

# 应用微孔板读板机和双报告系统 检测NF-κB活性

## 前言

报告基因对于基因表达的研究来说是非常有用的工具，它可以代替要研究的目的基因，从而帮助我们了解目的基因的信号通路和相关的疾病。荧光素酶是最常用的报告基因，使用光度计和化学发光功能的微孔板读板机我们可以很容易的检测到荧光素酶，另一方面，由于在细胞实验中其背景较低，因此具有很高的灵敏度。我们通常用萤火虫荧光素酶表达水平高低反映出我们感兴趣的基因在系统中的地位。而海肾来源的荧光素酶则更常在多荧光实验中作为第二种报告基因，来规范化多种在不同样本中变化较大的指标如转染效率，细胞活力等。

SpectraMax® DuoLuc™ Reporter 试剂盒可以对哺乳动物细胞中的萤火虫和海肾荧光素酶进行高灵敏度的定量。依次向微孔中加入两种适量的反应试剂即可检测荧光。这种双荧光信号检测系统可以在归一化检测荧光信号(萤火虫荧光)的同时提供持续表达的对照荧光信号(海肾荧光)。运用SpectraMax® iD5 多功能微孔板读板机、注射器系统和 SmartInject™ 技术可以将实验条件最优化。

在这里我们将展示如何在哺乳动物细胞模型中，通过双荧光报告检测系统和SpectraMax iD5 微孔板读板机来检测核转录因子κB (NF-κB)的活性。NF-κB是参与细胞进程中许多基因表达的“主要调节者”，如炎症，免疫，分化，增殖和凋亡。肿瘤坏死因子α (TNF-α)可以激活细胞信号通路来降解NF-κB的抑制剂，从而促使其释放并进入核内，调节数百目的基因的表达。NF-κB通路的紊乱可以诱发多种疾病，如多发性硬化病，糖尿病，阿尔兹海默病等，因此利用合适的工具加深我们对NF-κB通路的理解是十分必要的。

## 优势

- 灵敏的双报告系统检测多荧光素酶
- 用对照质粒转染进行均一化，提高结果的准确度
- SoftMax Pro软件的预置模板可简化操作

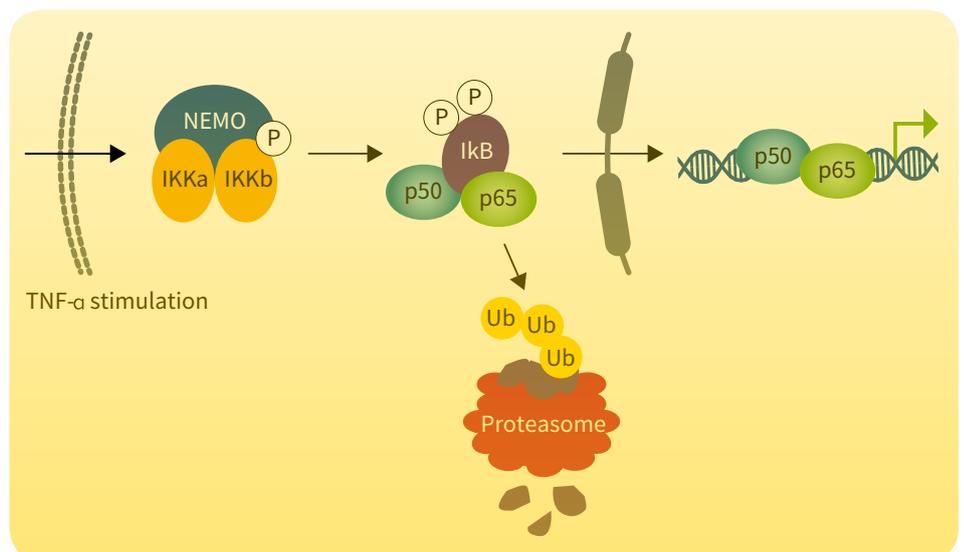


图1 NF-κB信号通路。TNF-α激活信号层级反应使NF-κB抑制剂IKB降解，并释放NF-κB转录因子。

## 材料

- SpectraMax 双报告试剂盒 (Molecular Devices cat. #R8361)
- HEK 293 细胞系 (ATCC cat. #CRL-1573)
- 培养基: DMEM + 10% fetal bovine serum + penicillin/streptomycin
- pGL4.32[luc2P/NF- $\kappa$ B-RE/Hygro] 萤火虫荧光素酶质粒 (Promega cat. #E849A)
- pGL4.75[hRluc/CMV] 海肾荧光素酶质粒 (Promega cat. #E693A)
- FuGENE HD 转染试剂盒 (Promega cat. #E2311)
- Opti-MEM 低血清培养基 (ThermoFisher Scientific cat. #31985062)
- 96孔白板 (Corning cat. #3610)
- TNF- $\alpha$  10  $\mu$ g/mL PBS + 1 mg/mL BSA溶液 (Sigma cat. #T0157)
- BrightMax 密封薄膜 (Excel Scientific cat. #WT-50)
- SpectraMax iD5 多功能微孔板读板机
- 具有 SmartInject技术的注射器系统

