APPLICATION NOTE

使用 FlexStation 3 微孔读板机检测双荧光素酶表达

Hoang Ha | Applications Scientist | Molecular Devices

介绍

报告基因是研究细胞通路激活相关基因表达的重要工具。细胞转染含有报告基因和感兴趣基因序列的质粒，通常是启动子或其他转录控制元件。当启动子激活时，报告基因表达且可测定其表达水平。

萤火虫荧光素酶是普遍使用的报告基因。其发光信号所提供的灵敏度相比荧光和其他方法更胜一筹。第二种发光报告基因是海肾荧光素酶，通常作为组成型启动子的对照，用以标准化诸如转染效率和细胞数量等差异。由于萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶使用不同的底物，所以两者可在同一个孔中使用双荧光素酶实验进行检测。

SpectraMax® DuoLuc Reporter Assay 试剂盒可实现在微孔板中使用萤火虫和海肾荧光素酶进行高灵敏度定量实验。添加萤火虫工作液到样品孔可启动萤火虫发光反应，然后在加入海肾工作液可淬灭萤火虫荧光素酶反应同时启动海肾荧光素酶发光反应。

FlexStation® 3 多功能微孔读板机可在 96 或 384 孔板中进行高灵敏和高通量的 SpectraMax DuoLuc 实验检测。在 FlexStation 3 读板机中，整个反应系列都是实时监测的，并同时进行机载试剂的吸液加液和发光检测 (图 1)。

材料

- FlexStation 3 多功能微孔读板机 (Molecular Devices cat. #Flex3)
- FlexStation 3 8-通道加样头 (Molecular Devices cat. #0200-6182)
- FlexStation 3 16-通道加样头 (Molecular Devices cat. #0200-6183)
- 96-孔黑色 FlexStation 吸头 (Molecular Devices cat. #0900-0911)
- 384-孔黑色 FlexStation 吸头 (Molecular Devices cat. #9000-0764)
- SpectraMax DuoLuc Reporter 检测试剂盒 (Molecular Devices cat. #R8361)
- HeLa 细胞 (ATCC cat. #CCL-2)
- pGL4.13 [luc2/SV40] 萤火虫荧光素酶表达载体 (Promega cat. #E668A)
- pGL4.75 [hRluc/CMV] 海肾荧光素酶表达载体 (Promega cat. #E693A)
- ViaFect™ 转染试剂 (Promega cat. #E4981)
- Opti-MEM 低血清培养基 (ThermoFisher Scientific cat. #31985062)

优势

- 按列加样且同时检测，更高通量
- 检测萤火虫和海肾荧光素酶表达可低至每孔 10 个细胞
- 预设实验模板可简化实验设置并快速获取结果

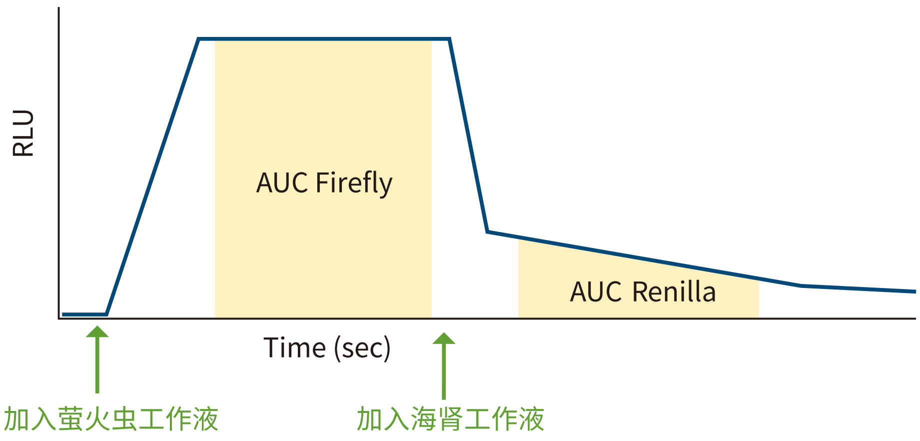

图 1 FlexStation 3 读板机上实时监测试剂添加后的反应。通过软件计算反应 (萤火虫和海肾) 的每个阶段特定部分曲线下面积 (AUC)

