

# 利用 FRET 技术在活细胞内 观察 EGF 对 PKA 作用的时空成像

王进军\*, 陈小川\*, 邢达  
(华南师范大学激光生命科学研究所, 广州 510631)

**摘要:** cAMP 依赖的蛋白激酶 (protein kinase A, PKA) 在细胞生长与分化过程中扮演重要角色, 特别是在调节 Ras 信号通路引起的细胞增殖效应中起着重要作用。为了在活细胞内动态观察表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 对 PKA 的作用, 采用一种可以检测 PKA 酶活性的报告蛋白 (A-kinase activity reporter, AKAR) ——这种报告蛋白是利用荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 原理设计的, 使其在人类肺癌细胞 (ASTC-a-1) 中稳定表达。加入 EGF 刺激因子后, 随时间变化的成像分析显示出在活细胞生理条件下被 EGF 作用的 PKA 酶活性变化的时空信息。这些资料为 EGF 作用 PKA 提供了直接的实时证据。

**关键词:** 荧光共振能量转移 (FRET); 表皮生长因子 (EGF); 蛋白激酶 A (PKA); 活细胞

**中图分类号:** Q6

## 1 引言

蛋白激酶 A (PKA) 又名 cAMP 依赖的蛋白激酶, 为一类丝/苏氨酸蛋白激酶, 在细胞各种生命活动过程中扮演着重要角色, 多种不同的刺激因子都可以通过 PKA 对细胞起着不同的调节作用<sup>[1]</sup>。在细胞增殖过程中, PKA 与 Ras 信号通路之间有着密不可分的关系, PKA 可以通过对 Raf-1 的磷酸化抑制 Raf-1 的激活, 从而阻断 Ras 信号通路的激活, 抑制细胞的增殖<sup>[2,3]</sup>。Ras 信号通路的激活可以引起细胞增殖, 已有报道表明表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 在激活 Ras 信号通路引起细胞增殖的同时又激活了 PKA, 通过对 PKA 的激活负调控对 Ras 信号通路的激活作用<sup>[4]</sup>, 因此 PKA 对于平衡 EGF 引起的 Ras 信号通路的激活起着重要作用<sup>[5]</sup>。但是一般的传统检测方法无法做到在活细胞生理条件下实时、动态地反映 PKA 酶活性变化, 而运用荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 技术<sup>[6,7]</sup>就可以很好地解决这个问题。

为了在活细胞内动态观察 EGF 对 PKA 的作用, 采用一种可以检测 PKA 酶活性的报告蛋白 (A-kinase activity reporter, AKAR) ——这种报告蛋白是利用 FRET 原理设计的融合蛋白, 包含一个

对 PKA 特异性的底物结构域 (substrate peptide) 和一个与磷酸化底物结构域相结合的磷酸化识别结构域 (14-3-3), 这个报告蛋白的两端是 GFP (green fluorescent protein) 的衍生物 CFP (cyan fluorescent protein) 与 YFP (yellow fluorescent protein), 利用 FRET 原理工作。当底物结构域被磷酸化后, 分子内部就会发生磷酸化识别结构域与其结合而引起的内部折叠, 两个荧光蛋白相互靠近就会发生能量迁移。如果磷酸酶 (phosphatase) 进行作用将其去磷酸化, 分子就会发生相反的变化 (图 1), 报告蛋白内部 FRET 变化可以非常好的反映 PKA 酶活性的变化<sup>[8]</sup>。本实验建立了可以稳定表达此报告蛋白的人类肺癌细胞系 (ASTC-a-1), 运用此细胞系进行成像及光谱分析, 在活细胞生理条件下记录了刺激因子 Forskolin 以及 EGF 对 PKA 作用的时空变化过程, 从而为检测 EGF 引起 PKA 酶活性变化提供更为有力的实时证据。

