

生物学中荧光共振能量转移的研究应用进展*

谢小燕 夏宁邵

(厦门大学细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室 厦门 361005)

摘要 荧光共振能量转移(FRET)可用于对生物大分子之间的距离进行定性、定量检测,所采用的材料、方法在近年都有了很大的发展,在核酸、蛋白质、细胞器结构功能检测、免疫测定、配体受体相互作用测定等方面都有巧妙而有效的应用,应用前景十分广阔。

关键词 荧光共振能量转移,分子间距离,生物检测

Progress of the studies and applications of fluorescence resonance energy transfer in the field of biology

XIE XiaoYan, XIA NingShao

(The Key Laboratory of the Ministry of Education for Cell Biology and
Tumor Cell Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, P. R. China)

Abstract The phenomenon of fluorescence resonance energy transfer(FRET) can be utilized to evaluate or to detect the distance between macromolecules. Recently, many new material and methods have been introduced into the use of this phenomenon, which has facilitated the structure and function study of nuclear, protein, cellular organs and the interaction between ligand and receptor. All the application of FRET implies that it has a bright future.

Key words fluorescence resonance energy transfer, distance between two molecules, biological assay

生物学的发展一向有赖于各种物理、化学研究手段的提高和迅速渗入,对于分子生物学来说,分析手段的进步更是阐明机理、应用开发的必要。为了研究生物大分子的结构和生物大分子之间的相互作用,人们应用了电子显微镜、X2线晶体衍射技术、核磁共振等方法,而仅诞生 50 年的荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)理论引入生物学也有 30 多年时间,作为一种极为有效的光学分子尺它在不断完善的过程中大大推动了生物检测的发展。

1 FRET 的发生、应用原理

一对合适的荧光物质可以构成一个能量供体(donor)和能量受体(acceptor)对,它们之间由于偶极-偶极的相互作用,激发供体分子的光子能量 $h\nu$ 可能被传递至受体分子,而后受体分子通过发射出光子 $h\nu'$ ($h\nu' < h\nu$) 而松弛,这就是 1948 年由 Förster 首先提出的荧光共振能量转移理论^[1]。其直观的表现就是供体和受体之间达到合适的距离内(1~10 nm),以供体的激发光激发,供体产生的荧光强度比它单独存在时要低得多,而受体发射的荧光却大大增强,同时伴随它们的荧光寿命的相应缩短和拉长。能量传递的效率和供体的发射光谱与受体的吸收光谱的重叠程度、供体与受体的跃迁偶极的相对取向、供体与受体之间的距离等有关。用公式表示

就是能量传递效率 $E = R_0^6 / (R_0^6 + R^6)$, 其中 R_0 为能量传递达到 50% 的距离,它依赖于供受体双方的光物理性质以及它们之间的取向^[2], 选定能量供受体对之后,可以将 R_0 看作恒量。利用这个临界转移距离 R_0 和实验测得的能量转移效率 E 就可测出能量供体与受体间的距离 R 。

据此, Stryer 和 Haugland 在 1967 年提出, FRET 可以作为光学尺,用以测量 1.0~6.0 nm 之间的距离^[3]。由于发生荧光共振能量传递将改变能量供体的去偏振程度、荧光寿命及荧光强度,而能量受体也有相应参数的变化,测定这些参数值就可以得出能量传递效率 E 。其中能量供体的荧光强度的变化最容易测量,是最常用的检测参数。此外,荧光体的去偏振程度、荧光寿命的变化也能用特殊的仪器测出,用以推算能量传递效率。

人们利用生物体自身的荧光或者将荧光物质标记到所研究的对象上,构建出大量合适的能量供受体对,应用在核酸检测、蛋白质结构、功能分析、免疫分析等许多方面,在应用中产生的新的需要随着新的荧光物质的发现、更灵敏精确的仪器的制造以及分析手段的提高不断得到满足,以下分别加以阐述。

* 海洋领域 863 计划(819206)、国家自然科学基金(39800029)和福建省自然科学基金(C0010001)资助课题

2 FRET 研究方法的改进

2.1 FRET 能量供受体对的新成员

作为 FRET 的能量供受体对, 荧光物质必须满足以下条件: 1 供受体的激发光谱要分得足够开; 2 供体的发射光谱与受体的激发光谱要重叠; 3 供受体的发射光谱要足够分开; 其中受体可以是只有吸收光、没有发射光的荧光淬灭剂, 而供体也可以是只有发射光、没有吸收光的化学方法发光物。由于生物体的自身荧光往往太微弱或缺乏特异性, 因此研究中常用的能量供受体多是些合成的荧光物质, 通过化学方法标记到研究对象上, 罗丹明与荧光素就是最常用的一对。将荧光物质进行修饰, 还可以使它针对特定的基团如巯基、羧基等进行标记^[4]。

1992 年, Prasher 等人首先从维多利亚水母中分离并克隆出了一种生物荧光物质)) 绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP)^[5], 由于它的稳定、高量子产率、无生物毒性、荧光反应不需要任何外源反应底物及表达无物种或细胞组织的专一性的优点, 很快就作为一种活体的标记得到了广泛的应用。1994 年以来, Heim 等人通过定点突变等方式, 得到了多种荧光光谱不同或量子产率更高的荧光蛋白^[6,7], 这样, 就产生了许多新的 FRET 能量供受体对, 它们适合于活体观察, 通过基因工程的手段可以与各种感兴趣的蛋白融合表达, 其特异性远远高于化学标记法。迄今, 荧光蛋白是唯一的一种活体标记物, 特别适用于观察活体内生物反应的动态变化; 其融合蛋白用于体外研究, 由于标记的特异性不需要高度纯化就能加以应用。

