基于 FRET 荧光蛋白探针的 活体定量分子影像方法探究

干颖奇¹ 唐吉¹ 刘晴¹ 白净¹ 刘晓冬¹²

摘 要 目的 荧光共振能量转移(fluorescent resonance energy transfer ,FRET) 探针由于自身仍存在诸多局限 ,其在活体成像领域尚未得到广泛应用。本文旨在解决 FRET 探针在活体定量分子影像应用中所存在的瓶颈问题 ,即如何利用 FRET 探针精准计算目标物浓度 ,以及如何基于 FRET 探针实现三维成像。方法 基于探针和目标物结合时的化学反应平衡关系 ,提出一种新型分析方法 ,以精确定量待测物 [钙调素(calmodulin , CaM)]的浓度。同时对于 FRET 探针的活体分子成像 结合荧光透射成像(3D-FMT)方法 ,建立了可进行三维时空动态 FRET 检测的平台系统 ,对 FRET 探针的测量结果(即待测物浓度)进行实时定量的三维重建。结果 准确地定量了待测物 CaM 浓度 ,并得到了高质量的 3D-FRET 分布影像。结论 提出 FRET 探针在活体成像应用领域两个关键问题的解决方案 ,为基因编码 FRET 探针向活体分子影像领域的推广奠定了重要的技术基础。

关键词 荧光共振能量转移;基因编码 FRET 探针; 荧光蛋白; 荧光断层成像; 钙调素

DOI: 10. 3969/j.issn. 1002-3208. 2016.06.03.

中图分类号 R318; Q631 文献标志码 A 文章编号 1002-3208(2016)06-0566-05

Quantitative *in-vivo* molecular imaging based on genetically-encoded FRET probes

WANG Yingqi¹, TANG Ji¹, LIU Qing¹, BAI Jing¹, LIU Xiaodong^{1,2}

1 Department of Biomedical Engineering, School of Medicine, Tsinghua University, Beijing 100084

2 School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084

(FRET) sensor in *in-vivo* molecular imaging and our research are trying to solve them. One of the bottleneck problems is how to quantify the binding equilibrium for the reaction between the probes and targets. The other problem is how to utilize FRET sensor to reconstruct 3–D images for temporal and spatial dynamics of the targeted molecules in the live body. **Methods** We take an established FRET sensor of calmodulin (CaM), BSCaM_{IQ}, as the exemplar, by which we propose a new method to analyze the FRET ratio due to the binding between endogenous CaM and BSCaM_{IQ}. We also utilize BSCaM_{IQ} in a 3–D FMT system, by which 3–D FRET thus the CaM dynamics is attempted. **Results** we successfully quantified the concentration of CaM in live-cells and the 3–D FRET distribution of BSCaM_{IQ}. **Conclusions** Our work provides the solutions for the two major bottleneck problems in applications of FRET probes to quantify targeted biomolecules, contributing to the

基金项目: 国家自然科学基金(31370822,81171382,81371604)、北

京市自然科学基金(7142089)资助

作者单位:1 清华大学医学院生物医学工程系(北京 100084)

2 清华大学生命科学学院(北京 100084)

通信作者: 刘晓冬 ,研究员。

E-mail: liuxiaodong@ mail.tsinghua.edu.cn

technical foundations for future development of molecular imaging with FRET probes *in vivo*.

Keywords I fluorescent resonance energy transfer; genetically-encoded FRET probe; fluorescent protein; fluorescence molecular tomography; calmodulin

0 引言

荧光 共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)探针是一种基于荧光共振能量转移的生物传感器^[1],一般的 FRET 探针由荧光供体、荧光受体以及传感器构成,当传感器与特定分子发生相互作用时,会引发与其相连的荧光供体和荧光受体耦合角度及相对距离的变化,进而使荧光供体和受体之间的 FRET 效率发生变化^[2]。

BSCa M_{IQ} 由 N 端的黄色荧光蛋白 YFP、C 端的青色荧光蛋白 CFP 和连接它们的短肽组成 [图 1 (a)] ^[3]。该短肽由 27 个氨基酸组成: AAATK – IQAAFRGHITRKKLKGEKKGAA。该短肽基于神经调制蛋白的 IQ 域: AAATKIQASFRGHITRKKL – KGEKK。BSCa M_{IQ} 可以与自由状态下的钙调素 apo-CaM 相结合。在发生结合之前,BSCa M_{IQ} 上的 CFP (作为荧光供体) 与 YFP(作为荧光受体) 之间存在较强的 FRET,但在结合钙调素之后由于构象改变导致其 FRET 效率降低,因而成为一种良好的钙调素指示剂。