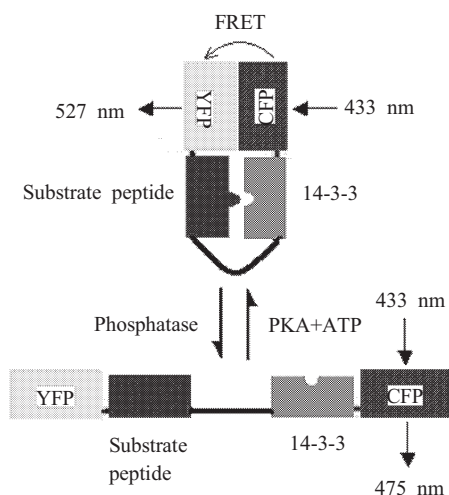
收稿日期: 2003-11-14

基金项目: 国家重大基础研究前期研究专项 (2002CCC00400)、国家自然科学基金面上项目 (60378043) 和广东省自然科学基金团队项目 (015012)

\* 同为第一作者

通讯作者: 邢达, 电话: (020)85210089,

E-mail: xingda@scnu.edu.cn



**Fig.1** Schematic representation of fluorescent reporter protein (AKAR) for detection of PKA activity. Fluorescent reporter protein consists of cyan fluorescent protein (CFP), a consensus substrate for PKA, a phosphoamino acid binding domain (14-3-3), yellow fluorescent protein (YFP). When PKA phosphorylates the substrate peptide, 14-3-3 will form an intramolecular complex with the phosphorylated substrate peptide. This conformational change alters the distance between CFP and YFP and generates a FRET change. Dephosphorylation of the peptide by a phosphatase will reverse the FRET change

## 2 材料与amp;方法

### 2.1 质粒及其构建

报告蛋白是由4部分组成的融合蛋白：CFP、YFP、PKA底物结构域、磷酸化结合结构域。报告蛋白基因通过限制性内切酶切位点 *Hind* III 和 *Eco*R I 插到质粒 pcDNA3 中，构建成可以在哺乳动物细胞中表达报告蛋白的新质粒。本实验所使用的能够表达报告蛋白 (AKAR) 的质粒由美国加利福尼亚大学 Tsien 教授提供。

### 2.2 瞬时转染

用胰蛋白酶消化人肺癌细胞，转至 35 mm 直径的细胞培养皿，培养 24 h 左右，使细胞汇合 30%~50%，使用 Lipofectin 试剂 (GIBCO 公司) 转染，首先取两只 Eppendorf 管：一只加入 1~2  $\mu$ g 质粒和 100  $\mu$ l 无血清 RPMI-1640 培养基 (GIBCO 公司)；另一只加入 2~20  $\mu$ l Lipofectin 试剂和 100  $\mu$ l 无血清 RPMI-1640 培养基室温静置

30~45 min，然后将上述两管轻轻混匀，室温静置 10~15 min，用无血清 RPMI-1640 培养基清洗细胞一次，加 0.8 ml 无血清 RPMI-1640 培养基于上述的 Lipofectin-DNA 混合物中，轻轻摇匀，加到细胞表面，培养 5~24 h 后用含小牛血清的 RPMI-1640 培养基换掉上述转染液，培养 24~48 h 后即可用于检测。

### 2.3 稳定表达 AKAR 的人肺癌细胞系的筛选

为了获得能够稳定表达报告蛋白的人类肺癌细胞系，使用 G418 (华美生工) 筛选：转染步骤同瞬时转染步骤，转染后 48~72 h 待细胞生长接近融合时，按 1:4 比例传代，继续培养至细胞融合达到 50% 左右，弃培养液，更换浓度为 800 mg/L 的 G418 培养液进行筛选 (G418 浓度可以通过预实验来确定)，同时用未转染细胞作对照，当对照细胞大部分死亡时，再换一次筛选液，约 10~20 d 可见抗性克隆形成，使用滤纸法将其逐一移至 24 孔板，继续培养 2~5 d，待细胞长满后，胰蛋白酶消化，移至 6 孔板继续培养，此后即可用于鉴定及检测。

