

# 荧光共振能量转移效率的实时定量测量

陈同生, 曾绍群, 骆清铭, 张智红, 周 炜

(华中科技大学生物医学光子学教育部重点实验室, 湖北 武汉 430074)

**摘要:** 荧光共振能量转移(FRET)广泛用于研究分子间的距离及其相互作用, 与荧光显微镜结合, 可定量获取有关生物活体内蛋白质、脂类、DNA 和 RNA 的时空信息。随着绿色荧光蛋白(GFP)的发展, FRET 荧光显微镜有可能实时测量活体细胞内分子的动态性质。提出了一种定量测量 FRET 效率以及供体与受体间距离的简单方法, 仅需使用一组滤光片和测量一个比值, 利用供体和受体的发射谱消除光谱间的串扰。该方法简单快速, 可实时定量测量 FRET 的效率和供体与受体间的距离, 尤其适用于基于 GFP 的供体-受体对。

**关键词:** 能量共振转移; 定量 FRET 效率测量; 实时成像; 绿色荧光蛋白; 串扰。

中图分类号: Q6-33 文献标识码: A 文章编号: 1000-6737(2002)01-0133-06

荧光共振能量转移(FRET)是一种用于定量测量两个不同发光基团间距离的技术<sup>[1]</sup>。FRET 是通过分子间的电偶极相互作用将供体激发态能量转移到受体激发态的过程, 它是一种非辐射跃迁<sup>[2]</sup>。当 FRET 发生时, 供体荧光减弱, 而受体荧光增强, 如果能准确测量受体增加的荧光强度和供体减少的荧光强度, 就可以准确测量 FRET 效率。但是, 由于供体和受体的发射谱通常交叉在一起, 实际测量时很难将供体发射的荧光与受体发射的荧光分开, 所以必须对测量的数据进行处理以便消除各种光谱串扰带来的影响。现在已有多种测量 FRET 效率的方法<sup>[3-5]</sup>。最近 Gordon 提出了一种可以修正以上影响因素的定量测量 FRET 效率的方法<sup>[3]</sup>, 采用三组不同的滤光片, 分别测量分离的供体和受体以及供体-受体对在三组滤光片组的条件下两个测量通道的荧光强度, 然后通过计算得到 FRET 效率。由于多次更换滤光片进行测量, 该方法需要较长时间, 因此与以前的 FRET 测量方法一样, 不能用于快速动态实时的活体研究。另外, 对已经制作好的完整的供体-受体对, 如 Cameleon<sup>[6]</sup>, 有时不能或很难得到分离的供体和受体, 故该方法不适用。绿色荧光蛋白(GFP)是一种实时观察活体细胞活动的理想报告基因<sup>[7, 8]</sup>。利用 FRET 技术, 由 GFP 变异体组成的用于基因表达的供体-受体对(如 Cameleon 等)在生物活体研究中的应用日益广泛<sup>[9-11]</sup>。对基于 GFP 的供体-受体对, 受体荧光强度与供体荧光强度的比值是一个测量 FRET 效率的理想量, 它与受体和供体的浓度无关<sup>[7]</sup>。为了利用 FRET 技术实时

测量活体细胞的各种快速生理过程和动态性质, 本文提出了一种快速定量测量 FRET 效率的方法, 该方法利用供体和受体的发射谱信息, 只须通过一次性测量供体-受体对在两个通道的荧光强度的比值, 即可定量获得 FRET 效率, 而无须测量供体和受体单独存在时的发光性质, 也无须更换滤波片。本文提出的方法消除了供体发射谱与受体发射谱的串扰影响, 与 GFP 技术结合, 可快速实时测量细胞内和细胞间的动态性质, 并且与供体和受体的浓度无关。

本文根据供体和受体的发射谱, 提出了定量测量 FRET 效率的方法, 并推导了通用计算公式, 然后利用文献提供的实验测量数据<sup>[9]</sup>验证了该方法的正确性, 最后讨论了该方法所基于的假设的合理性和该方法的特点及适用范围。

## 1 方 法

根据 FRET 的弱相互作用特点和原子的光子吸收及发射性质<sup>[2, 10]</sup>, 假设供体和受体的发射谱形状与 FRET 效率无关, 即 FRET 只改变供体和受体荧光发射谱的强弱而不改变其形状, 或 FRET 对供体发射谱形状的影响可以忽略。按 FRET 测量通常

收稿日期: 2001-06-08

基金项目: 国家杰出青年科学基金(60025514), 国家自然科学基金(39870205、30070215、30070261)和高校博士点专项基金(98048733)资助。

通讯作者: 骆清铭, 1966年生, 教授(博导), 博士,

电话: (027)87544624, E-mail: qluo@mail.hust.edu.cn.

