

siRNA 文库筛选细胞活力调控因子---CellTiter-Glo 法

siRNA Library Screening of Regulatory Factors of Cell Viability —CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay

陈敏^{1, #}, 骆大葵^{2, 3, #}, 韩帅¹, 李心翔^{2, 3}, 高大明^{1, *}

¹ 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心, 上海; ² 复旦大学附属肿瘤医院大肠外科, 上海; ³ 复旦大学上海医学院肿瘤学系

*通讯作者邮箱: dgao@sibcb.ac.cn

#共同第一作者

引用格式: 陈敏, 骆大葵, 韩帅, 李心翔, 高大明. (2021). siRNA 文库筛选细胞活力调控因子---CellTiter-Glo 法. *Bio-101* e1010825. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010825.

How to cite: Chen, M., Luo, D. K., Han, S., Li, X. X. and Gao, D. M. (2021). siRNA Library Screening of Regulatory Factors of Cell Viability---CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay. *Bio-101* e1010328. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010328. (in Chinese)

摘要: 细胞活力检测技术已广泛应用于分子生物学、遗传学、肿瘤生物学、免疫学、药理和药代动力学等研究领域。检测细胞存活与增殖的方法主要包括观察 DNA 合成含量和检测细胞代谢活性等。ATP 参与生物体内多种酶促反应, 是活细胞新陈代谢的常规指标, 其含量直接反应了细胞的数量及细胞状态, 与活细胞数成正相关。CellTiter-Glo (CTG) 发光法是目前常用的细胞活力检测手段, 通过定量 ATP 来确定存活细胞的数量, 被设计用于多孔板工作模式, 是细胞增殖和细胞毒性高通量筛选分析的理想选择。CTG 发光法灵敏度高, 信号持续时间长, 实验操作方便快捷, 只需较少的细胞量即可完成。CTG 发光法检测系统中需要的试剂和细胞培养中的常用培养基兼容, 如 RPMI1640、MEM、DMEM 和 Ham's F12 等, 也不受酚红和有机溶剂的影响, 误差小, 准确率高。我们以 HCT116 细胞为例, 通过 siRNA 文库转染及 CTG 化学发光检测, 建立了可用于鉴定细胞活力调控基因的高通量筛选体系。

关键词: 细胞增殖技术, ATP, CellTiter-Glo, HCT116, siRNA 文库, 高通量筛选

材料与试剂

1. DMEM 培养基 (元培生物, 货号: L110KJ, 4°C 保存)

2. 1 x PBS
3. OPTI-MEM (Gibco, 货号: 31985-070)
4. 0.25%胰酶 (Gibco, 货号: 25200-072)
5. 细胞计数板
6. 84 消毒液
7. 灭菌双蒸水
8. Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen, 货号: 13778-100, 4°C保存, 不可以冻存)
9. DharmaFECT 1 (GE, 货号: T-2001-03)
10. Negative control siRNA (NC, Dharmacon, 货号: D-001810-10-05)
TOX Transfection Control (Dharmacon, 货号: D-001500-01-05)
11. 5x siRNA Buffer (Dharmacon, 货号: B-002000-UB)
12. RNase-free water (Qiagen, 货号: 129117)
13. CellTiter-Glo (Promega, 货号: G756A, -20°C保存)
14. 96 孔板 (Corning, 货号: 3610)
15. 0.22 μm 滤器
16. 60 ml 注射器

仪器设备

1. 37 °C 5% CO₂ 细胞培养箱
2. 细胞计数仪
3. 自动分液器 (Thermo, 仪器型号: Multidrop Combi)
4. 水平离心机 (Eppendorf, 仪器型号: 5810R)
5. 多功能微孔板检测仪 (PerkinElmer, 仪器型号: Ensight)
6. 多标记微孔板检测仪 (PerkinElmer, 仪器型号: Envision)
7. 排枪, 移液枪, 移液器 (Eppendorf)

实验步骤

本课题工作通过前期探索性实验以及测序分析得到一些可能参与调控细胞增殖及存活的候选基因, 以 HCT116 细胞为研究对象, 我们对其中的一部分基因用 siRNA 文库转染的方法进行敲减, 一定时间以后通过检测 CTG 读值变化分析候选基因是否影响

