

网络出版时间: 2018-11-5 15:37 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20181105.0926.001.html>

◇基础医学研究◇

荧光共振能量转移(FRET)体系的构建及其验证

钱月娇¹, 冯钰斌¹, 钱学文¹, 朱传君¹, 李 鸽¹, 卢 多², 陈飞虎¹

摘要 目的 构建携带 FRET 体系(YFP-CFP 对)的一组原核表达工程质粒,在大肠杆菌(*E. coli*)中高效表达后,验证该体系 FRET 信号作为细胞内监测蛋白相互作用指标的可行性。方法 分别构建 N 端、C 端以及两端分别编码 YFP 和(或) CFP 的 6 个原核表达工程质粒: pNYFP、pCYFP、pNCFP、pCCFP、pYFP-CFP、pCFP-YFP。设计 YFP-CFP 和 CFP-YFP 作为阳性对照,而等量的 YFP 与 CFP 混合的体系(YFP + CFP)作为阴性对照。将过表达的工程蛋白通过镍柱、分子筛层析柱进行初步纯化后使用酶标仪检测相同摩尔浓度纯化蛋白的 FRET 信号。在此基础上,进一步用酶标仪检测表达工程蛋白的菌液中的 FRET 信号。结果 通过测序验证,成功构建了 6 个原核表达的工程质粒。酶标仪检测的结果显示在体外纯化蛋白条件和菌液条件下均可产生明确的 FRET 信号。结论 成功构建了 FRET 体系的原核表达工程质粒,不仅验证了蛋白条件下的可行性,而且验证了菌液条件下的可行性,为在活细胞条件下对蛋白-蛋白相互作用进行实时的动态研究,提供一个非常便利的实验方法。

关键词 荧光共振能量转移;蛋白-蛋白相互作用;活细胞;原核表达;工程质粒;蛋白纯化

中图分类号 R 966

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)12-1821-07
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.12.001

荧光能量共振转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)是较早发展起来的一门技术^[1]。该技术是基于两个荧光源针对其空间距离的差异表现出信号变化的现象而形成的,适用于活细胞和固定细胞各类分子,不破坏研究对象的活性和空间

构象,具有高灵敏度和高分辨率,并能够清晰成像,最直观地观察到蛋白质-蛋白质间相互作用的定位及定量信息^[2-4]。该研究在大肠杆菌系统构建了该体系,且明确了测量细胞内与细胞外信号的可行性。已有研究为了证实距离足够近可以产生 FRET 信号,构建过该体系,但其载体酶切位点较少,重在通过酶切确定 FRET 信号的消失^[5-6]。为此该研究选用具有多酶切位点的载体,重在后续用于具体功能检测而构建的一个新体系。由于两个荧光源蛋白编码基因非常相似^[7],在体系构建过程中存在一定的难度。该体系在药物研究中可以提供对生物大分子之间相互作用检测,进一步可以成为靶向分子间相互作用药物筛选手段。

1 材料与方法

1.1 质粒与菌株 质粒 pET28a(+)由中国医学科学院药物研究所实验室留存;大肠杆菌(*E. coli*) Trans1-T1/Rosetta(DE3)菌株感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司。

1.2 工具酶及主要试剂 DNA 模板 pEYFP-N1、pECFP-N1 购自普如汀生物技术(北京)有限公司;PCR 引物和测序均由睿博兴科生物技术有限公司完成;限制性内切酶 Nde I、BamH I、Not I、Xho I 购自北京经科宏达生物技术有限公司;T4 连接酶购自 NEB(北京)公司;高保真 Taq DNA 聚合酶、1 000 bp DNA Marker、蛋白质标志物购自北京全式金生物技术有限公司;Pure Plasmid Mini Kit、Gel Extraction Kit 均购自北京康为世纪生物科技有限公司;Agarose 购自上海拜力生物科技有限公司;Agar、Gel Green、YEAST EXTRACT、TRYPTONE 购自北京兰伯瑞生物技术有限公司;IPTG、卡纳霉素、氨苄霉素、氯霉素购自上海捷瑞生物工程有限公司;Tris-HCl、咪唑购自上海翊圣生物科技有限公司;Ni 柱、分子筛层析柱购自通用电气公司(GE);蛋白浓缩管(millipore)购自北京希凯创新科技有限公司。

1.3 工程质粒的构建 根据已知的 ECFP、EYFP 的编码 DNA 序列设计引物,并参考空载 pET28a

2018-08-06 接收

基金项目:中国医学科学院医学与健康科技创新工程(编号:2016-I2M-I-009)

作者单位:¹安徽医科大学药学院,合肥 230032

²中国医学科学院药物研究所,北京协和医学院,北京 100032

作者简介:钱月娇,女,硕士研究生;

陈飞虎,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: cfhchina@sohu.com;

