针上加上一些细胞器定位序列(如核定位序列、线粒体定位序列、内质网定位序列等)来测定亚细胞结构的实时离子浓度变化。例如: Nagai等<sup>[20]</sup>在YC3.6探针的C末端通过基因融合方式加上了Ki-Ras蛋白上的一段细胞膜定位序列, 从而将YC3.6探针成功定位于细胞膜上用来测定组胺刺激下细胞膜附近的钙离子浓度的实时动态变化。除了上述经典的钙离子FRET探针外, 基于同样的思路, 利用金属离子特异性结合蛋白, 人们又设计构建出其他金属离子FRET探针, 例如: 铜离子探针、锌离子探针等<sup>[26-27]</sup>, 这些探针已被广泛用于实时监测信号转导过程中细胞内金属离子浓度的动态变化。

### 3.2 蛋白酶类FRET探针

蛋白酶类FRET探针的典型代表是基于荧光蛋白的Caspase-3活性监测探针。1998年, Xu等<sup>[28]</sup>将

FRET供体荧光蛋白BFP与FRET受体荧光蛋白GFP直接通过18个氨基酸小肽连接起来融合表达, 而连接肽含有蛋白酶Caspase-3底物的识别序列DEVD。当细胞内Caspase-3没有被激活时, 细胞内表达有大量的BFP-DEVD-GFP融合蛋白。因为此时BFP和GFP荧光蛋白融合表达, BFP和GFP荧光蛋白会发生分子内FRET现象。而当细胞受到凋亡因子刺激, 发生凋亡时, 细胞内Caspase-3蛋白酶大量激活并识别含有DEVD氨基酸序列的BFP-DEVD-GFP融合蛋白探针, 并从DEVD处切割, 使得BFP荧光蛋白和GFP荧光蛋白分离, 从而分子内FRET现象消失。这类探针的特点是含有蛋白酶底物序列的小肽被具有活性的特异性蛋白酶不可逆的切割, 探针的FRET效率在此过程中会明显减小, 因而这类探针具有高特异性和高灵敏性的特点。而且探针分子内FRET的效率与Caspase活性呈现负相关, 所以可以直接从FRET效率的变化来监测Caspase蛋白酶在细胞凋亡中活性的变化。基于这样的构建思路, 人们又设计出实时监测Caspase-6、Caspase-8、Caspase-7活性的FRET蛋白酶探针<sup>[4,29-30]</sup>。基质金属蛋白酶(MMP)是降解细胞外基质及基底膜的一系列内肽酶, 其活性往往与肿瘤的转移、浸润相关<sup>[31-32]</sup>。2007年, Yang等<sup>[33]</sup>将MMP2识别序列MSS作为连接肽序列连入CFP和YFP荧光蛋白之间, 并将其定位于细胞膜表面, 成功地观测到MMP2的激活过程。这种MMP-FRET探针现在已被用来高通量筛选具有抗肿瘤活性的基质金属蛋白酶抑制剂。2007年, Vinkenborg等<sup>[34]</sup>通过对绿色荧光蛋白二聚化表面结构区域的研究, 发现S208F以及V224L的突变可以显著加强水母来源的荧光蛋白彼此之间的二聚化, 从而使连接肽连接的两个荧光蛋白分子内FRET效率大大提升(图3)。当含有蛋白酶底物序列的连接肽被蛋白酶切割后, 会产生更大的FRET效率变化, 大大提高了蛋白酶类探针的灵敏度。据报道, 运用CFP和YFP荧光蛋白经过S208F和V224L的突变后构建的Caspase探针其YFP荧光和CFP荧光的比值变化由原先的4倍增加到16倍。因此, 现在认为对荧光蛋白二聚化表面关键位点的突变可有效地改变蛋白酶类探针的灵敏度。利用FRET原理构建的蛋白酶类FRET探针的优势在于可以在活细胞生理状态下实时监测蛋白酶的活性, 并可以结合流式细胞仪进行高通量的蛋白酶类抑制剂药物的大规模筛选。



A: 将青色荧光蛋白(ECFP)与黄色荧光蛋白(EYFP)用含有蛋白酶切割序列的小肽连接起来,融合表达,构建成蛋白酶类FRET探针。此时探针内有中等程度的FRET现象发生。当蛋白酶被激活后,可以识别含有其切割序列的小肽,使得ECFP和EYFP分离,FRET效率大大降低;B: 将ECFP和EYFP蛋白做V224L和S208F双突变构建蛋白酶探针,ECFP与EYFP会形成弱二聚体,从而增加了蛋白酶探针分子内FRET的效率。

A: in the classical sensor design the linker assumes a random-coil distribution, which results in intermediate energy transfer; B: introduction of S208F and V224L mutations in both domains promotes intramolecular-complex formation, which results in an increase in energy transfer prior to cleavage. The interaction between the mutations of ECFP and EYFP is weak enough to result in dissociation of ECFP and EYFP after proteolytic cleavage.