GFP 应用中也有一些不足之处, 主要是相对分子质量偏大, 有 238 个氨基酸残基, 而且目前可选择利用的光谱范围小。针对这些问题, Griffin 等人设计了一对紧密结合的分子, 包括一个小的受体结构域, 含 6 个氨基酸 CCXXCC, 可以进行基因上的融合重组; 一个小的穿膜配体 FLAS2EDT2, 它的相对分子质量不到 700, 本身没有荧光, 但当 EDT 被受体上的多肽 CCXXCC 取代后却能发出明亮的荧光, 这样, 其游离物不会产生有干扰的背景荧光, 更适合于 FRET 分析^[8]。当然, 富半胱氨酸的受体结构可能影响融合蛋白的结构和功能, 而配体结构中含有 As³⁺ 也可能存在毒性, 这些都是应用中需要注意避免的缺点。

另一方面, Selvin 等人也发现, 以常规的有机染料进行 FRET 检测, 对于许多生物用途来说能够测到的最大距离还是过小了; 常用的供体荧光团的寿命太短(典型的只有几秒钟), 而且应用复合指数使得寿命的测量很困难且准确度有限; 供受体间的相对角度对能量传递效率的影响使精确的距离很难加以确定; 背景荧光对结果的影响又不可忽略, 因此他们提出通过引入一个发光 Tb 的螯合物作为能量供体, 有机染料四甲基罗丹明作为能量受体, 拓展 FRET 技术^[9]。实际上, 早在 1988 年 Morrison 就提出将稀土元素与时间分辨荧光检测相结合, 改进 FRET 检测^[10]。由于稀土元素中的镧系元素荧光寿命长, 电子转移是复合式的, 可以克服测量荧光

寿命的困难以及方向因子的不确定性对测量准确性的影响而且使信噪比也大大提高, 在这种情况下, R₀ 值甚至提高到了 9 nm^[11], 通过 FRET 也能测到大于 10 nm 的距离, 对于体外检测特别有利。这种方法有时也被单独划分出来称为长距离电子转移 (long range electron transfer, LRET)^[12] 或发光共振能量转移 (luminescence resonance energy transfer, LRET)^[9]。

2.2 FRET 分析方法和检测仪器的提高

在不寻找新的荧光物质构成能量供受体对的同时, FRET 的检测也出现了许多新的形式, 以满足复杂多样的生物检测的需要。

一些荧光物质具有光漂白的特性, 即激发态供体分子按一定几率通过光致过程分解。应用可以被光漂白的能量受体, 如果对它进行破坏将发现供体的发射光增强, 证实原来发生了 FRET^[13]。这种方法适合于检测固定化分子之间的相互距离。

能够被光漂白的供体分子, 它们能发射荧光的激发态分子数是衰减时间 τ 的函数, 而 τ 又是荧光寿命 S 的函数, 这样通过光漂白实验可以间接地得出 S 和 E。由于 τ 比 S 的数量级高 10⁶~10⁹ 倍, 测量对仪器的精度要求较低, 可能会有更广泛的应用。Jovin 等人就将光漂白技术与荧光显微镜结合起来对活细胞进行单细胞水平的测定^[14]。

为了研究一些细胞内的生理过程, 经常将 FRET 与显微技术结合起来, Mupam 等人就通过荧光显微镜、电感耦合相机 (charged coupled device, CCD) 和光谱仪来进行完整细胞中 FRET 发生的定位, 将细胞内的理化反应研究提高到细胞器的水平^[15]。

数码免疫荧光显微镜和 FRET 相结合成为数码显微镜的一种特殊形式)) FRET 成像 (imaging FRET), 它将荧光显微镜的分辨率提高到了分子水平 (< 10 nm), 可进行单细胞膜的定量测量^[13]。

荧光活化细胞筛选仪 (FACS) 可以分离与纯化特殊类型的细胞, 它与 FRET 相结合, 对处在生理反应的不同时期、从而导致不同的 FRET 效果的细胞加以分析和分选^[16]。而利用微球体的表面作为组装平台, 可以将研究对象结合上去, 再以流式细胞仪研究它们之间的相互作用, 可以使检测的灵敏度高于溶液中获得的结果, 对检测更为有利^{[17][18]}。

1988 年 Morrison 首先提出了时间分辨荧光共振能量转移 (time resolution FRET, TR2FRET)^[10], TR2FRET 测定可以得到在固定波长的荧光强度随时间曲线和在固定时间的荧光发射光谱, 对于动态的生物体系的检测尤为重要。利用时间分辨 FRET 技术, 当能量供受体之间的距离在激发态供体寿命期间不变且 R₀ 保持恒定时, 供体荧光强度随时间衰减的动力学曲线 I(t) 与距离分布 F(r) 有关。由此从时间分辨 FRET 实验中记录的 I(t) 曲线中可以得到 F(r) 的信息。

运用激发态寿命很长的镧系元素铕、铽等作为荧光标记的能量供体, 由于背景荧光 (自发荧光) 的激发态寿命很短, 标记物和背景很容易就能区分开。当供体染料具有很长的激发态寿命时, 能量转移能通过时间分辨 (延迟时间) 以及光

谱分辨(滤波器)与受体的荧光区别开来。由于能量转移的发生要求近距离,只有特异的复合物才能发出长寿命的受体发射光。这样的 TR2FRET 作为一种简单、快速而灵敏的技术在免疫分析和其它特异的结合分析中都得到了应用^[1, 19]。