卢多,男,研究员,博士生导师,责任作者,E-mail: luduo@imm.ac.cn

(+) 的序列, 设置目的片段的酶切位点 Nde I、BamH I 以及 Not I、Xho I, N 端 CFP 和 N 端 YFP 的上下游引物为: 5'-GGGAATTCCATATGGTGAGCAA GGGCGAGG-3', 5'-CGGGATCCCTTGTACAGCTCGTC CATGC-3'; C 端 CFP 和 C 端 YFP 的上下游引物为 5'-AAGGAAAAAAGCGGCCGCTGAGCAAGGGCGA GG-3', 5'-CCGCTCGAGCTTGTACAGCTCGTCCATGC-3'。再将 pEYFP-N1 和 pECFP-N1 作为 DNA 模板, 分别进行常规 PCR 反应。PCR 反应体系均为(50 μ l): 2 $\times$ Taq DNA 聚合酶反应混合液 25 μ l, 上下游引物(10 μ mol/L) 各 2 μ l, DNA 模板 0.25 μ g, 加 ddH₂O 至 50 μ l。PCR 的反应过程均为: ① 95.0 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; ② 开始进行 30 个循环: 95.0 $^{\circ}$ C 变性 1 min (50.0 $\pm$ 6.0) $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72.0 $^{\circ}$ C 延伸 30 s; ③ 循环结束; ④ 72.0 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min。DNA 琼脂糖凝胶(1%) 电泳分离 PCR 产物与模板 DNA, 使用 Gel Extraction Kit 回收 PCR 产物, 并用紫外分光光度仪测量其回收后的浓度; 再将空载 pET28a(+) 与胶回收 PCR 产物分别进行双酶切处理。N 端 CFP 和 N 端 YFP 工程质粒构建的双酶切体系为(40 μ l): Green buffer(10 $\times$) 4 μ l、DNA 总量为 1.8 μ g、Nde I 2 μ l、BamH I 2 μ l、加 ddH₂O 至 40 μ l。37 $^{\circ}$ C, 过夜。将过夜双酶切的质粒或 PCR 产物再分别进行切胶回收, 测其浓度。最后将回收的载体与目的片段按一定比例(1:3~1:9) 混合, 并使用 T4 连接酶, 16 $^{\circ}$ C 过夜连接, 连接体系为(10 μ l): T4 连接酶缓冲液 1 μ l, 回收的目的片段 + 载体 8 μ l, T4 DNA 连接酶 1 μ l。同时设立空白对照组。连接产物与空白对照组分别转化至 Trans1-T1 菌株, 37 $^{\circ}$ C 过夜恒温孵育。后续通过菌落 PCR 或双酶切验证初筛阳性克隆, 最后的结果以测序公司的测序结果为准; C 端 CFP 和 C 端 YFP 工程质粒的构建方法同上, 只是将 PCR 反应中的上下游引物换成 C 端的上下游引物, 且将限制性内切酶换为 Not I、Xho I 进行双酶切反应。N 端 CFP 和 C 端 YFP 融合蛋白工程质粒的构建, 是将构建好的 N 端 CFP 工程质粒和构建好的 C 端 YFP 工程质粒分别用 Not I、Xho I 进行双酶切反应, 切胶回收测其回收产物的浓度, 连接转化, 测序确定阳性重组克隆; N 端 YFP 和 C 端 CFP 融合蛋白工程质粒的构建, 则是将构建好的 N 端 YFP 工程质粒和构建好的 C 端 CFP 工程质粒分别用 Nde I、BamH I 进行双酶切反应, 切胶回收测其回收产物的浓度, 连接转化, 测序确定阳性重组克隆。

1.4 工程蛋白的诱导表达及其鉴定 阳性重组质

粒分别转化至 Rosetta(DE3) 菌株中, 挑单个菌落于加有卡纳霉素(终浓度为 50 μ g/ml)、氯霉素(终浓度 34 μ g/ml) 的 LB 培养基中, 置于摇床中 37 $^{\circ}$ C、220 r/min 过夜振荡培养。按 1:50 的转接比转接入新的加有抗生素的 LB 培养基中, 摇床振荡培养到 OD 值为 0.6, 加入 IPTG 进行诱导, IPTG 浓度分别设为 0.1、0.5、1 mmol/L 3 个梯度; 温度分别设为 37、16 $^{\circ}$ C; 诱导时间分别设为 37 $^{\circ}$ C 为 2 h、16 $^{\circ}$ C 则过夜; 同时设立未诱导组作为空白对照。收集诱导的菌液和未诱导的菌液用 SDS-PAGE 电泳检测(菌液离心后放 -80 $^{\circ}$ C 冰箱冻融破碎, 未 95 $^{\circ}$ C 加热变性), 用荧光凝胶成像系统检测其荧光, 同时用考马斯亮蓝染色观察蛋白条带位置, 确定合适的诱导表达条件以及鉴定目的蛋白。