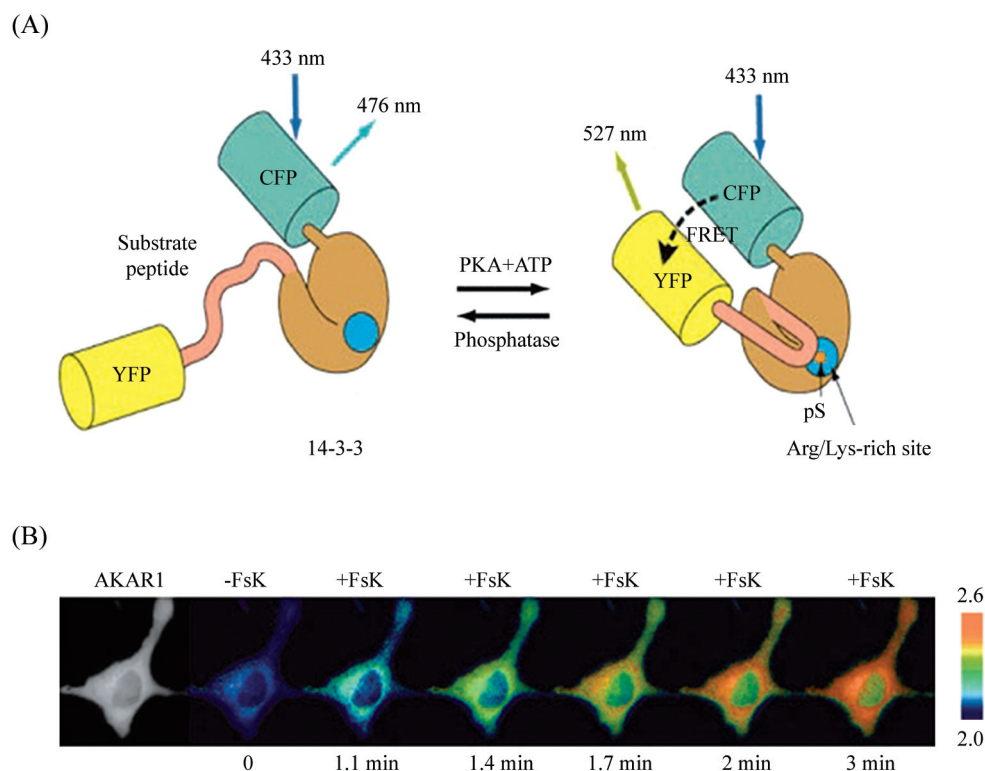
图3 蛋白酶类FRET探针结构图(根据参考文献[34]修改)

Fig.3 Schematic representation of protease FRET biosensor(modified from reference [34])

### 3.3 激酶类FRET探针

蛋白激酶是一类细胞内信使依赖的、在蛋白质磷酸化过程中起中介和放大作用并帮助完成信号传递过程的酶。蛋白激酶用ATP或GTP作为磷酸基团供体,靶蛋白中的丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸作为磷酸基团的受体,将磷酸基团转移到特定底物蛋白上<sup>[35-36]</sup>。蛋白质的磷酸化在信号转导过程中具有举足轻重的地位。特定蛋白激酶的活性往往与肿瘤细胞的恶性程度密切相关<sup>[37-38]</sup>。激酶类FRET探针的典型代表是基于荧光蛋白的蛋白激酶A(PKA)活性检测探针。2001年,Zhang等<sup>[39]</sup>将PKA激酶的底物序列LRRASLP与从14-3-3蛋白中得到的一段磷酸化丝氨酸结合序列14-3-3 $\tau$ (1-232)通过基因工程的方式连接在一起,并在融合蛋白的N末端和C末端分别连入FRET供体荧光蛋白CFP和FRET受体荧光蛋白YFP,成功构建了特异PKA激酶活性成像探针AKAR1(图4)。这种探针的原理类似于金属离子类FRET探针,当PKA没有活性或活性很低的时候,融合蛋白探针分子折叠成舒展状态,此时分子内FRET效率较低;但当加入PKA激动剂FsK时,细胞内PKA被激活并磷酸化分子探针内底物序列中的丝氨酸。丝氨酸被