采用的方法 [6, 9], 本文中激发光源选择性地激发供体而不激发受体, 因此不存在激发光谱串扰的问题。

1.1 符号说明

本文使用的符号及其涵义列于表 1。例如表示

FRET 效率,  $I_{d-a}$  表示只有供体而没有受体时供体发射的荧光强度, CH1 表示第一个通道,  $K_{d1}$  表示通道 1 中供体发射的荧光强度占其发射的全部荧光强度的比值,  $I_{ad+a}$  表示 FRET 存在时通道 1 实际测量的荧光强度,  $SP_d(\lambda)$  表示供体的发射谱。

Table 1 Symbols and their interpretation

symbols	meaning
$E$	FRET efficiency
$I_{d-a}$	The fluorescence from a donor-only specimen with acceptor is absent
$I_{a-d}$	The fluorescence from a acceptor-only specimen with acceptor is absent
$I_{d+a}$	Refers to only the donor fluorescence when both donor and acceptor are present
$I_{a+d}$	Refers to only the acceptor fluorescence when both donor and acceptor are present
CH1	Refers to the measuring channel by which the donor fluorescence was supposed to be measured, its passing band locates mainly in the emission spectra range of donor
CH2	Refers to the measuring channel by which the acceptor fluorescence was supposed to be measured, its passing band locates mainly in the emission spectra range of acceptor
$I_{ad+a}$	The actual measured signal from channel 1(CH1) when both acceptor and donor are present
$I_{aa+d}$	The actual measured signal from channel 2(CH2) when both acceptor and donor are present
$SP_d(\lambda)$	The donor emission spectra
$SP_a(\lambda)$	The acceptor emission spectra
$SP(\lambda)$	The emission spectra of the specimen where both donor and acceptor are present
$K_{d1}$	The ratio of the proportion of donor fluorescence in CH1 relative to donor fluorescence in the whole spectra range. $K_{d1} = \int_{CH1} SP_d(\lambda) d\lambda / \int_{-\infty}^{+\infty} SP_d(\lambda) d\lambda$
$K_{d2}$	The ratio of the proportion of donor fluorescence in CH2 relative to donor fluorescence in the whole spectra range. $K_{d2} = \int_{CH2} SP_d(\lambda) d\lambda / \int_{-\infty}^{+\infty} SP_d(\lambda) d\lambda$
$K_{a1}$	The ratio of the proportion of acceptor fluorescence in CH1 relative to acceptor fluorescence in the whole spectra range. $K_{a1} = \int_{CH1} SP_a(\lambda) d\lambda / \int_{-\infty}^{+\infty} SP_a(\lambda) d\lambda$
$K_{a2}$	The ratio of the proportion of acceptor fluorescence in CH2 relative to acceptor fluorescence in the whole spectra range. $K_{a2} = \int_{CH2} SP_a(\lambda) d\lambda / \int_{-\infty}^{+\infty} SP_a(\lambda) d\lambda$
$\varphi_A$	The quantum energy yield of acceptor when donor is absent
$\varphi_D$	The quantum energy yield of donor when acceptor is absent
Ratio	The ratio of signal from CH2 to signal from CH1

1.2 通用方程

当 FRET 发生时, 供体发射的荧光强度 (或量子产额) 下降 [13]

$$I_{d+a} = I_{d-a} - E \cdot I_{d-a} = (1 - E) I_{d-a} \quad (1)$$

其中  $I_{d+a}$  是受体存在时供体发射的荧光强度,  $I_{d-a}$  是没有受体存在时供体发射的荧光强度,  $E$  是 FRET 效率,  $E \cdot I_{d-a}$  是通过 FRET 从供体损失的能量。当选择性地激发供体时, 根据 FRET 效率的定义, 受体发射的荧光强度  $I_{a+d}$  可表示为 [2]

$$I_{a+d} = \varphi_A E \cdot I_{d-a} / \varphi_D \quad (2)$$

其中  $\varphi_A$  和  $\varphi_D$  分别是受体和供体的量子产额。如果分别测量到  $I_{d+a}$  和  $I_{a+d}$ , 则由 (1) 和 (2) 两式即可得到 FRET 效率。可是, 供体和受体的发射谱通常是重叠的 (通常称为光谱串扰), 例如 Cameleon 的