### 2.4 荧光成像

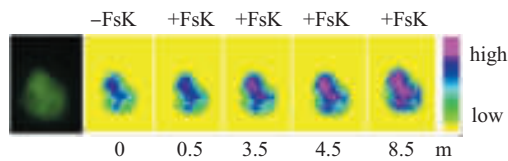
瞬时转染人肺癌细胞，37 $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 48 h 后，用 HBSS 液洗细胞两次，加 HBSS 液置黑暗的屋子里。尼康荧光显微镜观察细胞表达 AKAR 情况，为了观察细胞 FRET 效应，汞灯作光源，400~440 nm 激发滤光片，455 nm 分光镜，观察 CFP 发射荧光使用 460~490 nm 滤光片，YFP 发射荧光使用 520 nm 长通滤光片，在加刺激因子 Forskolin 或 EGF 之前以及之后 30 min 内使用尼康数码相机记录 YFP 发射荧光强度，使用 Photoshop 软件处理成像结果。

## 3 结 果

### 3.1 Forskolin 引起 PKA 酶活性变化的无损实时记录

实验前血清饥饿转染 AKAR 的肺癌细胞约 6 h，刺激因子 Forskolin (为 PKA 酶最强的激活剂) 浓度为 0.1 mmol/L，使用尼康数码相机记录单个细胞刺激前及后 30 min YFP 的荧光强度变化，由于 PKA 被激活后作用于报告蛋白 AKAR 中的 PKA 底物结构域，分子内部发生折叠，使 CFP 与 YFP 间的能量转移增强，从而使 YFP 的发射荧光强度增加，记录到的 YFP 荧光强度变化反映了

PKA 酶活性变化 (图 2), 如图所示, 当加入刺激因子 Forskolin 后, PKA 在几分钟内被迅速激活, 8.5 min 时酶活性达到最大。



**Fig.2** FRET response of lung cancer cell transfected with pAKAR to FsK. The YFP is imaged on the far left; Pseudocolor images depict the FRET response of reporter to FsK (0.1 mmol/L) stimulation. Fluorescent intensity changes of YFP of single cell was recorded with Nikon digital camera before and after forskolin stimulation. Fluorescent intensity of YFP gradually increased after stimulation and reached the maximum at 8.5 min

### 3.2 EGF 引起 PKA 酶活性变化的无损伤实时记录

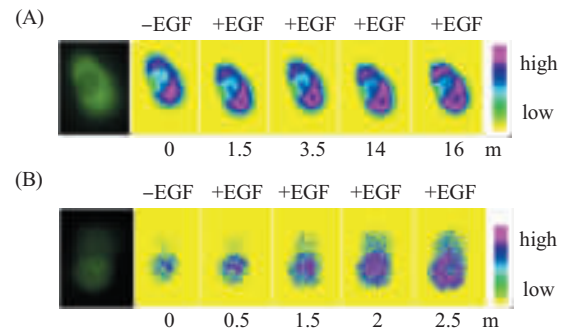
随后使用同样方法记录了不同浓度的刺激因子 EGF 对 PKA 酶活性变化的影响, 当 EGF 浓度为 20  $\mu\text{g/L}$  时, 记录到的 YFP 荧光强度逐渐增强 (图 3A), 在 16 min 时达到最大; 当 EGF 浓度升为 40  $\mu\text{g/L}$  时, 记录到的 YFP 荧光强度迅速增强 (图 3B), 在 2.5 min 时就达到最大。