细胞生长。由于候选基因数量不多 (<100 个), 且除了最后收集 CTG 数据外还希望获取整个实验过程中的细胞生长曲线, 因此本实验选用 96 孔板进行 siRNA 文库筛选实验。

1. 筛选体系建立及优化

为建立最优的筛选实验体系, 我们测试并优化了多种实验条件, 主要包括: 细胞接种密度、CTG 检测阈值、CTG 用量、siRNA 转染试剂及用量。

1.1 CTG 检测阈值摸索

我们将 HCT116 细胞消化后按照不同细胞接种数铺至 96 孔板, 连续培养 4 天, 每天用 Ensign 成像并分析细胞密度, 第 4 天实验结束后加入 CTG 使用 Envision 检测细胞活力。以第 4 天时细胞密度达到 80% 左右作为最理想条件, 不能长至接触抑制。具体的实验步骤如下:

- (1) 用 0.25% 胰酶消化 HCT116 细胞, 加一定量的 DMEM 培养基进行重悬, 吹打均匀后取 10 μ l 用细胞计数仪进行计数。(注: 细胞计数仪的精确范围一般在 5×10^5 - 1×10^6 个细胞/ml, 对于 HCT116 细胞, 一盘长满的 6 cm dish 用 5 ml 培养基重悬, 一盘长满的 10 cm dish 用 11 ml DMEM 培养基重悬比较合适)
- (2) 设置每孔 1000, 2500, 5000, 10000, 20000, 30000, 40000 和 50000 八个细胞接种梯度。根据细胞计数结果计算加入相应数量的细胞, 每个孔加 100 μ l DMEM 培养基, 每种细胞数条件设置 8 个复孔, 具体实验设计如下图 1。
- (3) 细胞铺好贴壁后 (<16h, 尽量在细胞贴壁但没有开始大量增殖的状态下开始检测) 在显微镜明场下观察细胞密度, 再用 Multidrop 往每个孔中加入提前制备好的 CTG 溶液, 其中 4 个复孔按照 1: 2 (CTG: 培养基) 每孔加 50 μ l CTG(培养基:CTG=2:1), 另 4 个复孔按 1:1 (CTG: 培养基) 每孔加 100 μ l CTG。
- (4) 水平离心机 800-1000 rpm 室温离心 1 min 后, 避光静置反应 10 min, Envision 仪器设置程序检测 CTG 值。
- (5) 分析数据, 确定最适细胞接种数及 CTG 用量。

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
		1000	2500	5000	10000	20000	30000	40000	50000			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		CTG-50 μ L/孔										
B		CTG-50 μ L/孔										
C		CTG-50 μ L/孔										
D		CTG-50 μ L/孔										
E		CTG-100 μ L/孔										
F		CTG-100 μ L/孔										
G		CTG-100 μ L/孔										
H		CTG-100 μ L/孔										

图 1. CTG 检测阈值实验设计

1.2 siRNA 转染条件优化

我们比较了 RNAiMax 和 DharmaFECT 1 两种转染试剂，通过设置合适的阳性对照和阴性对照，我们需要确定在 CTG 检测阈值内转染毒性较低且转染效率较高的转染试剂类型以及该转染试剂的用量和起始转染细胞数量。为了检测转染试剂的毒性，我们以 NC 作为实验组；检测转染试剂效率，我们以 TOX transfection control siRNA 作为阳性对照实验组。我们用反式转染（Reverse Transfection）方法进行转染，具体的实验步骤如下。

- (1) NC 和 TOX siRNA 的储存浓度为 20 μ M，用 1 x siRNA Buffer 按 1:100 稀释成 200 nM，每个孔加 10 μ l 稀释后的 siRNA。
- (2) 依据转染试剂说明书计算，两种转染试剂分别设三个剂量，分别是每孔 0.1 μ l，0.15 μ l 和 0.2 μ l，转染试剂溶解在 30 μ l OPTI- MEM 里。根据 CTG 预实验结果，在检测阈值内我们设置了每孔 1000，1500，2000 和 2500 四个初始转染细胞量。设置只加 OPTI-MEM 和 siRNA 稀释缓冲液作为比较细胞毒性的对照，NC 组与未加转染试剂的对照组比死亡率较低的则说明毒性较小，TOX 组与 NC 组比细胞死亡更多的则说明转染效率较高。每个条件各三个复孔即三块平行板，每块板的具体转染分布设计如下图：

