

多任务动力学检测功能可监测IPTG诱导细胞蛋白表达和其生长状态

简介

在一段时间内同时检测几种不同信号的输出尤其在研究蛋白或化合物对细胞生长或基因表达作用方面很有帮助。在本应用指南里，我们利用SoftMax[®] Pro 7版本软件同时来检测细胞生长(光吸收)和蛋白表达(荧光)。

在细菌中，lac操纵子是一种由编码β-半乳糖苷酶的启动子调控的基因群。将一个蛋白表达序列插入到含有lac操纵子的质粒中并转染细菌，可使这一转化细菌来表达感兴趣的蛋白。通常情况下，lac启动子是被变构抑制的，但是在异丙基-β-D-1-硫代半乳糖苷(IPTG)存在下，阻遏物从启动子序列释放引起感兴趣蛋白的表达。相反，如果IPTG过量，细胞会转变为优先将胞内物质用于蛋白表达并且细胞生长也会受到阻碍。

通过同时检测细胞密度和蛋白表达，我们展示了大肠杆菌(E.coli)是如何响应系列稀释的IPTG的。

材料

- SpectraMax[®] M2多功能酶标仪 (Molecular Devices)
- Luria Broth (LB)培养基(Teknova cat.#L8080)
- 氨苄青霉素(Teknova cat.#A9525)
- 1 M IPTG (Teknova cat. #I3431)
- 96-孔透明平底聚苯乙烯多孔板 (Greiner cat. #655-161)
- 含有pBbE5-RFP的E. coli质粒 (Keasling Lab)

优势

- 一定时间内同时检测几种不同信号
- 利用多种算法和曲线拟合全面分析数据
- 使用工作流程编辑器建立一套简单的实验方案

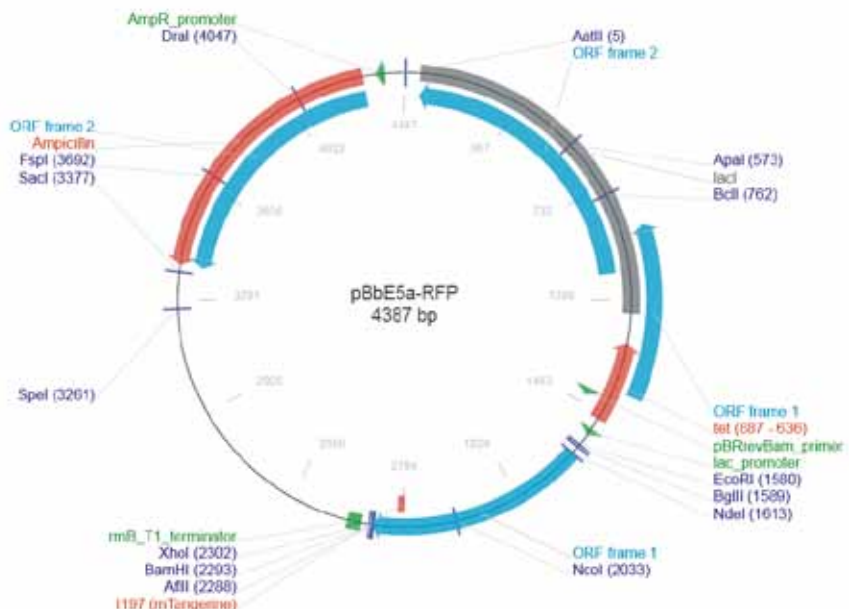


图 1. pBbE5a-RFP 质粒图谱

方法

包含pBbE5-RFP质粒(图1)的大肠杆菌(*E. coli*)由Jay D.Keasling2教授提供。大肠杆菌(*E. coli*)菌株培养在含有100 μM 氨苄青霉素的LB培养基中,生长到OD600为0.3时,再将100 μL 的大肠杆菌(*E. coli*)转移到透明96孔板中。用起始浓度500 μM 的IPTG两倍系列稀释来处理大肠杆菌(*E. coli*)。0 μM IPTG和只含培养基的对照也分别进行检测。

微孔板放入SpectraMax M2多功能酶标仪中32°C孵育并用动力学法检测。利用SoftMax Pro7软件的工作流程编辑器,创建包括光吸收和荧光两种检测方法的动力学循环,读数之间震板10秒,参数设置如表1。循环每10分钟1次,共24小时。使用SoftMax Pro7版本软件对产生的两种检测方法的动力学数据进行分析。

结果

光吸收和荧光检测的动力学曲线分别由图2和图3所示。图2中,不断增加IPTG浓度导致OD600下降,意味着对细菌生长起反作用。图3中,提高IPTG浓度不会引起红色荧光蛋白(RFP)表达量的增加。相反,提高IPTG浓度会导致总RFP表达量的减少。这一减少可能是因为细菌生长停滞造成的。

在图4中,对光吸收和荧光数据做处理以计算曲线下的面积(AUC)。采用SoftMax Pro7版本软件进行分析并总结出IPTG对细胞生长和蛋白表达的影响。IPTG对荧光的影响在除500 μM 浓度外的其他所有浓度中效果都是相似的,即提高IPTG浓度导致细菌生长下降(光吸收)。