磷酸化后,磷酸化丝氨酸结合序列14-3-3 $\tau$ (1-232)就可以特异识别并结合磷酸化了的底物序列,从而导致融合探针蛋白分子结构的巨大变化,融合蛋白探针分子由舒展状态变成紧缩状态,使得CFP和YFP蛋白空间距离靠近,分子内FRET效率在丝氨酸磷酸化前后发生较大变化。通过实时监测YFP与CFP荧光强度的比例变化就可以反映PKA被激活的状况。通过在分子探针加上细胞器定位序列,还可以将FRET探针定位到细胞的亚细胞结构上来对蛋白激酶活性成像。这种探针的最大优势是可以在生理状况下实时反映出蛋白激酶活性在活细胞中的特异性时空分布。基于这样的思路,2005年,Wang等<sup>[40]</sup>通过将磷酸化酪氨酸结合的蛋白质结构域SH2与Src激酶的特异磷酸化底物序列WMEDYDYVHLQG相连,并在其融合蛋白的N末端和C末端连入荧光蛋白CFP和YFP,成功构建了Src激酶的活细胞探针。Wang等结合光镊(Laser Tweezer)技术研究了力学刺激下的Src激酶激活和信号传导过程。这类蛋白磷酸化探针构建的基本方式是选择特异的与磷酸化的丝氨酸或酪氨酸结合的蛋白质结构域,如14-3-3 $\tau$ (1-232)或FHA,或者SH2,并将其与优化了的待检测激酶



A: 蛋白激酶A(PKA)检测探针融合蛋白包括青绿色荧光蛋白(CFP)、特异结合磷酸化丝氨酸的蛋白质结构域14-3-3 $\tau$ (1-232)、含有PKA激酶的底物肽LRRASLP以及黄色荧光蛋白(YFP)。当细胞中的PKA被激活后,会磷酸化探针底物肽的丝氨酸(Ser)位点,丝氨酸被磷酸化后,磷酸化丝氨酸结合结构域14-3-3 $\tau$ (1-232)会与底物肽结合,从而探针分子构象发生变化,使得原先相聚较远的CFP和YFP荧光蛋白位置靠近,FRET效率大大提升。pS代表磷酸化丝氨酸; B: 表达PKA探针(AKARI)的细胞在PKA激动剂FsK处理后,监测YFP荧光与CFP荧光强度随时间变化的比例,并做成伪彩色图。细胞图中红色区域表示YFP与CFP荧光强度比例高的区域,蓝色区域表示YFP与CFP荧光强度比例低的区域。YFP与CFP荧光强度比例的高低及变化反应了活细胞中PKA活性的高低及变化。

A: Domain structure of PKA FRET biosensor consist of tandem fusions of ECFP, a phosphoserine binding domain 14-3-3 $\tau$ (1-232), a consensus substrate for PKA, and EYFP. Activated PKA caused changes in the ratios of yellow to cyan emissions in live cells by phosphorylation-induced changes in fluorescence resonance energy transfer. pS stands for the phosphorylated serine. B: FRET response of HeLa cells transfected (24 h) with PKA FRET biosensor. The CFP-only image on the far left shows that the reporter distributes evenly throughout the cytosol. Pseudo color images depict the FRET response of the reporter to FSK stimulation.

图4 蛋白激酶A的FRET探针结构图(根据参考文献[39]修改)

Fig.4 Schematic representation of PKA FRET biosensor(modified from reference [39])

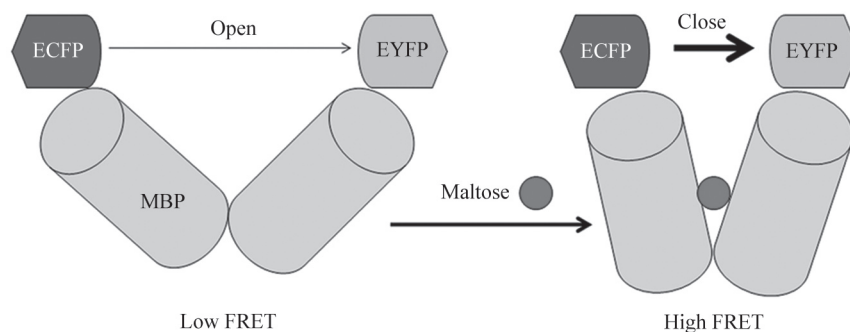
的底物序列融合表达,并在融合蛋白的N末端和C末端分别连入FRET供体和受体荧光蛋白<sup>[41]</sup>。2008年,Ouyang等<sup>[42]</sup>又将原先的Src探针的FRET荧光对CFP/YFP置换成CFP/YPet,显著提高了此类探针的灵敏度。他们认为这是因为CFP和YPet荧光蛋白比CFP和YFP荧光蛋白更易形成弱二聚体,从而提高了分子内FRET效率的缘故。因此,现在利用CFP和YPet荧光蛋白代替CFP和YFP荧光蛋白来构建高灵敏度的蛋白激酶类FRET探针,被认为是一种提高分子内FRET探针灵敏度的有效方式。迄今为止,人们已成功构建了针对诸如:ERK、FAK、PKA、PKB、PKC、PKD、Rac、RhoA以及Src等激酶的FRET活细胞探针<sup>[43-51]</sup>。激酶类FRET探针使人们能在时间