1.5 重组蛋白的纯化 配制 Ni 柱纯化缓冲液为 A 液: 500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 甘油 5% (v/v); B 液: 150 mmol/L NaCl, 250 mmol/L 咪唑 (pH 8.0), 甘油 5% (v/v); 分子筛纯化缓冲液为 150 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 甘油 5% (v/v)。纯化步骤: 取保存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱诱导表达的菌沉淀(500 ml 菌液离心) 至于冰上, 让其慢慢解冻, A、B 液中分别按 1:100 加入 PMSF(50 mmol/L), 1:1000 加入苯胺(1 mol/L) (现用现加), 菌沉淀加入 A 液至 5 ml, 至冰上超声破碎 2 min, 再加入 50 μ l MgCl₂ (1 mol/L), 50 μ l DNase I (10 mg/ml), 冰上放置 30 min, 18 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心取上清液加入用 A 液平衡过的 Ni 柱(1 ml) 中, 进行纯化。纯化程序为: 0 的 B 液洗脱 10 ml, 10% 的 B 液洗脱至 15 ml, 每管收集 4 ml; 而后用 100% 的 B 液拉梯度洗脱到 22 ml, 每管收集 0.5 ml; 再用 100% B 液继续洗脱到 30 ml, 每管收集 0.5 ml; 100% B 液洗脱至紫外趋平, 每管收集 4 ml。根据出峰位置取样进行 SDS-PAGE 电泳, 获取目的蛋白, 观察蛋白纯度, 并用蛋白浓缩管浓缩至 500 μ l。将浓缩后的蛋白进一步用分子筛(superdex 200) 进行分离, 同样根据出峰位置取样跑 SDS-PAGE 胶获得目的蛋白, 并浓缩至 200 μ l, 测其浓度后分装保存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱。

1.6 FRET 体系的验证 将纯化后的 N 端 CFP、N 端 YFP、CFP-YFP、YFP-CFP 四种蛋白以相同的摩尔浓度(12.7 μ mol/L) 加到 96 孔板中, 每孔 200 μ l (1 μ l 蛋白 + 199 μ l ddH₂O), 用酶标仪分别在激发光 430、480 nm 时对发射光进行扫描, 并在发射光 510 nm 处对激发光进行扫描, 由此确定本实验所用的黄

色荧光蛋白和青色荧光蛋白所对应的的激发波长和发射波长,以及在波长 430/480 nm 和 480/530 nm 处检测其荧光值的变化情况;并平行进行了 4 种蛋白诱导表达后的菌液,将其离心除去 LB 培养基,以降低酶标仪检测时可能的背景值,再以等量 T. S. E (10 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 100 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA) 进行重悬,测其四者菌液的 OD 值,以相同 OD 值(1.6)菌液加到 96 孔板,每孔 200 μ l,用酶标仪进行检测。

2 结果

2.1 目的基因 PCR 扩增及阳性克隆鉴定 C 端 CFP 和 N 端 CFP 目的片段的扩增,退火温度均分别设为 50、55、60 $^{\circ}$ C,同时进行 PCR 反应,反应结束后,1% 琼脂糖凝胶电泳可见 720 bp 的 DNA 片段,与预期序列大小均一致,见图 1A。而 C 端 YFP 目的片段的扩增,退火温度分别设为 50.5、55.5、60.3 $^{\circ}$ C;N 端 YFP 目的片段的扩增,退火温度分别设为 45.5、50.4、55.2 $^{\circ}$ C,同时进行 PCR 反应,反应结束后,1% 琼脂糖凝胶电泳可见 720 bp 的 DNA 片段,与预期序列大小均一致,见图 1B。连接产物转化至 Trans1-T1 后摇菌提质粒进行菌落 PCR 验证,1% 琼脂糖凝胶电泳结果显示在 720 bp 有电泳条带的出现,与预期结果一致,见图 1C。测序结果分别进行 BLAST 比对和软件分析后,显示 pNYFP、pCYFP、pNCFP、pCCFP、pYFP-CFP、pCFP-YFP 重组质粒均构建成功,见图 2。

2.2 小量诱导表达与目的蛋白的鉴定 YFP-CFP 蛋白和 CFP 蛋白同时在 37 $^{\circ}$ C,2 h,IPTG 分别为 0.1、0.5、1 mmol/L 以及在 16 $^{\circ}$ C 过夜,IPTG 分别为 0.1、0.5、1 mmol/L 的条件下进行小量诱导表达实验后,同时进行 SDS-PAGE 电泳,荧光凝胶成像系统检测其荧光显示 IPTG 诱导目的蛋白的适宜条件:CFP 蛋白 16 $^{\circ}$ C,过夜表达;YFP-CFP 蛋白 37 $^{\circ}$ C,2 h,均对 IPTG 在 3 个浓度时没有明显区别,且 YFP-CFP 蛋白荧光的位置明显高于 CFP 蛋白荧光的位置,符合两者的蛋白大小,见图 3A。本实验所诱导蛋白均采用 IPTG 0.1 mmol/L,16 $^{\circ}$ C 过夜表达。考马斯亮蓝染色后,可见 CFP 蛋白在 25~35 ku 之间,YFP-CFP 蛋白在 60~75 ku 之间,与目的蛋白大小保持一致,且空白对照组没有目的蛋白的表达,见图 3B。

