

基于光谱分离的定量荧光共振能量转移检测

尹傲^{1,2}, 陈同生^{1,2*}

¹华南师范大学生物光子学研究院教育部激光生命科学重点实验室, 广东 广州 510631;

²华南师范大学生物光子学研究院广东省激光生命科学重点实验室, 广东 广州 510631

摘要 由于天然克服光谱串扰的能力以及高灵敏和无损伤的特性, 基于光谱分离的荧光共振能量转移(FRET)定量检测(spFRET)方法被公认为是最有应用潜力的活细胞定量 FRET 检测技术。首先简要介绍 FRET 定量检测方法以及国内外的相关研究进展; 其次重点介绍基于发射光谱线性分离(Em-unmixing)和基于激发发射光谱线性分离(ExEm-unmixing)的两种定量 FRET 检测技术的原理、发展进程, 并比较了这两种检测技术的稳健性; 最后对这两种 spFRET 技术在活细胞 FRET 应用中的潜在优势进行展望。

关键词 生物光学; 荧光共振能量转移; 光谱分离; 定量荧光共振能量转移测量; 活细胞

中图分类号 Q631

文献标志码 A

doi: 10.3788/CJL202047.0207009

Quantitative Fluorescence Resonance Energy Transfer Measurement Based on Spectral Unmixing

Yin Ao^{1,2}, Chen Tongsheng^{1,2*}

¹Key Laboratory of Laser Life Science, Ministry of Education, College of Biophotonics, South China Normal University, Guangzhou, Guangdong 510631, China;

²Guangdong Key Laboratory of Laser Life Science, College of Biophotonics, South China Normal University, Guangzhou, Guangdong 510631, China

Abstract Owing to its inherent ability to overcome the spectral crosstalk, high sensitivity, and non-destructivity characteristic, fluorescence resonance energy transfer (FRET) quantitative measurement (spFRET) method based on spectral unmixing has been generally regarded as the most promising approach of live-cell FRET measurement. This paper first briefly introduced the quantitative FRET measurement method and the related research advances on FRET technology. Second, the principle, development process, and robustness of spFRET based on linear separation of emission spectra (Em-unmixing) and linear separation of excitation emission spectra (ExEm-unmixing), respectively, were introduced. Finally, the potential advantages of the two spFRET technologies in live-cell FRET applications was also provided and discussed.

Key words biotechnology; fluorescence resonance energy transfer; spectral unmixing; quantitative fluorescence resonance energy transfer measurement; living cell

OCIS codes 170.2520; 170.1790; 300.1030; 300.2140; 300.2530

1 引 言

荧光共振能量转移(FRET)是一种处于激发态的供体(d)分子通过偶极子间的相互作用将部分能量以非辐射的形式转移给邻近处于基态的受体(a)分子的非辐射的退激过程^[1-2]。供、受体之间发生 FRET 的程度一般采用 FRET 效率来表征。FRET

效率 E 定义为供体转移给受体的能量占供体发射总能量的比例, 表示为供体能量的转移程度。根据 Förster 理论, $E = 1/[1 + (r/R_0)^6]$, 其中 R_0 是 Förster 半径, r 是 E 等于 50% 时供、受体间的空间距离。 R_0 与供体的发射光谱和量子产率、受体的吸收光谱和消光系数、介质的折射率以及供、受体间的空间取向有关。根据 Förster 理论, r 即使有微小的

收稿日期: 2019-10-08; 修回日期: 2019-11-08; 录用日期: 2019-11-26

基金项目: 国家自然科学基金(6152782, 81471699)

* E-mail: chentsh@sncu.edu.cn

变化也会对 E 值产生较大的影响。FRET 效率 E 在 r 处于 $0.5R_0 \sim 2R_0$ 时能表现出较好的线性特性。大部分供、受体分子之间的 R_0 为 $1 \sim 15$ nm, 这个距离恰好属于蛋白分子和生物膜厚度的尺度范围^[3], 因此 FRET 也被称为“分子尺”^[4]。FRET 过程能导致供、受体的光谱红移, 因此 FRET 技术也被称为光谱尺。

FRET 技术已经被国内外的科研工作者广泛应用于在活细胞中, 以研究核蛋白机制、细胞外基质、生物膜功能、信号传导、细胞凋亡、细胞骨架等生化事件。在实际应用中, 特别是在生物领域的应用中, 主要是通过测量供、受体之间的 FRET 效率来反映分子构象变化^[5]、分子之间的相互作用^[6-8]、离子浓度^[9-10]、蛋白激酶活性^[11]等。Mochizuki 等^[12]利用 FRET 技术研究了细胞内 Ras 和 Rap1 的激活机制。Verveer 等^[13]基于 FRET 技术研究细胞膜局部受刺激后, 膜受体活化的横向扩散效应。Miyawaki 研究小组^[14]基于 FRET 技术首次证实了细胞凋亡线粒体中 Caspase-3 酶的激活是一个非常快速的过程。2009 年, 厦门大学单光存课题组^[15]研究了光学微腔机制对单分子对 FRET 实验的影响, 发现当供体分子被一束强激光激发但受体分子的自发辐射衰减太慢时, 光学微腔机制可以用来放大单分子对的荧光信号。因此, 在腔体中进行单分子对共振能量转移实验可以提高相应的分子荧光信号, 得到更高的时间分辨率。太原理工大学邱诚玉团队^[16]制备了高品质因子的 Fabry-Perot 光学微腔, 该结构结合光微流控技术, 利用三种荧光染料作为增益介质, 实现了低阈值的级联 FRET 光微流激光的产生, 可极大地降低光微流激光产生的阈值, 提高激光产生过程中的转换效率, 同时可在单一泵浦源的情况下, 把激光发射波长向长波长方向扩展。福建师范大学利用基于光谱仪的双光子激发的发射光谱线性分离方法测定了活细胞中受体与供体的截面比^[17], 实验结果表明, 在 $700 \sim 790$ nm 的激发波长范围内受体与供体的吸收截面比随激发波长的增大而减小, 在 $790 \sim 960$ nm 的激发波长范围内受体与供体的吸收截面比随激发波长的增大而增大。江苏大学 He 团队^[18]于 2018 年提出一种基于 FRET 原理的针对多巴胺的灵敏探测的新型荧光探针, 该探针可实现多巴胺的可视化检测。Patowary 等^[19-20]利用高斯 FRET 光谱法分析技术发现荧光蛋白标记的 M3Rs(毒蕈碱 M3 乙酰胆碱受体)可作为稳定的二聚体复合物, 其很大一部分因动态相互

作用而形成四聚体, 不存在三聚体、五聚体及六聚体等。Mishra 小组^[21]揭示了在 37 °C 下, 在中国仓鼠卵巢(CHO)细胞中表达的视蛋白会以各种大小寡聚体的形式存在, 在较低浓度的受体下, 视蛋白为二聚体或四聚体, 且四聚体呈近菱形, 在较高浓度的受体下, 视蛋白开始形成更高级的低聚物。Singh 小组^[22]在最近的一项研究中, 利用高斯 FRET 光谱法分析技术研究细菌 ABC 转运蛋白 Wzm 和 Wzt 亚基的寡聚化, 发现 Wzm 和 Wzt 亚基形成的寡聚体与正方形四聚体模型预测的一致。

定量 FRET 检测是学术交流以及准确解释 FRET 信号科学内涵的必然要求^[23]。FRET 定量检测主要有两个关键难点: 1) 光谱串扰; 2) 参与 FRET 作用的供体与受体对所占整个荧光基团的比例。由于供体发射光谱和受体吸收光谱有较大部分重叠是 FRET 产生的前提条件, 因此供、受体之间的光谱串扰很难避免^[24]。光谱串扰主要包括激发光谱串扰(即激发供体的同时激发了部分受体)和发射光谱串扰(即供体发射串扰到受体发射通道)。