在 TR2FRET 的基础上又出现了 spFRET (single pair FRET)^[20], 能量供受体都被标记在同一分子上, 通过时间分辨计量一定时间内不同能量传递出现的信号数目并绘制直方图, 将单分子的波动以及相应的荧光强度的变动都减到了最小, 这样可以将具有不同的能量转移效率 E 的亚群区分开并计算出它们之间的数量比率。这种方法拓展一步就可以用于研究生物多聚体的组成动力学、DNA 限制性内切酶酶切反应以及 DNA 发夹结构的去折叠等, 进一步可以拓展于研究不同条件下的反应、监测异质体系中每个亚群的动力学。近来, sp2FRET 还用于观察干燥表面的两个荧光染料之间的距离, 用于膜上配体受体的结合研究以及研究固定蛋白和溶液中的蛋白和 DNA 的相互作用^[21-23]。

近场扫描光学显微镜 (near field scanning optical microscopy, NSOM) 是一种相对较新的技术, 它允许在亚波长的分辨率上进行光学测量, 以一个极小的定位于所研究样品近距离内(近场, < 10 nm) 的激发源激发来检测单分子的荧光强度及其寿命, 此外由于近场中的光辐射在沿着它传播方向有一个电子场成分, 还允许以三维的形式图示出单个荧光分子的转移偶极方向。NSOM 和 FRET 的结合使得测量中可以同时得到距离和方向的信息, 再加上 spFRET, 监测单个生物大分子内的构造变化, 例如旋转及纳米水平上的距离变化已经成为可能^[21]。

另一方面, 用微液流和小体积的微型化 FRET 分析可以事现超高产量的分析扫描, Auroras 系统就已推出一种 3456 孔的分析板, 用于大量快速的分析研究^[24]。

3 FRET 在生物研究中的应用发展

自 Stryer 和 Haugland 提出将 FRET 作为光学尺应用于生物研究后, 出现了很多应用的例子。

3.1 核酸检测

核酸杂交技术与 FRET 相结合, 可用于突变检测、同源性分析和核酸定量分析等方面。在这些检测中, 标记在核酸上的能量供受体之间的距离会因探针结合状态的不同而改变, 可通过荧光的变化检测出来。能量供受体可以分别标记在探针和靶上, 当探针与靶结合后发生 FRET; 也可以标记在探针的不同部位, 当探针与靶结合后解链或改变构象而使原有的 FRET 消失; 还可以标记在不同的探针上, 当靶序列存在时同时结合两个探针而发生 FRET。其中选用苾、么两种物质作为能量供受体经 Masuko 等人验证结果严格服从 Förster 方程, 很可能得到广泛的开发应用^[25]。

一种新型的基因检测技术))) 分子灯标 (molecular beacon) 就在这一基础上诞生, 它是一种能形成茎环结构的寡核苷酸, 两端分别标有 FRET 的能量供体和受体, 茎部是一段

长 4~12 bp 的互补的发夹结构 (hairpin), 而中间环状结构所包含的寡核苷酸就是探针的基因识别、配对部分。当探针未与靶序列结合时, 它是正常的茎环结构, 可以检测到 FRET; 而探针一旦与靶序列结合, 茎环结构打开, FRET 就消失了。由于互补配对的特异性的差别将导致探针和靶序列的杂合体的解链温度的不同, 通过改变温度, 检测 FRET 的发生与否则可以确定靶序列与探针之间的同源性的^[26, 27]。

利用两条在序列上头尾相接的探针, 在临近的 3' 或 5' 端分别标记上 FRET 能量供受体对, 二者序列在与 PCR 扩增出的 DNA 片段杂交时, 两种染料能互相接近, 因而能进行 FRET。荧光讯号的强度和 DNA 的产量成正比, 由于受体荧光染料只在两个探针都与靶杂交时才产生讯号, 所以检测荧光的步骤是在退火后进行的, 准确性高, 对其他的双链 DNA 的存在不予反应^[28, 29]。RNA 转录合成的实时监测也可以这样完成^[30, 31]。在突变检测中同样也用到了这样的两条探针, 其中的一条杂交探针横跨要研究的突变, 使得杂交的稳定程度与突变的发生与否正相关, 如果存在突变, 在低温下稳定, 能发生 FRET 的杂合体稍一升温就达到变性温度, 这条探针解离出来, FRET 就将消失^[32, 33]。

FRET 还被运用到 DNA 结构研究、核酸调控、核酸降解^[34]、寡核苷酸从核糖体上的释放^[35] 的研究等许多方面, 通过在核酸的不同部位标记能量供受体对, 能量转移的效率会因核酸结构的改变而改变, 从而获得与分子构象相关的信息。例如 Askok 等人用 spFRET 技术检测了 DNA 发夹结构变性的动力学过程^[20]; Mergny 研究了胱氨酸富集的寡脱氧核苷酸经分子内折叠形成的 DNA 结构模并推测 FRET 可用于揭示多链 DNA 的结构的形成^[36]。在研究核酸调控中, 由于蛋白、核酸的相互作用将导致核酸变构和活性的改变, 据此, Lorenz 等以 FRET 研究了噬菌体 Hc 位点及其结合蛋白宿主整合因子 (integration host factor, IHF) 之间的相互作用^[37]。他们设计了几条双链 DNA 底物, 在每条单链的 5' 端分别标记供体和受体荧光染料, INF 的二聚体能结合 Hc 位点并使 DNA 发生弯曲, 双链 DNA 的两端靠近从而发生 FRET。由于 INF 是结合在 DNA 的小沟上的, 当小沟关闭时, INF 结合变弱, 这时观察到 FRET 的效率由 0.49 ± 0.01 降到 0.37 ± 0.01。这样的 FRET 和模型技术已有足够高的分辨率来区别核酸蛋白质复合物在生物关系中的微妙变化。Matsumoto 等人也用这样的方法筛选与 HIV-1 TAR RNA 特异结合的分子, 快速地获得了大量的结果^[38]。

