

基于一次成像测量 FRET 系统校正因子的智能型 QuanTi-FRET 方法

高璐^{1,2}, 翟士贤^{1,2}, 孙晗^{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 QuanTi-FRET 是一种通过对多种荧光共振能量转移(FRET)标准质粒样本进行多次 FRET 成像来测量 FRET 成像系统敏化淬灭转化因子(G)和供受体通道激发效率校正因子(β)的方法。本课题组发展了一种基于一次成像测量系统校正因子 G 和 β 的智能型 QuanTi-FRET 方法——AutoQT-FRET 方法。AutoQT-FRET 方法包括如下 4 个步骤:1)将分别转染了不同 FRET 标准串联质粒(C5V、C17V、C32V 和 CTV)的细胞合并到一个细胞培养皿中培养,对该皿细胞样本进行三通道 FRET 成像;2)对三通道图像进行区域划分,并根据不同种类的 FRET 标准质粒对各区域进行归类;3)对归类成功的区域逐像素绘制三维空间散点图,以确定各个 FRET 标准质粒的标准线;4)使用确定好的各质粒标准线对整个视野内的细胞区域进行质粒分类与系统校正因子 G 和 β 的测量。该方法大幅简化了系统校正因子的测量过程,缩短了测量时间。本文比较了 AutoQT-FRET 方法与其他方法测量系统校正因子的优劣,实验结果表明:AutoQT-FRET 方法操作简单,而且测量稳定性与准确度都有所提高。

关键词 生物光学; 荧光; 共振; 能量转移; 系统校正; 荧光显微镜

中图分类号 Q632

文献标志码 A

doi: 10.3788/CJL202249.0507010

1 引言

定量荧光共振能量转移(FRET)检测是在活细胞中研究分子间相互作用、分析寡聚化蛋白质分子结构、研究信号通路中蛋白间调节机制等的重要技术^[1-8]。Placone 等^[1]利用定量 FRET 检测技术测量了两种不同(野生型和突变型)成纤维细胞生长因子受体 3 (FGFR3) 构建体的相互作用,证明了软骨发育不全(ACH)突变会促使 FGFR3 二聚化,进而增加 FGFR3 的活性,并最终导致软骨发育不全症。Kawano 等^[9]利用定量 FRET 检测技术研究了 G 蛋白耦合受体之一 $\beta 2$ 肾上腺素受体($\beta 2AR$)的低聚状态与其功能之间的关系,研究结果表明,细胞表面的 $\beta 2AR$ 不会形成组成性的同源低聚物,并且 $\beta 2AR$ 无需在细胞表面形成寡聚体即可转导环磷酸腺苷信号。Ben-Johny 等^[10]利用定量 FRET 检测技术研

究了钙离子通道与钙调蛋白之间的结合,并发现:当细胞内钙离子浓度较低时,一个钙调蛋白与一个钙离子通道结合;当细胞内钙离子浓度较高时,一个钙离子通道可以同时结合两个钙调蛋白。

确定 FRET 测量系统的校正因子是实现定量 FRET 检测技术的前提。在诸多系统校正参数中,与仪器以及荧光分子的固有性能相关的系统校正因子(敏化淬灭转化因子 G)尤为重要。根据被检测样本的质粒数量不同,测量系统校正因子 G 的方法可大致分为单质粒法、双质粒法以及多质粒法。单质粒法以 2004 年 Zal 等^[11]提出的通过供体光漂白法对系统校正因子 G 进行测量为代表。采用该方法测量系统校正因子 G 时,不仅需要光漂白法测量与待测样本的供受体相同的参照样本,而且在光漂白过程中还存在光漂白不完全、单质粒测量不稳定以及仅能对固定细胞进行测量等缺点。2006 年,Chen

收稿日期: 2021-11-16; 修回日期: 2021-12-21; 录用日期: 2021-12-29

基金项目: 国家自然科学基金(61875056, 62135003)、广州市科学技术计划(2019050001)

