

使用 QPix400 系统通过荧光筛选细菌克隆

通过荧光报告基因筛选含有目的基因的细菌转化子比传统的方法更加方便高效。在研究蛋白折叠或分泌、酶的进化或者蛋白定位的时候，通过荧光成像和筛选可以定量单个克隆的独特信息。此外，这也是一个直接筛选突变或者识别报告基因的方法。

传统的手工挑取微生物克隆是一个费时烦人且易出错的过程。QPix400 系列微生物克隆筛选系统一小时可以完成 3000 个克隆的挑取，而一个熟练的人工只能挑取约 600 个克隆。自动化系统的速度相比人工提高了至少 5 倍，最关键的是更加准确，有效性 >98%。QPix400 系列的荧光成像模块可以显著减少下游的工作量，因为通过对荧光蛋白表达的定量，实现了有目的性筛选，确保只挑感兴趣的克隆。QPix 已成为市场上微生物克隆筛选系统的领导者，它可以提供多组荧光滤光片，兼容大多数的荧光克隆载体。基于荧光的重组克隆筛选方法使重组基因表达的筛选更加容易，提供了一个更加准确的筛选方法。

这里，我们描述了 QPix400 系统基于荧光的克隆筛选功能。使用的微生物是 *Escherichia coli*，转化有表达 GFP 或者 CFP 的重组质粒。

材料和方法

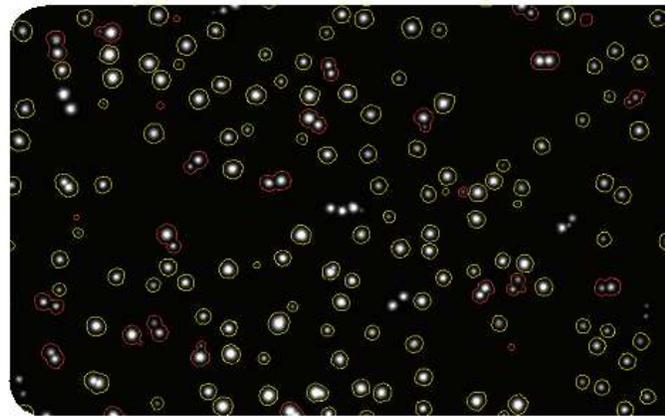
pFluoroGreen 质粒：Amp 抗性，携带 GFP 基因。转化质粒到 *E. coli*，然后使用含有 IPTG 和 Amp 的 LB 平板过夜培养。

pCyanFP 质粒：Kan 抗性，携带 CYP 基因。同样转化到 *E. coli*，然后过夜培养。两个质粒的图谱如 Figure 1A 和 1B 所示。

白光和荧光成像筛选克隆

使用 QPix420 系统，分别在白光（Figure 2A）和荧光下（Figure 2B）对 GFP 转化的细菌克隆进行成像；选择蓝色滤光片组（Ex/Em filter: 457/536 nm）基于荧光对 GFP 表达的克隆进行筛选。

QPix 系统可以根据白光和荧光图片识别克隆，并根据荧光报告基因的表达水平客观选取感兴趣的克隆。成像完成后，QPix 软件检测分析每个克隆的数据，并识别每个克隆在培养板上的位置。软件的灵活性允许使用者自定义克隆的筛选参数，比如大小，边缘形状，形态等；还可以自



优势

- 荧光定量筛选能够客观有效地筛选感兴趣的克隆
- 多组荧光通道增加试验的灵活性
- 易于使用的软件，随时根据试验自定义筛选参数，确保每一次都能挑到需要的克隆

定义荧光定量参数，比如设置荧光强度阈值，指定感兴趣克隆的蛋白表达水平。根据客户自定义的筛选参数，软件选取要挑取的克隆。然后，系统通过 96 通道气动挑头高精度自动化完成克隆挑取。对于这次试验，根据内部平均荧光强度进行筛选，大于 40000 的 GFP 表达克隆被选取。请参考 Figure 3A 和 3B 查看被选取以及未被选取的克隆。