### 3.3 EGF 引起单个活细胞内 PKA 酶活性变化的定量分析

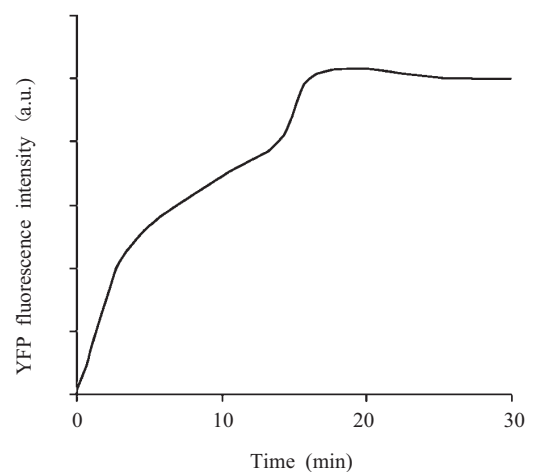
对 EGF 浓度为 20  $\mu\text{g/L}$  时记录的单个细胞 YFP 荧光强度进行随时间变化的定量分析, 从分析的结果中可以看出: 当加入 EGF 刺激因子后 16 min 内, YFP 荧光强度随时间逐渐增强, 16 min 之后达到饱和 (图 4)。这说明当 EGF 浓度为 20  $\mu\text{g/L}$  时可以激活 PKA 酶活性, 从定量分析的结果中可以看出 EGF 对 PKA 酶活性的激活也是非常迅速的。单个细胞 YFP 荧光强度随时间变化的定量分析结果更为清楚地反映了 EGF 诱导的单个细胞 PKA 酶活性变化大小的动态过程。

## 4 讨 论

随着生命科学的更深一步发展, 对细胞内蛋白质 - 蛋白质间相互作用的研究变得尤为重要, 而能够在活细胞生理条件下观测其作用的时空变



**Fig.3** FRET response of lung cancer cell transfected with pAKAR to EGF (20 and 40  $\mu\text{g/L}$ ). (A) The YFP is imaged on the far left; Pseudocolor images depict the FRET response of reporter to EGF (20  $\mu\text{g/L}$ ) stimulation. Fluorescent intensity changes of YFP of single cell was recorded with Nikon digital camera before and after EGF stimulation. Fluorescent intensity of YFP gradually increased after stimulation and reached the maximum at 16 min; (B) The YFP is imaged on the far left; Pseudocolor images depict the FRET response of reporter to EGF (40  $\mu\text{g/L}$ ) stimulation. Fluorescent intensity changes of YFP of single cell was recorded with Nikon digital camera before and after EGF stimulation. Fluorescent intensity of YFP rapidly increased after stimulation and reached the maximum at 2.5 min



**Fig.4** Quantitative analysis of YFP fluorescence intensity of individual cell. YFP fluorescence intensity of an individual cell was analyzed at different timepoints. The fluorescent intensity of YFP gradually increased after stimulation with EGF and reached the maximum at 16 min

化信息更是当前急待解决的问题。本实验采用了一种新的检测 PKA 酶活性的报告蛋白 (AKAR), 这种蛋白是根据 FRET 原理设计, 报告蛋白 FRET 变化反映了 PKA 酶活性变化, 解决了活细胞条件下无损伤实时检测 PKA 酶活性的问题, 这是其它任何传统的检测手段所无法达到的。

本实验为了在活细胞条件下无损伤地研究由刺激因子 EGF 引起 PKA 酶活性的时空变化情况, 使用一种可以在哺乳动物细胞内表达 AKAR 的质粒转染人肺癌细胞, 并筛选出可以稳定表达报告蛋白的人类肺癌细胞系。使用荧光显微镜观察, 尼康数码相机记录不同的刺激因子 Forskolin 以及 EGF 引起的 PKA 酶活性变化。结果显示 Forskolin 对 PKA 激活作用非常迅速, 8.5 min 达到最大值。对刺激因子 EGF 刺激的细胞成像结果分析表明: 当 EGF 浓度为 20  $\mu\text{g/L}$  时就可以激活 PKA, 在 16 min 时效应达到最大; 随着 EGF 剂量的加大, 当其浓度为 40  $\mu\text{g/L}$  时可以更快地激活 PKA, 在加入刺激因子后 2.5 min 内就可以使 PKA 酶活性迅速升高。对 YFP 荧光强度进行随时间变化的定量分析, 可以更为清楚地反映出 EGF 引起单个细胞 PKA 酶活性变化大小的动态过程。

