

利用注射器卡盒在SpectraMax i3x多功能酶标仪上进行双荧光素酶报告基因实验 (DLR)

简介:

报告基因实验一般用来研究真核生物的基因表达。在双报告基因实验中，细胞都转染了两种质粒，一种含有的目的基因调控的启动子，另一种包含一个质控基因的组成型启动子。将目的报告基因与质控报告基因共转染，最小程度减少实验误差。

生物发光报告系统广泛联合使用萤火虫和海肾荧光素酶，因为它们都很容易操作且极其灵敏。Promega公司的双报告基因实验(DLR)系统允许使用者在一个微孔板孔中分别检测萤火虫和海肾荧光素酶活性，其中萤火虫作为实验报告，海肾作为质控基因。Figure 1展示了两个酶促反应，按顺序发生在相同的实验孔中。萤火虫荧光素酶催化的荧光素的氧化会伴随着光的释放。反应需要ATP, Mg^{2+} 和 O_2 。海肾荧光素酶催化氧气依赖型腔肠动物荧光素，但是不需要ATP或 Mg^{2+} 。酶有着不同的底物要求，所以它们可以在一个反应体系中完成。

双报告基因实验需求两种不同的试剂含有不同的底物，每次都需要进行化学发光读数。这种实验流程可以轻松在SpectraMax i3x多功能酶标仪的注射器卡盒上进行，这套体系已通过DLReady体系认证。我们在这篇应用文章中向大家展示了重组萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶的6个数量级的线性范围检测，同时进行了每孔195到25000个被转染细胞的线性检测。

材料

- 双报告基因实验系统 (Promega cat. #E1960); 包括:
 - 荧光素酶检测试剂II
 - 荧光素酶检测底物
 - Stop & Glo 缓冲液
 - Stop & Glo 底物
 - 5X Passive 裂解缓冲液

- 纯化重组荧光素酶:
 - 萤火虫荧光素酶: QuantiLum® Recombinant Luciferase (Promega cat. #E1701)
 - 海肾荧光素酶: Recombinant Renilla Luciferase (RayBiotech cat. # RB-15-0003P-10)
- CHO-K1 细胞 (ATCC cat. #CCL-61)
- 质控荧光素酶质粒:
 - pGL4.13[luc2/SV40] 萤火虫荧光素酶质粒 (Promega cat. #E6681)
 - pGL4.74[hRluc/TK] 海肾萤火虫酶质粒 (Promega cat. #E6921)
- Fugene高效转染试剂 (Promega cat. #E2311)
- 6孔组织培养板 (Corning cat. #3516)
- 96孔平底底透白色TC处理板 (Corning cat. #3610)
- 光学放大的封膜 (Genesee cat. #12-639)
- 白色96和384孔微孔板 (Greiner cat. #655075 and #781075)
- SpectraMax i3x 多功能微孔板读板机
- SpectraMax 注射器卡盒

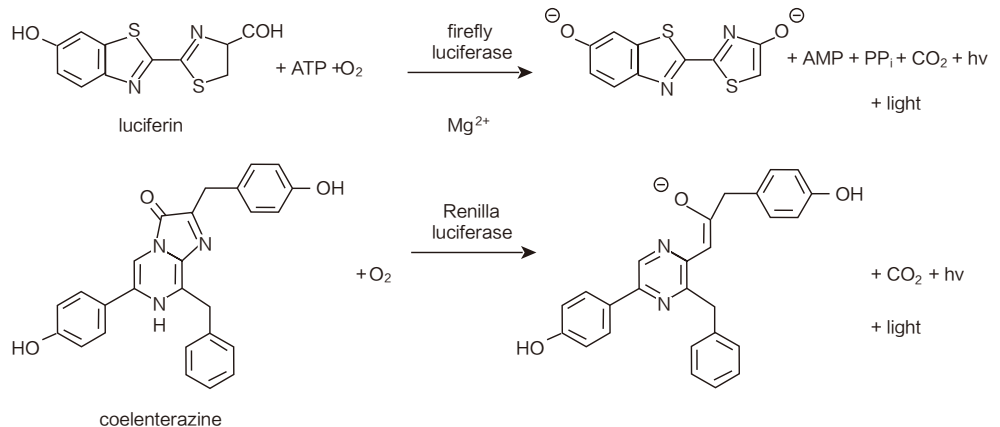


Figure 1. Reactions catalyzed by firefly and Renilla luciferases. Firefly and Renilla luciferase have different substrate requirements.