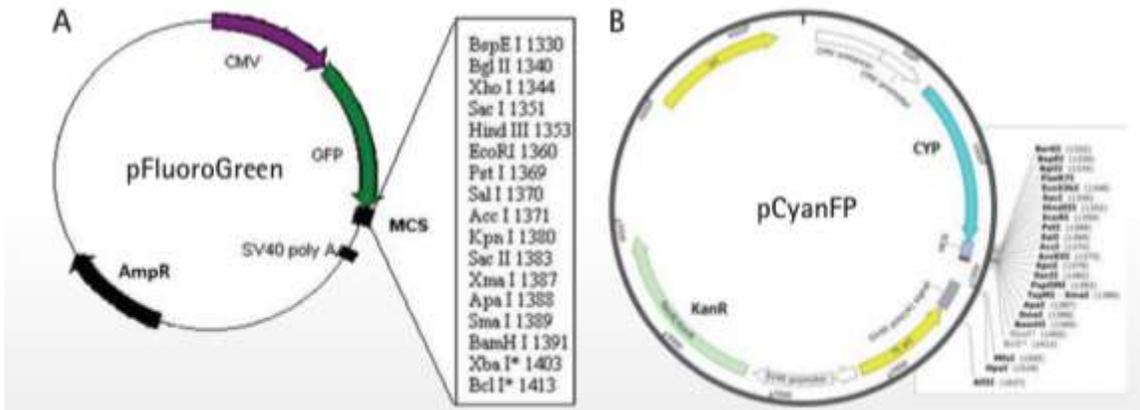


Figure 1. (A) PFluoroGreen 质粒载体图谱
(B) pCyanFP 质粒图谱

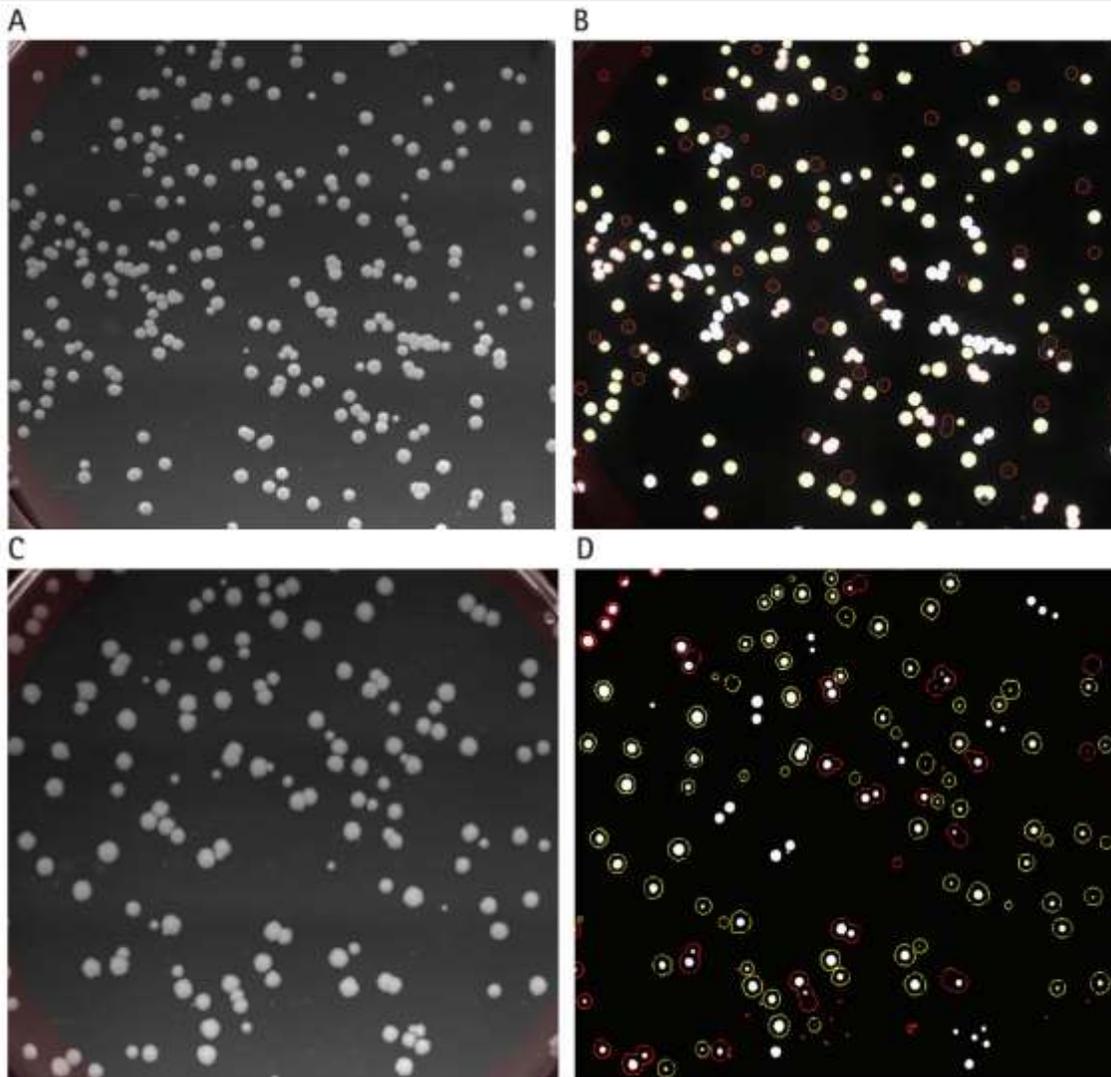


Figure 2. (A) 白光下，转化 pFluoroGreen 载体的所有细菌克隆都被检测到。(B) 荧光通道下，只有表达 GFP 荧光的克隆被识别。(C) 白光下，转化 pCyanFP 载体的所有细菌克隆。(D) 荧光通道下，表达 CFP 荧光的克隆。