通信作者: *chentsh@scnu.edu.cn

等^[12]提出了基于双质粒求解系统校正因子 G 的 TP-G 方法,该方法避免了光漂白的相关问题,但是双质粒测量仍具有不稳定性,如果两个质粒表达程度不同就会对测量结果产生较大影响。2016 年,Butz 等^[13]在 FRET 双杂交方法的基础上提出了通过供受体比为 1:1 的多个固定质粒测量系统校正因子 G 的双杂交-多质粒方法(TH-M 方法)。2020 年,Coullomb 等^[14]在 3-cube 方法的基础上提出了一种可同时测量得到系统校正因子(敏化淬灭转化因子 G 和供受体通道激发效率校正因子 β)的方法——QuanTi-FRET 方法。QuanTi-FRET 方法先通过三通道 DD、DA、AA 的组合获得供受体比为 1:1 的多皿细胞中不同 FRET 固定质粒样本的荧光强度图像 I_{DD} 、 I_{DA} 和 I_{AA} ;然后分别以 I_{DD} 、 I_{DA} 和 I_{AA} 为 x 、 y 和 z 轴绘制每种 FRET 固定质粒样本的空间散点图,将多种不同 FRET 质粒样本的空间散点图合并,对合并后的空间散点图采用平面最小二乘法进行拟合,拟合空间平面的方向向量的绝对值分别为系统校正因子 G 和 β 。不过,QuanTi-FRET 方法只能单独对 $i(i \geq 3)$ 个 FRET 固定质粒样本进行测量,需要切换多皿细胞样品,操作繁琐,而且分别对多皿细胞样本成像时很难保证相同的对比度和背景信号。

基于 QuanTi-FRET 方法,本文发展了一种基于一次成像测量系统校正因子的智能型 QuanTi-FRET 方法(以下简称“AutoQT-FRET 方法”),该方法不仅大幅简化了系统校正因子 G 的测量,还减少了测量时间,提高了测量准确性。AutoQT-FRET 方法先对一个培养皿中表达了多种有着不同 FRET 效率的 FRET 标准质粒细胞的系统校正因子 G 和 β 进行测量,然后进行自动分类。同时,本课题组使用 MATLAB 平台编写了一套从图像处理到质粒分类、校正因子测量以及 FRET 效率测量的自动程序,实现了一皿细胞、一次成像、一键操作进而准确测量系统校正因子的目的,提高了系统校正因子 G 和 β 测量的速度和准确性。

2 材料和方法

2.1 细胞的培养、质粒和转染

将从暨南大学医学院(中国广州)获得的热乳腺癌细胞(MCF7 细胞)在含有 10%胎牛血清(FBS)的 DMEM 培养基中培养过夜。将细胞播种在添加了 10%FBS、1%青霉素和链霉素的六孔板中,并在 37 °C、5% CO₂ 加湿培养箱中进行培养。

Cerulean(C)和 Venus(V)质粒购自 Addgene 公司。C-TRAF-Venus(CTV)、Cerulean-5-Venus(C5V)、Cerulean-17-Venus(C17V)和 Cerulean-32-Venus(C32V)由 Vogel 实验室提供。

将 MCF7 细胞按照每孔约 20~70 万细胞接种到六孔板内培养 24 h,使细胞密度达到 70%~80%。转染前将六孔板的每一孔内更换为 2 mL 新鲜 DMEM 培养液。在待转染的六孔板的每一个孔内加入 125 μ L 不含抗生素和血清的 DMEM 培养液,之后加入 2.5 μ g 质粒 DNA,再加入 4 μ L Lipo8000TM 转染试剂。24 h 后,为了在一个培养皿中共培养不同转染的细胞,将表达不同 FRET 质粒的转染细胞从孔中分离,并将其分成相等的部分,然后在一个含 10% FBS DMEM 的 35 mm 共聚焦培养皿中进行培养。培养 12 h 后,进行荧光成像。

2.2 活细胞荧光成像

活细胞 FRET 成像在本课题组自行构建的多模态 FRET 显微成像系统上进行^[15],该系统主要由一台倒置宽场荧光显微镜(IX73 型)和一台高灵敏度 CMOS 相机(ORCA-Flash 4.0)组成。在装有 63 \times 、1.42 数值孔径油浸物镜(IX73 型)的荧光显微镜上进行定量 FRET 成像和活细胞荧光成像。使用软件通过一个分辨率为 2048 pixel \times 2048 pixel 的高灵敏度 CMOS 相机获取图像。470 nm 波长用于激发 Cerulean(C)质粒,而 530 nm 波长用于激发 Venus(V)质粒。