2.3 蛋白纯化 蛋白(以 CFP 为例)经过 Ni 柱纯化显示,从咪唑浓度为 65 mmol/L 左右的洗脱液中

初步分离得到目的蛋白,蛋白大小在 25~35 ku 之间,与预期蛋白大小一致。分子筛层析分离结果显示得到了较纯的目的蛋白,见图 4。

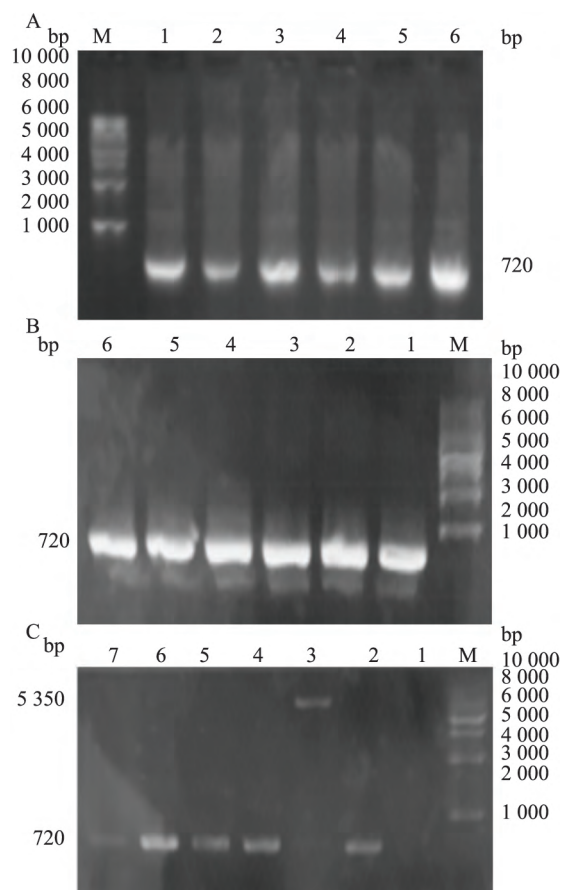


图1 目的基因 PCR 扩增及菌落 PCR 验证

M: 1 000 bp DNA Marker; A: 1~3: C 端 CFP 目的片段 PCR 扩增结果;4~6: N 端 CFP 目的片段 PCR 扩增结果; B: 1~3: C 端 YFP 目的片段 PCR 扩增结果;4~6: N 端 YFP 目的片段 PCR 扩增结果; C: N 端 CFP、YFP, C 端 CFP、YFP 重组质粒菌落 PCR 验证结果; 1: 没有加样; 2: 阳性对照; 3: 阴性对照; 4: pNCFP; 5: pNYFP; 6: pCCFP; 7: pCYFP

2.4 FRET 体系的验证 分别在蛋白条件下和菌液条件下进行了验证。首先在蛋白条件下,酶标仪检测 FRET 信号:4 种蛋白以相同摩尔浓度分别加到 96 孔板中,在激发波长为 430 nm 下,对发射波长在 450~600 nm 范围内进行扫描,而后将数据统计处理绘制成图,见图 5,可以检测到 CFP 在 480 nm 处有最大峰值,且在 510 nm 处伴有肩峰的存在,而 YFP 在 530 nm 处有最大峰值,同时对其激发波长在 480 nm 时,对发射波长在 500~600 nm 范围内进行扫描,并将数据统计处理绘制成图,见图 6,可以看到 CFP 随着波长的增大,逐渐降低,YFP 在 530 nm 处荧光值达到最高峰值,表明该实验所用的 CFP 最适激发波长为 430 nm,发射波长为 480 nm 和 510

