

使用 NanoLuc[®] 和 HaloTag[®] 技术对脑类器官进行实时监测

摘要

人脑类器官是研究神经发育、疾病进展和治疗反应的强大 3D 模型。然而，常规分析方法通常依赖于侵入性且具有破坏性的终点检测法，限制了其在动态长期研究中的应用。本文重点介绍一套非破坏性的生物发光和荧光工具——NanoLuc[®] 和 HaloTag[®] 技术——用于实时追踪类器官中的细胞身份、蛋白表达和组织发育。通过将这套系统与先进成像技术结合，研究人员能够在不影响样本完整性的情况下持续监测复杂的生物学过程。本文提供的信息基于 Stevens Rehen 博士的在线研讨会，他是巴西 D'Or 研究与教育研究所的神经科学家，并同时担任 Promega（普洛麦格）公司与 Usona 研究所的研究员。

引言

脑类器官（常被称为“微型大脑”）源自诱导多能干细胞，已成为模拟人脑发育某些方面的强大稳健的体外模型。这些 3D 培养物在模拟神经系统疾病、筛选化合物以及减少对动物模型的依赖方面具有独特优势。尽管其用途日益广泛，但研究人员在长期监测类器官健康状况和分化过程方面仍面临重大挑战，尤其是在不破坏培养物的情况下。

为解决这一问题，普洛麦格公司的研究人员采用了一种双报告基因策略，利用 NanoLuc[®] 萤光素酶和 HaloTag[®] 荧光标记技术，实现对类器官发育和类器官间通讯的连续、高分辨率定量评估（图 1）。这些系统支持终点分析和纵向分析，为实验设计提供了灵活性。

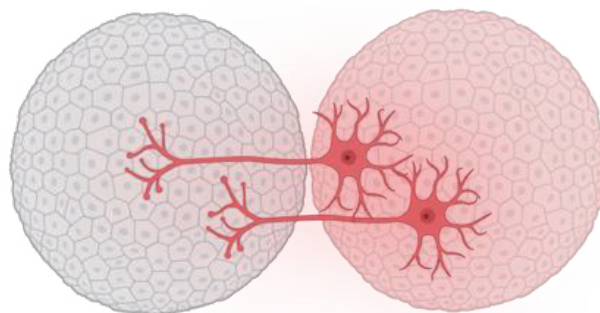


图 1. 本研究开发的 3D 类器官模型：通过荧光成像 HaloTag[®] 配体监测类器官间的交叉通讯。

方法与技术

HaloTag[®] 荧光报告基因系统

HaloTag[®] 蛋白是一种 33 kDa 的工程酶，可共价结合合成配体（这些配体可以是荧光或生物素化的）。当与目标蛋白融合或由神经元特异性启动子（如突触蛋白启动子）驱动时，HaloTag[®] 可用于：

- 通过共聚焦或多光子显微镜追踪细胞类型和蛋白定位
- 利用荧光报告基因进行活细胞脉冲追踪实验
- 使用不同配体（如 Janelia Fluor[®] 552 和 669）在混合群体中可视化特定神经元

NanoLuc® 生物发光报告系统

NanoLuc® 是一种小型（19 kDa）、不依赖 ATP 的萤光素酶，由深海虾萤光素酶改造而成。它在与 furimazine 底物反应时产生明亮的蓝光，并支持：

- 基于微孔板的高灵敏度基因表达定量分析
- 通过 GloMax® Galaxy 细胞成像仪对神经元分化和网络形成进行成像
- 以分泌形式（secNluc）用于通过条件培养基和 GloMax® Discover 微孔板读数仪监测启动子活性

递送与类器官制备

- 用携带神经元特异性启动子驱动下的 HaloTag® 或 NanoLuc® 报告基因的 AAV 载体转导 iPSC 来源的神经元祖细胞
- 类器官在悬浮液或基质胶中生长，并在所需时间点铺板进行成像
- 通过添加配体（如 Janelia Fluor® 染料）实现荧光标记，并使用 Nano-Glo® 试剂和 GloMax® Discover 微孔板读数仪监测发光信号