方法

细胞转染

HeLa 细胞以每孔 2x10⁵ 个细胞接种于组培处理过的 6 孔板中，转染前在 37°C/5% 条件下孵育 24 小时。pGL4.13[luc2/SV40] 萤火虫荧光素酶表达载体经 Opti-MEM 培养基稀释至 1 µg/µL，pGL4.75 [hRluc/CMV] 海肾荧光素酶表达载体稀释至 100 ng/µL。三个试管按以下方式建立并轻轻混匀：400 µL Opti-MEM 培养基 + 2 µL (2 µg) pGL4.13 [luc2/SV40] 萤火虫荧光素酶表达载体 + 2 µL (2 ng) pGL4.75 [hRluc/CMV] 海肾荧光素酶表达载体。每管加入 6 µL ViaFect 试剂轻轻混匀。试管在室温下孵育 10 分钟以形成转染复合物。200 µL 复合物逐滴加入 6 孔板的每个孔中，轻轻旋转混匀。在做下一步实验前，细胞重新孵育 48 小时。

细胞裂解物的准备

6 孔板中的转染细胞通过胰酶消化下来，每孔分成 10 个等分试样，1500 rpm 离心 5 分钟，PBS 洗涤一次。吸去 PBS，细胞团保存于 -80°C 下直到开始实验。

在实验准备中，被动裂解缓冲液和细胞团孵育至室温，将每个细胞团于 150 µL 被动裂解缓冲液中裂解。细胞裂解过程在室温下进行 15 分钟。裂解物在被动裂解缓冲液中以 1:2 系列稀释，每孔生成一条从 4 至 8700 个细胞的标准曲线。20 µL 各浓度细胞裂解物以三个复孔加入 96 孔板中，10 µL 各浓度细胞裂解剂添加到孔板的一整列孔中，利用 Flex 读数模式按照定义好的时间对这些孔反复读数。每个样品都会生成实时动力学轨迹。萤火虫和海肾荧光素酶信号在每条动力学轨迹中均可区分，且曲线下的面积也可分别计算 (图 3)

结果

HeLa 细胞中转染的 SpectraMax DuoLuc Reporter 实验的萤火虫和海肾荧光素酶在 FlexStation 3 微孔读板机上检测。在 96 孔板中进行的实验表现出非常好的线性和灵敏度。从每孔 8700 个细胞一直到每孔大约 4 个细胞，我们能够分别检测到萤火虫和海肾荧光素酶发光 (图 4)。

384 孔板的实验表现可与 96 孔板相媲美，具有相同程度的线性并检测到每孔大约 8 个细胞 (图 5)。

Parameter	96-well	384-well
Read mode	Luminescence	
Read type	Flex	
Wavelengths	All	
Integration time	200 ms	
Timing	2 minutes	3 minutes 40 seconds
Interval time	3.4 seconds	5.2 seconds
1st compound transfer	Add 100 µL of firefly solution Height = 50 µL Addition rate = 4 Addition time = 20 seconds	Add 25 µL of firefly solution Height = 25 µL Addition rate = 4 Addition time = 20 seconds
2nd compound transfer	Add 100 µL ofRenillasolution Height = 150 µL Addition rate = 4 Addition time = 60 seconds	Add 100 µL ofRenillasolution Height = 75 µL Addition rate = 4 Addition time = 70 seconds
Trituration	After 1st compound transfer: Height = 50 µL Cycle = 2 Volume = 50 µL After 2nd compound transfer Height = 100 µL	After 1st compound transfer: Height = 25 µL Cycle = 2 Volume = 25 µL After 2nd compound transfer Height = 25 µL
Data reduction	Firefly: 20 – 67 seconds Renilla 68 – 120 seconds	Firefly: 20 – 80 seconds Renilla 80 – 220 seconds