以常规的荧光检测仪就可以测定 FRET 的变化, 它已具有和放射性探针同样的灵敏度, 在核酸杂交中可以测定 100 L1 体积中 10⁻¹⁸ mol 数量级的反应, 却避免了操作的繁琐和危险性, 应用前景十分广阔。

3.2 蛋白质结构、功能分析

蛋白质的研究是 FRET 的应用中进展最大的一个方面, 新的荧光物质和检测方法在这里起了很重要的作用。

在蛋白质活性部位微环境的研究中, FRET 技术可以轻松的分析生物大分子三维结构及特定定位点间的距离。早期

的生化研究中就曾对胰凝乳酶分子中的 Trp 与标记的丹酰 (Dansyl) 基两者之间的能量转移效率降低进行研究,从而了解酶构象的变化,随后 FRET 也常用于确定蛋白质分子内部特定定位点之间的距离,研究大分子内部波动、多亚基蛋白的装配或是直接用来测量分子的大小。采用稀土荧光探针后,由于它的长激发寿命易于与生物的背景荧光区分开来,以稀土螯合物标记蛋白质成为研究蛋白质构象的一种新途径。王守业等人提出以铽(Tb^{3+})及铕(Eu^{3+})为能量受体标记蛋白,由于能量的转移而使蛋白的内源荧光得到淬灭,当底物与蛋白质(酶)结合只改变蛋白质的构象却不影响铽(Tb^{3+})、铕(Eu^{3+})在蛋白质中的结合部位时,则可通过对比蛋白质结合前后能量供受体间距离的改变观察其构象变化^[39]。如对比人血清白蛋白结合苯甲二氮前后其 214 位 Trp 残基与结合铽(Tb^{3+})间的距离。

由于 FRET 技术对生物大分子结构的分析在溶液中进行,无需复杂的结晶等样品处理步骤,因而快速、灵敏,同时还有实时监测的能力,与 X 射线晶体衍射法相比,其测定结果更能反映生物大分子结构与功能间的关系,体现生物大分子反应的动态过程。Thomas 等人用 FRET 研究了肌球蛋白头(S1)在不同状态的 ATP 酶的结合下催化域和调控域之间及调控域内部的距离,发现它们的相对运动并不显著,据此对常规的肌肉能量转化的理论提出了置疑^[40]。

引入绿色荧光蛋白及其多种变异型后,FRET 的应用又向前迈进了一大步,进入活体水平。

在蛋白酶底物的研究中,Heim 和 Tsien 用一段 25 个氨基酸残基的小肽连接 BFP 和 GFP,维持这样的近距离可以发生由激发态 BFP 向 GFP 的能量传递,而胰蛋白酶(trypsin)可以使这段小肽完全水解,随反应的进行 BFP 和 GFP 分散到溶液中,其浓度不足以使它们的距离达到发生共振能量传递的范围内,直接表现为 FRET 逐渐消失^[41]。Mitra 等人用一段 U^{a} 因子水解位点连接 BFP 和 eGFP,加入 FXa 就观察到 3 倍的发光效率的变化^[42]。

在活体水平上,由于荧光蛋白可适合多种哺乳动物细胞表达,许多类似的荧光蛋白连接体基因就用于作为细胞内的报告基因,以检测定位于胞质或高尔基体的蛋白酶。Xu 等人也利用一段保守的含 DEVD 的多肽连接 BFP 和 eGFP,由于 DEVD 是 Caspase3 的识别位点,在凋亡细胞中会逐渐被剪切,使原来发生在 BFP 和 eGFP 之间的 FRET 消失。这样 Caspase3 在凋亡过程中的活性可以用 FRET 加以监测^[43]。

过去研究蛋白质间的相互作用用的是酵母双杂合系统系统和哺乳动物双杂合系统,在反应完成后才能进行检测,检测时还要加入特殊的底物,而以荧光蛋白为基础的 FRET 应用在这方面则可以满足实时、原位检测的需要。例如 Day 为了证实细胞中 Pi21 转录因子是否是形成同源二聚体才能发挥功能,在 HeLa 细胞中将 Pi21 分别与 BFP、eGFP 融合表达,两种融合蛋白由于 Pi21 的相互作用而结合,发生了 FRET,证实 Pi21 同源二聚体的存在。利用相同的方法,他又证实了 Pi21 和 Ets21 之间存在聚合作用而 Pi21 和雌激素受体之

间没有相互结合的能力^[44]。

细胞中外膜磷酸酶 A (outer membrane phospholipase A, OMPLA) 的活性必须严格调控以防无控制的膜脂的破裂,一般认为这种调控是通过二聚体的形成与否进行的。就此 Ubarretxen2Belandia 等人对 OMPLA 进行了三个单胱氨酸突变,得到突变体 H26C、H234C 和 S144C,将能量供受体对都分别标记在这三种蛋白上,观察 FRET 的发生情况,发现 H26C 能有效地交联而 H234C 和 S144C 则不能。提示 OMPLA 地第 26 位氨基酸位于二聚体形成的轴心附近。FRET 效率还与共轭因子 Ca、存在的底物相关,提示二聚体的发生是特异的。他们得出 OMPLA 二聚体的活性是膜的聚集性被打乱,膜双分子层的物理性状的改变而导致的^[45]。