计算RFP/OD600的比值可以用来测定蛋白表达相对于细菌群体密度。使用SoftMax Pro7版本软件,我们计算出RFP/OD600比值(图5)。基于动力学追踪,250 μM IPTG处理的细菌每个细胞所表达的RFP是最多的。

	读板模式	
	光吸收	荧光
波长 (nm)	600	Ex/Em = 530/625
读数类型	底读	底读
间隔时间	1次/10分钟	1次/10分钟
光学参数设置	—	10次闪光/次
PMT增益	—	高

表 1. 测定细胞密度和蛋白表达的仪器参数设置

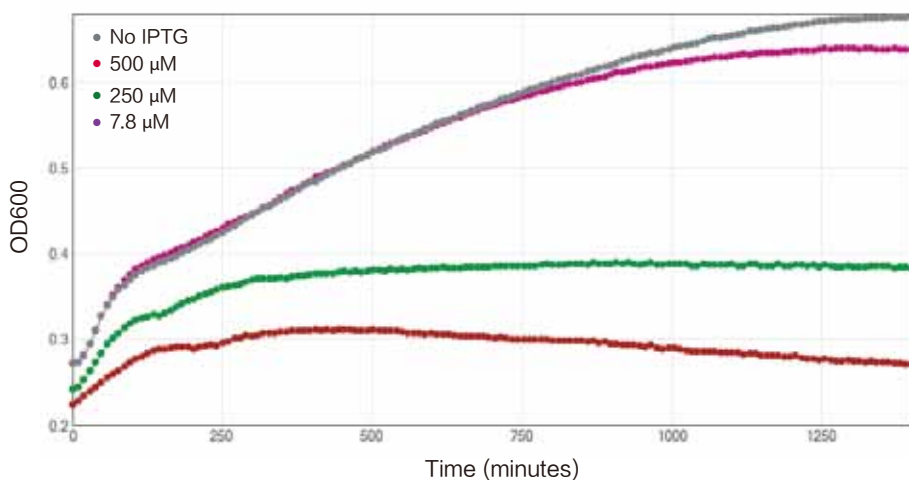


图 2. OD600动力学追踪。OD600读数24小时内每10分钟记录一次(n=3)。IPTG浓度增加,细菌生长减慢。

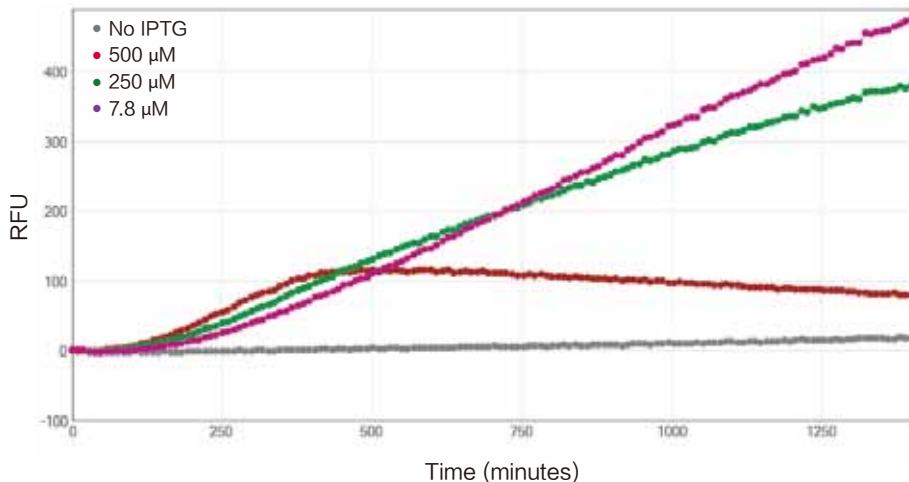


图 3. 荧光动力学追踪。测定OD600同时记录荧光强度(n=3)。除了500 μM IPTG处理的孔以外,荧光强度在其他所有浓度范围内都是相似的。

结论

我们展示了Molecular Devices SoftMax Pro7版本软件和多功能酶标仪配合使用能够在一段时间内同时检测许多生物学事件。尽管展示的实验较为简单，但这一应用也适合于更为复杂的实验。

参考文献

1. Malakar, P. and Venkatesh, K.V. (2012) Effect of substrate and IPTG concentrations on the burden to growth of *Escherichia coli* on glycerol due to the expression of Lac proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(6), 2543-2549.
2. Lee, T.S., Krupa, R.A., Zhang, F., Hajimorad, M., Holtz, W.J., Prasad, N., Lee, S.K., and Keasling, J.D. (2011) BglBrick vectors and datasheets: a synthetic biology platform for gene expression. *Journal of Biological Engineering*, 5, 12.