由于供体和受体的光谱差异性, 根据光谱的线性叠加原理, 光谱线性分离技术显然可以用于供、受体光谱的分离。Robert 等^[25]于 1992 年提出利用光谱分离的原理来测量的观点, 其基本思想是通过线性分离得到供体与受体的发射荧光强度比率, 以衡量 FRET 相互作用的程度。早期的光谱分离方法都是半定量的方法, 即光谱比率的方法(spectral ratio), 得到的结果只能定性地说明 FRET 相互作用的程度, 这就造成了在不同仪器和不同方法甚至不同的测量环境下测量的结果不能进行相互交流与比较^[26]。随着光学器件与光学技术的进步, 基于光谱法的 FRET 定量检测技术日渐成熟。清华大学黄国亮团队^[27]于 2009 年利用基于荧光强度的三通道定量 FRET 检测技术对溶液和微阵列中双链 DNA 的样品进行了准确、全面的定量测量。该课题组通过确定供体串扰因子 R_d 、受体串扰因子 R_a 和系统校正因子 G , 提出了适用于双色微阵列实验系统的 FRET 校正方法, 该方法为基于 DNA 微阵列技术的基因表达谱提供了更可靠的分析基础^[28-29]。该研究小组于 2017 年发展了一种基于高光谱干涉的无荧光标记法, 使用加权相位算法对 DNA 微阵列上纳米尺度分子间的相互作用进行定量测量, 并使用基于荧光强度的三通道定量 FRET 方法对发展的新方法进行了验证^[30]。Schaaf 团队^[31]开发了一种可以在真实的高通量筛选(HTS)条件下记录

完整的荧光发射光谱的微平板光谱探测器,并结合光谱的线性分离技术实现了活细胞快速和灵敏的定量 FRET 测量。Arsenovic 团队^[32]提出了一种不需要额外参考样本校正,基于激发和发射光谱显微成像的定量 FRET 检测方法(SensorFRET),由于不需要额外的校准图像,且不依赖于激光功率和增益设置,该方法的每幅图像可以独立调整,以实现最佳的成像条件。而近年出现的高斯 FRET 光谱法作为一种单分子灵敏度的荧光成像技术,为确定蛋白质复合物中原子(即四级结构)的化学计量和相对构型提供了必要的工具^[33-34]。基于光谱分离的定量 FRET 检测技术丰富了目前可用于在活细胞领域内的进行定量生物化学研究的工具包,而基于光谱检测和线性分离的定量 FRET 检测技术有望成为活细胞定量 FRET 检测的主要技术^[35]。本文分别介绍了基于发射光谱线性分离(Em-umixing)和基于激发发射光谱线性分离(ExEm-umixing)的定量 FRET 检测技术的原理、发展进程和技术特点。

2 基于发射光谱线性分离的定量 FRET 测量方法

基于发射光谱线性分离的定量 FRET(Em-spFRET)测量方法是将 FRET 样本分别在两个不同波长的光激发下收集到的发射光谱按照供体的发射光谱、受体的发射光谱和自发荧光的发射光谱进行线性分离^[36-38]。

$$S_M^i(\lambda) = W_D^i S_D(\lambda) + W_A^i S_A(\lambda) + W_Z^i S_Z(\lambda), \quad (1)$$

式中: λ 为激发光的波长; $i = 1, 2$, 表征第 i 个不同波长的激发光; $S_D(\lambda)$ 、 $S_A(\lambda)$ 和 $S_Z(\lambda)$ 分别为供体、受体和自发荧光的指纹发射光谱(也被称为基矢发射光谱); W_D^i 、 W_A^i 和 W_Z^i 分别为对应三个基矢的线性分离权重系数;下标 D 、 A 、 Z 、 M 分别为参与计算的供体浓度、受体浓度、自发荧光浓度、供受体 FRET 结合对浓度。

根据供体和受体的发射光谱差异性,Em-spFRET 测量方法可以直接消除供体发射串扰。但由于直接激发受体的发射光谱与敏化受体的发射光谱谱型一致,Em-spFRET 测量方法仍然不能直接消除直接激发串扰。为解决这一问题,在 Em-spFRET 测量过程中需要通过一个受体样本事先测量特定条件下的激发串扰系数,以作为系统修正因子来消除激发串扰^[39]。

基于双激发光激发的 Em-spFRET 测量方法主

要分为 5 个步骤:1)校正光学系统;2)测量供体、受体和自发荧光的基矢发射光谱 $S_D(\lambda)$ 、 $S_A(\lambda)$ 和 $S_M(\lambda)$;3)测量系统校正因子;4)分别采用两个激发光激发 FRET 样本受体发射光谱,然后利用(1)式进行线性分离获得权重系数;5)根据步骤 2)~4)测量的结果,计算 FRET 效率 E 和供、受体间的浓度比 R_C 。

根据对自发荧光处理方式的不同可以将 Em-spFRET 测量方法分为 2 类,即直接扣减自发荧光的 Em-spFRET 测量方法和将自发荧光作为基矢光谱进行线性分离的 Em-spFRET 测量方法。

2.1 直接扣减自发荧光的 Em-spFRET 测量方法

直接扣减自发荧光的 Em-spFRET 测量方法一般适用于自发荧光很弱的细胞,例如宫颈癌 HeLa、肝癌 HepG2 和 Huh-7 等细胞系^[40-42]。对于这类细胞系,一般事先测量多组未转染质粒的空白细胞分别在两个激发光激发下的荧光发射光谱,以此作为平均背景值,并在后期的光谱探测中统一扣除^[43-46]。此时(1)式变为

$$S_Z^i(\lambda) = W_D^i S_D(\lambda) + W_A^i S_A(\lambda). \quad (2)$$

Thaler 研究小组^[43]于 2005 年提出一种 Em-spFRET 测量方法(sRET 方法),该方法中的基矢发射光谱是通过激发纯荧光蛋白测量得到的荧光光谱。sRET 方法中的基矢发射光谱 $S_D(\lambda)$ 和 $S_A(\lambda)$ 分别利用单位浓度纯化供体荧光蛋白和受体荧光蛋白的发射光谱测量得到。由于荧光发射光谱依赖于激发光强度、激发光波长以及系统参数,该方法每次进行定量检测时一般都需要重新测量供体和受体的基矢发射光谱。而荧光基团所处的生理环境不同,活细胞中荧光蛋白的光谱性质可能发生改变,因此 sRET 方法可能不适用于活细胞定量 FRET 检测。

为避免纯荧光蛋白与细胞内表达荧光蛋白之间光学特性的差异,2008 年,Włodarczyk 等^[44]提出另一种通过分别测量单转供体和受体细胞的荧光光谱并以其作为基矢光谱的 Em-spFRET 测量方法(lux-FRET 方法)。研究表明,在不同水平供体和受体的不同细胞系中测得的归一化发射光谱是一致的,这就证明荧光蛋白的发射光谱是非常稳定的^[46-48]。每次实际测量得到的供体和受体基矢光谱强度不仅依赖于激发光强度,还依赖于供体和受体的表达水平,因此光谱线性分离得到的权重系数以及权重系数之比严重依赖于每次测量得到的基矢光谱,这就意味着每一次实验都必须对基矢光谱进行重新测量。

lux-FRET 方法以单转供体和受体的活细胞为参考样本,将在两个不同激发光激发下得到的供体的发射光谱和受体的发射光谱作为基矢光谱 $S_D(\lambda)$ 和 $S_A(\lambda)$ 。在保证单转受体样本和 FRET 样本测量条件相同的情况下, lux-FRET 方法引入特定波长激发光激发下的供体与受体的激发比率 $r^{\text{ex},i}$ 来消除直接激发串扰。 $r^{\text{ex},i}$ 的表达式为

$$r^{\text{ex},i} = \frac{Q_a S_A(\lambda) e_A(\lambda)}{Q_d S_D(\lambda) e_D(\lambda)}, \quad (3)$$

式中: Q_a 和 Q_d 分别为受体和供体的量子产额; $e_A(\lambda)$ 与 $e_D(\lambda)$ 分别为供体与受体按面积归一化的发射光谱; ex 表示激发。对两个不同波长激发光激发下得到的两个 FRET 样本光谱进行光谱线性分离,得到 4 个权重因子后, FRET 样本的效率 E_{f_D} 、 E_{f_A} 和受、供体的浓度比 R_C ^[44] 为

$$E_{f_D} = \frac{W_A^2 - W_A^1}{(r^{\text{ex},2} - r^{\text{ex},1})W_D^1 + W_A^2 - W_A^1}, \quad (4)$$

$$E_{f_A} = \frac{D^{\text{ref}}}{A^{\text{ref}}} \frac{W_A^2 - W_A^1}{W_A^1 r^{\text{ex},2} - W_A^2 r^{\text{ex},1}}, \quad (5)$$

$$R_C = \frac{A^{\text{ref}}}{D^{\text{ref}}} \frac{W_A^1 r^{\text{ex},2} - W_A^2 r^{\text{ex},1}}{(r^{\text{ex},2} - r^{\text{ex},1})W_D^1 + W_A^2 - W_A^1}, \quad (6)$$

式中: ref 表示参照样本; f_A 是用 3³-FRET 法确定的 FRET 效率,与敏化发射受体和直接激发受体的比例成正比; f_D 为用 E-FRET 方法计算的 FRET 效率。为了确定 FRET 样本的受体与供体的浓度比,需要确定参照样本的受体与供体浓度比 $\frac{D^{\text{ref}}}{A^{\text{ref}}}$ 。该浓度比可利用一个已知供、受体浓度比的标准质粒,通过光谱线性分离后由(5)式获得。