2.3 QuanTi-FRET 理论

Coullomb 等于 2020 年提出了一种基于 3-cube 法的测量系统校正因子 G 值的定量 FRET 方法(QuanTi-FRET 方法)。供体受体对之间的 FRET 效率(E)和供体-受体对供体分子占供受体分子和的比率(S)分别表示为

$$E = \frac{F_c}{GI_{DD} + F_c}, \quad (1)$$

$$S = \frac{GI_{DD} + F_c}{GI_{DD} + F_c + I_{AA}/\beta}, \quad (2)$$

式中: F_c 是 FRET 样本中供体敏化到受体的荧光强度; I_{DD} 表示采用供体激发光激发时在供体荧光探测通道中探测到的供体荧光强度; I_{AA} 表示采用受体激发光激发时在受体荧光探测通道中探测到的受体荧光强度; G 为敏化淬灭转化因子,与供受体通道的量子产额和探测效率有关; β 为供受体通道激发效率校正因子,与供受体通道的激发强度和吸收截面有关。由式(2)可得

$$\beta G I_{DD} + \beta F_c = \frac{S}{1-S} I_{AA}, \quad (3)$$

该式为有关 I_{DD} 、 F_c 、 I_{AA} 的空间平面方程。利用式 (3) 测量系统校正因子 G 和 β 时, 为了简化拟合参量, 可以使用供受体分子比为 1 : 1 的供受体 FRET 对 ($S=0.5$) 进行测量, 这样可使 I_{AA} 的系数为 1。

Coullomb 等在测量系统校正因子 G 和 β 时, 对分别转染了 C5V、C17V、C32V 质粒细胞的三个培养皿的三通道 DD、DA、AA 的原始图像进行背景去除处理及串扰校正, 得到逐像素的 I_{DD} 、 F_c 、 I_{AA} 的三维空间坐标。不同质粒的所有像素在三维空间坐标下绘制的空间散点图表现为不同颜色的“云”, 并且三个“云”均在同一平面内。要确定准确的系统校正因子 G 和 β 必须要使用 3 个或 3 个以上 FRET 效率不同的供受体质粒。根据式 (3) 采用最小二乘法对多种不同 FRET 效率的供受体质粒形成的空间散点图进行拟合, 就可以得到最佳的系统校正因子 G 和 β 。

2.4 基于一皿细胞的 AutoQT-FRET 测量方法

基于一皿细胞的 AutoQT-FRET 测量方法包括如下步骤。

步骤一: 在六孔板中分别培养单转了 C5V、C17V、C32V、CTV 质粒的 MCF7 细胞, 得到参照样本; 将表达了不同 FRET 质粒的转染细胞从孔中分

离并分成相等的部分, 在共聚焦培养皿中培养 12 h, 得到待测样本; 分别对参照样本和待测样本细胞进行 3-cube 法荧光成像。

步骤二: 确定每种质粒的 k 值范围。对于单转了 C5V、C17V、C32V、CTV 质粒的培养皿中的参照样本, 每种质粒选取 80 个细胞进行测量。从第 1 个细胞开始, 采用 3-cube 光谱成像获取经过背景扣除和串扰校正的图像 I_{DD} 、 F_c 、 I_{AA} , 然后绘制以 I_{DD} 、 F_c 分别为 x 和 y 轴的逐像素二维散点图, 如图 1(a) 所示, 并根据

$$F_c = G \frac{E}{1-E} I_{DD}, \quad (4)$$

采用最小二乘法进行拟合, 计算得到斜率 k 。

重复上述步骤, 分别获得 80 个细胞的 k 值。由于敏化淬灭转化因子 G 仅与仪器、荧光分子的固有性能相关, FRET 效率 E 与不同的供受体 FRET 对相关, 因此, 由式 (4) 得到的斜率 k 值 ($k = G \frac{E}{1-E}$) 代表着有着不同 FRET 效率的 FRET 标准质粒。然后对每种质粒中的 80 个细胞的 k 值按照参照样本中转染的不同质粒进行归类, 并统计每种质粒 k 值的范围。图 1(b) 表示根据每种质粒在不同视野中选取的 80 个细胞计算得到的 k 值的散点图。根据统计结果可列出表 1 所示的每种质粒的 k 值范围。

