生物钟调控基因的高通量 siRNA 筛选

A high-throughput siRNA Screen for Circadian Clock Modulators

李慧林^{1, #}, 欧家丽^{1, #}, 唐芸棋^{1, *}

¹ 中国科学院上海营养与健康研究所, 上海

*通讯作者邮箱: yctang@sibs.ac.cn

#共同第一作者/同等贡献

引用格式: 李慧林, 欧家丽, 唐芸棋. (2021). 生物钟调控基因的高通量 siRNA 筛选. *Bio-101* e1010821. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010821.

How to cite: Li, H. L., Ou, J. L. and Tang, Y. Q. (2021). 生物钟调控基因的高通量 siRNA 筛选. *Bio-101* e1010821. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010821. (in Chinese)

摘要: 生物节律是生物进化过程中形成的内源性的适应地球昼夜交替的机制, 并对生物体内多种代谢过程和生理功能具有调控功能。在细胞内, 生物节律主要通过转录-翻译反馈环进行调控, BMAL1-CLOCK 复合体可以启动 PER2 等下游基因的表达, PER2 可以通过抑制 BMAL1-CLOCK 复合体的转录功能。PER2 作为核心节律基因之一, 其表达水平具有明显的周期性, 其振幅和周期也是生物节律的重要特征。因此, 通过检测 PER2 表达水平的周期性可以反应生物节律的强弱。在本次 siRNA 文库筛选中, 我们使用表达 PER2-荧光素酶融合蛋白的小鼠 MEF 细胞, 通过检测生物发光值的变化, 来表征 PER2 表达水平的变化, 从而发现新的可以调控生物节律的基因。本文主要介绍了运用 siRNA 文库以及通过检测生物发光值进行高通量筛选的方法, 该方法适用性强, 操作简单, 有助于获得稳定的筛选结果。

关键词: 生物节律, siRNA 文库, Luciferase

材料与试剂

材料

1. 1.5 ml 离心管 (QSP, 509-GRD-Q)
2. 15 ml 离心管 (JET BIOFIL, CFT-011-150)
3. 50 ml 离心管 (JET BIOFIL, CFT-011-500)
4. 10 ml 移液管 (JET BIOFIL, GSP010010)

5. 10 cm dish (NUNC, 150466)
6. 384 孔板 (Corning, CLS3570BC-50EA)
7. 0.22 μ m 滤器 (JET BIOFIL, FPV213500)

试剂

8. DMEM (Thermo Fisher, 12430047)
9. Penicillin-Streptomycin (BIOSERA, XC-A4122)
10. 胎牛血清 (LONSERA, S711-001s)
11. Trypsin (Thermo Fisher, 25200072)
12. PBS (Thermo Fisher, 21300058)
13. Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium (Thermo Fisher, 31985070)
14. 5x siRNA buffer (Dharmacon, B-002000-UB-100)
15. DharmaFECT 1 Transfection Reagent (Dharmacon, T-2001-02)
16. alamarBlue™ Cell Viability Reagent (Thermo Fisher, DAL1100)
17. ONE-Glo™ Luciferase Assay System (Promega, E6120)

仪器设备

1. 细胞培养箱 (Thermo scientific, Heracell 150i)
2. 生物安全柜 (Eppendorf, 1300 SERIES A2)
3. 离心机 (Eppendorf, centrifuge 5810 R)
4. 细胞计数仪 (Beckman Coulter, Z2)
5. 自动化分液仪 (Thermo Fisher, Multidrop Combi)
6. 混匀仪 (Eppendorf, ThermoMixer comfort)
7. 多标记微孔板检测仪 (PE, envision)

实验步骤

1. siRNA 的制备

1.1 将 siRNA 库 (Dharmacon, Mouse siGENOME siRNA Library, 申请于生物化学与细胞生物研究所化学生物学技术平台) 的 384 孔板室温放置 10 min 后, 水平离心机中 800 x *g* 离心 2 min, 然后小心地撕去孔板上的膜;