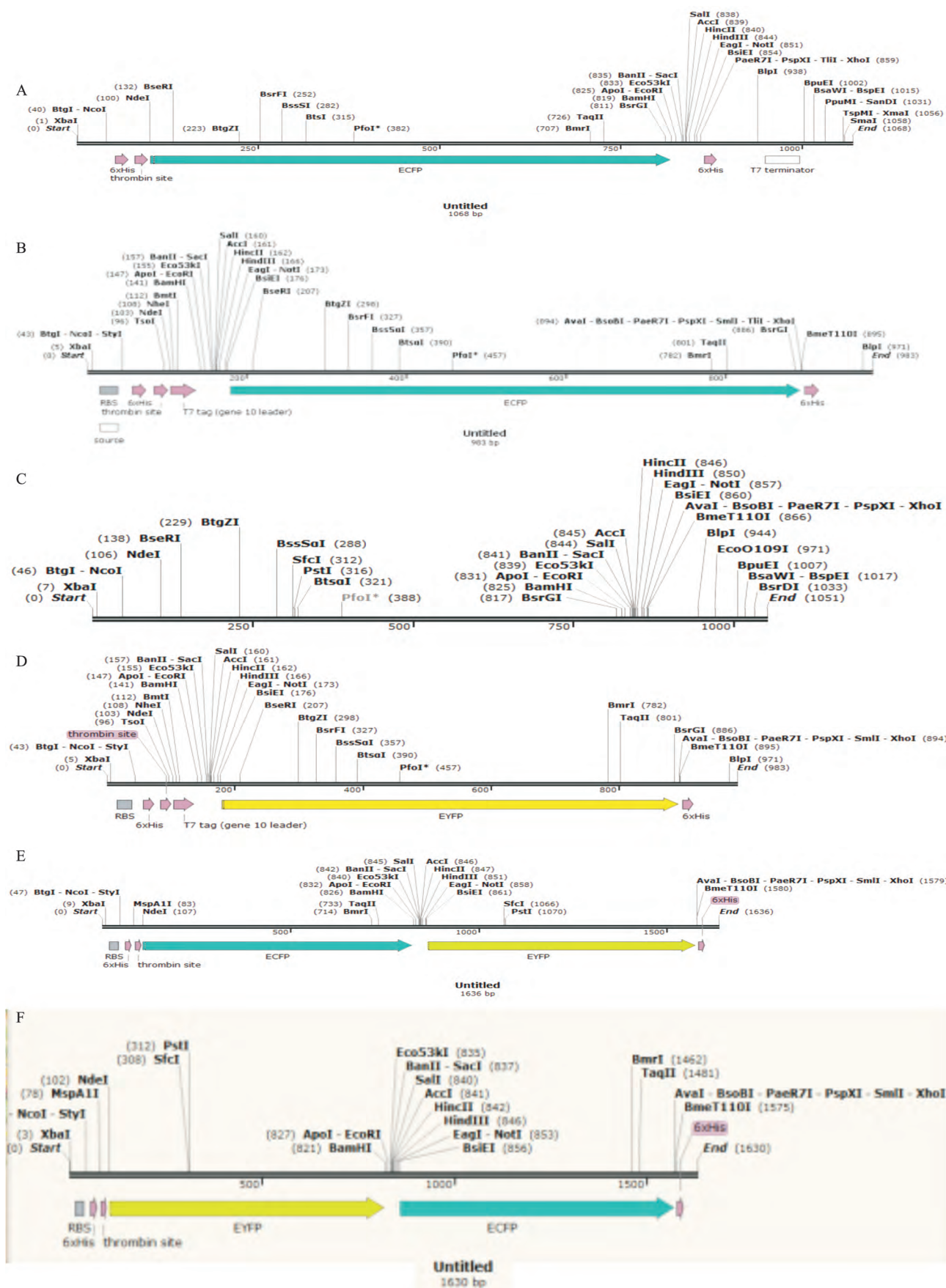


图2 测序结果 BLAST 比对及软件分析

A: pNCFP; B: pCCFP; C: pNYFP; D: pCYFP; E: pCCFP-YFP; F: pYFP-CFP

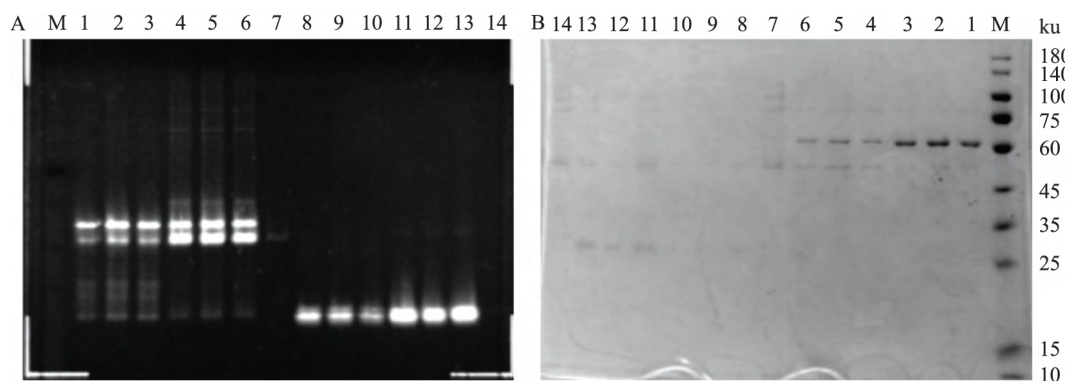


图3 SDS-PAGE 检测 IPTG 小量诱导表达情况

M: Marker; A: 荧光凝胶成像系统检测荧光结果; B: 考马斯亮蓝染色结果; 1~7: YFP-CFP 蛋白的表达结果; M: Marker; 7: 空白对照, 16 °C 未加 IPTG 过夜; 8~14: CFP 蛋白的表达结果; 14: 空白对照, 16 °C 未加 IPTG 过夜