和空间层面上在活细胞内更好地研究激酶活性调控过程,并且人们可以利用这类探针结合流式细胞技术来高通量地筛选一些激酶抑制剂类的药物,为治疗肿瘤提供前期基础。

### 3.4 单糖类FRET探针

单糖类FRET探针的典型代表是基于荧光蛋白的麦芽糖(Maltose)检测探针<sup>[52]</sup>。其基本思路是将FRET荧光蛋白供受体与单一的麦芽糖结合蛋白结构域以“三明治”方式相连,当麦芽糖与麦芽糖结合蛋白发生结合的时候,导致麦芽糖结合蛋白分子内的构象变化,从而使得FRET供受体相对距离靠近,产生FRET效率上的显著变化(图5)。这种分子内FRET探针的原理与前述的钙离子探针类似,只是这





在麦芽糖结合蛋白(MBP)的N-端和C-端各自连上青色荧光蛋白(ECFP)和黄色荧光蛋白(EYFP), 构建成麦芽糖荧光共振能量转移探针。当麦芽糖结合到探针上, 麦芽糖结合蛋白由原先分子开放结构变成分子闭合结构, 从而连接在麦芽糖结合蛋白两端的荧光蛋白CFP和YFP间的FRET效率发生显著变化。

ECFP donor and EYFP acceptor were genetically attached to the C- and N-termini of Maltose binding protein (MBP), respectively. Upon the addition of maltose, the donor emission intensity is expected to decrease, and the acceptor emission will subsequently increase based on the conformation alteration from open to close status of MBP.

图5 麦芽糖FRET探针结构图(根据参考文献[52]修改)

Fig.5 Schematic representation of Maltose FRET biosensor(modified from reference [52])

类探针中运用的是单一的麦芽糖结合蛋白。这类探针构建的思路主要是要寻找到一些具有底物结合特异性, 并且在结合底物后构象会发生巨大变化的蛋白质或蛋白质结构域。这类探针的一大运用是在体外直接表达纯化这种探针, 并开发成检测试剂盒, 在体外对待测物进行高效并且方便的检测。

#### 4 荧光蛋白FRET探针构建的优化

基于分子内的荧光共振能量转移探针因其能在活细胞内对信号转导过程进行时空成像而具有巨大的应用潜力。但构建一个高效、特异的FRET探针并非易事。FRET效率除了受到供受体荧光蛋白相对距离的影响外, 还受到荧光分子间相对取向的影响。大多数情况下, 人们并不能很好地预测探针蛋白在细胞内的具体构象。所以对FRET探针的设计、构建以及优化都需要经过漫长而反复的试错过程, 因而给高效FRET探针的研制带来了种种阻力。不同类型的FRET探针有不同的优化方式, 具体问题还要具体分析, 但有些通用原则, 例如如前所述在设计蛋白酶类探针时, 可以将供受体荧光蛋白做成双突变(S208F和V224L)形式增加分子内FRET的效率; 在设计激酶类探针时, 运用CFP和YPet荧光蛋白可以显著改善探针的灵敏度和动态范围。2011年, Komatsu等<sup>[53]</sup>通过设计长的灵活的EV连接肽, 消除了分子取向对FRET效率的影响, 从而使得设计的探针其FRET效率只受供受体荧光蛋白相对距离的影

