

FRET 荧光共振能量转移

对于分子生物学来讲，生物分析手段的发展，是阐明机理的必要条件。在研究分子间相互作用的道路上，人们不断探索，总结出很多方法，免疫技术，晶体衍射，核磁共振等。1948 年，荧光共振能量转移(Fluorescence resonance energy transfer, FRET) 理论被首次提出，它可以测定 1.0-6.0nm 距离内分子间的相互作用。1967 年，这一理论得到了实验验证，将 1.0-6.0nm 的距离称为光学尺。二十世纪八十年代出，通过科学家的不断探索，Fret 技术成功运用到蛋白质结构的研究中。自 Fret 荧光共振能量技术诞生以来，已结合多种先进的技术和方法，如电子显微镜，X 射线衍射等，推动了分子生物学检测手段的发展。

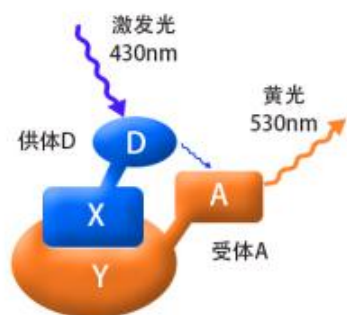
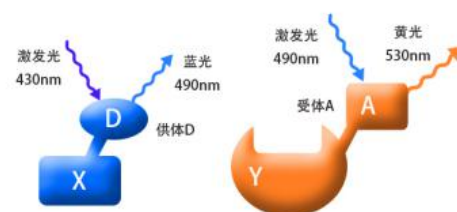
作用原理

荧光共振能量转移技术，是采用物理方法去检测分子间的相互作用的方法。

他适用于在细胞正常的生理条件下，验证已知分子间是否存在相互作用。

此方法的检测原理如下；

将我们要检测的蛋白(如图 X 和 Y) 分别偶联上 D 和 A 荧光蛋白，D 和 A 是一对荧光物质，我们称之为供体(donor) 和受体(acceptor)。当用 430nm 的紫光去激发 X 融合蛋白时，它能够产生 490nm 的蓝色荧光；同样，当我们用 490nm 的蓝光去激发 Y 融合蛋白时，它能够产生 530nm 的黄色荧光。（结合图 1）。



当蛋白 X 和 Y 间没有相互作用时（两者的空间距离 $>10\text{nm}$ ），融合蛋白 X 和 Y 分别产生相应的荧光而被检测到，如果蛋白 X 和 Y 间存在相互作用（两者的空间距离需 $<10\text{nm}$ ，结合图 2），用紫光激发融合蛋白 X 其产生的蓝光会被融合蛋白 Y 吸收，从而产生黄色荧光，这时，在细胞内将检测不到蓝色荧光的存在。这时因为能量从 X 融合蛋白转移到了 Y 融合蛋白，这就是荧光共振能量转移技术。

技术难点

一个理想的 Fret 相互作用体系，要求要有一对合适的荧光物质，即供体的发射光谱与受体的吸收光谱有明显的重叠。且当供体的激发波长时对受体无影响，供体和受体的发射光谱要完全分开，否则容易造成光谱干涉，而使反应体系不稳定。目前，较为常用的供体-受体分子对，主要有绿色荧光蛋白类（GFPs）和染料类。绿色荧光蛋白类有 CFP-YFP，BFP-GFP，BFP-YFP 等，染料类的有 Cy3-Cy5，FITC-Rhodamine 等。且这些荧光物质要能够标记在研究对象上。

应用要求

供体荧光基团和受体荧光基团的空间距离要 $<10\text{nm}$ ；

供体的发射光谱与受体的接收光谱有相当的重叠；

供体、受体分子在量子产率、消光系数、水溶性、抗干扰能力等方面要求较高。

优缺点

优点	缺点
在活细胞的正常生理条件下进行检测，观察大分子在细胞内的构象变化与相互作用，并弥补了需破碎细胞检测相互作用的缺点； 灵敏度高，可实现对单细胞水平的研究，研究单个受体分子； 可与多种仪器和技术结合使用，如显微镜，色谱技术，电泳，流失细胞技术等；	应用比较局限，一般需要在待检测分子上偶联荧光物质（加上标记）； 对实验要求较高，如供受体的光谱重叠不好，会导致荧光干扰，对供受体的抗干扰能力，水溶性等要求高； 需要不断探索合适的供体和受体，且能够标记分子； 难以观察瞬时的分子间作用，检测要求大量的样品；