结合荧光与生物发光技术

当联合使用时，HaloTag® 和 NanoLuc® 技术可从同一类器官系统提供互补的读数。研究人员可进行活细胞成像以定位标记蛋白，同时收集发光数据以量化基因表达动力学。这种双重方法简化了数据收集，并提高了基于类器官实验的空间和时间分辨率。

结果与应用

利用 HaloTag® 配体追踪神经元分化

通过标记神经元特异性蛋白（例如使用突触蛋白启动子），研究人员追踪了球体内的神经元成熟过程。荧光显微镜显示了 3D 空间中神经突延伸、网络形成和区室化表达。双标记实验表明，可通过合并表达不同 HaloTag® 配体的细胞群体进行动态共培养研究。

使用不同 HaloTag® 配体进行标记能够实现共培养实验，以研究类器官间的通信。例如，观察到两个用不同 Janelia Fluor® 染料（如 JF552 和 JF669）标记的球体彼此延伸出神经突，模拟了脑区间的交互作用（图 2）。

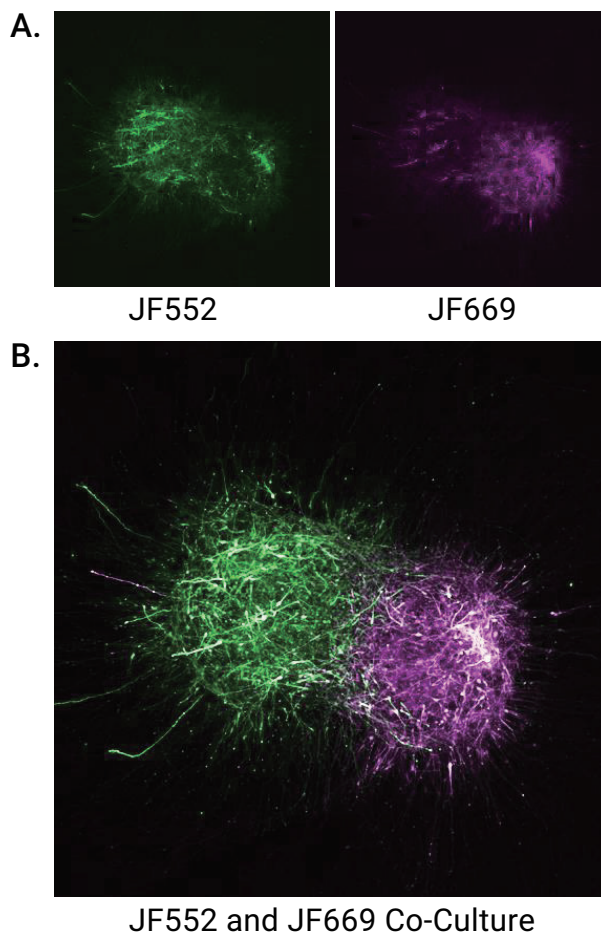


图 2. (A) 单荧光通道和 (B) 双荧光通道显示用 Janelia Fluor® 染料标记的球体之间的交叉通信。

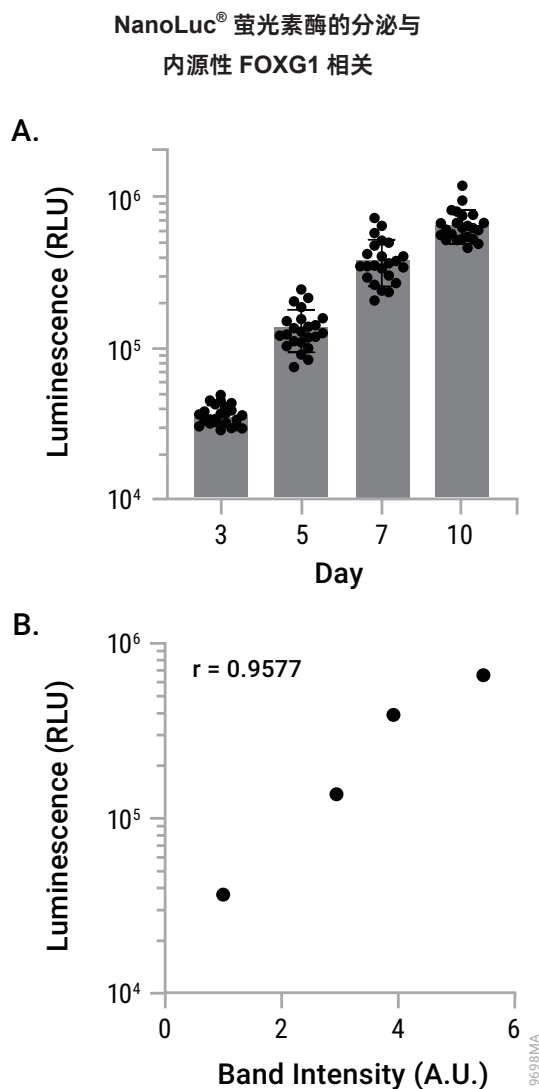


图 3. (A) 通过 GloMax® Discover 检测到的 NanoLuc® 萤光素酶分泌情况与 (B) 通过蛋白质印迹法检测到的内源性 FOXG1 水平, 随时间变化趋势相符。

使用分泌型 NanoLuc® 报告基因监测基因表达

NanoLuc® 报告基因在第二组实验中, 研究人员采用由 FOXG1 启动子驱动的改良 NanoLuc® 系统, 通过将分泌型 NanoLuc® 萤光素酶转化为生物发光信号来监测转录活性。FOXG1 是前脑发育和神经发生的关键转录因子。通过将其启动子与分泌型 NanoLuc® 相连, 研究人员能够直接从培养基中测量基因表达, 无需裂解细胞或干扰类器官形成。在类器官发育过程中, 培养基中测量的发光信号 (使用 GloMax® Discover 微孔板检测仪) 与通过蛋白质印迹法检测到的 FOXG1 蛋白水平高度吻合 (图 3)。