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
			1000	1500	2000	2500	1000	1500	2000	2500		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A			buf+Opti				buf+Opti					
B		NC	RNAiMax-0.1ul				DharmaFECT 1-0.1ul					
C		TOX	RNAiMax-0.15ul				DharmaFECT 1-0.15ul					
D		NC	RNAiMax-0.2ul				DharmaFECT 1-0.2ul					
E		TOX	RNAiMax-0.2ul				DharmaFECT 1-0.2ul					
F		NC	buf+Opti				buf+Opti					
G		TOX	buf+Opti				buf+Opti					
H			buf+Opti				buf+Opti					

图 2. siRNA 转染试剂条件优化预实验设计

- (3) 由于预实验条件设置较多，因此我们用排枪手动加样。将上述准备好的 siRNA 按上图中设计加入相应的孔中，每孔 10 μ l，再把转染试剂也用 30 μ l OPTI-MEM 配好加入相应的 siRNA 中。
- (4) 用水平离心机 5810R 将混合好的 siRNA 和转染试剂 800 rpm 离心 1-2 min，室温静置 20 min（静置的过程中准备细胞悬液，静置时间可以延长至 1 h 都影响不大）。
- (5) 准备细胞悬液
 - a) 用 0.25%的胰酶 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱中消化一盘基本长满的 HCT116 细胞 2 min，加 DMEM 培养基中和反应，用离心机 5810R 1000 rpm 离心 1 min 弃去上清消除胰酶，再加 10 ml DMEM 培养基重悬，用细胞计数仪计数得到活细胞浓度。将细胞稀释成 1000/1500/2000/2500 个细胞/100 μ l DMEM 完全培养基的悬液。
 - b) 用自动化分液仪 Multidrop Combi 将上述细胞悬液加入图 1 设计的 siRNA 板相对应的列，100 μ l/孔。
 - c) 将加好转染试剂和细胞的 96 孔板放置于 CO₂ 培养箱中培养（加入细胞后尽量不用离心，让细胞自然沉降以提高转染效率）。
 - d) 转染后的四天每天于固定时间用 Ensight 拍照观察细胞数，第四天拍照结束后加 CTG 检测分析细胞存活情况，分析数据确定合适的转染条件。

2. siRNA 库筛选正式实验

我们根据前期测序结果挑选出若干候选基因，每个基因 4 条不同的 siRNA，每条 siRNA 设置 3 个复孔。具体的实验步骤如下。

- (1) 由自动化液体工作站制备好 siRNA 文库板，每个孔 10 μ l siRNA (200nM)。将板子全部摊开在超净台中室温放置 5-10 min 使 siRNA 溶解，注意不能把板子摞在一起，否则会由于板子上下温度不一样而造成液体蒸发至封板膜上。再用水平离心机 5810R 2000 rpm 离心 1 min 将 siRNA 甩至板底。
- (2) 用 1x siRNA Buffer 溶解稀释阴性对照 NC 和阳性对照 siTOX，稀释方法与预实验相同，使浓度与 96 孔板中目的基因的 siRNA 一致。每块板都必需设置 4-5 个复孔的 NC 和 siTOX。
- (3) 根据预实验优化的转染条件计算需要的转染试剂的量，每个孔用 30 μ l OPTI-