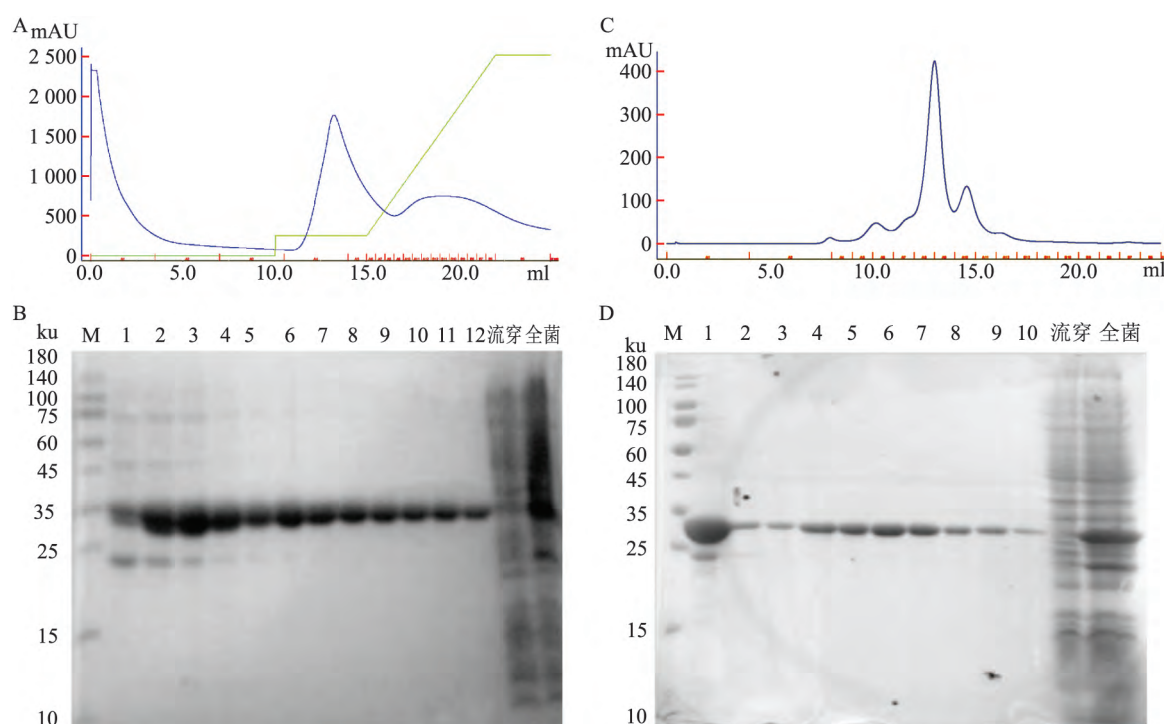


图4 蛋白纯化的峰图以及 SDS-PAGE 电泳检测的结果图

A: CFP 蛋白过 Ni 柱的峰图 横坐标是洗脱体积 (ml) 纵坐标是响应值 (mAU); B: CFP 蛋白过 Ni 柱后 SDS-PAGE 电泳检测结果; M: Marker; 1~12: 过 Ni 柱后的洗脱样品; C: 粗制备的 CFP 蛋白进一步过分子筛的峰图 横坐标是洗脱体积 (ml) 纵坐标是响应值 (mAU); D: 粗制备的 CFP 蛋白过分子筛后 SDS-PAGE 电泳检测结果; M: Marker; 1~10: 过分子筛后的洗脱样品

nm, 而 YFP 最适激发波长为 480 nm, 发射波长为 530 nm。同时在发射波长 510 nm 处, 对激发波长在 400~490 nm 范围内进行扫描, 见图 7。综合三图, 构建的 YFP-CFP 或 CFP-YFP 融合蛋白较单独存在的 YFP 和 CFP 而言, 可以很明显地看到黄色荧光大幅度上升, 而青色荧光蛋白大幅度减少, 即 FRET 体系构建成功。同时将其用酶标仪在 430/530 nm 和 430/480 nm 处进行检测, 其结果与酶标仪扫描结果一致, 见表 1。其次在菌液条件下, 酶标仪检测

FRET 信号: 虽然荧光值明显降低, 且 FRET 现象不如蛋白条件下的更加明显, 但依旧可以较为清晰地看到 FRET 现象的产生, 且可以看到阴性对照组 YFP + CFP 无 FRET 现象产生, 与预期结果保持一

表1 酶标仪同时对黄色荧光蛋白和青色荧光蛋白进行检测

检测波长 (nm)	荧光值			
	CFP	YFP	CFP-YFP	YFP-CFP
430/530	11 695	3 151	31 577	15 817
430/480	51 608	19	24 618	14 866