钙离子(Ca^{2+}) 可以与 apo-CaM 相结合 ,使其构象发生变化 ,进而无法与 $BSCaM_{IQ}$ 进行结合。因此 , $BSCaM_{IQ}$ 是特异性的 apoCaM 探针。 $BSCaM_{IQ}$ 与 apo-CaM 相互作用的过程可认为是一种化学结合过程 , 想要定量 apo-CaM 的浓度 ,不仅需要计算出 FRET的测量比率(apparent FRETratio 或 FR) ,还需要计算出参与反应的 $BSCaM_{IQ}$ 的量 ,以准确算出 apo-CaM 的浓度。钙调素 CaM 与多种重要的生物学过程密切相关 IaM_{IQ} 。因此 ,精确定量活细胞内 apo-CaM 浓度具有非常重要的意义。

真实的生理环境复杂多变,为在生理情况下使用 BSCaM_{IQ}探针实现对 apo-CaM 浓度的精确测量,使用已报道的定量效果最好的 3³-FRET 算法来计算 FRET 测量比率(等价于 FRET 效率),并提出了

一种全新的计算拟合方法,在活细胞内对 $BSCaM_{IQ}^{[5]}$ 与 apo-CaM 的结合反应过程进行了多点拟合计算,定量出了不同状态下活细胞内 apo-CaM 的准确浓度。

1 定量算法与实验设计

1.1 针对 FRET 探针的新型定量算法

在计算 FRET 比率时参考 3³-FRET 算法^[6] ,其 核心是通过对照实验 ,采用逼近的方式计算出供体 发射串扰与受体激发串扰。该算法可以得到精确的 FRET 比率 FR 的值。在此基础上 ,提出了一种新的 拟合计算方法 ,可以根据 FR 来准确定量活细胞内 钙调素浓度。

首先 ,FR 与 $\mathrm{BSCaM}_{\mathrm{IQ}}$ 结合 apo - CaM 的比例 S_{b} 有如下线性关系:

$$FR = FR_{max} - (FR_{max} - FR_{min}) S_b$$
 (1)

$$S_{\rm b} = \frac{[S_{\rm b}]}{[S_{\rm b}] + [S_{\rm free}]} \tag{2}$$

式中: $S_{\rm b}$ 是结合了 apo-CaM 的 BSCaM $_{
m IQ}$ 的比例; $[S_{\rm b}]$ 是结合了 apo-CaM 的 BSCaM $_{
m IQ}$ 的浓度; $[S_{\rm free}]$ 是自由的 BSCaM $_{
m IO}$ 的浓度。

在成像过程中,单个细胞在 CFP 通道(详见实验流程与实验材料)的平均荧光强度 S_{CFP} 与 $[S_b]$ 、 $[S_{free}]$ 的关系为:

$$S_{\text{CFP}} = a([S_{\text{b}}] + [S_{\text{free}}])$$
 (3)

式中: a 为成像设备参数,对于在同一设备上进行比对的不同实验结果而言,可以省略这一常数。

解离常数 K_a 为:

$$K_{\rm d} = \frac{[S_{\rm free}] [{\rm apoCaM}]}{[S_{\rm b}]}$$
 (4)

假定属于同一细胞系的细胞在相同培养条件下细胞内的 apo-CaM 总量是一定的 则:

$$[apoCaM] + [S_b] = C$$
 (5)

结合式(3)~式(5),可以解出[S_b],如下:

$$[S_{\rm b}] = \frac{\frac{1}{a}S_{\rm CFP} + K_{\rm d} + C - \sqrt{\left(\frac{1}{a}S_{\rm CFP} + K_{\rm d} + C\right) - \frac{4C}{a}S_{\rm CFP}}}{2}$$
(6)

由此 式(1) 中所有参量则都可以通过测量和计算获得。在实际的实验过程中,对处于同一状态的细胞系,采集多个细胞的数据。在得到多组数据的情况下,通过式(1) 对 FRET 比率 FR 和供体荧光

强度 S_{CFP} 进行最小二乘拟合,从而精确地还原出结合曲线。结合曲线以表征 FRET 比率 FR 为纵坐标,以表征 BSCa M_{IQ} 浓度 S_{CFP} 为横坐标。通过该结合曲线,可以准确计算出 apo-CaM 的浓度。