优势:

- 6数量级线性范围的高灵敏度荧光素酶定量检测
- 利用SoftMax Pro软件自动分析和计算数据，实现报告基因规范化检测
- 智能加样技术优化试剂混匀结果

方法

酶标准曲线

制备萤火虫荧光素酶贮存液，用含有1 mg/mL BSA的1X Passive 裂解缓冲液 (PLB, 一种双荧光素报告实验系统)将贮存液从12.4mg/ml稀释到1mg/ml。制备海肾荧光素酶贮存液，用1XPBS将冻干的酶稀释到1mg/ml。

工作液(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的制备是将10ul萤火虫和海肾荧光素酶的贮存液(1 mg/mL)加到990ulPLB中。一种混匀的萤火虫贮存液标准品(100 ng/mL)则是通过将10ul工作液加入到980ulPLB中。梯度1:10稀释贮存液标准品，浓度范围为100fg/ml到100ng/ml(1.6fM到1.6nM)。荧光素酶检测试剂II (LAR II) 和Stop & Glo 试剂的制备遵循双荧光素报告实验系统说明书。

用260ulLAR II冲洗SpectraMax卡盒的注射器1，然后用260ul Stop & Glo 试剂冲洗注射器2。在SoftMax Pro软件中，通过获取模式进行加液(Figure 2)。每根注射器都通过智能加液技术进行加液100ul(96孔板)和25ul(384孔板)，这种技术是在加液的同时进行震荡以确认试剂的充分混匀，同时设置2秒的时间延迟和10秒的检测。20ul(96孔板)和10ul(384孔板)的荧光素标准品加到实验孔中。将实验板放到SpectraMax i3x读板机的加样仓里，进行读取。最后通过SoftMax Pro软件进行数据分析和图表制作。预存的双荧光素报告实验模板可以直接在SoftMax Pro的模板库里直接调用。

基于细胞的实验

在6孔板中每孔接种 2.5×10^5 的CHO-K1细胞，生长过夜。第二天细胞瞬转pGL4.13 [luc2/SV40] 萤火虫荧光素酶质粒 和pGL4.74 [hRluc/TK] 海肾萤火虫酶质粒，参考Fugene HD转染试剂的标准流程。使用10:1比例的萤火虫:海肾质粒DNA，每个孔总共1 μg DNA和3ulFugene HD转染试剂转染24小时，细胞接种到96孔平底底透白色TC处理板中，密度从195到25000个细胞每孔，过夜生长。然后用1X Passive裂解液进行裂解，最后结合双荧光素酶报告实验系统和SpectraMax i3x读板机的注射器卡盒进行上述实验。实验前，用一张白色封膜放到微孔板底从而最大化检测信号。