响, 这种设计方式大大促进了高灵敏度FRET探针的设计和研制。

#### 5 荧光蛋白FRET探针在药物高通量筛选中的运用

药物高通量筛选(high-throughput screening, HTS)是20世纪80年代后期形成的寻找新药的高新技术。采用的筛选方法一般是以药物作用靶点为主要对象的细胞和分子水平的筛选模型。FRET探针已被广泛用于新药的高通量筛选中, 如G蛋白偶联受体、蛋白激酶以及膜蛋白受体的激动剂或拮抗剂的筛选中。Liu等<sup>[54]</sup>将HTS与FRET探针技术有机结合, 筛选出抗SARS-CoV 3CL的蛋白酶, 为开发抗SARS病毒药物提供了依据。Lauer-Fields等<sup>[55]</sup>通过FRET探针技术筛选到基质金属蛋白酶MMP-13的抑制剂, 从而为骨关节炎的治疗提供了基础。Tian等<sup>[56]</sup>结合流式细胞和FRET探针技术建立了抗肿瘤药物筛选平台, 并成功用于中草药抗肿瘤药物的筛选。2010年, Mizutani等<sup>[57]</sup>设计了一种监测癌细胞中BCR-ABL激酶活性的荧光蛋白FRET探针, 并将其运用于抗肿瘤药物的筛选和药效的评价中, 为慢性粒细胞白血病(CML)的临床治疗提供了可靠的基础。

#### 6 荧光蛋白FRET探针的开发前景及挑战

荧光蛋白FRET探针为人类揭示活细胞信号转导的时空性提供了可能。目前, 越来越多的基于荧

光蛋白的FRET探针被开发和运用于高通量药物的筛选中。但荧光蛋白FRET探针也具有其局限性, 尤其是用荧光蛋白来做FRET的供受体时, 荧光蛋白自身分子量较大可能会影响到探针整体分子不同结构域蛋白间的独立折叠。另外, 现有FRET荧光蛋白对间的föster半径仍然太短, 易导致FRET信号太弱而无法检测到。再者就是缺乏性能较好的红色荧光蛋白。如今的大多数红色荧光蛋白都有自身聚集的倾向<sup>[58]</sup>, 容易在细胞中形成大的蛋白聚集体, 对活细胞造成伤害, 并且由于缺乏性能优越的红色荧光蛋白, 使得荧光蛋白探针很难从细胞水平成像运用到动物整体水平成像。目前, 在具体研制荧光蛋白FRET探针过程中所面临的问题则主要在于如何提高探针在活细胞中检测的特异性和灵敏性。在探针检测特异性上, 人们可以通过结合计算机模拟和生物信息学方法来预测蛋白质与小分子相互作用后的构象变化, 并通过基因工程方式设计改造靶蛋白, 从而提高蛋白与小分子的结合的特异性。在提高探针灵敏度上, 运用优化了的或新开发的具有某种特异光学性质的荧光蛋白作为FRET荧光供体和荧光受体可以显著提高探针的灵敏度<sup>[59]</sup>。在信号检测方式上, 利用更高端的成像检测手段, 也可以提高FRET信号检测的灵敏度<sup>[60]</sup>。相信随着荧光蛋白和显微成像手段的不断发展, 结合计算机和生物信息学手段, 人们未来可以根据自己的需要通过基因工程和蛋白质工程来定向设计和研制高特异性和高灵敏度的FRET探针。

## 7 展望

综上所述, 基于荧光蛋白的荧光共振能量转移探针为人类在时间和空间二维层次上认识活体细胞信号转导的过程提供了前所未有的便利。随着绿色荧光蛋白及显微成像技术的发展, FRET荧光探针检测的特异性及灵敏性都得到了大大提高。FRET荧光探针照亮了细胞内部生命现象, 使我们在活细胞状态下, 对细胞信号转导的过程和本质看得更加清楚。基于荧光蛋白的荧光共振能量转移探针也必将在药物的高通量筛选以及新药的药效评价中发挥巨大的作用。