供体 (Cyan) 的发射谱延伸到了其受体 (Yellow) 发射谱的整个范围, 如图 1 所示 [6], 因此在测量上不可能将它们分开, 这种光谱串扰是定量测量 FRET 效率的主要困难。

为了消除光谱串扰, 选择两个具有不同带通性质的探测通道 CH1 和 CH2 分别探测两个不同波段区域的荧光强度, 其中 CH1 必须包括部分或全部供体的发射谱, 而 CH2 必须包括部分或全部受体的发射谱。CH1 和 CH2 通道实际测量到的荧光强度  $I_{ad+a}$  和  $I_{aa+d}$  通常可分别表示为

$$I_{ad+a} = I_{d+a} K_{d1} + I_{a+d} K_{a1} \quad (3a)$$

$$I_{aa+d} = I_{d+a} K_{d2} + I_{a+d} K_{a2} \quad (3b)$$

两个通道探测荧光强度的比值为

$$Ratio = I_{aa+d} / I_{ad+a} \quad \text{结合方程 (1) (2) (3) 可得}$$

$$\frac{\varphi_A E}{\varphi_D (1-E)} = \frac{Ratio \cdot K_{d1} - K_{d2}}{K_{a2} - Ratio \cdot K_{a1}} \quad (4)$$

$$令 C = \frac{Ratio \cdot K_{d1} - K_{d2}}{K_{a2} - Ratio \cdot K_{a1}} \quad (5)$$

则

$$E = \frac{C}{\varphi_A / \varphi_D + C} \quad (6)$$

由于供体和受体的发射谱形状不受 FRET 效率的影响,所以系数  $K_{d1}, K_{d2}, K_{a1}$  和  $K_{a2}$  可由供体和受体的发射谱以及两个测量通道的滤光性质在测量之前计算出来(见表 1)。当供体受体的量子产额已知时,只要将测量的代入(5)式计算得到  $C$ ,将  $C$  带入(6)式,既可得到 FRET 效率  $E$ ,结合  $r = R_0(1/E - 1)^{1/6}$  (其中  $R_0$  是临界距离)<sup>[10]</sup>可计算得到供体与受体间的距离  $r$ 。

(4)式左边只与样品的性质和状态有关,所以  $C$  只与样品的状态和性质有关而与两个探测通道的光谱性质无关。

## 2 实验验证

由(4)式可知,当保持样品构形不变时, $E$  不变,则该式右边即  $C$  也应该是一个常量,而不会随着 CH1 和 CH2 滤光性质的改变而变化。

实验中更换六种不同光谱性质的 CH1 和 CH2 滤光片,分别计算对应的系数  $K_{d1}, K_{d2}, K_{a1}$  和  $K_{a2}$ ,测量对应的  $Ratio$ ,代入(5)式得到  $C$ 。对不同光谱性质的测量通道, $C$  是常量的事实证明本文提出的方法的正确性。

实验中的  $Ratio$  由下式计算得到

$$Ratio = \frac{\int_{CH2} h_2(\lambda) SP(\lambda) d\lambda}{\int_{CH1} h_1(\lambda) SP(\lambda) d\lambda} \quad (7)$$

其中  $SP(\lambda)$  是供体-受体对的荧光发射谱。简单起见,取  $h_1(\lambda) = h_2(\lambda) = 1$ 。

供体-受体对有两种情况:一种是供体与受体结合在一起,它们始终作为一个整体存在,称之为完整(intact)的供体-受体对;另一种是供体与受体完全独立,它们只有在同时结合到样品中的相邻部位时才能发生 FRET,称之为分离的(split)供体-受体对。