表 1 FlexStation 3 微孔读板机化合物添加和测定参数。

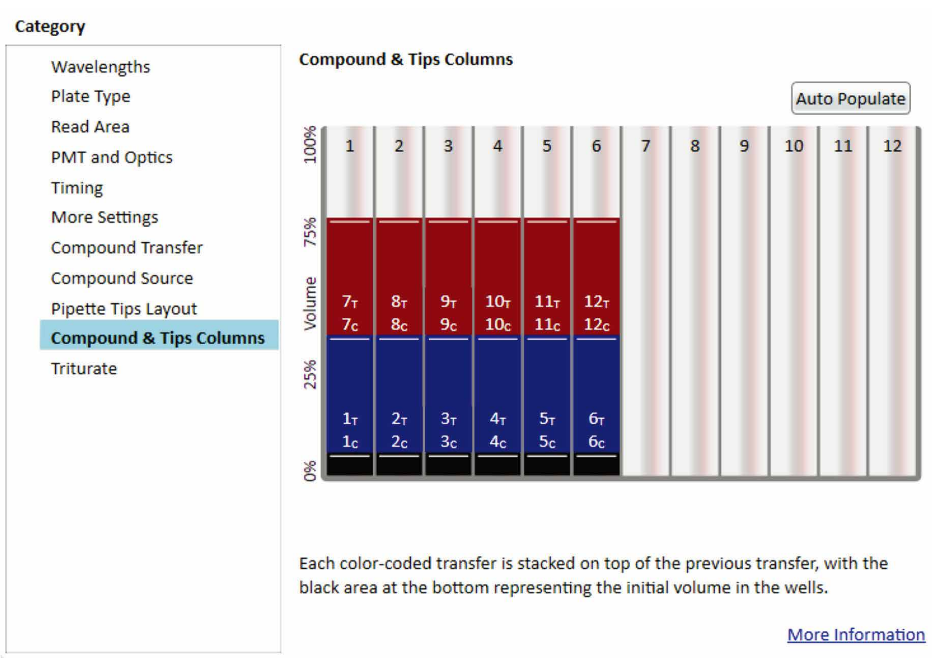

图 2 FlexStation 3 微孔读板机的 SoftMax Pro 7 软件用户界面。软件直观的操作界面简化了吸头和化合物列的分配

总结

当 SpectraMax DuoLuc reporter 实验与 FlexStation 3 微孔读板机内置的移液系统和发光检测结合起来的时候，即实现了在哺乳动物细胞中精确检测基因表达的高灵敏闪光型发光实验。得益于其整列添加试剂并在全部实验时间内对整列孔重复读数的能力，FlexStation 3 读板机提供了比双注射器系统更高的检测通量。SoftMax Pro 软件直观的操作界面和预设实验模板使用户能够快速创建参数、检测和分析双荧光素酶结果。

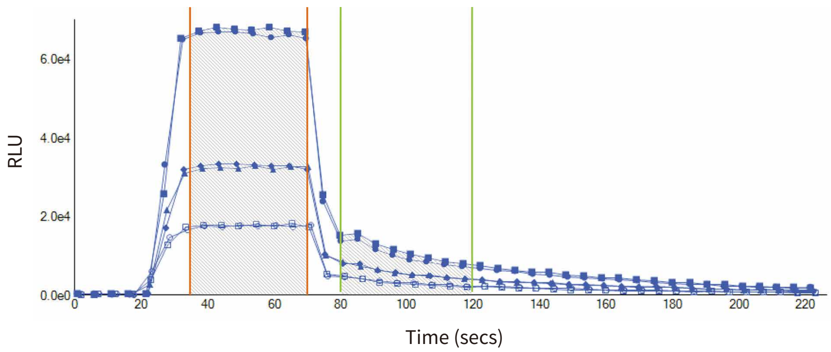

图 3　DuoLuc 动力学轨迹。DuoLuc reporter 实验的发光信号随时间记录以生成动力学轨迹。上图为 384 孔板中三种不同浓度细胞的测定。萤火虫 (35-70 秒) 和海肾 (80-120 秒) 动力学轨迹区域的曲线下面积。分别在 20 秒和 70 秒时添加试剂。