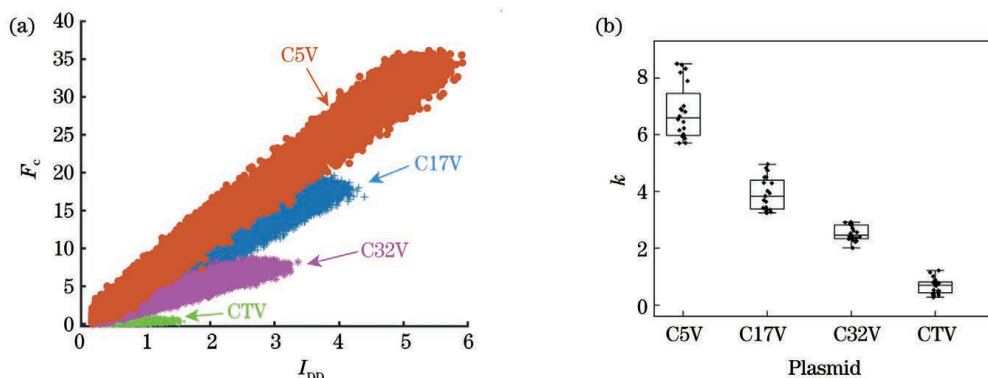


图 1 确定 4 种 FRET 标准质粒的 k 值范围。(a) 4 种 FRET 标准质粒的 F_c - I_{DD} 二维散点图, 其中符号“●”代表 C5V, “+”代表 C17V, “*”代表 C32V, “·”代表 CTV, 分别转染了上述 4 种质粒的 MCF7 细胞在 4 个不同的培养皿中分别培养; (b) 4 种 FRET 标准质粒 k 值范围箱形图, 每种质粒的 k 值范围由多个培养皿中转染了同种质粒的 80 个细胞统计所得

Fig. 1 Determining the k value range of four kinds of standard FRET plasmids. (a) F_c - I_{DD} two-dimensional scatter diagram of four kinds of standard FRET plasmids. In the figure, the symbols “●”, “+”, “*”, and “·” represent plasmids C5V, C17V, C32V, and CTV. The MCF7 cells transfected with the above four plasmids are cultured in four different culture dishes. (b) The k value range boxplot of four kinds of standard FRET plasmids. The range of k value of each plasmid is calculated from 80 cells transfected with the same plasmid in multiple culture dishes

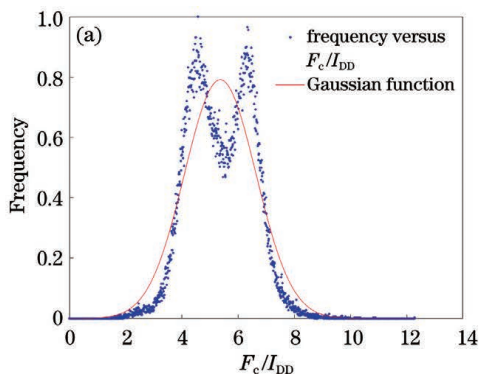
表 1 不同 FRET 标准质粒斜率 k 的范围
Table 1 Slope k value range of different standard FRET plasmids

Plasmid species	k
C5V	[5.5, 8.5]
C17V	[3.2, 5]
C32V	[2, 3]
CTV	[0.4, 1.3]

步骤三:确定质粒标准线。每种质粒标准线的确定过程包括三个步骤。

1) 背景扣除与串扰校正

对共转了 C5V、C17V、C32V、CTV 质粒的待测样本,任意选择一个视野进行 3-cube 光谱成像,获取原始图像(I_{DD} 、 I_{DA} 、 I_{AA})后,对三个通道的图像进行背景识别与扣除操作^[16],此处共包括以下三个步骤:①分别统计每一幅图像中不同灰度值的像素的个数,得到相应的计数与灰度值的关系图;②确定以计数灰度值图为背景(I_{BG})的 I_{min} (强度的最小灰度值)与 I_{middle} (强度的中值灰度值)之间的第一个峰值强度为背景 I_{BG} ;③从对应的原始图像中减去 I_{BG} 获得扣除背景后的图像。然后根据 Zal 等^[11]提出的



E-FRET 方法中的串扰校正部分对扣除背景后的图像进行串扰校正,得到 I_{DD} 、 F_c 、 I_{AA} 。

2) 对视野进行区域分割及筛选

以 100×100 的区域对扣除背景后的图像进行区域分割。对于每个分割好的区域,计算区域内除去背景后有强度值的像素数量占整个区域内像素数量的比例,并将其记为有效数据占比,然后筛选有效数据占比大于 30% 的区域。本课题组前期^[17]得出如下结论:同种质粒的 F_c/I_{DD} 计数直方图满足单峰高斯分布,两种及两种以上质粒的 F_c/I_{DD} 计数直方图表现为存在与质粒数对应的多个高斯峰。根据该原理,本课题组对经过有效数据筛选的区域逐区域绘制 F_c/I_{DD} 计数直方图,对其进行归一化后得到频率分布图,然后用单峰高斯函数进行拟合(单峰高斯函数拟合程度用统计学中 R^2 表示)。图 2(a)表示一个分割区域内存在两种质粒时的 F_c/I_{DD} 频率分布图和单峰高斯函数拟合曲线,此时单峰高斯函数的拟合程度较低。统计结果显示,当单峰高斯函数的拟合程度大于 0.9 时,可认为该区域内仅存在一种质粒。再次筛选出单峰高斯拟合程度大于 0.9 的区域,排除一个区域存在多种质粒时对质粒标准线确定的影响。