编制了一个从曲线采集数据的软件包,可方便地从一条曲线上采集数据,采集数据的相对误差小于 1%。

### 2.1 完整供体-受体对的实验验证

选择完整的 Cameleon(YC2.1) 供体-受体对

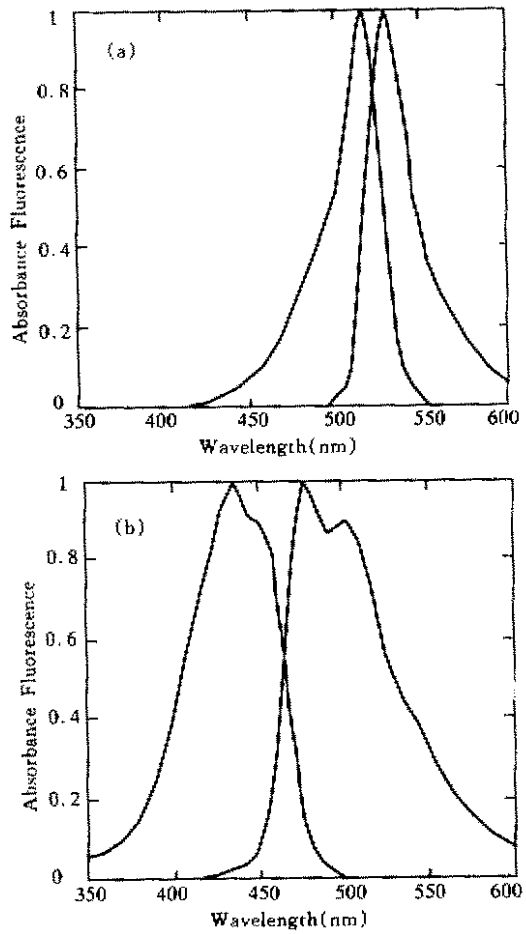


Fig.1 Absorption spectrum (solid line) and emission spectrum (dot line) of Cameleon. (a) Acceptor (Yellow mutant), (b) Donor (Cyan mutant)(T sien, 1998)

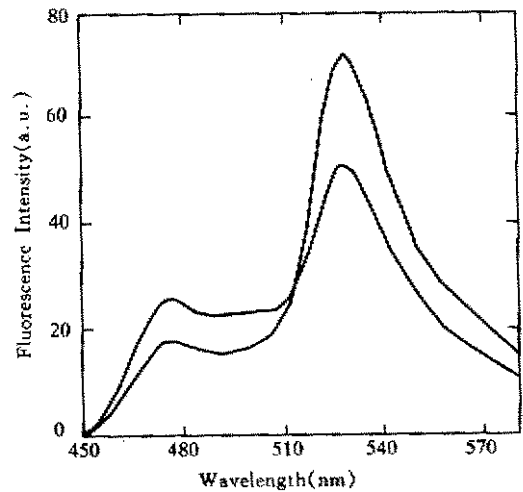


Fig.2 Emission spectra of the intact YC2.1 (excited at 432 nm) with 100 mmol/L EGTA (solid line) and 100 mmol/L CaCl<sub>2</sub> (dotted line) at pH 7.3. Nominal bandpasses for ECFP (480DF30) and EYFP-V68LYQ69K (535DF25) emission filters are indicated by boxes (Miyawaki et al., 1999)

作为实例，它的供体和受体连接在一起的，其供体 (Cyan) 和受体 (Yellow) 的发射谱见图 1 所示。Miyawaki 用 432nm 的激发光在体外激发完整的 YC2.1，并分别测量了在零钙 ( $Ca^{2+}$ ) 和饱和钙 ( $Ca^{2+}$ ) 情况下的荧光发射谱，如图 2 所示<sup>[9]</sup>。Förster 距离取为 50Å，供体和受体的量子产额分别取为 0.40 和 0.71<sup>[4]</sup>。利用 (4) (5) 和 (7) 式计算出相应的 *Ratio*, *C*, *E* 和 *r*，结果列于表 2 中。零钙时 *C* 为

0.75/0.01(平均值/方均差), *SD/ave* 为 1.33%。饱和钙时 *C* 为 1.80/0.03, *SD/ave* 为 1.67%。

2.2 分离供体 - 受体对的实验验证

分离的 Cameleon(YC2.1) 的结构见图 3 所示<sup>[9]</sup>，供体 ECFP 与 CaM 结合在一起，受体 EYFP - V68L/Q69K 与 M13 结合在一起。当加入 CaM 时，溶液中的 CaM 就会与供体上的 CaM 发生竞争去同受体上的 M13 结合。所以溶液中的 CaM