同样地，分别在白光（Figure 2C）和荧光通道下（Figure 2D）识别和筛选表达 CFP 的细菌克隆。表达荧光的克隆，其中内部平均荧光强度值大于 20000 的克隆被选取。根据自定义的参数，被选取的克隆（Figure 3C）以及未被选取的克隆（Figure 3D），都被软件标记上不同的颜色，并可以显示克隆的所有参数，以及未被选取的原因。QPix 软件可以自定义设置荧光筛选参数，提供了一个灵活、客观、定量的细菌克隆初筛方案。

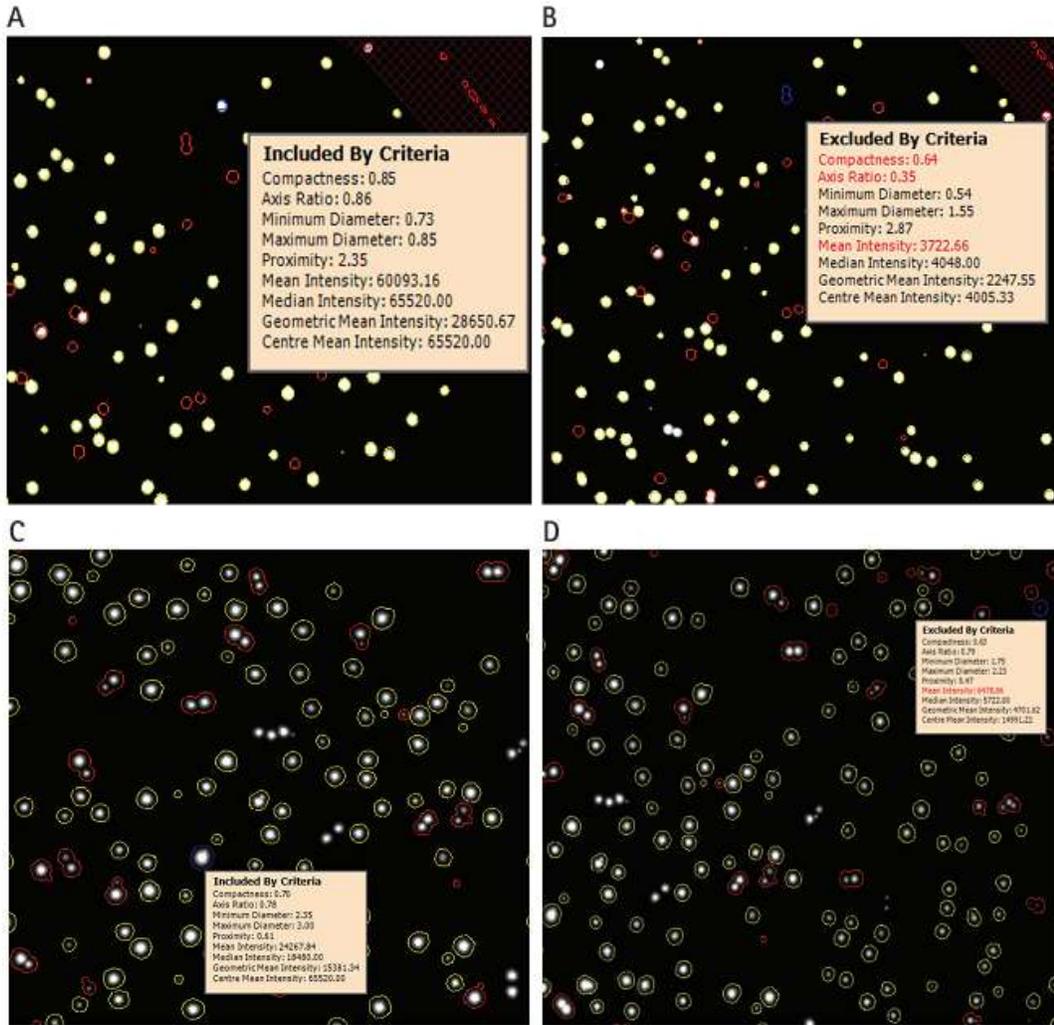


Figure 3. 根据客户自定义筛选参数，在 GFP 荧光通道（A）和 CFP 荧光通道（B）下识别到的克隆被标记黄色。没有满足自定义筛选参数的克隆不会被选取，并标记为红色。（B：表达 GFP 的克隆；D：表达 CFP 的克隆）

总结

使用报告基因比如 GFP 和 CFP 进行荧光筛选相比传统筛选方法具有显著的优势。这种高效的技术具有很多潜在的应用，比如蛋白折叠的跟踪，体外检测蛋白的分泌，用于酶进化的突变库筛选等。QPix400 系统的荧光筛选能力，使科研人员可以直接高通量筛选并选取感兴趣的重组克隆。多组荧光通道方便使用者选择多种多样的荧光载体。易于操作的软件方便使用者根据试验要求自定义并随时修改克隆筛选参数。因此，QPix400 系列微生物克隆筛选系统提供了一个高效、可靠的自动化微生物克隆筛选方案，相比传统方法，大大节省时间，并提高准确性。