## 方法

### 细胞接种和转染

HEK293细胞(80%融合度)用胰酶消化后分到96孔白板中,每孔15,000细胞。当细胞超过50% 融合度时,用NF- $\kappa$ B-RE 萤火虫荧光素酶和海肾对照组质粒对细胞进行共转染,其中使用三种不同比例FuGENE和DNA组合方式,转然后,细胞置于37°C培养箱中培养24h。

### TNF- $\alpha$ 诱导

将10  $\mu$ g/mL TNF- $\alpha$ 的溶液用细胞培养基稀释到20ng/ml制成诱导溶液。无添加培养基作为对照。操作时将原培养基移除后加入100 $\mu$ L对照或诱导溶液,之后将板放回培养箱继续孵育7小时。

	Ratio of transfection reagent to DNA		
	3:1	2.5:1	2:1
Medium to a final volume	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L
DNA amount	2.2 $\mu$ g (2 $\mu$ g Fluc + 0.2 ng Rluc)	2.2 $\mu$ g (2 $\mu$ g Fluc + 0.2 ng Rluc)	2.2 $\mu$ g (2 $\mu$ g Fluc + 0.2 ng Rluc)
Volume of FuGENE HD Transfection Reagent	6.6	5.5	4.4

表1 转染试剂体积与不同DNA含量的比例。

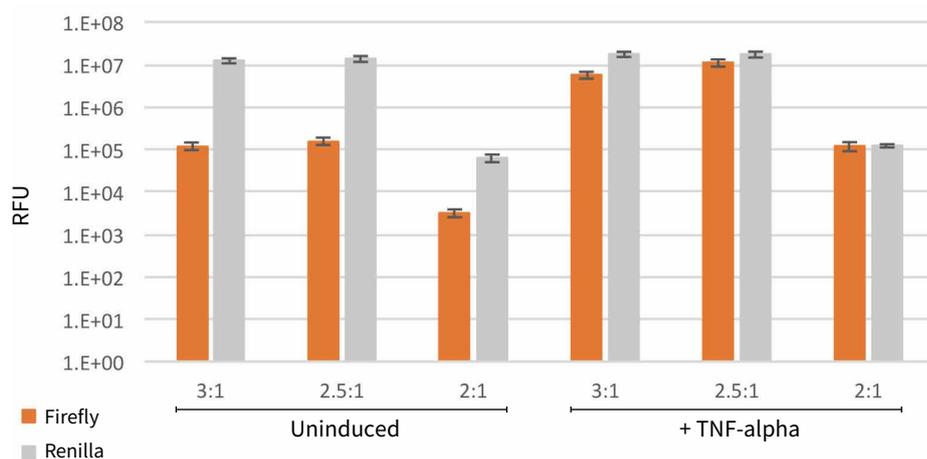


图2 原始发光值数据。图中所示为不同转染条件下(转染试剂: DNA比值)TNF- $\alpha$ 未诱导和诱导的RFU值。每个转染条件有9个重复。

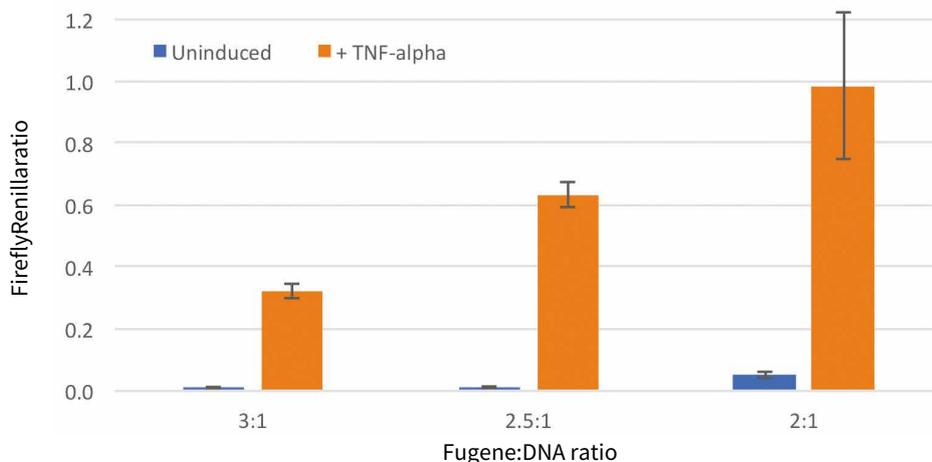


图3 均一化发光值结果。用海肾发光值对萤火虫RLU做均一化。

## 细胞裂解液的制备

移除细胞培养基后孔中细胞用PBS洗两次。裂解缓冲液恢复至室温后每孔加入20 $\mu$ L。室温下轻柔震荡15分钟促进细胞裂解。在板底安上一个白板密封盖以增强荧光信号强度。

## 荧光素酶检测设定

试剂盒中的试剂使用前需在室温下孵育。向装有2.2 mg冻干底物的小瓶中加入220 $\mu$ L水混匀后即为萤火虫酶底物。向装有440 $\mu$ g冻干底物的小瓶中加入220 $\mu$ L水混匀后即为水蛭素肠杆菌素。

用萤火虫检测缓冲液按1:50比例稀释萤火虫酶底物后即为萤火虫工作液。用海肾荧光素酶缓冲液按1:50比例稀释水蛭素肠杆菌素后即为海肾工作液。对一个96孔板来说，每种工作液(working solution)我们需要11mL，其中包含220 $\mu$ L各自的底物(substrate)。SoftMax<sup>®</sup> Pro Software中预配置的程序可以帮助执行实验操作和结果分析，这需要以下的参数设置：

- 1、使用注射器1向孔中加入100 $\mu$ L萤火虫工作液
- 2、等2秒钟使反应充分
- 3、设置integration time 5秒检测萤火虫荧光
