

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 荧光共振能量转移技术诞生以来，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。

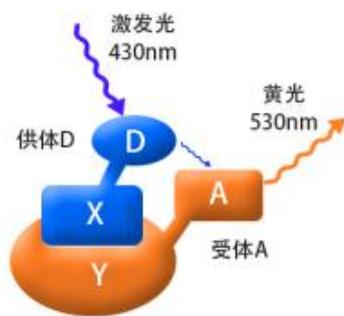
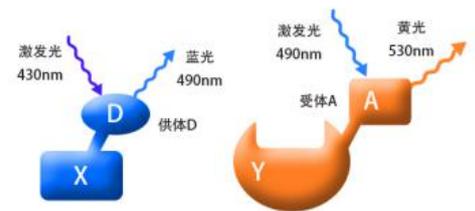
作用原理

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 > 10nm)，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 < 10nm，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 < 10nm；

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
<p>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；</p> <p>灵敏度高，可实现对单细胞水平的研究，研究单个受体分子；</p> <p>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；</p>	<p>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）；</p> <p>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；</p> <p>需要不断探索合适的供体和受体，且能够标记分子；</p> <p>难以观察瞬时的分子间作用，检测要求大量的样品；</p>

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。

更多优质服务推荐

1

SingleB® mAb Discovery Service

SingleB®单B细胞快速单抗发现

德泰生物提供SingleB®单B细胞快速单抗发现服务,利用SmartFlow® FACS记忆B细胞筛选平台与DeepLight®浆细胞筛选平台,实现记忆B细胞与浆细胞的双筛选。平台适用于小鼠、兔、羊驼、人源化小鼠、绵羊等多种免疫对象,从动物免疫到获得单抗,快至29天,比传统杂交瘤技术至少节省120天。

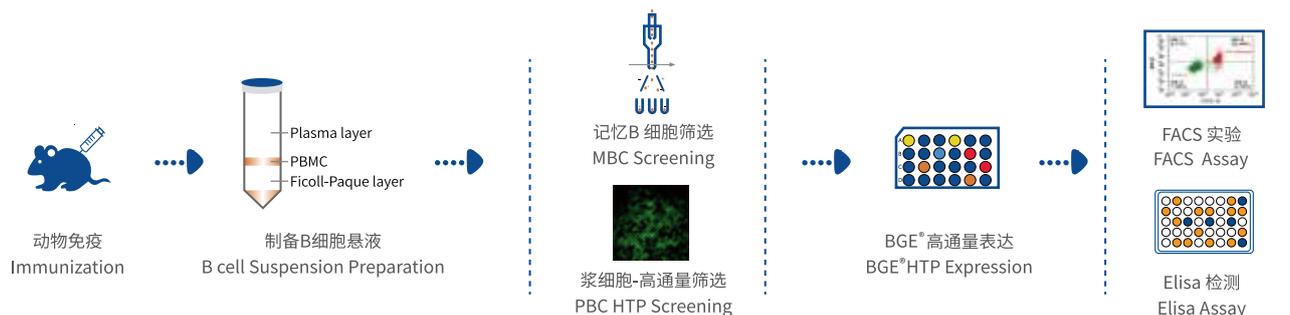
平台优势

- 支持蛋白、多肽、细胞、病毒等多种类型抗原免疫
- 记忆B细胞 & 浆细胞双筛选,保证B细胞多样性
- 单细胞扩增阳性率高,无需刺激培养,减少多样性损失
- 重轻链天然配对,亲和力更优
- 高通量,周期短,单抗发现快至29天
- ELISA、FACS、WB、IHC等多平台验证

可开发单抗物种



服务流程





Recombinant Antibody Expression Service

重组抗体表达

德泰生物拥有完善的重组抗体表达与纯化体系、抗体多工艺质量验证体系。已交付的重组抗体项目种类包括scFv、Fab、(Fab')₂、VHH、嵌合抗体、双特异性抗体、Fc融合蛋白、全长IgG、IgM。cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器用于HEK293/CHO细胞的小试及大量培养。HPLC纯度、内毒素、浓度等要求均可以根据您的下游应用进行定制。

服务优势



服务流程

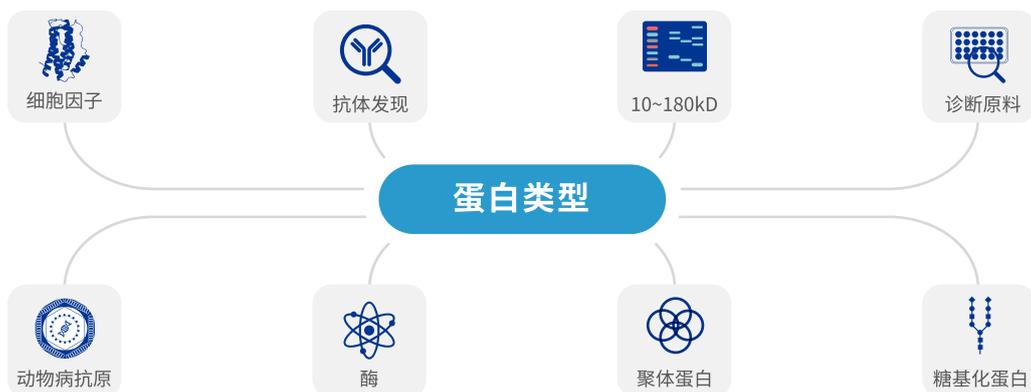


Recombinant Protein Expression Service

重组蛋白表达

原核蛋白表达系统、哺乳动物细胞蛋白表达系统

德泰生物拥有完善的原核蛋白表达与纯化体系和哺乳动物细胞蛋白表达与纯化体系。基于细胞因子、酶、诊断原料蛋白的工业化需求,我们配备了发酵设备并推出了大规模发酵制备服务;我们还配备了cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器,用于HEK293/CHO等真核细胞的小试及大量培养。