自由肌球蛋白轻链激酶 (MLCK) 中有一段 26 个氨基酸残基的钙调蛋白结合域,Ronoser 等人取出这段多肽作为柔性连接子连接 BFP 和 eGFP,其嵌合基因的表达产物可以发生 FRET,加入 Ca^{2+} 后使钙调蛋白浓度增加,相应地结合这段 26 氨基酸多肽,使柔性连接转化为刚性,BFP 和 eGFP 之间距离加大,FRET 将大大减弱,也证实这段多肽确实是 MLCK 的钙调蛋白结合域^[46]。Miyawaki 等人也重新确证了这段定名为 M13 的多肽,他们构建了 BFP2Calmodulin2M13eGFP 和 CFP2Calmodulin2M13YFP 两种嵌合体,当细胞内 Ca^{2+} 浓度增加,M13 与钙调蛋白(Calmodulin)结合,将观察到 FRET 的增加^[47]。类似的嵌合体大量应用到观察与 Ca^{2+} 浓度密切相关的细胞生理变化中^[48,49]。

在凋亡相关蛋白的研究中,Mahajan 等人也用到了 FRET^[50]。首先他们将 FRET 用于研究在线粒体内蛋白的相互作用,构建的嵌合体 eGFP2Bax、BFP2Bcl2 在活细胞中可以发生聚合,在足够近的距离内发生 FRET,并保持野生的 Bax 和 Bcl2 的活性。以此为基础,他们还将进一步研究在凋亡过程中 Bax2Bcl2 的结合和对凋亡的影响。

可以说荧光蛋白的出现是活体检测的一大进展,配合 FRET 观察细胞内的一些动态生理变化,将解决许多常规的免疫组化、电镜观察等所不能解决的问题。

3.3 免疫分析

免疫分析是目前疾病检测的一项重要手段,在现有的免疫检测方法中,固相免疫法以放射免疫检测法(RIA)和酶免疫检测法(EIA)应用最为广泛,但操作复杂,存在误检;而液相法的免疫反应和信号测定在溶液中一步完成,没有固相的参与,因此反应速度较快,操作也相应简单,其中均相荧光免疫测定(homogeneous fluoroimmunoassay, hFIA)应用最为广泛。FRET 则是最简便的均相测定方法之一。

早期的检测包括夹心法和竞争法两种。在夹心法中能量供受体分别标记针对同一抗原的抗体,形成 D2Ab1 和 A2Ab2,加入抗原后形成的抗原抗体复合物有可能是 (D2Ab1)2A2 的形式,由于它把能量供受体拉近,通过检测 FRET 的发生就证实了免疫反应的发生。而在竞争法中,能量供受体分别标记一对抗原、抗体中的一种,例如形成 DAg 和 A2Ab 的形式,它们可因免疫反应而聚集在一起,发生

FRET, 当待测样品中存在相应的未标记的抗原或抗体时, 就可能与已标记的抗原或抗体竞争, 发生取代而生成无 FRET 的免疫复合物。该体系已用来检测蛋白质和半抗原分子(例如吗啡)^[51]。

此后, 均相免疫测定又得到了一些改进。

Ueda 等人提出了开放三明治荧光免疫测定(open sandwich fluoroimmunoassay)^[52, 53], 通过对基因工程获得的重链可变区(V_H)和轻链可变区(V_L)分别标记或融合表达荧光能量供受体, 形成一个检测体系, 加入特异抗原, 组合出免疫复合物, V_H 和 V_L 被重组到一起, 标记的能量供受体对也就检测到了 FRET 的发生。通过这种方法, 它们检测了鸡蛋溶菌酶(HEL)及其抗体 HyHEL210 的可变区之间的特异性结合。并且预测这将是取代传统的复杂而昂贵的免疫检测的一种快速而廉价的检测方法。

引入镧系元素后, Blomberg 等人用 Tb 作为荧光标记物进行均相荧光免疫测定, 他们用时间分辨荧光测定法将 Tb 的长寿命荧光与生物材料的背景荧光区分开, 以 Tb 为能量供体, 罗丹明为能量受体对抗原或抗体进行标记, 检测因免疫反应造成的 FRET 现象的变化, 发现它的灵敏度只比异相免疫反应略低, 但具有高速和简单的优点, 更适用于要求高效的分析中^[54]。

3.4 其它方面的应用

在糖类的结构分析中也有 FRET 的运用。Young 等人以 FRET 证实了加入 NaOH 能使 3 螺旋 1 y 3H12 葡聚糖部分打开并使其活性上升^[55]。

配体与受体作用的分析也用到了 FRET。Szabo 等人就通过 FRET 方法, 发现 T 细胞受体 TCR2CD3 与 CD4 必须以适当的方式相互作用之后才能激活 T 细胞引发免疫反应^[56, 57]。Karolina 等人将作为能量供体的 Eu 螯合物标记 II22, 而作为能量受体的 Cy5 标记 II22 受体 A 链单克隆抗体, 随着配体、受体的结合及受体与其抗体的反应, 形成了 Donor 配体受体 2 抗体 2 Acceptor 形式的复合物, 以时间分辨检测 FRET, 证实了 II22 及其受体的相互作用并计算出它们的饱和度^[58]。