Dispense and Shake

Read

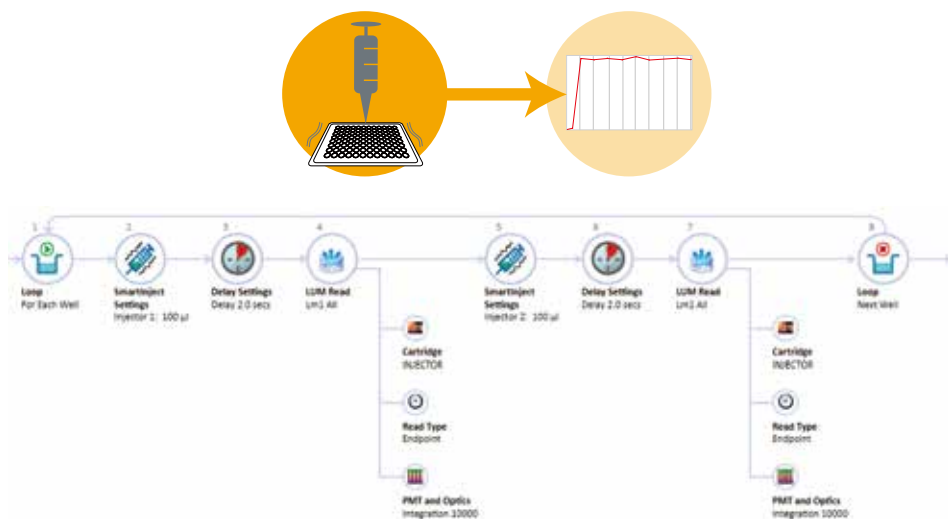


Figure 2. DLR的获取设置。SoftMax Pro中的获取设置编辑器可以通过拖拽设置进行每个孔的操作。上面显示了DLR实验的设置。进行分别注射和读取。智能注射模式描绘在上面的图示中。加样方式，能够在加样时震荡，并且有2秒的时间延迟，保证试剂充分混匀、使孔与孔之间信号快速和持续的进行。

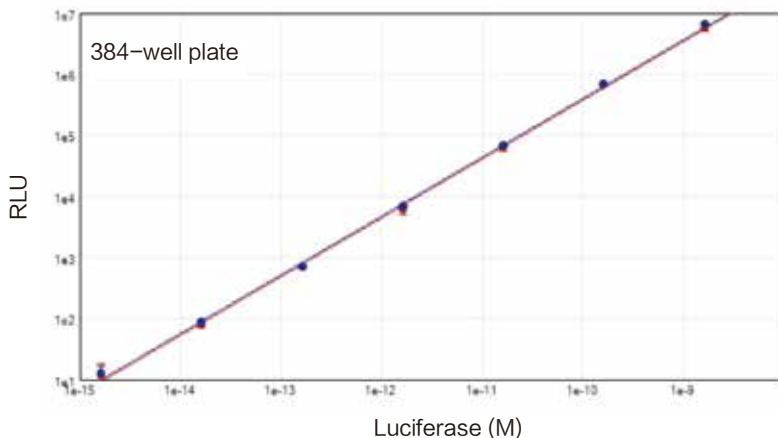
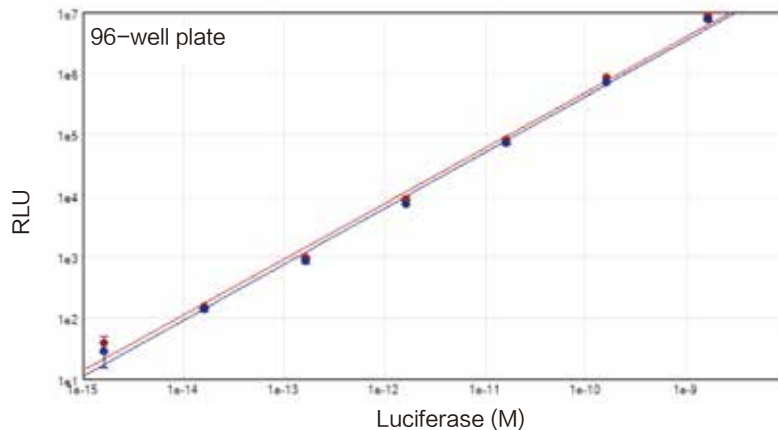


Figure 3. 96- 和 384-孔双荧光素酶标准曲线。1:10梯度稀释，重组萤火虫(红点)和海肾(蓝点)荧光素酶应用DLR系统。6个数量级的线性范围检测($r^2=0.994$)。顶，96孔板形式；底，384孔板形式。

实验结果

荧光素标准曲线

酶测结果显示，萤火虫和海肾荧光素酶信号都能达到6个线性数量级，从1.6fM到1.6nM(Figure 3)。对于96孔板，相当于1fg每孔到1ng每孔；对于384孔板是0.5fg到0.5ng每孔。96孔板和384孔板都具有相似的线性度和动态范围，揭示了双荧光素酶系统和SpectraMax i3x系统的稳定性。