- MEM 稀释转染试剂。再用自动化分液仪 Multidrop Combi 将配好的转染试剂溶液加到每个 siRNA 孔中。用细头的分液盒加转染试剂（量程为 0.5-50 μl ），装好后默认匹配的是 384 孔板，需要更改设置调成 96 孔板，速度用低速（low）。
- (4) 转染试剂加完后用水平离心机 5810R 800 rpm 离心 1-2 min 将转染试剂和 siRNA 混匀，室温静置 20 min，此时可以准备细胞，时间可以延长至 1 h。
 - (5) 与预实验方法相同准备 HCT116 细胞悬液，用粗头的分液盒加细胞，每孔 100 μl ，速度设为低速，每孔细胞数根据预实验优化的条件加。
 - (6) 将加好转染试剂和细胞的 96 孔板放置于 5% CO_2 培养箱中培养（加入细胞后尽量不用离心，让细胞自然沉降以提高转染效率），转染完成细胞贴壁后第二天即可进行后续相关检测实验。
 - (7) 转染后的四天每天于固定时间用 Ensight 观察细胞数，第四天成像结束后加入 CTG 检测分析细胞存活情况，分析数据筛选出对生长有影响的候选基因。

结果与分析

1. CTG 检测阈值

依据上述实验步骤进行完实验后，对实验数据进行分析，结果如图 2 所示。在 96 孔板中铺 8 个不同量的 HCT116 细胞，贴壁后第二天在显微镜下观察显示 20000 个左右细胞的密度在 80% 左右，而 30000 以上的细胞就基本长满已经有接触抑制了。从 CTG 曲线可以看出，20000 个细胞也在 CTG 检测的线性范围内，且 100 μl 培养基中加 50 μl 和 100 μl CTG 效果基本一致，50 μl 稍微敏感一些。正式实验时我们打算培养 96 h，因此推算出起始细胞量在 1000-2500 之间比较合适，CTG 的检测加 50 μl 即可。

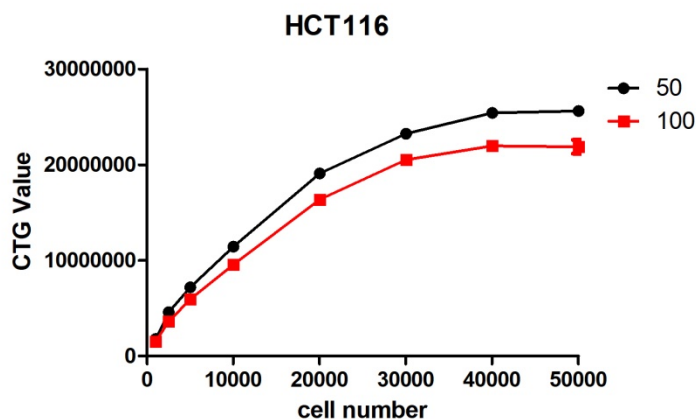


图 3. CTG 检测阈值结果

2. siRNA 转染条件优化

根据预实验设计，两种转染试剂 RNAiMax 和 DharmaFECT 1 各三种不同的用量 0.1, 0.15 和 0.2 $\mu\text{l}/\text{孔}$ ，在 CTG 检测阈值范围内起始细胞数设置 1000、1500、2000 和 2500 个/孔四个条件。

siRNA 转染 HCT116 后培养 96 h 测出的 CTG 曲线如下图 3 到图 6。图 3 和图 4 是将转染 NC 对照组和只加 1 x siRNA 稀释缓冲液的对照组在不同实验条件下的 CTG 值进行比较分析两种转染试剂对 HCT116 细胞的毒性，CTG 曲线结果表明转染试剂的用量越多，细胞毒性越高。图 5 和图 6 是将转染 siTOX 实验组和只加 1x siRNA 稀释缓冲液的对照组在不同实验条件下的 CTG 值进行比较分析两种转染试剂对 HCT116 细胞的转染效率，图中结果表明转染试剂的用量越多，转染效率也越高。综合转染毒性和转染效率，以及 CTG 的线性检测阈值，我们最终确定 HCT116 细胞 96 孔板每孔初始细胞量为 1500 个，0.15 $\mu\text{l}/\text{孔}$ RNAiMax 转染试剂，为 siRNA 转染最优条件。