FRET 的应用对象还被扩展到分子水平以外, 用于解释一些细胞器和细胞水平的现象。最常见于对细胞膜的研究, 在单分子膜组成的描述、跨膜电压的变化研究以及观察膜脂的转移等实验中都有应用。Cacciatore 等人在细胞外膜上连接香豆素(coumarin), 膜疏水核上连接 Oxonol, 这一疏水核可以在膜内外转移, 香豆素和 Oxonol 能构成一对能量供受体对, 在膜电压为 0 mV 时有 FRET 的发生, 100 mV 时无 FRET。长期测量后他们得出了神经元有节律得电子输出的模式^[59]。Matjus 等人构建了一套膜供体和膜受体囊泡, 膜供体由能量供体 2 糖脂、能量受体 2 甘油三酯及一种磷脂酰胆碱 POPC 组成, 而膜受体仅含 POPC, 反应起始时 FRET 最强, 不断加入特异的糖脂转移蛋白后, 能量供体 2 糖脂被转移到膜受体囊泡上, FRET 逐渐减弱, 实现了实时、持续观察脂质转移的目的^[60]。

Kenworthy 等人用 FRET 成像技术对目前流行的脂质皮

筏模型进行了验证, 他们对一种 GPI 锚定蛋白 52 核苷酸酶(52NT)的抗体分别标记能量供受体, 抗体与该蛋白结合后将发生 FRET, 而能量传递的效率将取决于 52NT 在膜上的聚集程度。他们发现 52NT 并不象皮筏模型所说的那样成束存在、漂浮于脂双分子层中, 而是散在分布的, 以此对流行的理论模型提出了置疑^[13]。

4 FRET 应用的优劣势及发展前景

FRET 作为 1.0~10.0 nm 距离范围内的光学尺, 具有高分辨率(可以达到 ns、Ls 级)、高灵敏度及适用与复杂体系等优点。对比常规的 X 衍射、核磁共振等研究生物大分子的仪器技术, 它不需要通过繁琐的手段制备晶体, 在溶液中就能进行检测; 进行合适的标记后, 对纯度的要求可以降低许多, 用荧光蛋白融合表达甚至可以不考虑杂质的影响; 它还特别适用于动态体系的测定并且已经获得了活体检测的能力; 它可以测定 10.0 nm 左右的分子间距, 这比核磁共振技术仅限于零点几纳米的测定范围要有利而实用得多。

在 FRET 检测中, 存在一个不确定的方向因子 J^2 的取值的干扰; 在具体的研究中, 如何选择一对合适的能量供受体并把它们标记到研究对象上有时候也是个棘手的问题, 必须靠继续寻找能量供受体对和采用更精密的仪器来解决。

荧光蛋白的开发和稀土元素的应用已大大拓宽了 FRET 的应用范围, 时间分辨荧光检测、荧光显微镜等都已开始与 FRET 结合应用, 新材料、新技术的作用都是不可估量的, 未来 FRET 除了用于研究生物大分子的结构功能之外, 还可能用于细胞器功能研究、细胞信号传导以至对在自然环境中的生活细胞进行分析。而在核酸检测、免疫测定、生物大分子相互作用的测定方面也会出现更多的实际应用价值, 联系目前迅速发展的 PCR2ELISA、生物芯片等技术, FRET 将对生物检测的发展起到巨大的推动作用。

参考文献

- 1 Förster T. Intramolecular energy migration and fluorescence. *Ann Phys*, 1948, 2: 55
- 2 Marian M, Barbara M. The lanthanides as luminescent probes in investigations of biochemical systems. *J Photochem. Photobiol*, 1996, A99(23): 85
- 3 Stryer L, Haugland R. Energy transfer: a spectroscopic ruler. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1967, 58: 719
- 4 Sinev M, Landsmann P, Sineva E et al. Design consideration and probes for fluorescence resonance energy transfer studies. *Bioconjug Chem*, 2000, 11(3): 352
- 5 Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW et al. Primary structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Gene*, 1992, 111: 229
- 6 Heim R, Prasher DC, Tsien RY. Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 12501
- 7 Heim R, Cubitt AB, Tsien RY. Improved green fluorescence. *Nature*, 1995, 373: 663