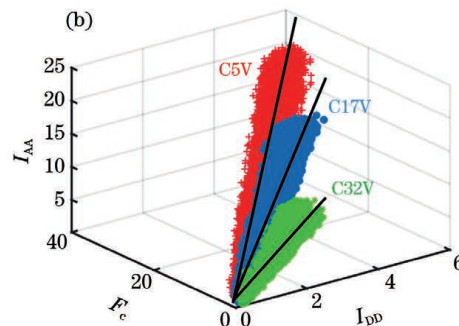


图 2 确定三种 FRET 标准质粒的标准线。(a)相邻两个细胞荧光图像的逐像素 F_c/I_{DD} 频谱图,该相邻细胞区域单峰的高斯拟合程度为 0.82;(b)三种 FRET 标准质粒的标准线,拟合得到的质粒标准线在图中用黑色实线表示,不同的质粒用不同的符号表示,其中符号“+”表示 C5V 质粒,“●”表示 C17V 质粒,“*”表示 C32V 质粒

Fig. 2 Determining the standard lines of three kinds of FRET standard plasmids. (a) Pixel by pixel F_c/I_{DD} spectrum diagram of fluorescence images of two adjacent cells, and the single peak Gaussian fitting degree in this region is 0.82; (b) standard lines of three kinds of FRET standard plasmids (in the figure, the black solid lines represent fitted standard line. Different kinds of plasmids are represented by different shapes of symbols: the symbol “+”, “●”, and “*” represent plasmids C5V, C17V, and C32V)

3) 确定质粒标准线

针对每个筛选后的区域,计算其 k 值范围,然后根据表 1 所示不同质粒的 k 值范围,对步骤三中的步骤 2) 筛选出的区域进行归类。对于归类成功的各区域集合,分别以 I_{DD} 、 F_c 和 I_{AA} 为 x 、 y 和 z

轴绘制空间散点图,然后用最小二乘法拟合有关 I_{DD} 、 F_c 、 I_{AA} 的空间直线,并将拟合的直线作为每种质粒的标准线,如图 2(b)所示。

步骤四:根据式(3)与式(4)对步骤三确定的每种质粒的标准线进行最小二乘法拟合,得到系统校

正因子 G 和 β 。

步骤五:根据质粒标准线进行分类。对步骤三确定的每种质粒的标准线,逐像素求坐标为 I_{DD} 、 F_c 、 I_{AA} 的空间点到每条质粒标准线的距离 $d_n (n=1, 2, \dots, n)$, 公式为

$$d_n = \frac{|\mathbf{M}_0 \mathbf{M} \times \mathbf{s}|}{|\mathbf{s}|}, \quad (5)$$

式中: \mathbf{s} 为标准线 $L_i (i=1, 2, \dots, n)$ 的空间向量; \mathbf{M} 为直线 L_i 上任一点的坐标; \mathbf{M}_0 为所求空间点的坐标。比较点 \mathbf{M}_0 与每条标准线的距离,并判断该点距哪条标准线最近。距离哪条标准线最近,则该点属于该标准线对应的质粒。

3 分析与讨论

3.1 对一皿四质粒中的重叠细胞进行分类

本文发展的基于一次成像测量系统校正因子的 AutoQT-FRET 方法包括图像识别、背景去除、区域分割、质粒分类、 G 和 β 值拟合的自动程序,目的是达到仅需一皿细胞一次成像一键操作就可以测量得到准确的系统校正因子 G 和 β 。本文提出的 AutoQT-FRET 方法不仅可以对一皿转染了多种质粒的细胞进行分类,还可以准确地对重叠在一起的转染了不同质粒的细胞进行边界的划分。图 3(a) 是根据 AutoQT-FRET 方法进行质粒分类的结果,白框区域中的细胞为叠加在一起的转染了两种质粒的细胞。本文提出的 AutoQT-FRET 方法根据转染质粒的不同,准确地区分了这两个细胞的轮廓范围,如图 3(b) 所示。同时,由于细胞自发荧光和背景噪声的影响,合理地背景进行过滤是必要,尽管这有可能导致低表达质粒被忽略。