由于 lux-FRET 方法中对 FRET 样本光谱进行线性分离的基矢光谱也是未归一化的供、受体发射光谱,且用于校正激发串扰的受、供体激发比率 $r^{\text{ex},i}$ 与特定实验仪器设置下的激发光强度和供、受体的吸收光谱特性相关,因此利用 lux-FRET 方法进行定量测量,需要同时准备供体单独表达、受体单独表达以及供、受体连接结构的样本,并且所有测量样本的激发光的强度、系统设置和探测系统的设置必须保持一致。由于各个细胞中荧光蛋白的表达水平存在差异,尤其是在细胞图像中各个像素上对应的荧光强度也不同,在相同的成像条件下无法灵活地改变成像参数。这些严格的限制条件使得该方法在活细胞的动态应用中难以快速而准确地测量 FRET^[44]。

为了在最佳的成像条件下进行 FRET 定量检

测,陈同生研究小组^[45]于 2015 年发展了一种不依赖于激发光强度和探测器增益系数的 Em-spFRET 测量方法(Iem-spFRET 方法),该方法克服了所有测量样本的成像条件必须保持相同这一严格限制。Iem-spFRET 方法将单独表达供、受体的活细胞的测量得到的发射光谱按面积归一化后的光谱作为基矢发射光谱 $S_D(\lambda)$ 和 $S_A(\lambda)$ 。由于基矢发射光谱为面积归一化的发射光谱,不同的激发光强度只影响线性分离得到的权重大小而不影响权重之间的比值。

Iem-spFRET 方法定义供体在第 i 个激发光激发下供体与受体的权重比为 $\delta^i = \frac{W_D^i}{W_A^i}$,通过预先测量一个 FRET 效率已知的串联结构 FRET 样本来测量供体与受体的消光系数比 $\gamma(\lambda_{\text{ex}}^i)$ 。 $\gamma(\lambda_{\text{ex}}^i)$ 与 lux-FRET 方法中供体与受体的激发比率 $r^{\text{ex},i}$ 的关系式^[45]为

$$\gamma(\lambda_{\text{ex}}^i) = \frac{\varepsilon_A(\lambda_{\text{ex}}^i)}{\varepsilon_D(\lambda_{\text{ex}}^i)} = \frac{Q_D - Q_A E \delta^i - E Q_D}{Q_A \delta^i} = r^{\text{ex},i} \frac{D^{\text{ref}}}{A^{\text{ref}}}, \quad (7)$$

式中: FRET 效率 E 可以通过部分受体光漂白法^[47-49]或荧光寿命法^[50]等 FRET 定量检测方法测量得到; $\varepsilon_A(\lambda_{\text{ex}}^i)$ 和 $\varepsilon_D(\lambda_{\text{ex}}^i)$ 分别为特定激发波长 λ_{ex}^i 下的受体消光系数和供体消光系数。特定激发波长下的 $\gamma(\lambda_{\text{ex}}^i)$ 不受激发光强度和供、受体的荧光团浓度影响。由于基矢光谱和消光系数比都不依赖于激发光强度和探测器增益,因此 Iem-spFRET 方法不依赖于激发光的强度和探测器增益。故在实际测量过程中,可以通过调节激发光强度和探测器增益获得最佳的成像,在此条件下进行定量 FRET 成像,能提高活细胞定量检测的成功率^[45]。

在定量 Iem-spFRET 检测过程中,校正光学系统、测量供受体的归一化发射光谱和测量供受体的消光系数比 $\gamma(\lambda_{\text{ex}}^i)$ 这 3 个步骤一旦完成就不再需要重复操作。在荧光表达比较弱的情况下, Iem-spFRET 方法也可以通过调整仪器中与强度相关的参数,从而采集到较好的光谱图像,极大地提高了实验的成功率。

sRET、lux-FRET 和 Iem-spFRET 方法都是属于直接从原始光谱中扣除自发荧光的 Em-spFRET 测量方法。由于不同的激发光强和不同细胞之间的背景光有所差异,对相较于 FRET 结构的荧光、背景荧光和自发荧光较弱的细胞系,采用统一扣除未转质粒细胞的平均背景来测量是可行的^[43-45]。但是

对于自发荧光很强的细胞系,采用直接扣除的方法会导致测量结果存在偏差^[39],事实上,在精确的 FRET 定量中,自发荧光在荧光较弱的细胞中是不能被忽略的。研究表明,用 488 nm 波长激发可以在 Huh-7 细胞中产生较强的自发荧光,而且植物细胞很容易产生自发荧光^[41]。因此自发荧光的发射光谱作为基矢光谱参与到线性光谱分离中,理论上可以进一步提高 Em-spFRET 测量方法的稳健性^[42]。

2.2 将自发荧光作为基矢光谱的 Em-spFRET 测量方法

对于自发荧光很强的细胞系,例如人胚肾成纤维细胞株 293 (HEK293) 细胞^[51],由于细胞自发荧光的差异性很大,将自发荧光作为背景值直接扣减的方法不再适合活细胞定量 FRET 检测^[41,45]。对于这类细胞系,在利用 Em-spFRET 测量方法进行 FRET 定量测量过程中,待测样本在两个不同波长的激发下分别得到面积归一化的供体发射光谱 $S_D(\lambda)$ 和受体发射光谱 $S_A(\lambda)$,在同样成像设置条件下,从未转染荧光蛋白 (FPs) 的细胞中测得的细胞的背景和自发荧光的发射光谱按单位面积归一化得到 $S_M^i(\lambda)$ 。

Levy 等^[39]于 2011 年提出一种通过限制一个激发波长选择性激发受体的 Em-spFRET 方法 (Sp-FRET),该方法需保证待测 FRET 样本和单受体样本的测量条件相同,以此来消除受体直接激发串扰。该方法以归一化的供体、受体和自发荧光的发射光谱为基矢,并通过单独表达受体的参考样本光谱的线性分离权重系数来确定直接激发串扰的比例。该比例表达式为

$$X_{SF} = \frac{W_A^1}{W_A^2}, \quad (8)$$

式中: X_{SF} 为直接激发串扰系数。那么, FRET 样本中受体敏化发射信号 X_{SE} 为

$$X_{SE} = (W_A^1 - W_A^2) \times X_{SF}. \quad (9)$$

则样本的 FRET 效率与受体、供体的浓度比^[39]为

$$E = \frac{X_{SE} \times Q_d}{X_{SE} \times Q_d + W_D^1 \times Q_a}, \quad (10)$$

$$R_C = P_{AD} \times \frac{W_A^2 \times Q_d}{X_{SE} \times Q_d + W_D^1 \times Q_a}, \quad (11)$$

式中: $P_{AD} = K_A / K_D$ 为受体与供体的消光系数和之比,可以由一个只含有一个供体和一个受体的连接结构的标准质粒来确定^[48]。由于 P_{AD} 与供、受体的

吸收光谱特性和成像设置参数有关,因此当测量系统发生改变时需要重新测量。光学参数的精密校准和基于光谱分离方法的多次迭代和表征使得 Sp-FRET 方法具有高灵敏度和良好稳健性,能够校准消除自发荧光和背景光的影响。

在 Iem-spFRET 方法的基础上,陈同生研究小组^[45]于 2015 年将细胞自发荧光作为光谱分离的一个基矢分量,提出改进型的 Em-spFRET 方法 (IIem-spFRET 方法)。相对于 Sp-FRET 方法,IIem-spFRET 方法能解除定量检测对激发光强度和探测器增益等系统参数的依赖。该方法利用两个激发波长处 (λ^1, λ^2) 的 δ^1, δ^2 , 确定 E 和受、供体浓度比 R_C , 又引入激发光 λ^1, λ^2 所对应的受、供体消光系数比的比值 (ρ)。通过单转供体和受体的样本测量出两种激发波段下对应的消光系数比的比值 $\rho = \frac{\gamma^2}{\gamma^1}$, 得到 ρ 就可以求出待测样本的 FRET 效率^[45], 即

$$E = \frac{\delta^2 \rho - \delta^1}{\delta^1 \delta^2 (\rho - 1) (Q_A / Q_D) + \delta^2 \rho - \delta^1}, \quad (12)$$

$$R_C = \frac{(\delta^1 - \delta^2) / \gamma^1}{\delta^1 \delta^2 (\rho - 1) (Q_A / Q_D) + \delta^2 \rho - \delta^1}, \quad (13)$$