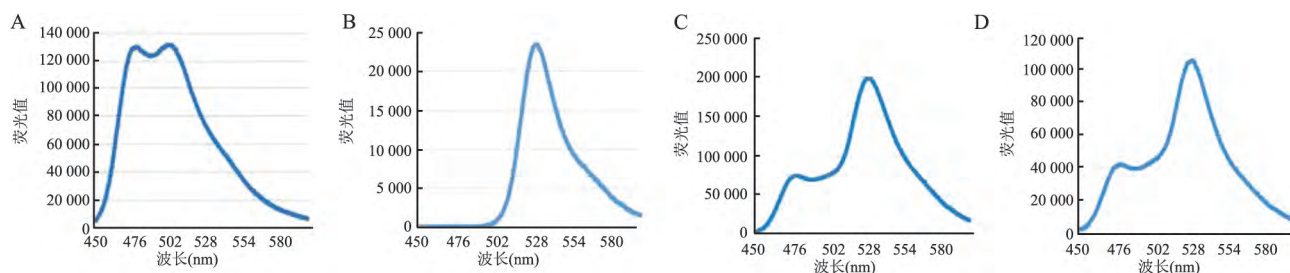


图5 激发波长 430 nm 时对发射波长在 450 ~ 600 nm 范围内进行扫描

A: CFP 蛋白; B: YFP 蛋白; C: CFP-YFP 融合蛋白; D: YFP-CFP 融合蛋白

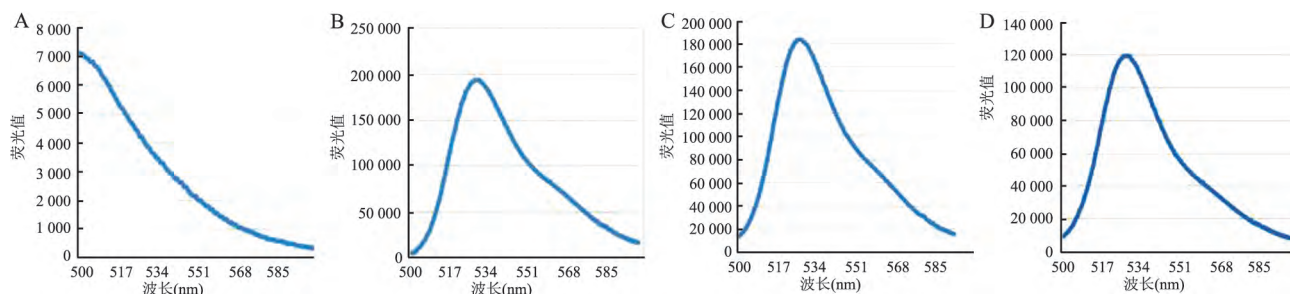


图6 激发波长 480 nm 时对发射波长在 500 ~ 600 nm 范围内进行扫描

A: CFP 蛋白; B: YFP 蛋白; C: CFP-YFP 融合蛋白; D: YFP-CFP 融合蛋白

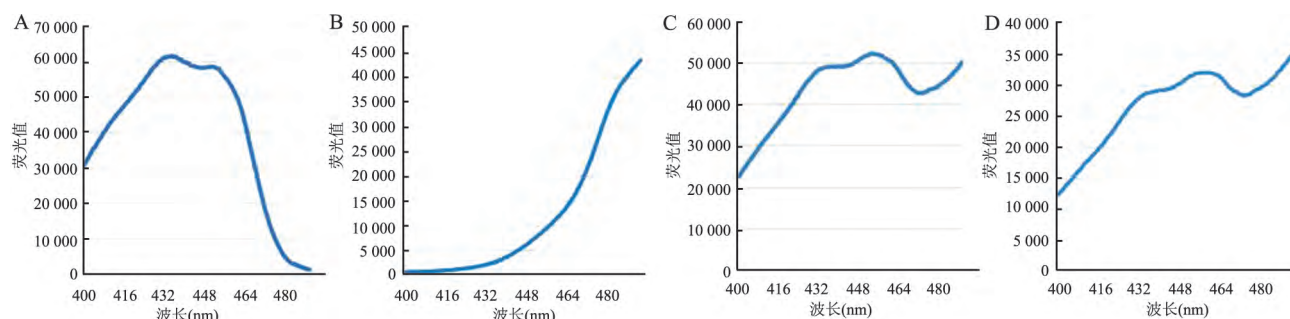


图7 发射波长 510 nm 时对激发波长在 400 ~ 490 nm 范围内进行扫描

A: CFP 蛋白; B: YFP 蛋白; C: CFP-YFP 融合蛋白; D: YFP-CFP 融合蛋白

致,见表2。

表2 酶标仪同时对黄色荧光蛋白和青色荧光蛋白进行检测

检测波长 (nm)	荧光值				
	CFP	YFP	CFP-YFP	YFP-CFP	YFP + CFP
430/530	886	154	258	758	1 020
430/480	3 931	35	311	889	4 350

3 讨论

本课题旨在建立一种行之有效的 FRET 体系,成功构建了 YFP-CFP、CFP-YFP 作为阳性对照,YFP + CFP 作为 FRET 体系的阴性对照。然后对其进行了充分的验证实验,不仅对其在蛋白条件下进行了验证,且在菌液条件下进行了验证,酶标仪结果均显示青色荧光大幅度减弱,黄色荧光大幅度增强,即 FRET 现象的产生,为相关研究者提供了详细而全

面的 protocol,但由于杂蛋白的影响,致使菌液条件下的现象不如蛋白条件下的现象明显。

随着蛋白质间相互作用逐渐成长为一类新兴的药物靶点,快捷简便的功能检测方法势必会有益于药物研究的推进。当前实验室一般比较常用的检测蛋白-蛋白相互作用的方法包括酵母双杂交、噬菌体展示、免疫共沉淀、等温滴定量热、表面等离子共振、热泳动以及荧光共振能量转移等技术^[8-9]。各种技术比较起来,荧光信号属于一种比较灵敏且易于观察的报告形式,配之以生长周期短、遗传背景比较清楚、基因操作方法比较成熟的大肠杆菌异源表达体系,有利于快速形成一个适用于多种蛋白质间相互作用的检测方法^[10]。诚然,大肠杆菌体系不能表达所有异源蛋白质,可能面临表达水平低、蛋白质