## 参考文献 (References)

1 Benesch J, Hungerford G, Suhling K, Tregidgo C, Mano JF, Reis

- RL. Fluorescence probe techniques to monitor protein adsorption-induced conformation changes on biodegradable polymers. *J Colloid Interface Sci* 2007; 312(2): 193-200.
- 2 Mahanta S, Singh RB, Guchhait N. Study of protein-probe interaction and protective action of surfactant sodium dodecyl sulphate in urea-denatured HSA using charge transfer fluorescence probe methyl ester of N,N-dimethylamino naphthyl acrylic acid. *J Fluoresc* 2009; 19(2): 291-302.
- 3 Jost CA, Reither G, Hoffmann C, Schultz C. Contribution of fluorophores to protein kinase C FRET probe performance. *Chembiochem* 2008; 9(9): 1379-84.
- 4 Wu X, Simone J, Hewgill D, Siegel R, Lipsky PE, He L. Measurement of two caspase activities simultaneously in living cells by a novel dual FRET fluorescent indicator probe. *Cytometry A* 2006; 69(6): 477-86.
- 5 Periasamy A, Vogel SS, Clegg RM. FRET 65: A celebration of Förster. *J Biomed Opt* 2012; 17(1): 011001.
- 6 Sun Y, Wallrabe H, Seo SA, Periasamy A. FRET microscopy in 2010: the legacy of Theodor Förster on the 100th anniversary of his birth. *ChemPhysChem* 2011; 12(3): 462-74.
- 7 Szilvay GR, Blenner MA, Shur O, Cropek DM, Banta S. A FRET-based method for probing the conformational behavior of an intrinsically disordered repeat domain from *Bordetella pertussis* adenylate cyclase. *Biochemistry* 2009; 48(47): 11273-82.
- 8 Albertazzi L, Arosio D, Marchetti L, Ricci F, Beltram F. Quantitative FRET analysis with the EGFP-mCherry fluorescent protein pair. *Photochem Photobiol* 2009; 85(1): 287-97.
- 9 Biskup C, Zimmer T, Kelbauskas L, Hoffmann B, Klocker N, Becker W, *et al.* Multi-dimensional fluorescence lifetime and FRET measurements. *Microsc Res Tech* 2007; 70(5): 442-51.
- 10 Heim R, Prasher DC, Tsien RY. Wavelength mutations and post-translational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(26): 12501-4.
- 11 Heim R, Cubitt AB, Tsien RY. Improved green fluorescence. *Nature* 1995; 373(6516): 663-4.
- 12 Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BN, Palmer AE, Tsien RY. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 2004; 22(12): 1567-72.
- 13 Shcherbo D, Merzlyak EM, Chepurnykh TV, Fradkov AF, Ermakova GV, Solovieva EA, *et al.* Bright far-red fluorescent protein for whole-body imaging. *Nat Methods* 2007; 4(9): 741-6.
- 14 van der Velden LM, Golynskiy MV, Bijmans IT, van Mil SW, Klomp LW, Merkx M, *et al.* Monitoring bile acid transport in single living cells using a genetically encoded FRET sensor. *Hepatology* 2012; doi: 10.1002/hep.26012.
- 15 Mazina O, Reinart-Okugbeni R, Kopanchuk S, Rinken A. BacMam system for FRET-based cAMP sensor expression in studies of melanocortin MC1 receptor activation. *J Biomol Screen* 2012; 17(8): 1096-101.
- 16 Marshall KE, Robinson EW, Hengel SM, Pasa-Tolic L, Roesijadi G. FRET imaging of diatoms expressing a biosilica-localized ribose sensor. *PLoS One* 2012; 7(3): e33771.
- 17 Miyawaki A, Llopis J, Heim R, McCaffery JM, Adams JA, Ikura M, *et al.* Fluorescent indicators for Ca<sup>2+</sup> based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* 1997; 388(6645): 882-7.
- 18 Miyawaki A, Griesbeck O, Heim R, Tsien RY. Dynamic and