式中: γ^1 只用来确定待测样本受、供体的浓度 R_C , 对于特定的供受体对和光学系统 γ^i 和 ρ 的值是恒量。因此 γ 值仅需用一个 FRET 效率未知的 FRET 质粒来确定。

一方面,相对于 Iem-spFRET 方法,IIem-spFRET 方法在进行光谱线性拟合时也将细胞的背景光和自发荧光的归一化发射光谱作为光谱线性分离的基矢光谱,从而消除了由不同背景细胞的荧光产生的干扰,增加了抗干扰的能力;而且 Iem-spFRET 方法不依赖于其他定量 FRET 检测方法就能得到 γ , 使得 γ 的光学测量更加简单、快速,同时也降低了对系统的配置要求。尽管受体光漂白法是 FRET 定量测量最为直接的方法^[52-55], 过程较为简单,但是对受体的光漂白程度要求较为严格,需要熟练的实验操作,并且整个测量时间较长。漂白前后光的波动性、细胞的流动性和细胞受到光漂白的损伤都可能对测量的结果产生影响^[6,42,48-49]。另一方面,相较于 Sp-FRET 方法,IIem-spFRET 方法能解除所有测量样本的成像条件必须保持相同这一严格限制,只需对实验样本进行直接测量。基于稳定性和抗干扰性,IIem-spFRET 方法能够拓展 FRET 显微术在细胞生物学领域的应用范围。

3 基于激发发射光谱线性分离的定量 FRET 测量方法

因为供体和受体的发射光谱有着明显的差异, Em-spFRET 方法可以轻松地将 FRET 样本中供体的荧光和受体的荧光(敏化荧光)分离。但遗憾的是,受体激发串扰使得分离出来的受体荧光(敏化荧光)中包含了直接激发受体的荧光,这一问题成为 Em-spFRET 方法中定量 FRET 测量的主要障碍^[25]。与 Em-umixing 的原理类似,由于供体和受体的激发光谱(或称吸收光谱)也不同,因此从原理上通过对供体和受体激发光谱的线性分离也可以解析 FRET 信号^[25]。由于早期缺乏有效激发荧光基团的多个波长的激发光,基于激发发射光谱线性分离的方法(ExEm-spFRET 方法)并未在 FRET 定量检测领域中得到广泛应用^[56]。显然,供体和受体的激发发射光谱以及供受体敏化的激发发射光谱是完全不一样的^[43],因此 ExEm-spFRET 方法具有天然分离供体、受体和供受体激发发射光谱的能力,可解决光谱串扰的问题^[57]。

Ecker 小组^[58]于 2004 年首次提出利用三个不同强度值的激发发射矩阵进行定量 FRET 测量的方法,但该方法实际上仍然是基于 Em-umixing 的思想。Corry 小组^[57]于 2013 年首先提出了利用激发光谱和发射光谱联合线性分离方法进行定量 FRET 检测的思想,并首次在 405 nm 和 488 nm 激发波长的激光扫描共焦显微镜上实现基于激发发射光谱线性分离(ExEm-unmixing)的定量 FRET 测量。与 Em-spFRET 处理基矢光谱的原理类似,早期部分 ExEm-spFRET 方法也是采用直接扣除平均背景值的方法来减小测量误差^[49,55],因此将自发荧光和背景光作为激发发射光谱指纹参与到线性光谱分离中,理论上可以进一步提高 ExEm-spFRET 方法的稳健性^[35]。

ExEm-spFRET 方法将 FRET 样本的激发发射光谱 $S_Z(\lambda_{ex}, \lambda_{em})$ 线性分离为供体的激发发射光谱 S_D 、受体的激发发射光谱 S_A 、供受体敏化的激发发射光谱 S_S 和自发荧光的激发发射光谱 S_M 4 个部分^[38],其中下标 em 表示发射的荧光。

$$S_Z(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) = W_D S_D(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) + W_A S_A(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) + W_S S_S(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) + W_M S_M(\lambda_{ex}, \lambda_{em}), \quad (14)$$

式中: W_D 、 W_A 、 W_S 、 W_M 分别为对应 4 种光谱成分的线性分离权重系数^[57]。激发发射光谱指纹的表达式为

$$\begin{cases} S_D(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) = S_D^{ex} \otimes S_D^{em} \\ S_S(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) = S_D^{ex} \otimes S_A^{em} \\ S_A(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) = S_A^{ex} \otimes S_A^{em} \\ S_M(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) = S_M^{ex} \otimes S_M^{em} \end{cases}, \quad (15)$$

式中: S_D^{ex} 和 S_D^{em} 分别为面积归一化的供体的激发光谱和发射光谱; S_A^{ex} 和 S_A^{em} 分别为面积归一化的受体的激发光谱和发射光谱; S_M^{ex} 和 S_M^{em} 分别为面积归一化的自发荧光的激发光谱和发射光谱;符号 \otimes 为外积运算,也称张量积。通过(14)式线性分离得到四个权重系数后,可计算出 E_A 、 E_D 和 R_C 。

$$E_A = \frac{K_A}{K_D} \times \frac{W_S}{W_A}, \quad (16)$$

$$E_D = \frac{W_S}{W_S + W_D(Q_A/Q_D)}, \quad (17)$$

$$R_C = \frac{W_A}{\frac{K_A}{K_D} [(Q_A/Q_D)W_D + W_S]}, \quad (18)$$

式中: $\frac{Q_A}{Q_D}$ 为受体与供体的量子产额比; $\frac{K_A}{K_D}$ 为受体与

供体的消光系数和之比。 $\frac{K_A}{K_D}$ 与系统的激发光谱、激发光源的光谱性质、测量系统激发通道的传输函数、供体和受体的荧光基团的光学性质有关。

在利用 ExEm-spFRET 方法进行定量 FRET 测量的过程中,供体和受体的弱自发荧光细胞在两个不同激发波长的激发下分别得到供体的激发发射光谱 S_D 和受体的激发发射光谱 S_A ,供受体敏化的激发发射光谱 S_S 由供体的激发发射谱 S_D 和受体的激发发射谱 S_A 外积得到。从未转染 FPs 的强自发荧光细胞系在同样成像设置条件下测得细胞的背景和自发荧光的激发发射光谱 S_M 。为了得到 E_D 和 R_C ,需要预测测量系统修正因子 $\frac{Q_A}{Q_D}$ 和 $\frac{K_A}{K_D}$ 。在很多研究中都是直接引用文献中供体和受体的量子产额用于定量 FRET 测量^[26,58-59]。系统中真正的 $\frac{Q_A}{Q_D}$ 不仅依赖于受体和供体的光学性质,还与测量系统的发射性质有关。尽管供体和受体的荧光蛋白的吸收光谱非常稳定,但是基于激发通路响应函数的非线性特征,通过供受体荧光蛋白的吸收谱和激发通路的响应函数以及激发光源的光谱来计算 $\frac{K_A}{K_D}$ 非常困难,因此对于特定的测量系统和供受体荧光蛋白对,在激发光源稳定性良好的情况下只需定期直接测量

$\frac{K_A}{K_D}$ 值。利用一个 E_D 和 R_C 已知的供受体串联结构

可以预测量 $\frac{Q_A}{Q_D}$ 和 $\frac{K_A}{K_D}$ [43]。

$$\frac{Q_A}{Q_D} = \frac{W_S - W_S E_D}{W_D E_D}, \quad (19)$$

$$\frac{K_A}{K_D} = \frac{W_A}{R_C [(Q_A/Q_D)W_D + W_S]}. \quad (20)$$

在此基础上,基于 Lee 等 [60] 提出的一种同时测量系统参量消光系数比与量子产额比的思想,本文提出一种同时测量 ExEm-spFRET 方法中 $\frac{Q_A}{Q_D}$ 和

$\frac{K_A}{K_D}$ 的新方法 [61]。该方法测量由一个供体和一个受体组成的 FRET 串联质粒(不少于两个)的激发发射光谱,经过线性分离得到对应的权重系数。

$$\frac{W_S}{W_D} = \frac{W_A}{W_D} \times \frac{K_D}{K_A} - \frac{Q_A}{Q_D}, \quad (21)$$

以 $\frac{W_A}{W_D}$ 为自变量, $\frac{W_S}{W_D}$ 为因变量,线性拟合由一个供体荧光分子和一个受体荧光分子组成的 FRET 标准质粒(不少于两个)的 $\frac{W_A}{W_D}$ 和 $\frac{W_S}{W_D}$, 线性方程斜率的倒数即为 $\frac{K_A}{K_D}$, 线性方程的截距的绝对值即为 $\frac{Q_A}{Q_D}$ 。