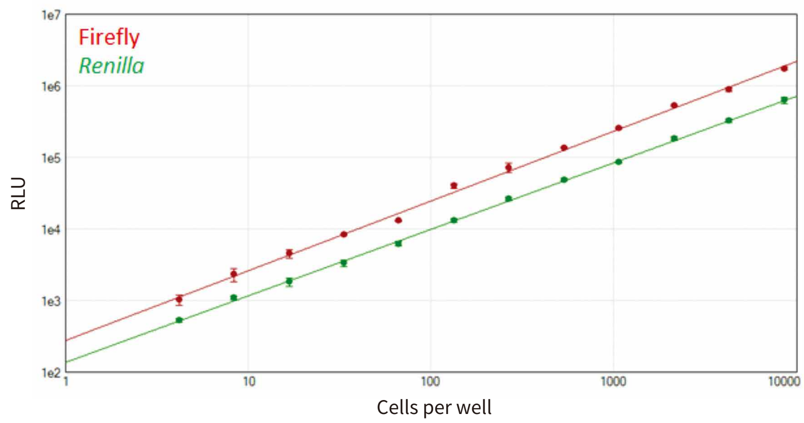

图 4　96 孔板中的 DuoLuc reporter 实验测定。使用 FlexStation 3 微孔读板机在 96 孔板中进行 DuoLuc reporter 实验测定。用 SoftMax Pro 软件中的 log-log 曲线拟合绘制萤火虫 (红色) 和海肾 (绿色) 标准曲线 (每条曲线 $r^2 > 0.998$)。每个稀释浓度做三个重复。

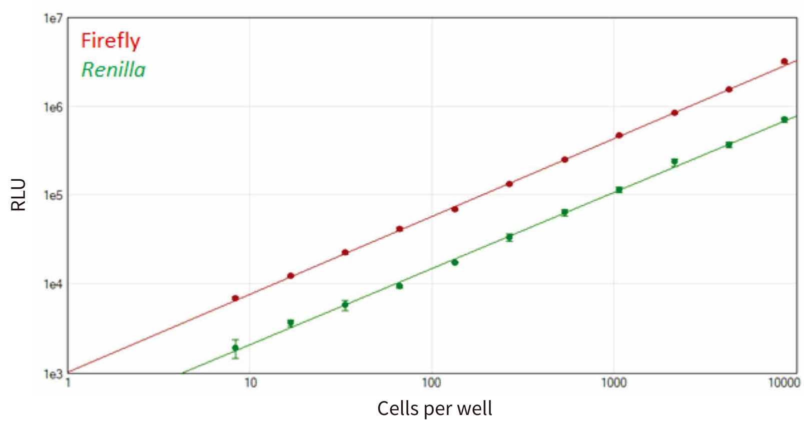

图 5　384 孔板中进行 DuoLuc reporter 实验测定。SpectraMax DuoLuc reporter 实验测定在 384 孔板中进行。用 SoftMax Pro 软件中的 log-log 曲线拟合绘制萤火虫 (红色) 和海肾 (绿色) 标准曲线 (每条曲线 $r^2 > 0.998$)。每个稀释浓度做四个重复。

更多精彩内容
尽在官方微信

美谷分子仪器 (上海) 有限公司

全国咨询服务热线：400-820-3586　www.MolecularDevices.com.cn　Email: info.china@moldev.com

上海　电话：86-21-3372 1088　传真：86-21-3372 1066　地址：上海市长宁区福泉北路 518 号 1 座 501 室　200335
北京　电话：86-10-6410 8669　传真：86-10-6410 8601　地址：北京市朝阳区广渠东路 3 号中水电国际大厦 612 & 613 室　100124
成都　电话：86-28-6558 8820　传真：86-28-6558 8831　地址：成都市锦江区东御街 18 号百扬大厦 2208 室　610016
台北　电话：886-2-2656 7585　传真：886-2-2894 8267　地址：台北市内湖区堤顶大道二段 89 号 3 楼
香港　传真：852-2289 5385　地址：香港中环皇后大道中15号置地广场 公爵大厦21楼

MOLECULAR DEVICES