3.2 三种不同方法的 G 值测量

使用 AutoQT-FRET 方法分类出一个视野中存在的多种质粒后即可分别用 TP-G 方法、TH-M 方法、AutoQT-FRET 方法进行校正因子 G 的测量。首先对已分类成功的 22 个视野共 200 个转染了 C5V、C17V、C32V、CTV 的一皿四质粒细胞使用 TP-G 方法进行分析。由于 TP-G 方法仅允许对双质粒进行测量,因此分别选取了 TP-G-1 (C5V 与 CTV)、TP-G-2 (C17V 与 CTV)、TP-G-3 (C32V 与 CTV) 三组数据进行分析(如图 4 所示),得到校正因子 G 分别为 5.34 ± 1.63 、 3.99 ± 1.39 、 3.01 ± 1.27 。由于 TP-G 方法仅使用两种质粒进行测量,受质粒表达程度的影响很大,因此采用该方法得到的不同质粒组合的系统校正因子 G 值相差较大。

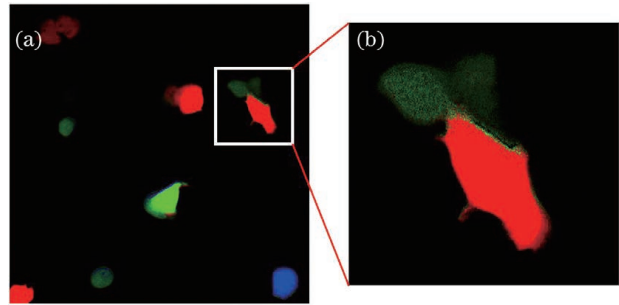


图 3 一皿多种质粒细胞的分类。(a)一皿多种质粒细胞的分类结果。用 AutoQT-FRET 方法对该视野进行分类,可发现该视野存在三种转染了不同 FRET 标准质粒的细胞。红色细胞表示转染了 C5V 质粒,蓝色细胞表示转染了 C17V 质粒,绿色细胞表示转染了 C32V 质粒。(b)重叠细胞的分类结果

Fig. 3 Classification of multiple plasmid cells in one culture dish. (a) Classification result of multiple plasmid cells in one culture dish. Using AutoQT-FRET method to classify this visual field, we can find that there are three kinds of cells transfected with different FRET standard plasmids. Red, blue, and green cells show that plasmids C5V, C17V, and C32V were transfected, respectively. (b) Classification result of overlapping cells in

Fig. 3 (a)

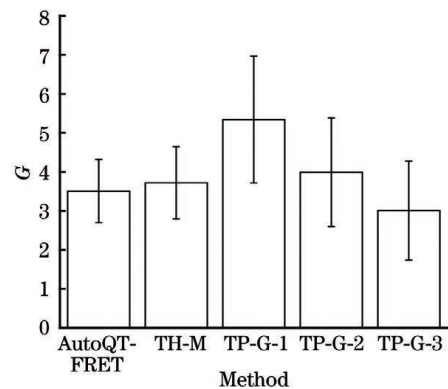


图 4 不同方法测量系统校正因子 G 的统计结果,其中 TP-G-1 代表用 C5V 与 CTV 质粒测量校正因子 G 的方法,TP-G-2 代表用 C17V 与 CTV 质粒测量校正因子 G 的方法,TP-G-3 代表用 C32V 与 CTV 质粒测量校正因子 G 的方法

Fig. 4 Statistical results obtained using different methods to measure system correction factor G . TP-G-1, TP-G-2, and TP-G-3 represent the methods of measuring correction factor G with C5V and CTV plasmids, C17V and CTV plasmids, and C32V and CTV plasmids, respectively

故而,TP-G 方法可能不是用于校正因子 G 拟合的最优方法。

然后本课题组使用 AutoQT-FRET 方法和 TH-M 方法对同样 22 个视野中 200 个细胞的相关数据进行分析。在 TH-M 方法中,以分类后的质粒图像中提取的 $\frac{I_{DD}}{a \cdot I_{AA}}$ 的平均值作为横坐标,以 $\frac{F_c}{a \cdot I_{AA}}$ 的平均值作为纵坐标,绘制二维散点图,并对其进行最小二乘法拟合。对 22 个视野所求得的 G 值取平均值,得到系统校正因子 G 为 3.72 ± 0.93 ,如图 4 所示。同理,使用 AutoQT-FRET 方法对同样的数据集拟合可得 22 个视野下系统校正因子 G 的平均值为 3.51 ± 0.81 。TH-M 方法和 AutoQT-FRET 法求得的校正因子 G 的误差为 5.64%,在误差允许范围内。可见,TH-M 方法和 AutoQT-FRET 法求得的校正因子具有相似的稳定性,而 AutoQT-FRET 方法可以通过一皿转染多种质粒来大幅减少求解系统校正因子 G 的时间与工作量。