研究表明,从表达不同水平供体和受体荧光蛋白的不同细胞系中测得的归一化发射光谱是一致的,这就进一步证明了荧光蛋白的激发和发射光谱是非常稳定的 [46-47]。虽然发射荧光强度正比于激发光的强度,但是由于 4 个激发发射光谱指纹都是按单位体积归一化的,不同的激发光强度只影响分离得到的权重而不影响权重之间的比值,因此 ExEm-spFRET 方法不依赖于激发光的强度。

随着光学器件与光学技术的进步,基于光谱线性分离的 FRET 定量检测技术也在不断发展与完善。Thaler 研究小组 [43] 提出 sRET 方法,每次进行定量检测时都需要重新测量供体和受体的基矢光谱,且 sRET 方法不适用于活细胞定量 FRET 检测。Wlodarczyk 等 [44] 提出 lux-FRET 方法,避免了纯荧光蛋白与细胞内表达荧光蛋白光学特性之间的差异,但利用 lux-FRET 方法进行定量测量需要同时准备供体单独表达、受体单独表达以及供受体连接结构的样本,并且所有测量样本的激发光的强度、系统设置和探测系统的设置必须保持一致,从而使该方法在活细胞的动态应用过程中难以快速而准

确地进行 FRET 测量。Levy 等 [39] 于 2011 年提出的 Sp-FRET 方法具有高灵敏度和良好的稳健性,能够消除自发荧光和背景光的影响,但该方法依然依赖于激发光强度和探测器增益等系统参数。Iem-spFRET 方法解决了 Sp-FRET 方法的约束条件,不依赖于激发光强度和探测器增益系数,能打破所有测量样本的成像条件必须保持一致这一严格限制 [44]。Iem-spFRET 方法在 Iem-spFRET 方法基础上,将细胞的背景光和自发荧光归一化的发射光谱也作为光谱线性分离的基矢光谱,从而消除了不同背景下细胞荧光产生的干扰,增加了抗干扰的能力,而 ExEm-spFRET 方法具有天然分离供体、受体和供受体激发发射光谱的能力 [57,62]。陈同生研究小组 [62] 在自己搭建的光谱型宽场荧光显微成像系统上评估了 Em-spFRET 方法和 ExEm-spFRET 方法的稳健性,测量结果表明 ExEm-spFRET 方法的稳健性优于 Em-spFRET 方法。

4 定量 spFRET 检测仪器

近年来,随着荧光光谱检测技术和显微技术的发展,基于 ExEm-spFRET 方法的 FRET 技术逐渐发展起来 [46,57]。Mustafa 研究小组 [57] 于 2013 年利用分光光度计对表达了 cerulean-venus 串联结构的细胞进行基于 ExEm-unmixing 的 FRET 测量,并证明 ExEm-spFRET 方法最少只需要两个激发波长就可以得到准确的 E_D 值。他们还在共聚焦显微镜上用 405 nm 和 488 nm 激发光实现了单细胞定量 ExEm-spFRET 成像。同年 Hoppe 小组 [63] 提出适合 n 个荧光蛋白的 N-Way 理论,但是他们只是在宽场显微镜上用三激发三通道实现了 6-cube 的三色(蓝、黄、红)FRET 定量检测,实际上该实验仍然用的是基于通道探测的光谱法,而且这两个小组在实验过程中都要求所有样本成像条件一致。

目前的光谱 FRET 定量成像一般通过具有光谱检测功能的共聚焦荧光显微系统和宽场显微荧光成像系统实现。共聚焦荧光显微镜的光谱成像功能集合显微成像与光谱探测,既能对单细胞实现显微成像,又能实现光谱探测。与此不同,陈同生研究小组 [64] 于 2015 年搭建了一套简单实用的能同时对单个活细胞进行显微成像及光谱探测的基于便携式光谱仪的宽场显微成像系统(MSM),实验结果表明,宽场显微成像系统的状态和性能在至少 3 个月内保持稳定。2015 年,本研究小组首次在一套装备了液晶可调谐电压滤光片(LCFT)的光谱型宽场显微

FRET 定量成像 (SWFM-FRETI) 系统上实现了 spFRET 定量成像^[65]。尽管 LCFT 的设计初衷是为了实现光谱扫描,但 LCFT 在 460~480 nm 波段的低通过率严重阻碍了它在 FRET 定量检测中的应用,这限制了我们的获取基于绿色荧光蛋白(CFP)的 FRET 结构的全光谱信息,进而限制了结果的精确性。为克服这一难题,2018 年,陈同生小组^[62]改进了早期搭建的 SWFM-FRETI 系统,将一个激发滤光片转轮代替 LCFT 集成到激发光路中,并在该系统上实现了 Em-spFRET 方法以及 ExEm-spFRET 方法的定量 FRET 测量。2019 年,陈同生小组^[66-67]搭建了一台多模定量 FRET 显微成像仪,该成像仪又称自动的显微成像与光谱探测系统 (Auto-MS),该系统能够结合 Em-spFRET 和 ExEm-spFRET 两种 FRET 定量测量方法,能实现

活细胞的定量 FRET 显微成像及单细胞的定量 ExEm-spFRET 测量,为研究生物信号的转导和蛋白质的活化等问题提供了一个非常有力的工具。

最近,陈同生研究小组^[62]在自己搭建的光谱型宽场荧光显微成像系统上评估了 Em-spFRET 方法和 ExEm-spFRET 方法的稳健性,对分别转染了不同模型质粒的细胞同时进行定量 Em-spFRET 和 ExEm-spFRET 测量。实验过程中分别转染了不同模型质粒 CTV、C5V、CVC、VCV、C+V 以及 C32V+C [C: cerulean, V: venus, CTV: CeruleanTRAFVenus (TRAF is a tumour necrosis factor receptor associated factor domain including 229 amino acids)],并对不同信噪比(SNR, R_{SN})条件下的同一个细胞分别实施定量 Em-spFRET 和 ExEm-spFRET 测量。图 1(a)为不同模型质粒的细胞荧光图像^[62],其中标有“BG”

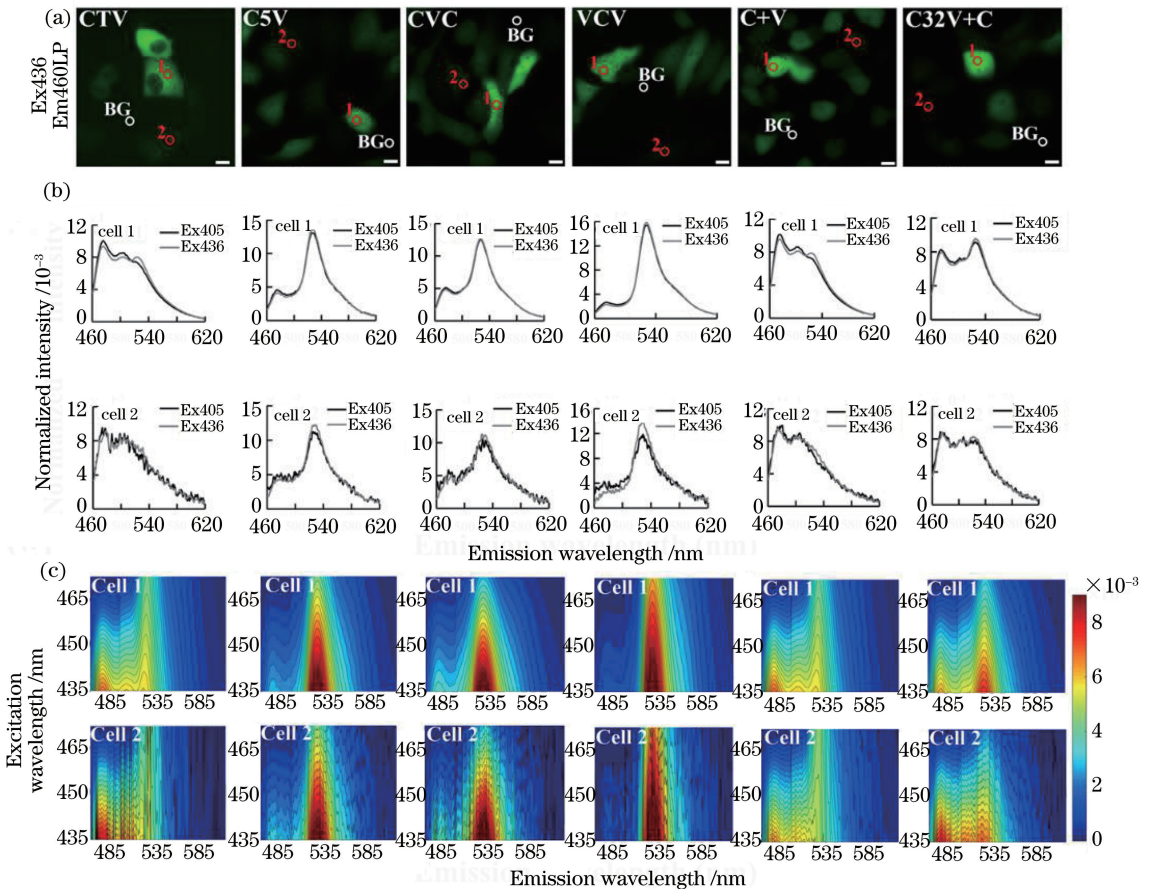


图 1 CTV、C5V、CVC、VCV、C+V 和 C32V+C 的活 HepG2 细胞的发射光谱和激发发射光谱^[62]。(a)不同 FRET 结构的细胞荧光图像。比例尺为 10 μm ; (b)细胞 1 与细胞 2 在 Ex405 和 Ex436 激发下的单位面积归一化的发射光谱图; (c)细胞 1 与细胞 2 在 Ex436 和 Ex470 激发下的单位体积归一化的激发发射光谱图