- quantitative Ca<sup>2+</sup> measurements using improved cameleons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(5): 2135-40.
- 19 Griesbeck O, Baird GS, Campbell RE, Zacharias DA, Tsien RY. Reducing the environmental sensitivity of yellow fluorescent protein. Mechanism and applications. *J Biol Chem* 2001; 276(31): 29188-94.
- 20 Nagai T, Yamada S, Tominaga T, Ichikawa M, Miyawaki A. Expanded dynamic range of fluorescent indicators for Ca<sup>2+</sup> by circularly permuted yellow fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(29): 10554-9.
- 21 Nagai T, Sawano A, Park ES, Miyawaki A. Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense Ca<sup>2+</sup>. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(6): 3197-202.
- 22 Ai HW, Hazelwood KL, Davidson MW, Campbell RE. Fluorescent protein FRET pairs for ratiometric imaging of dual biosensors. *Nat Methods* 2008; 5(5): 401-3.
- 23 Horikawa K, Yamada Y, Matsuda T, Kobayashi K, Hashimoto M, Matsu-ura T, *et al.* Spontaneous network activity visualized by ultrasensitive Ca<sup>2+</sup> indicators, yellow Cameleon-Nano. *Nat Methods* 2010; 7(9): 729-32.
- 24 Heim N, Griesbeck O. Genetically encoded indicators of cellular calcium dynamics based on troponin C and green fluorescent protein. *J Biol Chem* 2004; 279(14): 14280-6.
- 25 Mank M, Reiff DF, Heim N, Friedrich MW, Borst A, Griesbeck O. A FRET-based calcium biosensor with fast signal kinetics and high fluorescence change. *Biophys J* 2006; 90(5): 1790-6.
- 26 Qiao W, Mooney M, Bird AJ, Winge DR, Eide DJ. Zinc binding to a regulatory zinc-sensing domain monitored *in vivo* by using FRET. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(23): 8674-9.
- 27 Wegner SV, Arslan H, Sunbul M, Yin J, He C. Dynamic copper(I) imaging in mammalian cells with a genetically encoded fluorescent copper(I) sensor. *J Am Chem Soc* 2010; 132(8): 2567-9.
- 28 Xu X, Gerard AL, Huang BC, Anderson DC, Payan DG, Luo Y. Detection of programmed cell death using fluorescence energy transfer. *Nucleic Acids Res* 1998; 26(8): 2034-35.
- 29 Onuki R, Nagasaki A, Taira K. Visualization of activated caspase 8 using fluorescent resonance energy transfer (FRET). *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 2003; 48(11 Suppl): 1573-7.
- 30 Li IT, Pham E, Chiang JJ, Truong K. FRET evidence that an isoform of caspase-7 binds but does not cleave its substrate. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 373(2): 325-9.
- 31 Lokeshwar BL. MMP inhibition in prostate cancer. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 878: 271-89.
- 32 Quaranta M, Daniele A, Coviello M, Venneri MT, Abbate I, Caringella ME, *et al.* MMP-2, MMP-9, VEGF and CA 15.3 in breast cancer. *Anticancer Res* 2007; 27(5B): 3593-600.
- 33 Yang J, Zhang Z, Lin J, Lu J, Liu BF, Zeng S, *et al.* Detection of MMP activity in living cells by a genetically encoded surface-displayed FRET sensor. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1773(3): 400-7.
- 34 Vinkenburg JL, Evers TH, Reulen SW, Meijer EW, Merckx M. Enhanced sensitivity of FRET-based protease sensors by redesign of the GFP dimerization interface. *Chembiochem* 2007; 8(10): 1119-21.
- 35 Nolen B, Taylor S, Ghosh G. Regulation of protein kinases; controlling activity through activation segment conformation. *Mol Cell* 2004; 15(5): 661-75.
- 36 Pearl LH, Barford D. Regulation of protein kinases in insulin, growth factor and Wnt signalling. *Curr Opin Struct Biol* 2002; 12(6): 761-7.
- 37 Kolibaba KS, Druker BJ. Protein tyrosine kinases and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1333(3): F217-48.
- 38 Giamas G, Stebbing J, Vorgias CE, Knippschild U. Protein kinases as targets for cancer treatment. *Pharmacogenomics* 2007; 8(8): 1005-16.
- 39 Zhang J, Ma Y, Taylor SS, Tsien RY. Genetically encoded reporters of protein kinase A activity reveal impact of substrate tethering. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(26): 14997-5002.
- 40 Wang Y, Botvinick EL, Zhao Y, Berns MW, Usami S, Tsien RY, *et al.* Visualizing the mechanical activation of Src. *Nature* 2005; 434(7036): 1040-5.
- 41 Ni Q, Titov DV, Zhang J. Analyzing protein kinase dynamics in living cells with FRET reporters. *Methods* 2006; 40(3): 279-86.
- 42 Ouyang M, Sun J, Chien S, Wang Y. Determination of hierarchical relationship of Src and Rac at subcellular locations with FRET biosensors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(38): 14353-58.
- 43 Green HM, Alberola-Ila J. Development of ERK activity sensor, an *in vitro*, FRET-based sensor of extracellular regulated kinase activity. *BMC Chem Biol* 2005; 5: 1.
- 44 Seong J, Lu S, Wang Y. Live cell imaging of Src/FAK signaling by FRET. *Cell Mol Bioeng* 2011; 2(4): 138-47.
- 45 Ting AY, Kain KH, Klemke RL, Tsien RY. Genetically encoded fluorescent reporters of protein tyrosine kinase activities in living cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(26): 15003-8.
- 46 Kunkel MT, Ni Q, Tsien RY, Zhang J, Newton AC. Spatiotemporal dynamics of protein kinase B/Akt signaling revealed by a genetically encoded fluorescent reporter. *J Biol Chem* 2005; 280(7): 5581-7.
- 47 Violin JD, Zhang J, Tsien RY, Newton AC. A genetically encoded fluorescent reporter reveals oscillatory phosphorylation by protein kinase C. *J Cell Biol* 2003; 161(5): 899-909.
- 48 Kunkel MT, Toker A, Tsien RY, Newton AC. Calcium-dependent regulation of protein kinase D revealed by a genetically encoded kinase activity reporter. *J Biol Chem* 2007; 282(9): 6733-42.
- 49 Itoh RE, Kurokawa K, Ohba Y, Yoshizaki H, Mochizuki N, Matsuda M. Activation of rac and cdc42 video imaged by fluorescent resonance energy transfer-based single-molecule probes in the membrane of living cells. *Mol Cell Biol* 2002; 22(18): 6582-91.
- 50 Yoshizaki H, Ohba Y, Kurokawa K, Itoh RE, Nakamura T, Mochizuki N, *et al.* Activity of Rho-family GTPases during cell division as visualized with FRET-based probes. *J Cell Biol* 2003; 162(2): 223-32.
- 51 Seong J, Lu S, Ouyang M, Huang H, Zhang J, Frame MC, *et al.* Visualization of Src activity at different compartments of the plasma membrane by FRET imaging. *Chem Biol* 2009; 16(1): 48-57.
- 52 Park K, Lee LH, Shin YB, Yi SY, Kang YW, Sok DE, *et al.* Detection of conformationally changed MBP using intramolecular FRET. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 388(3): 560-4.
- 53 Komatsu N, Aoki K, Yamada M, Yukinaga H, Fujita Y, Kamioka Y, *et al.* Development of an optimized backbone of FRET biosensors for kinases and GTPases. *Mol Biol Cell* 2011; 22(23): 4647-56.