4 结 论

本文发展了基于一次成像测量系统校正因子的智能型 QuanTi-FRET 方法 (AutoQT-FRET 方法)。该方法通过一皿转染多种质粒的方法大幅减少了计算系统校正因子 G 的时间和流程,并提高了测量的稳定性;同时,该方法可以对一皿共转多种质粒的视野进行分类,分类时间仅需数秒,具有快速、准确等特点。AutoQT-FRET 方法实现了一皿细胞一次成像一键操作即可准确测得系统校正因子 G 和 β ,大幅简化了数据处理的流程,降低了研究人员使用定量 FRET 测量的门槛。AutoQT-FRET 方法具有较强的鲁棒性,并且测量过程更加快速简洁。

参 考 文 献

- [1] Placone J, Hristova K. Direct assessment of the effect of the Gly380Arg achondroplasia mutation on FGFR3 dimerization using quantitative imaging FRET[J]. PLoS One, 2012, 7(10): e46678.
- [2] Deal J, Pleshinger D J, Johnson S C, et al. Milestones in the development and implementation of FRET-based sensors of intracellular signals: a biological perspective of the history of FRET [J]. Cellular Signalling, 2020, 75: 109769.
- [3] Elder A D, Domin A, Schierle G S K, 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(1): S59-S81.
- [4] Raicu V. Efficiency of resonance energy transfer in homo-oligomeric complexes of proteins [J]. Journal of Biological Physics, 2007, 33(2): 109-127.
- [5] 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.
- [6] Luo L L, Niu J J, Mo B X, et al. Advances in the application of Förster resonance energy transfer and fluorescence lifetime imaging microscopy (FRET-FLIM) technique in life science research[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2021, 41(4): 1023-1031.
罗淋淋, 牛敬敬, 莫蓓蓓, 等. 荧光共振能量转移-荧光寿命显微成像(FRET-FLIM)技术在生命科学中的应用进展[J]. 光谱学与光谱分析, 2021, 41(4): 1023-1031.
- [7] Liu L X, Qi M J, Gao P, et al. Application of fluorescence lifetime imaging in cancer diagnosis (invited)[J]. Acta Photonica Sinica, 2021, 50(10): 1017001.
刘立新, 齐美捷, 郜鹏, 等. 荧光寿命成像在癌症诊断研究中的应用(特邀)[J]. 光子学报, 2021, 50(10): 1017001.
- [8] Yin A, Chen T S. Quantitative fluorescence resonance energy transfer measurement based on spectral unmixing [J]. Chinese Journal of Lasers, 2020, 47(2): 0207009.
尹傲, 陈同生. 基于光谱分离的定量荧光共振能量转移检测[J]. 中国激光, 2020, 47(2): 0207009.
- [9] Kawano K, Yano Y, Omae K, et al. Stoichiometric analysis of oligomerization of membrane proteins on living cells using coiled-coil labeling and spectral imaging[J]. Analytical Chemistry, 2013, 85(6): 3454-3461.
- [10] Ben-Johny M, Yue D N, Yue D T. Detecting stoichiometry of macromolecular complexes in live cells using FRET[J]. Nature Communications, 2016, 7: 13709.
- [11] Zal T, Gascoigne N R J. Photobleaching-corrected FRET efficiency imaging of live cells[J]. Biophysical Journal, 2004, 86(6): 3923-3939.
- [12] Chen H M, Puhl H L, Koushik S V, et al. Measurement of FRET efficiency and ratio of donor to acceptor concentration in living cells[J]. Biophysical Journal, 2006, 91(5): L39-L41.
- [13] 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.

- [14] Coullomb A, Bidan C M, Qian C, et al. QuanTi-FRET: a framework for quantitative FRET measurements in living cells[J]. Scientific Reports, 2020, 10: 6504.
- [15] 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.
- [16] 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.
- 孙晗, 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.
- [17] Yin A, Sun H, Chen H C, et al. Measuring calibration factors by imaging a dish of cells expressing different tandem constructs plasmids [J]. Cytometry Part A, 2021, 99(6): 632-640.