Fig. 1 Emission spectra and excitation emission spectra of living HepG2 cells CTV, C5V, CVC, VCV, C+V and C32V+C^[62]. (a) Fluorescence images of cells with different FRET constructs. Scale bar is 10 μm ; (b) unit-area normalized emission spectra measured from the corresponding cell 1 and cell 2 at Ex405 or Ex436 excitation; (c) unit-volume normalized excitation emission spectra measured from the corresponding cell 1 and cell 2 at Ex436 or Ex470 excitation

字样的圈代表背景区域(无细胞),而标有数字符号的圈代表感兴趣区域(ROI),分别指示高 SNR 的细胞 1 和低 SNR 的细胞 2。SNR 定义为 ROI 内平均背景荧光强度除以背景区域内平均背景荧光强度。图 1(b)、(c)分别为从细胞 1 和细胞 2 中测得的单位面积归一化的发射光谱 $S_z1(\lambda)$ 和 $S_z2(\lambda)$ 及单位体积归一化的激发发射光谱 $S_z^{[62]}$ 。对于细胞 1,两种方法得到的 R_C 值均与文献值和期望值一致;对于细胞 2,两种方法都得到了一致的 E 值,但是用 Π em-spFRET 方法得到的 R_C 值与期望值存在明显的偏差。结果表明,两种方法都适用于高 SNR 细胞的定量 FRET 测量,而对低 SNR 细胞,ExEm-spFRET 方法的稳健性优于 Π em-spFRET 方法。

图 2 为从不同 SNR 的细胞中测得的 E 与 R_C 的统计结果^[62],原始数据如表 1^[62]所示。对于 $R_{SN} > 9$ 的细胞,两种方法得到的 E 与 R_C 值是一致的;对于 $3 < R_{SN} < 9$ 的细胞,两种方法都能得到一致的 E 值,但是用 Π em-spFRET 方法得到的

R_C 值是不稳定的,而且 VCV 的 R_C 值是不准确的;对于 $R_{SN} < 3$ 的细胞,用 Π em-spFRET 方法得到的 C5V 和 CVC 的 R_C 值都不稳定,而且 VCV 的 E 和 R_C 值都与文献值和期望值存在偏差。这些结果进一步证明 ExEm-spFRET 方法的稳健性优于 Π em-spFRET 方法,尤其当 $R_{SN} < 3$ 时。虽然很高的 FPs 表达水平有利于提高 SNR,但是随机碰撞有可能导致高估 E 值。例如,在共表达未连接 C 和 V 的细胞 1 中,自由的供体和受体有很高的表达水平,此时 E 值仍然不为零(约为 0.07),这很可能是因为供体分子和受体分子在细胞内是随机碰撞的,因此,进行定量 FRET 测量时不应选择那些特别亮的细胞。ExEm-spFRET 方法测得的 VCV 的 R_C 值略高于期望值(表 1),可能是因为模型质粒 VCV 的 E 值比较大(> 0.66),460~500 nm 波段内激发发射光谱信号非常微弱(供体荧光淬灭),所以两种方法测得的 VCV 的 R_C 值都存在偏差。

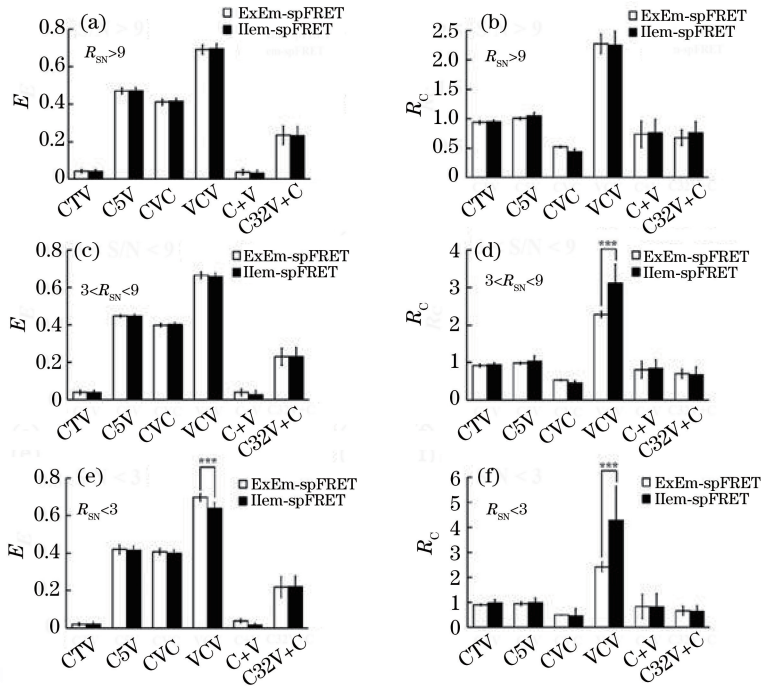


图 2 不同 SNR 的 HepG2 细胞 CTV、C5V、CVC、VCV、C+V、C32V+C 的 E 、 R_C 值的统计^[62]。(a) $R_{SN} > 9$ 时统计的 E 值;(b) $R_{SN} > 9$ 时统计的 R_C 值;(c) $3 < R_{SN} < 9$ 时统计的 E 值;(d) $3 < R_{SN} < 9$ 时统计的 R_C 值;(e) $R_{SN} < 3$ 时统计的 E 值;(f) $R_{SN} < 3$ 时统计的 R_C 值

Fig. 2 Statistical E and R_C of HepG2 cells CTV, C5V, CVC, VCV, C+V and C32V+C with different SNR^[62]. (a) Statistical E with $R_{SN} > 9$; (b) statistical R_C with $R_{SN} > 9$; (c) statistical E with $3 < R_{SN} < 9$; (d) statistical R_C with $3 < R_{SN} < 9$; (e) statistical E with $R_{SN} < 3$; (f) statistical R_C with $R_{SN} < 3$

表 1 ExEm-spFRET 方法和 IEm-spFRET 方法测得的细胞 1 和 2 的统计 E 值和 R_C 值^[62]

Table 1 Statistical E and R_C values in cell 1 and cell 2 measured by ExEm-spFRET and IEm-spFRET method^[62]

Construct	Condition	E		R_C	
		ExEm-spFRET	IEm-spFRET	ExEm-spFRET	IEm-spFRET
CTV	$R_{SN} > 9$	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.94 ± 0.03	0.95 ± 0.03
	$9 > R_{SN} > 3$	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.92 ± 0.03	0.94 ± 0.05
	$R_{SN} < 3$	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.91 ± 0.04	0.98 ± 0.12
C5V	$R_{SN} > 9$	0.47 ± 0.02	0.47 ± 0.02	1.00 ± 0.03	1.05 ± 0.05
	$9 > R_{SN} > 3$	0.45 ± 0.01	0.45 ± 0.01	0.98 ± 0.03	1.04 ± 0.14
	$R_{SN} < 3$	0.42 ± 0.02	0.41 ± 0.02	0.95 ± 0.07	0.98 ± 0.20
CVC	$R_{SN} > 9$	0.41 ± 0.02	0.42 ± 0.02	0.52 ± 0.01	0.44 ± 0.05
	$9 > R_{SN} > 3$	0.40 ± 0.01	0.40 ± 0.01	0.53 ± 0.01	0.46 ± 0.06
	$R_{SN} < 3$	0.41 ± 0.02	0.40 ± 0.02	0.49 ± 0.01	0.46 ± 0.29
VCV	$R_{SN} > 9$	0.69 ± 0.02	0.69 ± 0.03	2.27 ± 0.16	2.25 ± 0.24
	$9 > R_{SN} > 3$	0.67 ± 0.02	0.66 ± 0.02	2.28 ± 0.08	3.12 ± 0.50
	$R_{SN} < 3$	0.70 ± 0.02	0.64 ± 0.03	2.31 ± 0.02	4.28 ± 1.37
C+V	$R_{SN} > 9$	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.73 ± 0.22	0.76 ± 0.23
	$9 > R_{SN} > 3$	0.04 ± 0.02	0.03 ± 0.02	0.81 ± 0.22	0.85 ± 0.23
	$R_{SN} < 3$	0.04 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.83 ± 0.48	0.83 ± 0.52
C32V+C	$R_{SN} > 9$	0.23 ± 0.05	0.23 ± 0.05	0.67 ± 0.13	0.76 ± 0.18
	$9 > R_{SN} > 3$	0.23 ± 0.04	0.23 ± 0.05	0.70 ± 0.13	0.68 ± 0.21
	$R_{SN} < 3$	0.22 ± 0.06	0.22 ± 0.06	0.66 ± 0.19	0.63 ± 0.23