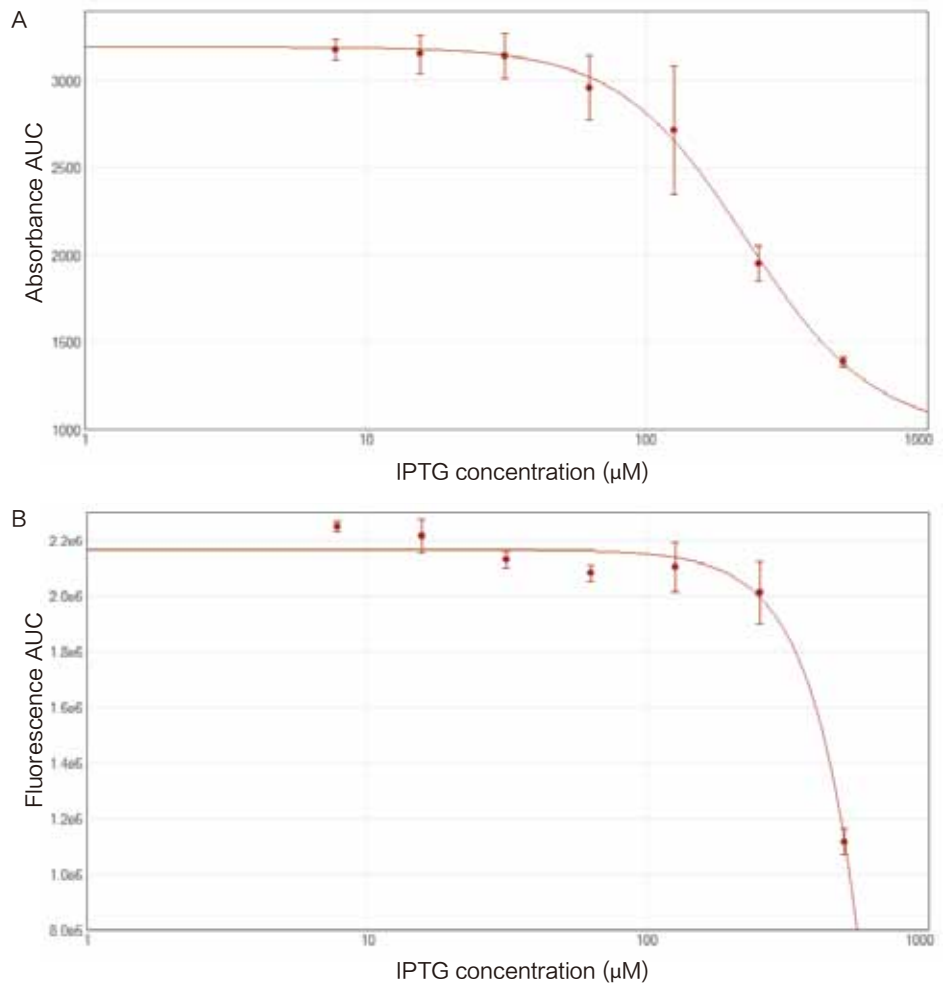


图 4. 光吸收和荧光检测的曲线下面积(AUC)。光吸收(A)和荧光(B)的AUC通过SoftMax Pro7版本软件计算并描绘曲线。4参数曲线应用于说明IPTG对细胞生长(光吸收)和蛋白表达(荧光)的作用。

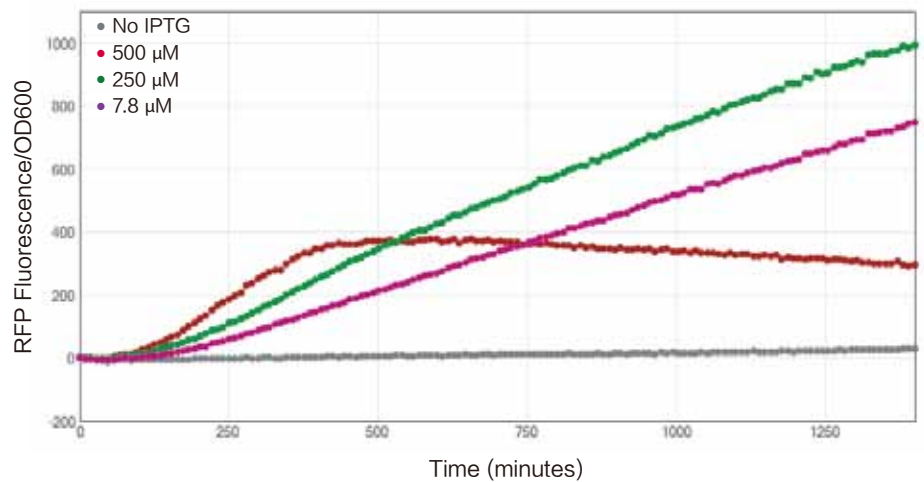


图 5. RFP/OD600 比值。荧光与细胞密度的比值通过荧光强度值除以OD600值得到。将荧光比细胞密度标准化后, 250 µM IPTG处理细菌(绿色)表明了每个细胞中有更高的RFP浓度。



扫一扫关注我们
的官方微信