该方法实现了跨时间点与实验条件的动态、非侵入式转录活性评估。由于萤光素酶具有分泌特性, 该平台可在保持样本完整性的同时, 实现对三维模型的纵向监测和持续质量控制。

结论

NanoLuc® 和 HaloTag® 技术能够实时、无损地监测脑类器官中的复杂生物过程。这些工具提供高分辨率成像、灵敏定量和多重检测功能, 支持广泛的神经发育研究。当与 AAV 递送系统和成像平台等技术联用时, 它们为三维培养系统提供了可扩展、可定制的动态长期分析解决方案。欲了解 3D 模型成像的更多信息, 请查看我们的[活细胞成像页面](#)。

相关产品:

- [Nano-Glo® Live Cell Assay \(Cat.# N2011\)](#)
- [Janelia Fluor® HaloTag® Ligands \(e.g., HT1060\)](#)
- [GloMax® Galaxy Bioluminescence Imager](#)
- [AAV Vectors for Neuronal Promoter Expression](#)

The GloMax® Galaxy Bioluminescence Imager is For Research Use Only. Not for use in Diagnostic Procedures.

Trademarks herein are the property of Promega Corporation or their respective owners.

Products may be covered by pending or issued patents or may have certain limitations. Please visit our Web site for more information.

普洛麦格 (北京) 生物技术有限公司

地址: 北京市东城区北三环东路 36 号

环球贸易中心 B 座 907-909

电话: 010-58256268

传真: 010-58256160

网址: www.promega.com

技术支持电话: 400 810 8133

技术支持邮箱: chinatechserv@promega.com

更新时间: 2025.10



关注 Promega 生命科学