5 结 论

Em-spFRET 技术已经比较成熟,并被广泛应用于活细胞信号转导机制的研究中。由于不能完全消除直接激发串扰,利用 Em-spFRET 方法进行 FRET 定量测量时,要么实验前用参照样本确定供受体的消光系数比^[45],要么保持所有样本的成像条件一致^[44],要么使其中一个激发光选择性激发受体并增加一个与 FRET 样本成像条件相同的单受体样本^[39],要求同时准备所有校正样本。以上苛刻的测量要求严重限制了活细胞定量 FRET 测量的成功率和效率。

ExEm-spFRET 方法具有天然克服光谱串扰的能力,具有良好的稳健性。实验证明,ExEm-spFRET 方法不需要在测量过程中保持实验条件不变,可使荧光蛋白表达水平不一致的细胞都能在最佳的成像条件下进行 FRET 定量测量,从而极大地减轻了活细胞定量 FRET 测量的难度。研究表明,ExEm-spFRET 方法相比于 Em-spFRET 方法具有更好的稳健性,即使对于信噪比较低低的细胞也能获得较为准确的测量结果^[62]。随着光谱成像技术的发展,定量 ExEm-spFRET 检测技术在细胞生物学领域会有越来越广阔的应用前景。而基于 Em-spFRET 方法和 ExEm-spFRET 方法的定量 FRET

测量自动显微仪,必将为活细胞内生化动态的实时检测分析提供重要的技术手段。

参 考 文 献

- [1] Cario G, Franck J. Über zerlegung von Wasserstoffmolekülen durch angeregte Quecksilberatome[J]. Zeitschrift für Physik, 1922, 11(1): 161-166.
- [2] Förster T. Zwischenmolekulare energiewanderung und fluoreszenz[J]. Annalen Der Physik, 1948, 437 (1/2): 55-75.
- [3] Fábíán Á I, Rente T, Szöllösi J, et al. Strength in numbers: effects of acceptor abundance on FRET efficiency[J]. ChemPhysChem, 2010, 11(17): 3713-3721.
- [4] Stryer L. Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler [J]. Annual Review of Biochemistry, 1978, 47(1): 819-846.
- [5] Tramier M, Gautier I, Piolot T, et al. Picosecond-hetero-FRET microscopy to probe protein-protein interactions in live cells [J]. Biophysical Journal, 2002, 83(6): 3570-3577.
- [6] Kravnov V S, Chamberlain C, Bokoch G M, et al. Localized Rac activation dynamics visualized in living cells[J]. Science, 2000, 290(5490): 333-337.
- [7] Mochizuki N, Brusslan J A, Larkin R, et al. Arabidopsis genomes uncoupled 5 (GUN5) mutant reveals the involvement of Mg-chelatase H subunit in

- plastid-to-nucleus signal transduction [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001, 98(4): 2053-2058.
- [8] Xu Q, Brecht W J, Weisgraber K H, et al. Apolipoprotein E4 domain interaction occurs in living neuronal cells as determined by fluorescence resonance energy transfer[J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(24): 25511-25516.
- [9] Butz E S, Ben-Johny M, Shen M, et al. Quantifying macromolecular interactions in living cells using FRET two-hybrid assays [J]. Nature Protocols, 2016, 11(12): 2470-2498.
- [10] Miyawaki A, Llopis J, Heim R, et al. Fluorescent indicators for Ca^{2+} based on green fluorescent proteins and calmodulin [J]. Nature, 1997, 388(6645): 882-887.
- [11] Zhang J W, Yang F F, Chai L Y, et al. Spectral measurement of acceptor-to-donor extinction coefficient ratio in living cells[J]. Micron, 2015, 68: 98-106.
- [12] Mochizuki N, Yamashita S, Kurokawa K, et al. Spatio-temporal images of growth-factor-induced activation of Ras and Rap1 [J]. Nature, 2001, 411(6841): 1065-1068.
- [13] Verveer P J. Quantitative imaging of lateral ErbB1 receptor signal propagation in the plasma membrane [J]. Science, 2000, 290(5496): 1567-1570.
- [14] Takemoto K, Nagai T, Miyawaki A, et al. Spatio-temporal activation of caspase revealed by indicator that is insensitive to environmental effects[J]. The Journal of Cell Biology, 2003, 160(2): 235-243.
- [15] Shan G C, Huang W. Theoretical study of single-pair fluorescence resonant energy transfer spectroscopy in microcavity[J]. Acta Optica Sinica, 2009, 29(4): 1049-1053.
单光存, 黄维. 微腔中单分子对荧光共振能量转移光谱学的理论研究[J]. 光学学报, 2009, 29(4): 1049-1053.
- [16] Qiu C Y, Jia Z N, Zhang T T, et al. Cascade FRET optofluidic laser generation in Fabry-Perot microcavity[J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2019, 56(18): 181403.
邱诚玉, 贾卓楠, 张婷婷, 等. 法布里-珀罗微腔中串联 FRET 光微流激光产生研究[J]. 激光与光电子学进展, 2019, 56(18): 181403.
- [17] Hou Z X, Wang Y H, Zheng L Q, et al. Determination of acceptor-to-donor cross section ratio for two-photon excitation in living cells [J]. Proceedings of SPIE, 2016, 10024: 1002428.
- [18] He Y S, Pan C G, Cao H X, et al. Highly sensitive and selective dual-emission ratiometric fluorescence detection of dopamine based on carbon dots-gold nanoclusters hybrid [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2018, 265: 371-377.
- [19] Patowary S, Alvarez-Curto E, Xu T R, et al. The muscarinic M_3 acetylcholine receptor exists as two differently sized complexes at the plasma membrane [J]. Biochemical Journal, 2013, 452(2): 303-312.
- [20] Pisterzi L F, Jansma D B, Georgiou J, et al. Oligomeric size of the M_2 muscarinic receptor in live cells as determined by quantitative fluorescence resonance energy transfer [J]. Journal of Biological Chemistry, 2010, 285(22): 16723-16738.
- [21] Mishra A K, Gragg M, Stoneman M R, et al. Quaternary structures of opsin in live cells revealed by FRET spectrometry [J]. Biochemical Journal, 2016, 473(21): 3819-3836.
- [22] Singh D R, Mohammad M M, Patowary S, et al. Determination of the quaternary structure of a bacterial ATP-binding cassette (ABC) transporter in living cells[J]. Integrative Biology, 2012, 5(2): 312-323.
- [23] Zal T, Gascoigne N R J. Photobleaching-corrected FRET efficiency imaging of live cells[J]. Biophysical Journal, 2004, 86(6): 3923-3939.
- [24] Dickinson M E, Bearman G, Tille S, et al. Multi-spectral imaging and linear unmixing add a whole new dimension to laser scanning fluorescence microscopy [J]. BioTechniques, 2001, 31(6): 1272-1278.
- [25] Robert M, Feddersen B A, Enrico G, et al. Time-resolved imaging fluorescence microscopy [J]. Proceedings of SPIE, 1992, 1640: 448-460.
- [26] Aye-Han N N, Ni Q, Zhang J. Fluorescent biosensors for real-time tracking of post-translational modification dynamics [J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2009, 13(4): 392-397.
- [27] Zhu J, Deng C, Huang G L, et al. Quantitative fluorescence correction incorporating Förster resonance energy transfer and its use for measurement of hybridization efficiency on microarrays[J]. Analytical Chemistry, 2009, 81(4): 1426-1432.
- [28] Zhu J, Lu Y, Deng C, et al. Assessment of fluorescence resonance energy transfer for two-color DNA microarray platforms [J]. Analytical Chemistry, 2010, 82(12): 5304-5312.
- [29] Xie F B, Zhu J, Deng C, et al. General and reliable quantitative measurement of fluorescence resonance energy transfer using three fluorescence channels[J]. The Analyst, 2012, 137(4): 1013-1019.
- [30] Li Q, Fu R X, Zhang J Q, et al. Label-free method