- 8 Griffin BA, Adams SR, Tsien RY. Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells. *Science*, 1998, 281: 269
- 9 Selvin PR, Hearst JE. Luminescence energy transfer using a terbium chelate: improvements on fluorescence energy transfer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 10024
- 10 Morrison LE. Time-resolved detection of energy transfer: theory and application to immunoassays. *Anal Biochem*, 1988, 174: 101
- 11 Mathis G. Rare earth cryptates and homogeneous fluorimmunoassays with human sera. *Clin Chem*, 1993, 39: 1953
- 12 Stryer L, Thomas DD, Mearns CF. Diffusion enhanced fluorescence energy transfer. *Annu Rev Biophys Biochem*, 1982, 11: 203
- 13 Kenworthy AK, Edidin M. Distribution of a glycosylphosphatidylinositol anchored protein at the apical surface of MDCK cells examined at a resolution of $< 100\text{\AA}$ using imaging fluorescence resonance energy transfer. *J Cell Biology*, 1998, 142: 69
- 14 Jovin TM. Cell structure and function by microspectrofluometry. Orlando: Academic Press, 1989. 99
- 15 Nupam PM, Katrina L, Gail B et al. Bcl2 and Bax interactions in mitochondria probed with green fluorescent protein and fluorescence resonance energy transfer. *Nature Biotechnology*, 1998, 16: 547
- 16 Xiang X, Amy L, Gerard V et al. Detection of programmed cell death using fluorescence energy transfer. *Nucleic Acids Research*, 1998, 26: 2034
- 17 Buranda T, Lopez GP, Keij J et al. Peptides, antibodies, and FRET on beads in flow cytometry: A model system using fluoresceinated and biotinylated beta-endorphin. *Cytometry*, 1999, 37(1): 21
- 18 Song X, Shi J, Swanson B. Flow cytometry-based biosensor for detection of multivalent proteins. *Anal Biochem*, 2000, 284(1): 35
- 19 Selvin PR. Fluorescence resonance energy transfer. *Methods Enzymol*, 1995, 246: 300
- 20 Ashok AD, Maxime D, Jocelyn R et al. Single-pair fluorescence resonance energy transfer on freely diffusing molecules: Observation of Förster distance dependence and subpopulations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 3670
- 21 Ha T, Enderle T, Ogdree DF et al. Probing the interaction between two single molecules: fluorescence resonance energy transfer between a single donor and a single acceptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 6264
- 22 Schiitz GJ, Trabesinger W, Schmidt T. Direct observation of ligand colocalization on individual receptor molecules. *Biophys J*, 1998, 74: 2223
- 23 Ha T, Ting AY, Liang J et al. Single-molecule fluorescence spectroscopy of enzyme conformational dynamics and cleavage mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 893
- 24 Mere L, Bennett T, Coassin P et al. Miniaturized FRET assays and microfluidics: key components for ultrahigh-throughput screening. *Drug Discov Today*, 1999, 4(8): 363
- 25 Masuko M, Ohuchi S, Sode K et al. Fluorescence resonance energy transfer from pyrene to perylene labels for nucleic acid hybridization assays under homogeneous solution conditions. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(8): E34
- 26 Tyagi S, Kramer FR. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nature Biotechnol*, 1996, 14: 303
- 27 Parkhurst KM, Parkhurst LJ. Donor-acceptor distance distributions in a double-labeled fluorescent oligonucleotide both as a single strand and in duplexes. *Biochemistry*, 1995, 34: 285
- 28 De Silva D, Hermann M, Tabiti K et al. Rapid genotyping and quantification on the LightCycler™ with hybridization probes. *Biochimica*, 1998, 2: 12
- 29 Hohler T, Thanm B, Labner D et al. Quantitation of mRNA by polymerase chain reaction. Springer Lab Mammal, Springer Verlag Heidelberg, 1995
- 30 Se2lida Y, Koshimoto H, Kondo S et al. Real-time monitoring of in vivo transcriptional RNA synthesis using fluorescence resonance energy transfer. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(12): E59
- 31 Tsuji A, Koshimoto H, Sato Y et al. Direct observation of specific messenger RNA in a single living cell under a fluorescence microscope. *Bioophys J*, 2000, 78(6): 3260
- 32 Bernard PS, Lay MJ, Witwer CT. Integrated amplification and detection of C677T point mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene by fluorescence resonance transfer and probe melting curves. *Anal Biochem*, 1998, 255: 101
- 33 Cotton RG. Slowly but surely towards a better scanning for mutations. *Trends Genet*, 1997, 13: 43
- 34 Uchiyama HH, Kashiwasak2 Jibu M, Taira K. Detection of undegraded oligonucleotides in vivo by fluorescence resonance energy transfer. Nuclease activities in living sea urchin eggs. *J Biol Chem*, 1996, 271: 380
- 35 Zelphati O, Szoka FC. Mechanism of oligonucleotide release from cationic liposomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 11493
- 36 Mergny JL. Fluorescence energy transfer as a probe for tetraplex formation: the 2motif. *Biochemistry*, 1999, 33: 1573
- 37 Lorenz M, Hillisch A, Goelman SD. Global structure similarities of intact and nicked DNA complexed with INF measured in solution by fluorescence resonance energy transfer. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27(23): 4619
- 38 Matsumoto C, Hamasaki K, Mihara H et al. A high-throughput screening utilizing intramolecular fluorescence resonance energy transfer for the discovery of the molecules that bind HIV-1 TAR RNA specifically. *Bioorg Med Chem Lett*, 2000, 10(16): 1857
- 39 王守业, 余华明, 张祖德等. 荧光探针在蛋白质研究中的应用. *大学化学*, 1998, 13(3): 5
- 40 Thomas P, Ken S, Lonise B. Interdomain distances in the regulatory domain of the myosin head in prepower and postpower stroke states: fluorescence energy transfer. *Biochemistry*, 1999, 38: 13026
- 41 Heim R, Tsien RY. Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Curr Biol*, 1996, 6: 178
- 42 Mitra RD, Silva CM, Youvan DC. Fluorescence resonance energy transfer between blue-emitting and red-shifted excitation derivatives of the green fluorescent protein. *Gene*, 1996, 173: 13
- 43 Xu X, Gerard AL, Huang BC et al. Detection of programmed cell death using fluorescence energy transfer. *Nucleic Acids Res*, 1998, 26(8): 2034
- 44 Day RN. Visualization of p21 transcription factor interactions in the living cell nucleus by fluorescence resonance energy transfer microscopy. *Mol Endocrinol*, 1998, 12(9): 1410
- 45 Ubarretena2Belandia I, Hozeman L, Der Laan EB et al. Outer membrane phospholipase A is dimeric in phospholipid bilayers: a cross-linking and fluorescence resonance energy transfer study. *Biochemistry*, 1999, 38: 7379
- 46 Romoser VA, Hinkle PM, Persechini A. Detection in living cells of Ca²⁺-independent changes in the fluorescence emission of an indicator composed of two green fluorescent protein variants linked by a calmodulin-binding sequence: a new class of fluorescent indicators. *J Biol Chem*, 1997, 272: 13270
- 47 Miyawaki A, Llopis J, Heim R et al. Fluorescent indicators for Ca²⁺-based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature*, 1997, 388(6645): 882
- 48 Vanderklish PW, Krushel LA, Holst BH et al. Marking synaptic activity in dendritic spines with a calpain substrate exhibiting fluorescence resonance