Automatic QuanTi-FRET Method for Measuring System Correction Factors Based on Single Imaging

Gao Lu^{1,2}, Zhai Shixian^{1,2}, Sun Han^{1,2}, Chen Tongsheng^{1,2*}

¹MOE Key Laboratory of Laser Life Science & Institute of Laser Life Science, College of Biophotonics, South China Normal University, Guangzhou, Guangdong 510631, China;

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

Abstract

Objective Quantitative fluorescence resonance energy transfer (FRET) is an important technology that can be used to study molecular interactions in living cells, analyze the molecular structure of oligomerized proteins, and study regulatory mechanisms between proteins in signal pathways. A prerequisite for quantitative FRET detection technology is determining the correction factor of the FRET measurement system. Among many system calibration factors, the system calibration factor (G) related to the inherent performance of the instrument and fluorescent molecules is particularly important. However, traditional methods, such as the donor-dequenching method, TP-G method, and two hybrid-multi plasmid methods, are cumbersome. The QuanTi-FRET method can measure the sensitized quenching transition factor (G) and the donor and the acceptor excitation correction factor (β) of a FRET imaging system by performing multiple FRET imaging for different types (≥ 3) of standard FRET plasmid samples. However, this method is challenged by the difficulty in switching multi-dish cells to measure different types (≥ 3) of standard FRET plasmid samples and thus ensuring the same contrast and background signals when imaging multi-dish cell samples separately. In this study, we have developed an automatic QuanTi-FRET method (AutoQT-FRET) to measure the G and β factors by measuring cells that express multiple FRET standard plasmids with different FRET efficiencies in a cell petri dish. We hope that our method can be helpful for researchers using quantitative FRET technology.

Methods In this study, quantitative FRET and living-cell fluorescence imaging were performed using our multi-modal FRET microscopy imaging system, mainly consisting of an inverted wide-field fluorescence microscope (IX73, Olympus, Japan) and a high-sensitivity CMOS camera (ORCA-Flash 4.0, Hamamatsu, Japan). The AutoQT-FRET method contains four steps: (1) Combine the cells transfected with different types of FRET standard tandem plasmids (C5V, C17V, C32V, and CTV) into one cell petri dish to perform three-channel imaging. (2) Divide the three-channel image into regions, and classify regions using different FRET standard plasmids. (3) Draw a three-dimension spatial scatter map pixel-by-pixel for the successfully classified regions to determine the plasmid standard line. (4) Use the plasmid standard line to classify the plasmid, and measure the G and β values in the cell regions of the entire field of vision.

Results and Discussions In this study, the $I_{DD}-F_c$ images of standard FRET plasmids with different FRET efficiencies have different ranges of slope k that do not intersect each other. The k value ranges of the four standard FRET plasmids (C5V, C17V, C32V, and CTV) were listed in Table 1. Using the AutoQT-FRET, we classified cells transfected with multiple standard FRET plasmids in a cell petri dish and labeled them with different colors

[Fig. 3(a)]. Simultaneously, the AutoQT-FRET method classified cells transfected with multiple standard FRET plasmids in one cell petri dish and accurately divided the cell boundaries of overlapping cells transfected with different standard FRET plasmids [Fig. 3(b)]. In Fig. 3(b), we accurately classified two overlapping cells transfected with different standard FRET plasmids, and the red and green cells were transfected with C5V and C32V plasmids, respectively. Furthermore, we used the classification results of the cells transfected with multiple standard FRET plasmids in one cell petri dish to measure the correction factor G using the TP-G, TH-M, and AutoQT-FRET methods. As the TP-G method only needs double plasmids, we selected TP-G-1 (C5V and CTV), TP-G-2 (C17V and CTV), and TP-G-3 (C32V and CTV) groups to analyze, and the correction factor G values were 5.34 ± 1.63 , 3.99 ± 1.39 , and 3.01 ± 1.27 . The large error of the result shows that the TP-G method may not be the best method for getting correction factor G . Thereafter, we used the AutoQT-FRET and TH-M methods to analyze the same cell data. Based on the TH-M and AutoQT-FRET methods, the system correction factor G values were obtained as 3.72 ± 0.93 and 3.51 ± 0.81 , respectively (Fig. 4). It shows that the TH-M and AutoQT-FRET methods have similar stability in calculating the correction factor G .

Conclusions We developed an automatic Quanti-FRET (AutoQT-FRET) method to measure the G and β factors by performing single imaging. The method for transfecting multiple plasmids in one cell dish reduces the time and shortens the process of calculating the correction factor G of the system. Simultaneously, the AutoQT-FRET method can classify cells transfected with multiple standard FRET plasmids in a cell petri dish. Thus, it enables the accurate measurement of the system correction factors G and β values using the one-button operation of one-time imaging of a cell petri dish, which greatly simplifies data processing and lowers the threshold for researchers who use quantitative FRET measurements. The AutoQT-FRET method is not only robust but also fast and concise.

Key words biotechnology; fluorescence; resonance; energy transfer; system calibration; fluorescence microscope