Table 2 The intact YC2.1 results of *C*, *E* and *r* at zero  $Ca^{2+}$  and saturating  $Ca^{2+}$  respectively

CH1	CH2	Zero $Ca^{2+}$				Saturating $Ca^{2+}$			
		<i>Ratio</i>	<i>C</i>	<i>E</i> (%)	<i>r</i> (Å)	<i>Ratio</i>	<i>C</i>	<i>E</i> (%)	<i>r</i> (Å)
476/40	535/60	2.54	0.75	29.74	57.70	4.80	1.83	50.77	49.74
476/40	535/30	1.59	0.75	29.81	57.67	3.19	1.81	50.47	49.84
480/50	535/30	1.25	0.76	29.95	57.60	2.50	1.83	50.77	49.75
480/20	530/20	1.19	0.74	29.32	57.90	3.84	1.77	49.86	50.05
476/6	529/8	2.60	0.73	30.34	57.43	5.26	1.75	49.58	50.14
480/30	535/40	2.24	0.74	29.55	57.79	4.40	1.79	50.30	49.90
average		/	0.75	29.79	57.68	/	1.80	50.29	49.90
SD		/	0.01	0.01	0.12	/	0.03	0.0042	0.02

Table 3 Results of split cameleon (Yellow YC2.1) at different concentration of CaM

CH1	CH2	add 0 $\mu$ mol/L CaM				add 1 $\mu$ mol/L CaM			
		<i>Ratio</i>	<i>C</i>	<i>E</i> (%)	<i>r</i> (Å)	<i>Ratio</i>	<i>C</i>	<i>E</i> (%)	<i>r</i> (Å)
476/40	535/60	3.07	1.02	36.05	54.82	1.67	0.34	16.07	65.86
476/40	535/30	1.97	1.05	37.13	54.59	0.98	0.37	17.12	65.03
480/50	535/30	1.54	1.06	37.29	54.45	0.78	0.37	17.18	64.98
480/20	530/20	2.40	1.00	36.05	54.01	1.19	0.34	16.19	65.76
476/6	529/8	3.30	1.01	36.15	54.97	1.58	0.34	16.10	65.83
480/30	535/40	2.79	1.03	36.69	54.70	1.42	0.35	16.44	65.57
average		/	1.03	36.65	54.78	/	0.35	16.52	65.50
SD		/	0.02	0.01	0.17	/	0.01	0.01	0.34

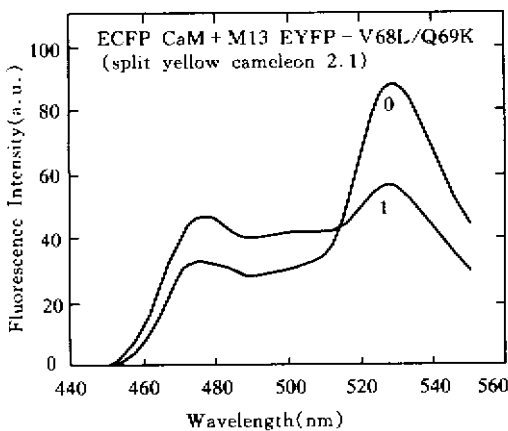


Fig.3 Emission spectra of split YC2.1 (1 $\mu$ mol/L) (excited at 432 nm) with 1 $\mu$ mol/L  $CaCl_2$  when preincubated with 0, 1 $\mu$ mol/L CaM. Also shown is the schematic structure of split YC2.1, the equimolar mixture of ECFP - CaM and M13 - EYFP - V68LyQ69K. (Miyawaki et al., 1999)

浓度越高，供体上的 CaM 结合钙离子的机会就越少，供体与受体间的距离就越大，FRET 效率就越低。Miyawaki 测量了分离 YC2.1 在几种不同 CaM 浓度时的荧光发射谱<sup>[9]</sup> (见图 3)。按照与完整 YC2.1 同样的方法计算了分离 YC2.1 的 *Ratio*, *E*, *C* 和 *r*，计算结果列于表 3 中。加入 0 $\mu$ mol/L 的 CaM 时，*C* 为 1.03/0.02, *SD/ave* 为 1.94%。加入 1 $\mu$ mol/L 的 CaM 时，*C* 为 0.35 和 0.01, *SD/ave* 为 2.86%。