4

Hybridoma Antibody Gene Sequencing Service

杂交瘤抗体基因测序

德泰生物拥有mRNA全长测序平台和Failsafe®假基因排除技术,能够提供快速、可靠的杂交瘤抗体基因测序服务。

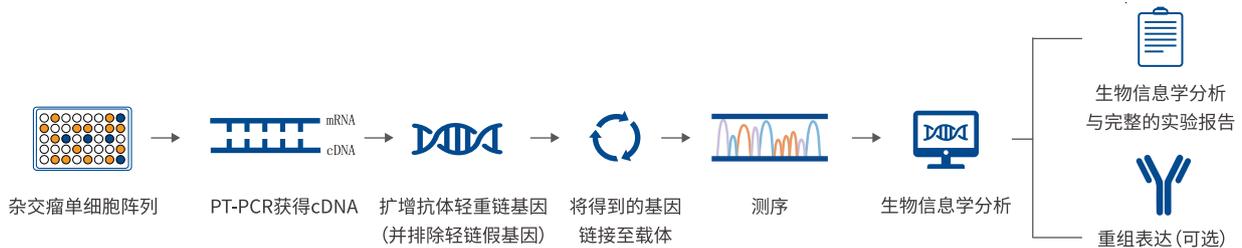
应用场景

- 抗体序列保护:获取抗体基因序列后可通过专利对CDR区进行保护。
- 生产方式备份:杂交瘤存在退化转阴风险,抗体序列可通过基因工程方式轻松转化为抗体样品。
- 抗体工程改造:获得的抗体序列可用于抗体人源化、双特异性抗体等抗体工程改造。

服务优势

- 极速体验:测序5天,表达5天,全程高通量
- 细胞需求少:只需1~5个细胞,可以接收孔板样品
- 保证测序结果准确:采用Failsafe®假基因排除技术,可排除k轻链假基因
- 测序范围广:可测小鼠、大鼠、兔、羊等物种的IgM和IgG的所有亚型
- 一站式服务:德泰生物拥有丰富经验,可提供表达验证服务

服务流程



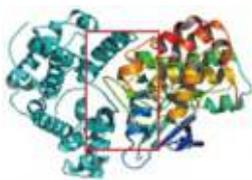
5

Biomolecular Interaction Analysis Service

分子间相互作用检测

德泰生物提供的分子间相互作用检测服务基于表面等离子共振 (SPR) 平台及生物膜干涉技术 (BLI) 平台,能够实现对分子间亲和力的定量和定性分析。与传统的GST pull down, 免疫共沉淀, 酵母双杂交等相比, 具有更高的灵敏度、检测通量及较低的样品要求等优点。

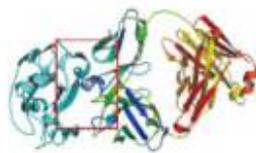
检测范围



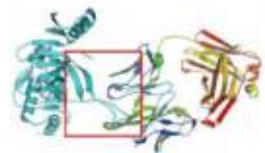
蛋白和蛋白



蛋白和小分子



蛋白和抗体



蛋白和抗体Fab片段

检测范围包括蛋白-蛋白、抗体-抗原、抗体片段-抗原、蛋白-抗体、蛋白-小分子、抗体-多肽、蛋白-DNA、DNA-DNA间的相互作用。

6

Antibody Humanization Service

抗体人源化

德泰生物人源化改造服务基于人工智能之深度学习算法,通过构建抗体结构模型、CDR移植与回复突变、识别关键氨基酸及人源化运算,获得人源化程度高且突变能低的抗体序列。

服务优势



重链和轻链同时参与优化



改造后的抗体人源化程度>90%



人源化抗体的亲和力与初始抗体相当



可进行多物种的抗体人源化

服务流程

- 1 Antibody sequence confirmation
- 2 Human germline acceptor selection
- 3 CDR grafting
- 4 Back mutation
- 5 Mutation energy ranking
- 6 Antibody expression
- 7 Affinity ranking

7

Stable Cell Line Development Service

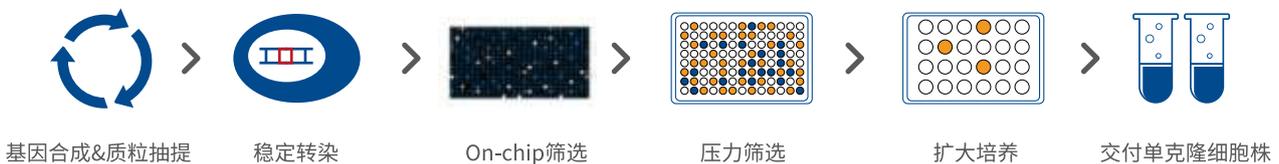
生产型稳转细胞株构建

德泰生物提供高表达哺乳动物稳定细胞株构建服务,筛选过程使用先进的可视化DeepLight®单克隆细胞筛选平台,较传统筛选流程快近100天,大大缩短了稳定细胞株的开发周期。

DeepLight®细胞筛选平台的优势

	有限稀释法筛选	DeepLight® On-chip筛选
筛选时间	8周	1天
细胞分离效率	低	高
筛选通量	低	高
单细胞水平筛选	否	是

服务流程



服务优势



更快的筛选速度

从DNA到细胞株
较传统方法快近100天



百k级筛选通量

一次筛选640k细胞
优选高表达细胞株



可视化筛选结果

先进DeepLight®平台
高表达细胞株实时成像



稳定高产

可稳定转代50代
重组单抗可达5 g/L