- 54 Liu YC, Huang V, Chao TC, Hsiao CD, Lin A, Chang MF, *et al.* Screening of drugs by FRET analysis identifies inhibitors of SARS-CoV 3CL protease. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 333(1): 194-9.
- 55 Lauer-Fields JL, Minond D, Chase PS, Baillargeon PE, Saldanha SA, Stawikowska R, *et al.* High throughput screening of potentially selective MMP-13 exosite inhibitors utilizing a triple-helical FRET substrate. *Bioorg Med Chem* 2009; 17(3): 990-1005.
- 56 Tian H, Ip L, Luo H, Chang DC, Luo KQ. A high throughput drug screen based on fluorescence resonance energy transfer (FRET) for anticancer activity of compounds from herbal medicine. *Br J Pharmacol* 2007; 150(3): 321-34.
- 57 Mizutani T, Kondo T, Darmanin S, Tsuda M, Tanaka S, Tobiume M, *et al.* A novel FRET-based biosensor for the measurement of BCR-ABL activity and its response to drugs in living cells. *Clin Cancer Res* 2010; 16(15): 3964-75.
- 58 Cotlet M, Hofkens J, Köhn F, Michiels J, Dirix G, van Guyse M, *et al.* Collective effects in individual oligomers of the red fluorescent coral protein DsRed. *Chem Phys Lett* 2001; 336(5/6): 415-23.
- 59 Evanko DS, Haydon PG. Elimination of environmental sensitivity in aameleon FRET-based calcium sensor via replacement of the acceptor with Venus. *Cell Calcium* 2005; 37(4): 341-8.
- 60 Shroff H, Galbraith CG, Galbraith JA, White H, Gillette J, Olenych S, *et al.* Dual-color superresolution imaging of genetically expressed probes within individual adhesion complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(51): 20308-13.

## Design and Application of GFP-based FRET Biosensor

Wang Sheng, Chen Dianhua, Jiang Chizhou, Wu Qiong, Li Huang, Hua Zichun\*

(School of Life Science, State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, Nanjing 210093, China)

**Abstract** FRET is distance-dependent physical process by which energy is transferred non-radiatively from an excited molecular fluorophore (the donor) to another fluorophore (the acceptor). GFP-based FRET techniques have been widely used and applied in protein-protein interaction detection, protein conformation change monitoring and biosensors designing. GFP-based FRET biosensor greatly facilitates the research of cell signal transduction both at spatial and temporal levels. Herein, recent progress of design and application of GFP-based FRET biosensor has been reviewed, with emphasizes on its application in live cell imaging and drug screening.

**Key words** fluorescence resonance energy transfer; fluorescence protein; fluorescence probe; live cell imaging; drug screening

Received: August 9, 2012 Accepted: September 3, 2012

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.50973046, No.81070807), the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No.BK2010046, No.BZ2010074, No.BK2011573, No.BZ2011048, No.BK2011228), and the Ph.D. Program Foundation of Ministry of Education of China (No.200802840023)

\*Corresponding author. Tel: 86-25-83324605, E-mail: zchua@nju.edu.cn