1.2 使用自动化分液仪 Multidrop Combi (见图 1) 在含有 siRNA 的孔中加入 10 μ l 1x siRNA buffer;

图 1. 自动化分液仪 Multidrop Combi

- 1.3 使用 1x siRNA buffer 分别稀释 Non-targeting Pool siRNA 及阳性对照 siRNA 至 0.1 μ M，并加入 siRNA 孔板中（如图 2，第二列）；
- 1.4 在水平离心机中 200 x g 离心 1 min；

图 2. siRNA 板排布方式。（橙色为阴性对照，绿色为阳性对照，蓝色为 siRNA 库，白色为空格；红色虚线为 Multidrop Combi 分液路径）

2. 转染试剂的制备

- 2.1 用 Opti-MEM 按照体积比 1:100 稀释 DharmaFECT 1 转染试剂；
- 2.2 使用 Multidrop Combi 将上述转染试剂溶液加入 siRNA 孔板内（10 μ l/孔）；
- 2.3 水平离心机 200 x g 离心 1 min，将 siRNA 与转染试剂混匀；
- 2.4 室温静置 20 min；

3. 细胞悬液的制备

- 3.1 将 MEF 细胞计数后加入适当体积 DMEM 培养基，配制成浓度为 4000 细胞/30 μ l 的细胞悬液。
- 3.2 使用 Multidrop Combi 将上述细胞悬液加入 siRNA 孔板，30 μ l/孔；

- 3.3 为减少边缘效应，在未使用的孔中加入 50 μ l PBS 或 DMEM;
- 3.4 将加好转染试剂和细胞的 siRNA 孔板在水平离心机中 200 $\times$ g 离心 2 min，放置于 CO₂ 培养箱中培养 48 h;
4. 换液：（用于同步细胞节律，换液后 27h 时 PER2 表达处于波峰位置）
  - 4.1 采用倒扣离心的方式（如图 3）在水平离心机中 200 $\times$ g 离心 10 s，将孔中的培液去除；

图 3. 倒扣离心步骤（1. 将孔板中大部分培液倒出；2. 将灭菌过的纸放在板盖上；3. 将孔板倒扣在板盖上； 4. 如图所示将孔板放入离心机）

- 4.2 使用 Multidrop Combi 加入新的 DMEM，50 μ l/孔（为防止将细胞冲起，将程序调整为慢速）；
- 4.3 水平离心机中 200 $\times$ g 离心 1 min，放入培养箱中继续培养 27 h；
5. 细胞数量检测
  - 5.1 使用 Multidrop Combi 向 384 孔板中加入 alamarBlue，5.5 μ l/孔
  - 5.2 水平离心机中 200 $\times$ g 离心 2 min，放入培养箱中继续培养 3 h；
  - 5.3 检测前，将板子在室温静置 30 min，然后用酶标仪（Ex: 530-560 nm, Em: 590 nm）检测荧光值；
6. 检测生物发光值
  - 6.1 采用倒扣离心的方式在水平离心机中 200 $\times$ g 离心 10 s，将孔中的培液去除；
  - 6.2 迅速使用 Multidrop Combi 加入 ONE-Glo，10 μ l/孔；

6.3 水平离心机中 800 x g 离心 2 min，放入混匀仪中 550 rpm 混匀 3 min，然后在酶标仪中检测生物发光值。

结果与分析

1. SD 值，C.V 值及 Z-factor 值计算

在筛选开始前，应先检测系统的稳定性。SD 值为标准差；C.V 值为离散系数，用于评估组内数据的离散程度；Z-factor 也被称作 Z-因子，用于评估筛选体系是否适合高通量筛选，Z-factor 值介于 0.5-1.0 之间时，证明筛选体系适合进行高通量筛选。我们使用阴性对照和阳性对照分别做了 40 个复孔用来测试系统稳定性。结果见图 4。根据 alamarBlue 值的计算，C.V 值较小，证明孔间细胞数量基本一致；在生物发光值的检测中，阴性对照和阳性对照的 C.V 值较小，并且 Z-factor 值大于 0.50，证明整个筛选系统比较稳定，可以用于大规模筛选。

$$C.V = \sigma/\mu.$$

$$Z\text{-factor} = 1 - (3 * (\sigma_p + \sigma_n) / |(\mu_p - \mu_n)|).$$

(σ 为标准差，μ 为平均值，p 为阳性对照，n 为阴性对照)