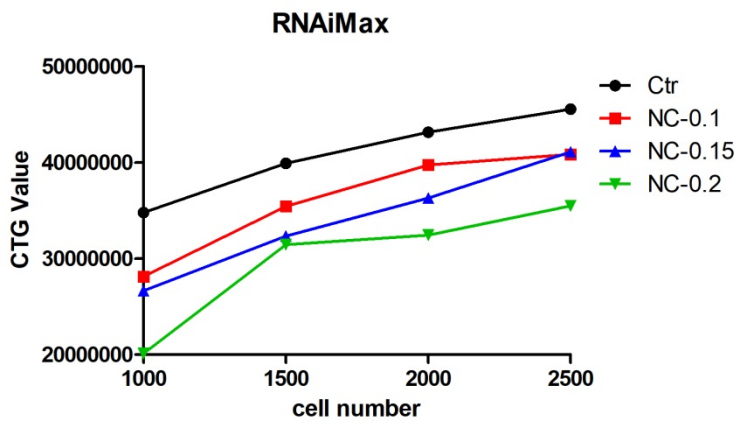


图 4. 转染试剂 RNAiMax 细胞毒性分析

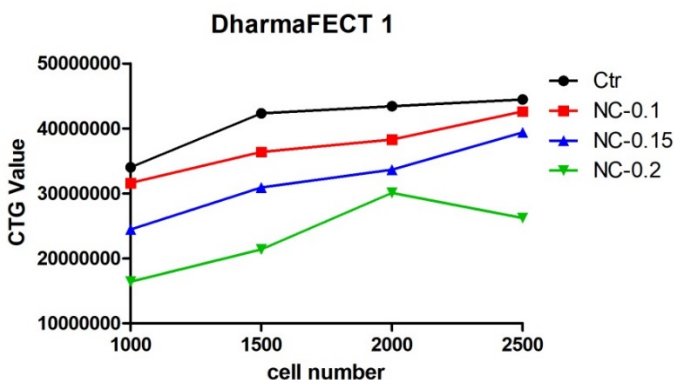


图 5. 转染试剂 DharmaFECT 1 细胞毒性分析

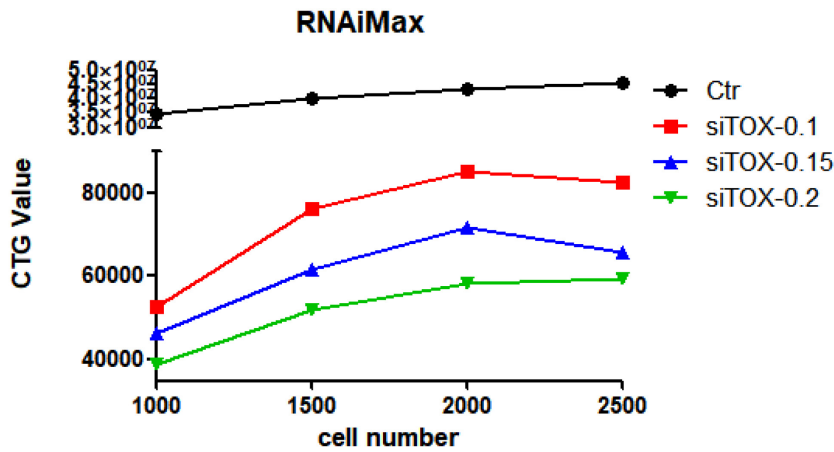


图 6. 转染试剂 RNAiMax 转染效率分析

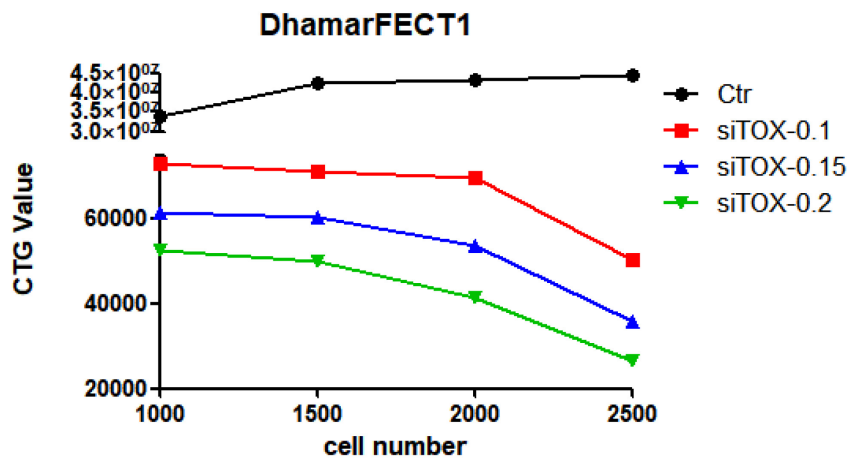


图 7. 转染试剂 DharmaFECT 1 转染效率分析

3. 筛选影响细胞生长的基因

总结分析实验数据，计算每块板的阴性对照 NC 的 CTG 数值平均值，再将相应板的每个孔 CTG 数值除以 NC 组的平均值得到一组新的数值，TOX 的数值越小说明转染实验做的越好。分析归类出与 NC 有差异的基因，大于 1 的说明敲低该基因后促进细胞生长，小于 1 的说明敲低该基因后抑制细胞生长。筛选出候选基因后，后续再用其他实验辅助验证。

溶液配方

1. 1 x PBS

用双蒸水稀释 10 x PBS 获得

2. 10% 84 消毒液

用双蒸水稀释 84 原液获得，再用 0.22 μm 滤器过滤制备

3. DMEM 培养基

500 ml 培养基加 10% FBS 和 1% 氨苄青霉素/链霉素溶液

4. 灭菌双蒸水

将双蒸水 121 °C 高压灭菌 20 min 获得

5. siNC/siTOX 溶液

用 1 x siRNA Buffer 将 siRNA 储存液稀释 100 倍，每个孔加 10 μ l

6. CTG 试剂制备

提前溶解 CTG 缓冲液并平衡至室温，将冻干状态的 CTG 底物也置于室温，用 CTG 缓冲液溶解冻干状态的酶/底物混合物，温和的震荡混匀即配制成 CTG 试剂

注意事项

1. 室温溶解 siRNA 时不要将孔板摺在一起，否则会由于板子上下温度不一致而导致溶液挥发至封板膜上，不容易被离心至孔内。
2. 自动化分液仪 Multidrop Combi 加样时要根据体积选择合适的分液盒，速度设置要合适。由于分液盒长期使用是磨损型耗材，加样前要用移液器确认实际体积与目的体积是否有偏差。另外由于吹打混匀以及管子里需要充盈液体，因此需要比实际需要加样的总体积多配一些溶液，细分液盒至少需要 1 ml，粗分液盒至少需要 7 ml。
3. 正式筛选实验时，每块 siRNA 板子都需要设置阴性和阳性对照，数据处理时都是跟同一块板的阴性对照 NC 比较。