表 2 和表 3 的结果表明：对不同的 CH1 和 CH2, *Ratio* 的变化很大，例如零钙时从 1.19 变化到 2.60，但是 *C* 的变化却很小，相对误差皆小于 5%。所以在误差范围内可以认为 *C* 是常量，与 CH1 和 CH2 的带通性质无关，由供体 - 受体之间的 FRET 效率决定。这就从实验上验证了假设的正确性或合理性，从而证明本文提出的定量测量 FRET 效率的方法是正确的。

### 3 讨 论

本文提出的定量测量 FRET 效率的方法,只需要测量在两个不同波段区域的荧光强度的比值,而不须像以前的 FRET 测量方法<sup>[1,3]</sup>多次更换滤光片或激发光源,也不须单独测量供体或受体及供体-受体对在不同滤波片组时的荧光强度。本文提出的测量方法与双通道荧光显微镜结合可以实时测量 FRET 效率及其样品动态性质的变化。

由(3)式可知,两个通道测量的荧光强度由供体发射荧光和受体发射荧光两部分之和,用权重系数  $K_{d1}$ ,  $K_{d2}$ ,  $K_{a1}$  和  $K_{a2}$  分别表示供体和受体发射荧光的贡献,  $K_{d1}$ ,  $K_{d2}$ ,  $K_{a1}$  和  $K_{a2}$  仅仅由供体和受体的发射谱及通道滤光片的光谱性质确定。由于受体仅仅通过 FRET 从供体接受能量而发射荧光,所以受体发射的荧光强度与供体发射的荧光强度有(2)式的关系,这样当两个通道测量的荧光强度相比时,就完全消除了供体发射谱和受体发射谱的交叉以及浓度的影响。

FRET 是测量活体细胞内蛋白质之间的相互作用以及细胞膜两侧动态性质的重要技术。特别是随着 GFP 在生物研究中的广泛应用, FRET 技术的应用将更加广泛。我们提出的定量测量 FRET 效率的方法只须测量两个通道荧光强度的比值,测量和数据处理都非常简单,而且不受样品浓度以及供体发射谱与受体发射谱交叉重叠的影响,对测量的数据也无须进行修正就可直接送入计算机计算获得 FRET 效率以及供体和受体间的距离。为利用 FRET 技术实时动态测量活体细胞内的各种生理过程及分子机制提供了可能。

光子的吸收过程是  $10^{-15}$ s 量级,激发态的内转换过程是  $10^{-12}$ s 量级,而激发态的荧光寿命是  $10^{-8}$ s 量级,所以内转换在发射之前就已完成<sup>[2]</sup>。荧光发射谱是从与环境达到热平衡的激发态发射出来的,这也是发射谱一般与激发光谱无关的原因<sup>[2]</sup>。能级达到热平衡所需要的时间约为  $10^{-12}$ s 量级, FRET 过程是  $10^{-9}$ s 量级<sup>[2, 11]</sup>。由于 FRET 过程比激发态的内转换过程和激发态的热平衡驰豫过程以及光子的吸收过程慢得多,所以在 FRET 过程中供体激发态的能量分布可以认为保持不变。而激发态的寿命只是  $10^{-8}$ s 量级,所以,即使 FRET 传输的只是供体中与受体吸收谱相重叠的那一部分光谱成分(也许事实上并非如此),在 FRET 之后和供体发射荧光之前的时间内,供体激发态也有足够的时间调整到与

周围环境处于热平衡的分布状态。通常吸收谱反映分子或原子的激发能级的结构,而发射谱反映分子或原子基态的能级结构<sup>[2]</sup>。FRET 是一种粒子间的弱相互作用,它不会改变供体和受体基态能级的结构<sup>[2]</sup>,因此供体和受体的发射谱以及系数  $K_{d1}$ ,  $K_{d2}$ ,  $K_{a1}$  和  $K_{a2}$  在 FRET 过程中保持恒定。所以  $K_{d1}$ ,  $K_{d2}$ ,  $K_{a1}$  和  $K_{a2}$  的值可以在测量之前利用供体和受体的发射谱以及两个测量通道的光谱性质计算得到,并将它们与测量的 *Ratio* 输入计算机,就可以快速计算得到 FRET 效率并推测样品的相关动态性质。