1.2 3D-FMT 成像平台上的实验设计

FRET 探针如何与三维荧光重建相结合一直是活体 FRET 检测领域的一大难点,主要原因有以下两点。

一是在已报道的活体 FRET 检测方法中,绝大多数使用的是非定量 FRET 方法^[7](如 pb-FRET、比例 FRET等) 这些方法无法准确计算出 FRET 无法对待测分子进行准确定量,因而不具备向活体检测领域推广的可能性。

二是 FRET 比率的三维重建是一项具有挑战性的工作^[8],由于所获得的荧光强度信息直接用于FRET 比率等重要参数的计算,所以对成像的精确性要求非常高。

首次在 FRET 探针实验中将定量效果最好的 3³ -FRET 算法与三维荧光透射成像(3D-FMT) 平台相结合 实现了 FRET 探针 BSCaM_{IQ}在仿体(准活体)上 FRET 比率的时空动态三维重建。

1.3 实验流程与实验材料

宽场荧光显微镜下的 FRET 检测采用 3³-FRET 方法中标准的 3 通道 3 样品的方式进行。3 通道分别为: CFP 通道 ,采用 CFP 激发波长 接收 CFP 发射波长 ,使用 440 nm 激发滤光片 ,480 nm 发射滤光片; FRET 通道 ,采用 CFP 激发波长 ,接收 YFP 发射波长 ,使用 440 nm 激发滤光片 ,530 nm 发射滤光片; YFP 通道 ,采用 YFP 激发波长 ,接收 YFP 发射波长 ,使用 488 nm 激发滤光片 ,530 nm 发射滤光片。3 样品分别为: 实验组(表达蛋白依据实验目的而定); CFP 单独对照组(单独表达 CFP); YFP 单独对照组(单独表达 YFP)。FR 的具体计算过程请参考文献 [6] 本篇不再赘述。

在 3D-FMT 平台上,采用相同参数的滤光片构建同样的三通道。为了实现三维重建,得到更多的空间分布信息,每次成像时,对样品进行了 12 个角度的 360°旋转成像,将 12 个角度下的 3³-FRET 计算结果进行重建,并最终得到三维水平的 FRET 分布(图 2)。

在活细胞实验中,以 pcDNA3.1 为载体 构建了 $BSCaM_{IQ}$ 质粒和 CaM 质粒。以 HEK293T 细胞系作 为表达体系 将质粒通过 lipo2000 试剂进行转染。

在 3D-FMT 成像中,以从细胞表达体系中纯化 出来的蛋白质为样本,表达方式与在活细胞中相同。

2 实验结果与分析

2.1 活细胞内 apoCaM 的定量分析

在实验中,使一组细胞单独表达 $BSCaM_{IQ}$,另一组细胞则共表达 CaM 和 $BSCaM_{IQ}$ 。 实验结果如图 1 (b) 所示: 红色的点和线表征了 $BSCaM_{IQ}$ 仅与细胞内源性的钙调素结合的情况,而黑色的点和线表征了在过表达钙调素情况下 $BSCaM_{IQ}$ 与钙调素的结合情况。通过新型计算拟合方法和拟合函数得到了两个重要的参数——完全无外源性apo-CaM 时 $BSCaM_{IQ}$ 的 FRET 比率指数 FR_{max} 和过表达时胞内 apo-CaM 的总浓度,分别为 $4.78~\mu mol/L$ 和 $11.45~\mu mol/L$ 从而实现了对 apo-CaM 浓度的精确定量。

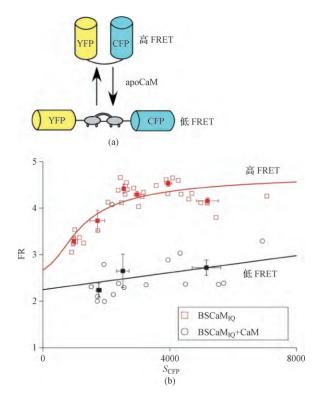


图 1 $BSCaM_{IQ}$ 在有或无外源性钙调素情况下 与 CaM 的结合曲线

Figure 1 Binding curve of $BSCaM_{IQ}$ and CaM with or without exogenous CaM overexpression

2.2 3D 载体成像实验结果

如图 2(a) 所示,FMT 成像平台由多部分构成,核心部分为一个可旋转的成像平台,其中放置一个装满脂肪乳的容器,样品装入内径为4mm的细管,插入到脂肪乳中,以模拟真实生物体中组织的光学