4. Envision 的检测对体积有要求，液体不可以太多否则容易溢出污染 aperture（信号检测相机的光圈）。运用 96 孔板进行筛选实验，液体体积在 150-200 μ l 均可。
5. 由于 ATP 易水解，加入 CTG 试剂的整个检测实验操作过程中应该特别注意避光。

致谢

本工作的顺利开展得益于国家自然科学基金面上项目（资助号：81972260, 81772599）的经费支持。实验技术方面得到了中国科学院分子细胞科学卓越创新中心化学生物学技术平台的韩帅老师和慈云青老师的悉心指导。

参考文献

1. Crouch, S. P., Kozlowski, R., Slater, K. J. and Fletcher, J. (1993). [The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity.](#) *J Immunol*

Methods 160(1): 81-88.

2. Kangas, L., Grönroos, M. and Nieminen, A. L. (1984). [Bioluminescence of cellular ATP: a new method for evaluating cytotoxic agents *in vitro*](#). *Med Biol* 62(6): 338-343.
3. Cree, I. A., Pazzagli, M., Mini, E., Mazzei, T., Hunter, E. M., Sutherland, L. A., Pinzani, P., Gerli, A. and Andreotti, P. E. (1995). [Methotrexate chemosensitivity by ATP luminescence in human leukemia cell lines and in breast cancer primary cultures: comparison of the TCA-100 assay with a clonogenic assay](#). *Anticancer Drugs* 6(3): 398-404.
4. 白志军, 狄飏. (2015). [Celltiter-Glo ATP 荧光活性检测在登革病毒 1 型中和试验中的应用](#). 《江苏预防医学》 2015 年 01 期