- using a weighted-phase algorithm to quantitate nanoscale interactions between molecules on DNA microarrays[J]. *Analytical Chemistry*, 2017, 89(6): 3501-3507.
- [31] Schaaf T M , Peterson K C , Grant B D , et al. Spectral Unmixing Plate Reader: High-Throughput, High-Precision FRET Assays in Living Cells. *SLAS Discovery: Advancing Life Sciences R&D*, 2017, 22(3):250-261.
- [32] Arsenovic P T, Mayer C R, Conway D E. SensorFRET: a standardless approach to measuring pixel-based spectral bleed-through and FRET efficiency using spectral imaging [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 15609.
- [33] Raicu V, Jansma D B, Miller R J D, et al. Protein interaction quantified *in vivo* by spectrally resolved fluorescence resonance energy transfer [J]. *Biochemical Journal*, 2005, 385(1): 265-277.
- [34] Raicu V. Efficiency of resonance energy transfer in homo-oligomeric complexes of proteins [J]. *Journal of Biological Physics*, 2007, 33(2): 109-127.
- [35] Lin F, Du M, Yang F, et al. Improved spectrometer-microscope for quantitative fluorescence resonance energy transfer measurement based on simultaneous spectral unmixing of excitation and emission spectra [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2018, 23(1): 016006.
- [36] Scott B L, Hoppe A D. Optimization of FRET microscopy for live-cell imaging of multiple protein-protein interactions [J]. *Biophysical Journal*, 2013, 104(2): 669a.
- [37] Artz A S, van Besien K, Zimmerman T, et al. Long-term follow-up of nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation for renal cell carcinoma: The University of Chicago Experience [J]. *Bone Marrow Transplantation*, 2005, 35(3): 253-260.
- [38] Su W H, Du M Y, Lin F R, et al. Quantitative FRET measurement based on spectral unmixing of donor, acceptor and spontaneous excitation-emission spectra [J]. *Journal of Biophotonics*, 2019, 12(4): e201800314.
- [39] Levy S, Wilms C D, Brumer E, et al. SpRET: highly sensitive and reliable spectral measurement of absolute FRET efficiency [J]. *Microscopy and Microanalysis*, 2011, 17(2): 176-190.
- [40] Du M Y, Yang F F, Mai Z H, et al. FRET two-hybrid assay by linearly fitting FRET efficiency to concentration ratio between acceptor and donor [J]. *Applied Physics Letters*, 2018, 112(15): 153702.
- [41] Zipfel W R, Williams R M, Christie R, et al. Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(12): 7075-7080.
- [42] Zhang J, Zhang L L, Chai L Y, et al. Reliable measurement of the FRET sensitized-quenching transition factor for FRET quantification in living cells [J]. *Micron*, 2016, 88: 7-15.
- [43] Thaler C, Koushik S V, Blank P S, et al. Quantitative multiphoton spectral imaging and its use for measuring resonance energy transfer [J]. *Biophysical Journal*, 2005, 89(4): 2736-2749.
- [44] Wlodarczyk J, Woehler A, Kobe F, et al. Analysis of FRET signals in the presence of free donors and acceptors [J]. *Biophysical Journal*, 2008, 94(3): 986-1000.
- [45] Zhang J, Li H, Chai L, et al. Quantitative FRET measurement using emission-spectral unmixing with independent excitation crosstalk correction [J]. *Journal of Microscopy*, 2015, 257(2): 104-116.
- [46] Ai H, Henderson J N, Remington S J, et al. Directed evolution of a monomeric, bright and photostable version of *Clavularia* cyan fluorescent protein: structural characterization and applications in fluorescence imaging [J]. *Biochemical Journal*, 2006, 400(3): 531-540.
- [47] Day R N, Davidson M W. Fluorescent proteins for FRET microscopy: monitoring protein interactions in living cells [J]. *BioEssays*, 2012, 34(5): 341-350.
- [48] Elder A, Domin A, Kaminski Schierle G, et al. A quantitative protocol for dynamic measurements of protein interactions by Förster resonance energy transfer-sensitized fluorescence emission [J]. *Journal of the Royal Society Interface*, 2009, 6(suppl_1): S59-S81.
- [49] Yu H N, Zhang J W, Li H L, et al. An empirical quantitative fluorescence resonance energy transfer method for multiple acceptors based on partial acceptor photobleaching [J]. *Applied Physics Letters*, 2012, 100(25): 253701.
- [50] Lakowicz J R. *Principles of fluorescence spectroscopy* [M]. Boston, MA: Springer, 1999.
- [51] Hoppe A D, Scott B L, Welliver T P, et al. N-way FRET microscopy of multiple protein-protein interactions in live cells [J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e64760.
- [52] Wouters F S, Bastiaens P I, Wirtz K W, et al. FRET microscopy demonstrates molecular association of non-specific lipid transfer protein (nsL-TP) with fatty acid oxidation enzymes in peroxisomes [J]. *The EMBO Journal*, 1998, 17(24): 7179-7189.

- [53] Kenworthy A K, 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]. *The Journal of Cell Biology*, 1998, 142(1): 69-84.
- [54] Chan Francis K M, Siegel R M, Zacharias D, et al. Fluorescence resonance energy transfer analysis of cell surface receptor interactions and signaling using spectral variants of the green fluorescent protein [J]. *Cytometry*, 2001, 44(4): 361-368.
- [55] Kenworthy A K. Imaging protein-protein interactions using fluorescence resonance energy transfer microscopy [J]. *Methods*, 2001, 24(3): 289-296.
- [56] Ecker R C, de Martin R, Steiner G E, et al. Application of spectral imaging microscopy in cytomics and fluorescence resonance energy transfer (FRET) analysis [J]. *Cytometry*, 2004, 59A(2): 172-181.
- [57] Mustafa S, Hannagan J, Rigby P, et al. Quantitative Förster resonance energy transfer efficiency measurements using simultaneous spectral unmixing of excitation and emission spectra [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2013, 18(2): 026024.
- [58] Erickson M G, Alseikhan B A, Peterson B Z, 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.
- [59] Biskup C, Zimmer T, Kelbauskas L, et al. Multi-dimensional fluorescence lifetime and FRET measurements [J]. *Microscopy Research and Technique*, 2007, 70(5): 442-451.
- [60] Lee S R, Sang L J, Yue D T. Uncovering aberrant mutant PKA function with flow cytometric FRET [J]. *Cell Reports*, 2016, 14(12): 3019-3029.
- [61] Zhang C, Lin F, Du M, et al. Simultaneous measurement of quantum yield ratio and absorption ratio between acceptor and donor by linearly unmixing excitation-emission spectra [J]. *Journal of Microscopy*, 2018, 270(3): 335-342.
- [62] Lin F, Zhang C, Du M, et al. Superior robustness of ExEm-spFRET to Ilem-spFRET method in live-cell FRET measurement [J]. *Journal of Microscopy*, 2018, 272(2): 145-150.
- [63] Lin J, Hoppe A D. Uniform total internal reflection fluorescence illumination enables live cell fluorescence resonance energy transfer microscopy [J]. *Microscopy and Microanalysis*, 2013, 19(2): 350-359.
- [64] Chai L Y, Zhang J W, Zhang L L, et al. Miniature fiber optic spectrometer-based quantitative fluorescence resonance energy transfer measurement in single living cells [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2015, 20(3): 037008.
- [65] Zhang L L, Qin G Q, Chai L Y, et al. Spectral wide-field microscopic fluorescence resonance energy transfer imaging in live cells [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2015, 20(8): 086011.
- [66] Zhang C, Liu Y, Sun H, et al. Automated E-FRET microscope for dynamical live-cell FRET imaging [J]. *Journal of Microscopy*, 2019, 274(1): 45-54.
- [67] Sun H, Chen T S. Automatic background recognition and data selection for online quantitative E-FRET imaging [J]. *Acta Optica Sinica*, 2019, 39(2): 0217001.
- 孙哈, 陈同生. 用于在线 E-FRET 定量成像的自动背景识别与数据筛选 [J]. *光学学报*, 2019, 39(2): 0217001.