特性(iv)。其他部分则是处于光路前端的氙灯光源(i)和激发滤光片(ii,iii),及光路后端的接收滤光片(v)及CCD相机(vi),所有部分都由电脑程序进行控制(vii)。

为了探究在实际活体成像中是否可以用上述FRET 方法定量区分出自由 apoCaM 的高低 在进行单个样品管三维重建的基础上 ,尝试在脂肪乳中同时插入两个样品管 [图 2(b)],并在其中一个管子中加入了过量的钙离子。在进行完一次成像后 将两个管子调换位置 ,以避免因位置因素引入的干扰。并测试在两次成像(时间变化)及位置不同(空间变化)的情况下该方法是否稳定。

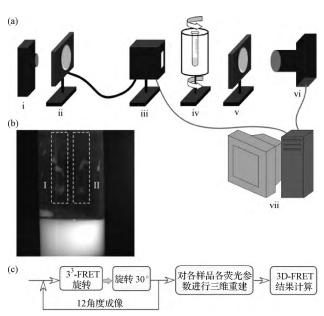


图 2 FMT-FRET 系统组成及基于 3³-FRET 算法的 3D-FR 三维重建步骤

Figure 2 The system and procedure of FMT-FRET based on 3³-FRET method

实验结果如图 3 所示。为了验证三维荧光重建效果,首先只在脂肪乳的中心位置插入一个单独的管子。采用从细胞表达体系中提取出的 BSCaM_{IQ}蛋白 将其与缓冲液混合均匀,加入到管子中,并按上述流程进行成像、计算与 FRET 比率 FR 的三维重建。最终得到该管子在三维空间上的 FR 分布,如图 2(a) 所示。依据每个视野内测得的 BSCaM_{IQ}的最大 FR 值,对每个重建单元(单个三维像素点)的FR 进行归一化处理,红色表示高 FR,而蓝色表示低FR。从三维分布来看,FR 在样品中分布较为均匀。

并且抽取三维重建结果的一个截面进行观察,如图 3(b) 所示。

接下来是对 FRET 探针定量效果进行测试。将从细胞提取出的 $BSCaM_{IQ}$ 蛋白与 CaM 蛋白混合均匀 加入两个样品管中,分别放在位置 I 和位置 II 处。首先,仅向 I 位置处的管子加入大量的钙离子,而 II 位置处的管子则仅加入能够螯合钙离子的缓冲液 结果如图 3(c) 所示。 II 位置处的样品管呈现低 FRET,这是由于样品管中存在过量的 CaM,且由于缺少钙离子与其结合而处于自由状态 (apo-CaM),过量的 apo-CaM 与 $BSCaM_{IQ}$ 相结合,因此样品表现为低 FRET。而 I 位置处的管子由于加入了过量的钙离子,钙离子与 CaM 相结合,失去与 $BSCaM_{IQ}$ 的结合能力,使其从 $BSCaM_{IQ}$ 上解离, $BSCaM_{IQ}$ 恢复到非结合状态,因此表现为高 FRET。

图 3(d) 为图 3(c) 调换位置后的结果,I 位置处为之前加入大量钙离子的管子,可以看到其依旧表现为高 FRET。而图(b) II 位置处为之前未加入钙离子的管子,可以看到其依旧表现为低 FRET。

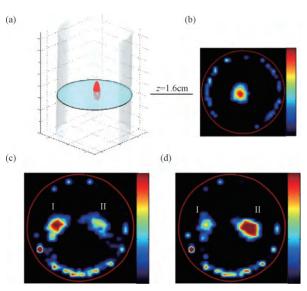


图 3 混合 BSCaM_{IQ}及 CaM 的样本在 FMT-FRET 平台上的 3D-FR 三维重建

Figure 3 Reconstruction results of the mixture of $BSCaM_{IO} \ and \ CaM \ by \ FMT-FRET$

以上结果表明 ,FRET 探针 BSCaM_{IQ}经三维重建 后的 FR 符合实际情况(设定的 apoCaM 浓度) 在两 次成像(时间变化)和位置不同(空间变化)的情况 下依然能稳定地计算出正确结果。在活体细胞/组 织中如果结合图 1 做进一步的分析可以根据 FR 计算得到 free apoCaM 在不同时空条件下的浓度。因此 .该方法基本实现了 FRET 探针在三维水平上对目标分子的时空动态进行检测 ,是进一步进行活体实验的基本原型(proof-of-concenpt)。