- nance energy transfer. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(5): 2253
- 49 Emmanouilidou E, Teschemacher AG, Pouli AE et al. Imaging Ca²⁺ concentration changes at the secretory vesicle surface with a recombinant targetedameleon. Curr Biol, 1999, 9(16): 915
- 50 Mahajan NP, Linder K, Berry G et al. Bcl2 and Bax interactions in mitochondria probed with green fluorescent protein and fluorescence resonance energy transfer. Nat Biotechnol, 1998, 16(6): 547
- 51 陈国珍, 黄贤智, 郑朱梓等. 荧光分析法. 北京: 科学出版社, 1990. 290~ 291
- 52 Ueda H, Kubota K, Wang Y et al. Homogeneous noncompetitive immunoassay based on the energy transfer between fluorolabeled antibody variable domains (open sandwich fluorimmunoassay). Biotechniques, 1999, 27(4): 738
- 53 Arai R, Ueda H, Tsumoto K et al. Fluorolabeling of antibody variable domains with green fluorescent protein variants: application to an energy transfer based homogeneous immunoassay. Protein Eng, 2000, 13(5): 1133
- 54 Blomberg K, Hurskainen P, Hemmila I. Terbium and rhodamine as labels in a homogeneous time resolved fluorometric energy transfer assay of the beta subunit of human chorionic gonadotropin in serum. Clin Chem, 1999, 45: 855
- 55 Young SH, Dong WJ, Jacobs RP. Observation of a partially opened tripeptide helix conformation in 1,4-β-D-glucan by fluorescence resonance energy transfer spectroscopy. J Biol Chem, 2000, 275(16): 11874
- 56 Szabo Jr G, Pine PS, Weaver JL. CD4 changes conformation upon ligand binding. J Immunol, 1992, 149(11): 3596
- 57 Szabo Jr G, Weaver JL, Pine PS. Crosslinking of CD4 in a TCR/CD3 juxtaposed inhibitory state: a pFRET study. Biophys J, 1995, 68(3): 1170
- 58 Karolina S, Pertti H, Susann E et al. Homogeneous time resolved IL2/IL2RA assay using fluorescence resonance energy transfer. Cytokine, 1998, 10(7): 495
- 59 Cacciatore TW, Brodfuehrer PD, Gonzalez JE et al. Identification of neuronal circuits by imaging coherent electrical activity with FRET based dyes. Neuron, 1999, 23: 449
- 60 Mattjus P, Molotkowsky JG, Smaby JM et al. A fluorescence resonance energy transfer approach for monitoring protein mediated glycolipid transfer between vesicle membranes. Analytical Biochemistry, 1999, 268: 297
(20021209 收稿)

欢迎订阅 2002 年 5 草食家畜 6 杂志

5 草食家畜 6 杂志系中国畜牧学类核心期刊之一, 主要介绍国内外有关草食家畜研究领域的新成果、新理论、新技术、新信息、生产管理经验和动态等。报道内容为牛、羊、山羊、马、骆驼、家兔、鹿等草食家畜的遗传育种、繁殖技术、饲养管理、饲料营养、家畜生理、家畜卫生、畜产品生产、草原牧草、畜病防治和牧业经济等方面的科研成果、论文等内容。适合各级从事畜牧科研、教学和生产管理人员阅读。

本刊为季刊, 16 开本, 48 页, 9 万余字, 季末月 25 日出版, 定价 4.50 元, 全年 4 期价 18.00 元 (邮寄每期加邮资 1.00 元)。本刊代号: 58- 71, 全国各地邮局均可订阅, 亦可向本刊编辑部函订。

为了促进我国兽医、畜牧、草原科学技术的进步, 本刊愿为国内、外广告客户提供有偿的发表园地。经营广告业务范围包括优良家畜品种, 牧草种子, 各种饲料添加剂, 肉、乳、蛋、毛、皮畜产品, 兽药和疫苗, 仪器设备, 牧业机械及各种情报信息。我部愿为您提供优质服务。

地 址: 乌鲁木齐克拉玛依东路 21 号 新疆畜牧科学院科技信息研究所 5 草食家畜 6 编辑部

邮 编: 830000 电话: (0991)4843824 联系人: 王 强 刘金定

欢迎订阅 5 中药新药与临床药理 6 杂志

5 中药新药与临床药理 6 是由国家药品监督管理局主管, 广州中医药大学主办的一份学术性期刊, 主要宣传和报道中药新药和临床药理的研究成果和进展, 为中药的研制、生产和应用部门提供有关药品法规和技术开发的信息, 是中药新药开发与临床药理研究的核心期刊之一。主要栏目: 论坛、临床研究、药效与毒理学研究、质量分析研究、中药指纹图谱研究、不良反应与合理用药、新工艺与新方法、新药介绍、药政药事、学术争鸣、专题笔谈与讲座、综述、论著摘要、简讯等, 是科研院所、医院、大中专院校等部门从事中药新药开发、中药临床药理研究的工作者的工具书。欢迎订阅, 欢迎供稿。

本刊为双月刊, 从 2002 年起改为大 16 开本, 每期 64 页, 每册订价 10 元, 全年 60 元。现已开始 2002 年的征订工作。欢迎新老读者到当地邮局订阅, 邮发代号: 46210, 国外代号: BM 4647。订阅不便及错过订阅时间者可直接汇款到本刊编辑部补购。

地 址: 510405 广州市机场路 12 号 5 中药新药与临床药理 6 编辑部

电 话: 0208659123 22483, 02036590367 E2mail: ZYXYLC@Public1.guangzhou. gd. cn; ZYXYLC@163. net