- 4、使用注射器2向孔中加入100 $\mu$ L海肾工作液
- 5、等2秒钟使反应充分
- 6、设置integration time 5秒检测海肾荧光
- 7、对每个实验孔，需要将第一次测量(firefly荧光)与第二次测量(海肾荧光)的RLU值相比获得数据。

SpectraMax iD5注射器模块和SmartInject技术可以在加入试剂的过程中进行震荡，从而保证试剂充分混匀以最大限度的获得萤火虫和海肾的荧光信号。

Transfection condition (Reagent:DNA)	Average normalized FFRenilla		Fold induction (Induced/uninduced)
	Induced (+TNF $\alpha$ )	Uninduced	
3:1	0.322	0.010	32
2.5:1	0.634	0.012	54
2:1	0.986	0.051	19

表2 在诱导与不诱导情况下不同转染条件下获得的比值。最好的条件是转染试剂：DNA为2.5:1。

## 结果

相对于诱导条件的变化而言，各种转染条件均能检测到海肾荧光素酶的高表达，而加入细胞因子TNF- $\alpha$ 会大大增加萤火虫荧光素酶的表达水平(图2)。总之，转染试剂与DNA比例为2:1时荧光素酶的表达水平较其他比例而言最低。

结果显示诱导条件下，三种转染比例条件下萤火虫荧光素酶与海肾荧光素酶均一化读值较高(图3)。然而均一化比值在3:1和2.5:1的转染条件下较低，但是加TNF- $\alpha$ 诱导的与不加的倍比关系明显较大。表2显示三种转染条件下诱导的倍比关系，最好的诱导倍比条件是试剂：DNA比例为2.5:1。

## Reference

1. Oeckinghaus, A and Ghosh, S. The NF- $\kappa$ B Family of Transcription Factors and Its Regulation. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2009 Oct; 1(4): a000034.

## 结论

在HEK293细胞系应用双报告基因检测法，我们证实了加入TNF- $\alpha$ 强烈诱导NF- $\kappa$ B的表达。由于此系统对萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶都敏感，都可得到较强的信号。三种转染条件下，我们加入TNF- $\alpha$ 诱导使NF- $\kappa$ B均一化后的最佳比值可达到54倍。

使用SpectraMax<sup>®</sup> iD5 多功能微孔板读板机、具有SmartInject<sup>™</sup> 技术的注射器系统，可用于检测SpectraMax<sup>®</sup> DuoLuc<sup>™</sup> Reporter 实验。预置的操作流程简化了数据采集和分析的操作。SpectraMax Pro软件可助你快速完整、灵敏可靠的获得双荧光素酶报告系统的检测结果。



扫一扫关注我们  
的官方微信