本实验的最大特点就在于应用了荧光共振能量转移 (FRET) 以及荧光显微镜技术, 通过这种方法可以最大限度地记录 PKA 活性变化的时空信息, 使得研究结果更为真实、全面地反映在活细胞生理条件 EGF 引起 PKA 酶活性变化的时空动态过程。这些研究结果是其他任何传统的研究手段所无法达到的, 从而弥补了其缺陷。

#### 参考文献:

- [1] Griffioen G, Thevelein JM. Molecular mechanisms controlling the localization of protein kinase A. *Curr Genet*, 2002,41: 199~207
- [2] Hafner S, Adler HS, Mischak H, Janosch P, Heidecker G, Wolfman A, Pippig S, Lohse M, Ueffing M, Kolch W. Mechanism of inhibition of Raf-1 by protein kinase A. *Mol cell boil*, 1994,14:6696~6707
- [3] Dhillon AS, Pollock C, Steen H, Shaw PE, Mischak H, Kolch W. Cyclic AMP-dependent kinase regulates Raf-1 kinase mainly by phosphorylation of serine 259. *Mol Cell Biol*, 2002,22(10):3237~3246
- [4] Fishman D, Galitzki L, Priel E, Segal S. Epidermal growth factor regulates protein kinase A activity in murine fibrosarcoma cells: differences between metastatic and nonmetastatic tumor cell variants. *Cancer Res*, 1997,57(23): 5410~5415
- [5] Pursiheimo JP, Kieksi A, Jalkanen M, Salmivirta M. Protein kinase A balances the growth factor-induced Ras/ERK signaling. *FEBS Lett*, 2002,521(1~3):157~164
- [6] Pollok BA, Heim R. Using GFP in FRET-based applications. *Trends Cell Biol*, 1999,9(2):57~60
- [7] Lakowicz JR. Principles of fluorescence spectroscopy. New York: Plenum Press, 1983. 305~337
- [8] Zhang J, Ma Y, Taylor SS, Tsien RY. Genetically encoded reporters of protein kinase A activity reveal impact of substrate tethering. *Proc Natl Acad Sci*, 2001,98(26): 14997~15002

## SPATIO-TEMPORAL IMAGING OF EGF-INDUCED ACTIVATION OF PROTEIN KINASE A BY FRET IN LIVING CELLS

WANG Jin-jun, CHEN Xiao-chuan, XING Da

(Institute of Laser Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

**Abstract:** The cAMP-dependent protein kinase-A (PKA) is an intracellular enzyme with serine-threonine kinase activity that plays a key role in cell growth and differentiation. Epidermal growth factor (EGF), a well-characterized polypeptide cell growth factor, has been demonstrated to induce PKA activation through the ligation of EGFR. To investigate the spatial and temporal dynamics of PKA activation by EGF, we visualized the PKA activation in living cells using a fluorescent indicator (AKAR) composed of two green fluorescent protein (GFP) variants, cyan fluorescent protein (CFP) and yellow fluorescent protein (YFP), joined by a phosphoamino acid binding domain (14-3-3) and a consensus substrate for protein kinase-A (PKA). Phosphorylation of the consensus substrate by PKA activation resulted in the transfer of energy from excited CFP to YFP within the AKAR molecule. A human lung cancer cell line (ASTC-a-1) that stably expressed the AKAR indicator protein was established and characterized. After treatment with EGF, the activation dynamics of PKA was visualized in living cells by fluorescence microscopic imaging system. Time-lapse imaging analysis reveals the spatio-temporal distribution of EGF-activated PKA in specific sites within the living cells. These data provide direct and *in vivo* evidence for PKA activation by EGF and add a new dimension for PKA signaling pathway.

**Key Words:** Fluorescence resonance energy transfer (FRET); Protein kinase-A (PKA); Epidermal growth factor (EGF); Living cells