#### 参考文献:

- [1] Clegg RM. Fluorescence resonance energy transfer[A]. in: Wang X-F, Herman B, ed. Fluorescence Imaging Spectroscopy and Microscopy[C]. John Wiley & Sons, 1996. 179-252.
- [2] Lakowicz JR. Principles of fluorescence spectroscopy[M]. New York: Plenum Press, 1983.
- [3] Gordon GW, Berry G, Liang XH, et al. Quantitative fluorescence resonance energy transfer measurements using fluorescence microscopy[J]. *Biophys J*, 1998, 74: 2702-2713.
- [4] Patterson GH, Knobel SM, Sharif WD. Use of the green fluorescence protein (GFP) and its mutants in quantitative fluorescence microscopy[J]. *Biophys J*, 1997, 73: 2782-2790.
- [5] Miyawaki A, Liopis J, Heim R. Fluorescent indicators for Ca<sup>2+</sup> based on green fluorescent proteins and calmodulin[J]. *Nature*, 1997, 388: 882-887.
- [6] Tsien RY. The green fluorescent protein[J]. *Annu Rev Biochem*, 1998, 67: 509-544.
- [7] Heim R, Cubitt AB, Tsien RY. Improved green fluorescence[J]. *Nature*, 1995, 373: 663-664.
- [8] Miyawaki A, Griesbeck O, Heim R. Dynamic and quantitative measurements using improved calmodulins[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 2135-2140.
- [9] Fan GY, Fujisaki H, Miyawaki A, et al. Video-rate scanning two-photon excitation fluorescence microscopy and ratio imaging with calmodulins[J]. *Biophys J*, 1999, 76: 2412-2420.
- [10] Wu P, Brand L. Resonance energy transfer: Method and Applications[J]. *Analytical Biochemistry*, 1994, 218: 1-13.
- [11] Pearce L, Robin E, Wasserloos K. Role of metallothionein in nitric oxide signaling as revealed by a green fluorescent fusion protein[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(4): 477-482.
- [12] Gadella TW, Jr J, Krogt GNM, et al. GFP-based

FRET microscopy in living plant cells[J].

*Trends in Plant Science*, 1999,4(7):286-291.

microscopy: spatial resolution of biochemical processes in

the cell[J]. *Trends in Cell Biology*, 1999,9:48-52.

[13] Bastiaens P, Squire A. Fluorescence lifetime imaging

## REAL-TIME QUANTITATIVE FLUORESCENCE RESONANCE ENERGY TRANSFER MEASUREMENTS USING FLUORESCENCE MICROSCOPY

CHEN Tong-sheng, ZENG Shao-qun, LUO Qing-ming, ZHANG Zhi-hong, ZHOU Wei

(*The Key Laboratory of Biomedical Photonics of Ministry of Education of China,*

*Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China*)

**Abstract:** Fluorescence resonance energy transfer (FRET) is widely used in studies of biomolecular structure and dynamics. By combining fluorescence microscopy with FRET it is possible to obtain quantitative temporal and spatial information about the binding and interaction of protein, lipids, enzymes, DNA, and RNA in vivo. With the recent development of a variety of mutant green fluorescent proteins (GFPs), FRET microscopy provides the potential to measure the dynamic interaction of intracellular molecular species in intact living cells where the donor and acceptor fluorophores are actually part of the molecules themselves. However, present intensity-based FRET quantitative measurements suffer from cross talk of the donor and acceptor emission spectra, which cannot be corrected in a real time. We present a simple method to correct this cross talk in a real time. The data were obtained with only one standard filter set in a fluorescence microscopy. Four coefficients were introduced to eliminate the cross talk, which are constants over various FRET strengths and can be calculated ahead of the experiments based on the emission spectra of the donor and acceptor, and the spectra features of the detection channels. Our quantitative FRET measurements approach has the potential to track dynamic interactions in biological system.

**Key Words:** Resonance energy transfer efficiency ;

Quantitative FRET efficiency measurement; Green fluorescent proteins;

Real time imaging; Cross talk