折叠错误、修饰欠缺等多种问题,但是这并不能也从来没有阻碍其成为一个广泛应用的异源蛋白表达体系。同时,大肠杆菌属于革兰氏阴性菌,具有两层细胞膜结构,可能在药物筛选中有利于对药物递送能力的检测。同样使用荧光信号检测蛋白质间相互作用的方法还有荧光偏振技术,但是该技术要求荧光标记分子的分子量不能太大,以避免对其偏振能力造成较大的影响,因此与荧光共振能量转移技术相比有更多的局限性。

总之,FRET技术的应用迄今为止非常的广泛,也是目前研究蛋白-蛋白相互作用中非常有价值和发展潜力的一种研究方法。今后的目标主要是以活体细胞和动物作为载体,在其生理条件下实时、动态地阐明分子间的相互作用规律和分子内的构象变化,加深对生命活动基本规律的认识。另外与转基因等生物技术的结合,将其应用到细胞分子水平的高通量药物筛选中去,也十分具有发展前景^[11]。随着FRET技术应用及其研究的不断深入,必将对现代生命科学研究的发展起着重大的推动作用。

参考文献

- [1] 张顺超,沈国励,李合松. 共振能量转移技术在生命科学中的应用研究新进展[J]. 分析科学学报, 2015, 31(4): 560-6.
- [2] Sun Y, Rombola C, Jyothikumar V, et al. Förster resonance energy transfer microscopy and spectroscopy for localizing protein-protein interactions in living cells[J]. *Cytometry A*, 2013, 83(9): 780-93.
- [3] Leavesley S J, Andrea L B, Cichon L K, et al. Assessing FRET using spectral techniques[J]. *Cytometry A*, 2013, 83(10): 898-912.
- [4] 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.
- [5] 金艳燕,邓君,金良韵,等. 荧光共振能量转移技术阳性参照质粒的构建及其应用[J]. 山西医科大学学报, 2015, 46(11): 1074-8.
- [6] 刘波,邵帅,谢飞,等. 荧光共振能量转移技术在细胞离子研究中的应用[J]. 北京生物医学工程, 2015, 34(2): 196-202.
- [7] Ganesan S, Meer-Beg S M, Ng T T, et al. A dark yellow fluorescent protein (YFP)-based resonance energy-accepting chromoprotein (REACH) for forster resonance energy transfer with GFP[J]. *PNAS*, 2006, 103(11): 4089-94.
- [8] Uhm H, Kang W, Ha K S, et al. Single-molecule FRET studies on the cotranscriptional folding of a thiamine pyrophosphate riboswitch[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(2): 331-6.
- [9] Goryashchenko A S, Khrenova M G, Savitsky A P. Detection of protease activity by fluorescent protein FRET sensors: from computer simulation to live cells[J]. *Methods Appl Fluoresc*, 2018, 6(2): 022001.
- [10] Konagaya Y, Terai K, Hirao Y, et al. A highly sensitive FRET biosensor for AMPK exhibits heterogeneous AMPK responses among cells and organs[J]. *Cell Rep*, 2017, 21(9): 2628-38.
- [11] BenJohny M, Yue D N, Yue D T. Detecting stoichiometry of macromolecular complexes in live cells using FRET[J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 13709.

Construction and validation of a fluorescence resonance energy transfer (FRET) system

Qian Yuejiao, Feng Yubin, Qian Xuwen, et al

(School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To construct a set of plasmids carrying an inducible prokaryotic expression cassette for FRET system (YFP-CFP pair) and verify the feasibility of this system in detecting the FRET signal of protein-protein interactions inside living *E. coli* cells upon over-expression. **Methods** Six plasmids were constructed to encode YFP and(or) CFP at N-terminus, C-terminus, or both termini, namely pNYFP, pCYFP, pNCFP, pCCFP, pYFP-CFP, pCFP-YFP. YFP-CFP and CFP-YFP were designed to perform as a positive control, and the mixture of YFP + CFP in equal molar ratio was deployed as a negative control in FRET signal examinations. The FRET signals were examined in a microplate reader with the purified proteins in same molar concentration after the over-expressed protein was primarily purified on Ni column and molecular sieve chromatography. In addition, the bacteria hosting the over-expressed fluorescent proteins expressed were examined in the microplate reader. **Results** The set of 6 plasmids were constructed, and the correctness was verified by sequencing. The target protein was preliminarily purified through the Ni column, and reached a reasonable purity after the molecular sieve chromatography. The results from microplate reader suggested that FRET signals were readily detectable under both the purified protein condition and the bacteria suspension condition. **Conclusion** The prokaryotic expression recombinant plasmids are successfully constructed for a FRET system, which is not only proved feasible with purified proteins but also under the condition of living bacteria. The convenient experimental method will help the real-time studies of the dynamic protein-protein interactions under physiological conditions in living cells.

Key words fluorescence resonance energy transfer; protein-protein interaction; living cells; prokaryotic expression; engineering plasmids; protein purification