图 4. SD 值，C.V 值及 Z-factor 值

2. 细胞数量检测

由于本次实验通过检测生物发光值来检测不同的 siRNA 对 PER2 的影响，检测 alamarBlue 主要是为了排除 siRNA 造成细胞数量改变，从而导致生物发光值降低或

增高。在我们的结果中，确实发现某些基因的 siRNA 会明显改变 MEF 细胞数量，在后续的分析中会将这些 siRNA 排除。

3. 生物发光值

由于 siRNA 的三个复孔位于不同的 384 孔板中，因此每个 384 孔板中均应加入阴性对照和阳性对照（如图 5，第二列）；并且在分析时，首先将每个 siRNA 的值与板内的阴性对照做标准化处理，然后再计算三重复的平均值。

图 5. Bioluminescence 值示例

板内阴性对照平均值 $M = (B2+D2+F2+H2+J2+L2+N2)/7$

其他值分别除以 M，做标准化处理。

可能遇到的问题及调整建议

1. 转染效率低

尝试使用不同的转染试剂或者对转染试剂的用量进行调整。

2. 细胞数量过少或太多

在正式筛选开始前，应根据实验目的和筛选策略，选择大致的细胞密度范围进行预实验，以确定筛选时的细胞密度。细胞悬液制备时，应采用多次计数求平均值的方法。

3. 生物发光值太低

3.1 确定使用的细胞可以稳定表达荧光素酶，并且表达量不会太低；

3.2 使用合适的生物发光检测试剂以及检测试剂的用量。本次实验中，每孔中加入 10 μ l ONE-Glo，可以根据细胞中荧光素酶的表达量，进行调整。

4. 板内阴性对照误差较大

4.1 每次进行实验前，均应检查 Multidrop Combi 不同通道的通畅情况，防止因管道阻塞造成加入孔中体积不一致；

4.2 实验过程中，保证 Multidrop Combi 的软管插入液体底部，防止吸入气泡，并经常混匀。

5. 细胞贴壁不牢，无法进行倒扣离心

可以不倒扣离心，直接在培液中加入 ONE-Glo 的方式检测生物发光值，但要检测试剂用量，混匀时间等条件进行优化。

溶液配方

1. DMEM 完全培养基

在 1 L DMEM 中加入 100 ml 胎牛血清和 10 ml P-S 双抗

2. PBS

在 1 L ddH₂O 中加入 9.6 g PBS 粉末，完全溶解后，过 0.22 μm 滤器至已灭菌的玻璃瓶中。

致谢

感谢中国科学院生物化学与细胞生物学研究所化学生物学技术平台各位老师对本实验方法的帮助和改进。本实验得到国家自然科学基金项目 (31471342 and 31671408) 的资助。

参考文献

1. Yoo, S. H., Yamazaki, S., Lowrey, P. L., Shimomura, K., Ko, C. H., Buhr, E. D., Siepka, S. M., Hong, H. K., Oh, W. J., Yoo, O. J., Menaker, M. and Takahashi, J. S. (2004). [PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues.](#) *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(15): 5339-5346.
2. Ramanathan, C., Khan, S. K., Kathale, N. D., Xu, H. and Liu, A. C. (2012). [Monitoring cell-autonomous circadian clock rhythms of gene expression using luciferase bioluminescence reporters.](#) *J Vis Exp*(67): e4234.