应用

- 细胞内分子间的相互作用
- 膜蛋白的研究
- 细胞膜受体蛋白间的相互作用
- 细胞凋亡的研究
- 核酸检测

实验流程简述

以荧光物质 CFP（供体）-YFP（受体）为例，检测 AB 蛋白在细胞内的相互作用。

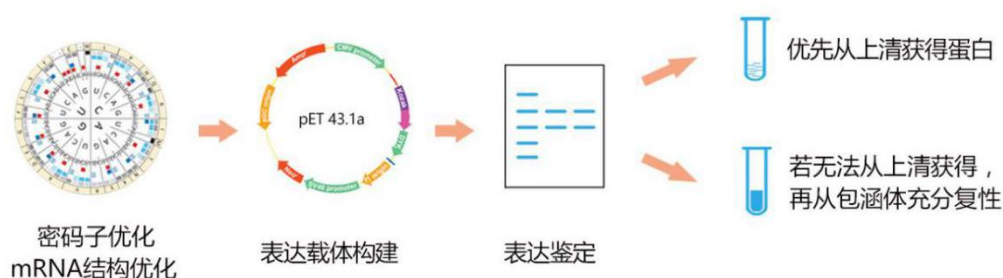
1. 细胞培养：根据实验培养特定的细胞用于转染，观察检测分子在细胞内的相互作用；
2. 细胞转染：构建质粒载体 CFP-A 和 YFP-B，将检测的 AB 蛋白分别偶联上荧光蛋白 CFP 和 YFP，并将两个质粒共转染到培养的细胞内；
3. 检测 FRET：质粒载体 CFP-A 和 YFP-B 转染细胞 10h、12h、18h、24h、36h、48h、72h 后检测，是否发生 FRET；
4. FRET 图像采集：确定 FRET 配对的激发波长，蓝光被调谐分别用于探测最大和最小的供体和受体信号，最大供体信号和最小受体信号对应的波长用于收集双表达细胞的 FRET 信号。调整激光变化，以便获取最大 CFP 信号和最小 YFP 信号的激发光波长，采集供体和受体图像，收集 FRET 信号。每个细胞 FRET 检测重复 3 次，每种转染至少完成 6 个细胞的 FRET 检测；
5. FRET 数据处理：去除 FRET 信号中 DSBT 和 ASBT 的光谱串色信号；受体通路的 FRET 信号需要对供体受体光谱灵敏度的变化进行矫正、对自发荧光和光学噪声进行矫正；利用矫正系数对双标定细胞进行像素匹配矫正。

南京德泰生物 -- 专注蛋白与抗体

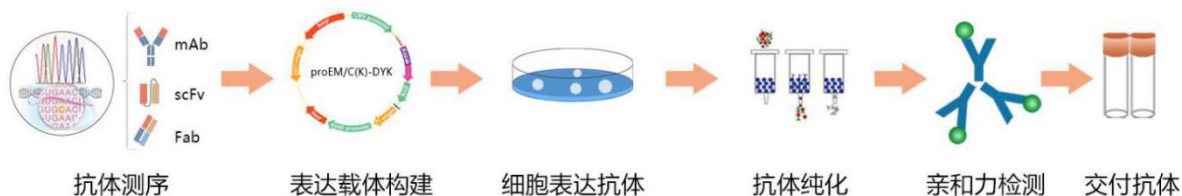
一、蛋白表达（哺乳动物细胞表达）蛋白被细胞充分修饰，活性有保障



二、蛋白表达（大肠杆菌表达）成功率>95%，不成功不收费，成功有保障



三、重组抗体表达 若想改造一个抗体，可以试试重组表达



四、稳定细胞系构建 研究级细胞系构建 & 高表达细胞株开发

