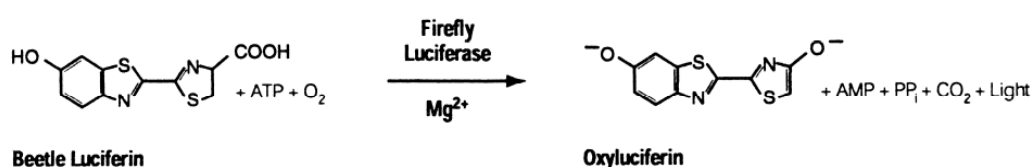


## Luciferase 报告基因技术

自然界中广泛分布着生物发光有机体，其中包括细菌、真菌、鱼、昆虫等。在这些生物发光有机体中催化生物发光反应的各种酶都称之为荧光素酶 (Luciferases)，底物则命名为荧光素 (Luciferin)。自 1986—1987 年首次被当作报告基因使用以来，荧光素酶基因已成为目前运用最广泛的报告基因之一。尽管来自不同物种的荧光素酶及底物存在有很大的差异，但有一个共同点，即在生物发光反应体系中均需发生氧化反应。它通过两个步骤使底物荧光素发生氧化作用，而产生发光反应，此反应是 ATP 依赖性的。杂环荧光素首先腺苷化，然后通过氧化脱羧作用，产生 AMP、CO<sub>2</sub>，并通过激活的荧光素中间产物发射光。



将反应所需的试剂与含有荧光素酶的细胞裂解液混合即会产生一种迅速衰减（在一秒钟内）的黄绿色闪光（发射峰 560 nm），这种光信号可用配备了便于迅速混合反应物的自动注射装置的荧光检测仪（Luminometer）进行检测，也可用标准的液闪仪对光信号进行记录。当底物过量时，发光量的总值与样品的荧光酶活性成正比，因此，可对荧光素酶报告基因的转录进行间接估计。荧光素酶易被蛋白酶降解，在转染的哺乳动物细胞中的半衰期约为 3 小时。荧光素酶报告系统为启动子活性的检测提供了一个敏感、快速、非放射性的检测方法。

### 实验步骤：

1. 实验第一天，消化并接种细胞（根据具体实验选择合适的细胞）于 35mm 细胞培养皿，置于 5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的 37℃ 培养箱内培养过夜。
2. 等细胞密度达到 70% 时用 Luciferase 报告基因质粒、LacZ 的表达质粒及其它质粒（根据具体实验确定）共转染细胞（根据具体实验选择转染方法，如磷酸钙沉淀法、PEI、lipofectamine2000 等均可）。
3. 转染 24—36 小时后，吸去培养液，用冰冷的 PBS 洗涤细胞。

注：荧光酶的酶促反应会被痕量的钙所抑制，故用磷酸钙转染的细胞在收集细胞前应充分洗涤除去含钙介质。

4. 在每个培养皿中加入 350  $\mu\text{l}$  预冷的 harvest buffer, 于 4  $^{\circ}\text{C}$  或冰上放置 10 min 裂解细胞。
5. 在细胞裂解期间, 准备足量的 1.5 mL 微量离心管, 将 ATP buffer 与 luciferin buffer 以 1: 3.6 比例混合成反应液后分装, 每管 100 $\mu\text{l}$ 。
6. 依次取等体积的细胞裂解液 (100 $\mu\text{l}$ ) 至步骤 5 中的离心管中, 迅速混匀, 在发光仪 (Luminometer) 上读取吸光值。

注：发光反应会迅速衰减，将细胞裂解液加入反应液后 5 秒内必须读取吸光值。

7. 确保以相同操作手法读取全部样品吸光值后。
8. 取剩余裂解液测定 LacZ 的活性, 其读数作为内标用以矫正荧光素酶的读数。
9. 用矫正后的读数作图, 分析数据。

注：荧光素见光易氧化，已稀释未用的荧光素应丢弃。

## 实验试剂：

(1) harvest buffer (25 ml):

1.25 ml 1 M Tris-HCl(pH7.5), 25  $\mu\text{l}$  1 M DTT, 250  $\mu\text{l}$  10% Triton X-100, 加水至 25 ml, 4 $^{\circ}\text{C}$  保存。

(2) ATP buffer (10 ml):

1.25 ml 1 M Tris-HCl(pH7.5), 250  $\mu\text{l}$  1 M  $\text{MgCl}_2$ , 24 mg ATP, 加水至 10 ml -20 $^{\circ}\text{C}$  保存。

(3) luciferin buffer (36 ml):

10 mg luciferin, 36 ml 5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH7.8), 4 $^{\circ}\text{C}$  保存。

(4) PBS:

20 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1.76 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 4 $^{\circ}\text{C}$  保存。