3 讨论

本文提出的新型 FRET 探针拟合计算方法具有非常好的定量效果,可以准确计算得到 FRET 比率 FR,并可以通过计算 FR 对多个处于同一状态的细胞 FR 及供体荧光强度进行拟合,计算出该状态下细胞内 CaM 的准确浓度。

对比于现有的对 FRET 探针的计算方式^[9-11],本计算方法可以很大程度上减少假阳性结果发生的可能性^[12-13],对定量能力有较大提升。

当然 在实际的实验过程中,也存在诸多需要解决的问题。最关键的就是计算 FR 时,单独供体对照组、单独受体对照组与实验组这 3 组细胞的状态很难保持一致,成像参数(如荧光强度、数值孔径等)也有可能发生变化,因此,还需要寻找定量效果更佳的 FRET 方法,来实现对 FRET 比率更准确的计算。基于 3³-FRET 算法的三维 FRET 比率重建方法,在 FMT 平台上较好地实现了对 FRET 比率 FR 的三维重建与还原,按照之前的拟合方法,通过三维的 FR 分布,就可以准确回算出 apo-CaM 的浓度分布信息,并在此基础上进一步实现时空动态检测,提供了一套可行并可靠的定量解决方案。

4 结论

本文工作解决了 FRET 探针在活体定量分子影像中的两个关键问题,初步实现了时空动态定量计算 在接下来的工作中 希望借助 FMT 平台,具体实现在活体水平上对重要生理参数的时空动态检测。

总之,本文工作具有明确和广阔的应用前景,在 FRET 探针活体分子影像检测领域具有推广价值。 相关的完善和验证实验有待于在下一步的工作中加 以实现。

致谢: 感谢清华大学刘晓冬实验室(X-Lab) 全体成员给予的帮助、建议和支持。

参考文献

- [1] Chen TW, Wardill TJ, Sun Y, et al. Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity [J]. Nature, 2013, 499 (7458): 295-300.
- [2] Berney C, Danuser G. FRET or no FRET: a quantitative comparison [J]. Biophys Journal, 2003, 6(84): 3992-4010.
- [3] Persechini A , Cronk B. The relationship between the free concentrations of Ca²⁺ and Ca²⁺-calmodulin in intact cells[J]. J Biol Chem , 1999 , 11(274): 6827-6830.
- [4] Liu X , Yang PS , Yang W , et al. Enzyme-inhibitor-like tuning of Ca²⁺ channel connectivity with calmodulin [J]. Nature , 2010 , 463(7283): 968-972.
- [5] Mank M, Reiff DF, Heim N, et al. A FRET-based calcium biosensor with fast signal kinetics and high fluorescence change [J]. Biophys Journal, 2006, 5(90): 1790-1796.
- [6] Erickson MG, Alseikhan BA, Peterson BZ, et al. Preassociation of calmodulin with voltage-gated Ca(2+) channels revealed by FRET in single living cells [J]. Neuron, 2001, 6(31): 973-985
- [7] Mallik S, Mastrianni JA. Donor photobleaching fluorescence energy transfer (pbFRET) can be used to predict the intermolecular determinants for prion propagation [J]. 38th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2008, 38(1): 22-23.
- [8] Zhang Y, Cao X, Xu YY, et al. Tomographic imaging of ratiometric fluorescence resonance energy transfer in scattering media [J]. Applied Optics, 2012, 51(21): 5044-5050.
- [9] Ma L, Yang F, Zheng J. Application of fluorescence resonance energy transfer in protein studies [J]. Journal of Molecular Structure, 2014, 1077: 87-100.
- [10] Erickson MG, Alseikhan BA, Peterson BZ, et al. Preassociation of calmodulin with voltage-gated Ca(2+) channels revealed by FRET in single living cells [J]. Neuron, 2001, 31(6): 973-985.
- [11] Shibata AC, Maebashi HK, Nakahata Y, et al. Development of a molecularly evolved, highly sensitive CaMKII FRET sensor with improved expression pattern [J]. PloS One, 2015, 10 (3): e0121109.
- [12] Gordon GW, Berry G, Liang XH, et al. Quantitative fluorescence resonance energy transfer measurements using fluorescence microscopy [J]. Biophysical Journal, 1998, 74(5): 2702-2713.
- [13] Kenworthy AK. Imaging protein protein interactions using fluorescence resonance energy transfer microscopy [J]. Methods , 2001 24(3): 289–296.

(2016-04-17 收稿 2016-06-24 修回)