基于细胞的实验

萤火虫和海肾荧光素酶信号的线性度通过细胞密度梯度进行检测，从195到25000个细胞每孔(Figure 4)。两种酶的化学发光信号差异是基于用于转染细胞的10:1比例的萤火虫:海肾质粒，也基于SV40(萤火虫质粒)和TK(海肾质粒)启动子的不同能力。Figure 5显示萤火虫荧光素酶RLU值通过海肾荧光素酶RLU值进行均一化，均一化的数值在整个范围的细胞梯度测试中都近似。

结论

上述结果揭示了出色的灵敏度，萤火虫和海肾荧光素酶低到<1fg每孔，并达到6个数量级的动态范围，确保荧光素酶表达量和细胞密度都有很大不同的情况下仍然都能准确检测荧光素酶信号。

SpectraMax i3x读板机特色的制冷PMT检测器可以降低化学发光检测背景信号。当联合使用SpectraMax注射器卡盒时，这个系统可以进行闪光型化学发光实验，提高包括报告基因实验在内的一些实验的灵敏度和动态范围。利用SoftMax Pro软件预设的模板进行快速分析，将每个荧光素酶信号进行均一化计算以轻松阐释结果。

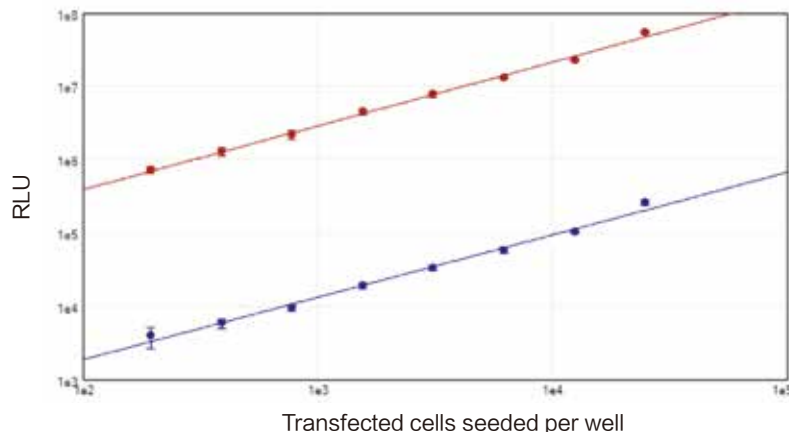


Figure 4. 基于细胞的标准曲线。将萤火虫和海肾荧光素酶转染接种到密度为195到25000个细胞每孔的96孔板中，使用DLR体系。结果通过散点图显示，RLU 比每孔转染的细胞数。红色点，萤火虫荧光素酶信号；蓝色点，海肾荧光素酶信号（两者都是 $r^2=0.99$ ）

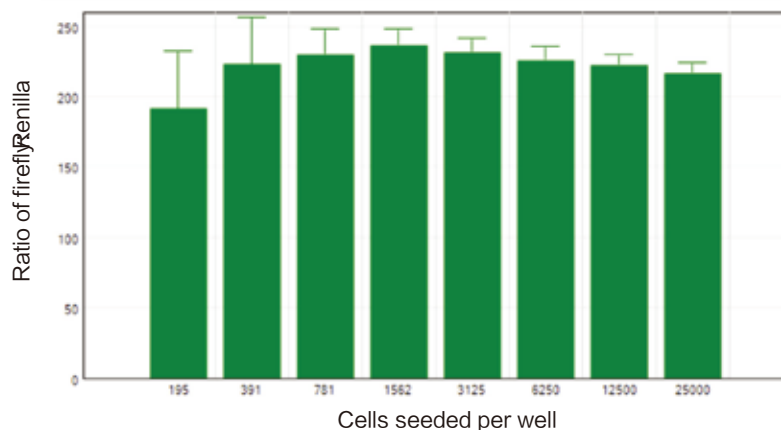


Figure 5. 转染细胞的萤火虫荧光素酶信号通过海肾荧光素酶信号进行均一化。均一化后的结果数值vs每孔的接种细胞数。

文献

1. DeLuca, M.A. and W.D. McElroy (1978) in Meth. Enzymol., 53:3.
2. Matthews, J. C. et al. (1977). Purification and properties of Renilla reniformis luciferase. Biochemistry, 16:58.
3. <https://www.promega.com/products/pm/dlready-luminometers/dlready-validatedluminometers>