基于高内涵成像技术的细胞内 PAR 检测方法

Investigation of Cellular PAR Using High-Content Imaging System

李杰, 孔娟, 杨光, 许红涛*, 马培翔*

免疫化学研究所, 上海科技大学, 上海

*通讯作者邮箱: xuht@shanghaitech.edu.cn; mapx@shanghaitech.edu.cn

引用格式: 李杰, 孔娟, 杨光, 许红涛, 马培翔. (2021). 基于高内涵成像技术的细胞内 PAR 检测方法. // 高内涵成像及分析实验手册. *Bio-101* e1010829. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010829.

How to cite: Li, J., Kong, J., Yang, G., Xu, H. T. and Ma, P. X. (2021). Investigation of Cellular PAR Using High-Content Imaging System. // High-Content Imaging and Analysis Protocol eBook. *Bio-101* e1010829. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010829. (in Chinese)

摘要: DNA 编码化合物库 (DEL) 是一种含有百万甚至上亿个含有特异性 DNA 标签的巨型化合物库, 利用靶标蛋白与 DNA 编码的小分子之间的亲和力进行筛选, 最后通过 PCR 扩增和深度测序技术实现筛选信息的高通量解码 (Brenner and Lerner, 1992; Ma *et al.*, 2019)。我们利用光交联技术和点击化学, 成功构建了首个基于天然产物的 DNA 编码化合物库 (nDEL)。针对靶标蛋白 PARP1 (聚腺苷二磷酸核糖聚合酶-1) 我们筛选得到了一个小分子抑制剂-木犀草素 (Luteolin)。细胞中的 DNA 一旦发生单链断裂损伤, PARP1 蛋白 DNA 结合结构域可以迅速地结合到损伤位点, C 端的催化结构域催化 NAD⁺ 分解为 ADP 核糖和烟酰胺, 然后以 ADP 核糖为底物, 在自身及其他蛋白的谷氨酸、天冬氨酸等残基上进行聚腺苷二磷酸核糖 (Poly [ADP-ribose], PAR) 长链修饰, 招募其他蛋白参与到 DNA 损伤修复等重要功能中。为了进一步探究木犀草素对于细胞内 PARP1 的活性抑制能力, 我们使用高内涵成像技术的方法检测木犀草素处理后细胞内聚腺苷二磷酸核糖 PAR 生成的情况 (Yuan *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2020)。

关键词: PARP1, PAR, 高内涵成像, PARP1 抑制剂, DNA 损伤

材料与试剂

1. 96 孔培养板 (Greiner Bio-One, catalog number: 655090)
2. Fetal Bovine Serum 胎牛血清 (Gibco, catalog number: 10100147)

3. 一抗 pADPr (10H) (Santa Cruz, catalog number: sc-56198)
4. 二抗 Goat anti-Mouse IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor Plus 488 (Invitrogene, catalog number: A32723)
5. DAPI (碧云天, catalog number: C1002)
6. DMEM 培养基 (Gibco, catalog number: 11995065)
7. PBS (上海源培生物科技有限公司, catalog number: B310KJ)
8. 木犀草素 (美仑生物, catalog number: MB2172)
9. olaparib (美仑生物, catalog number: MB1700)

仪器设备

1. 哺乳动物细胞二氧化碳恒温培养箱 (Thermo Fisher Scientific, HERACELL 150i)
2. ELISA 平板洗板机 (Biotek)
3. 高内涵成像系统 (Perkin Elmer)

实验步骤

我们以来源于胰腺癌的 BRCA 缺陷型细胞 Capan-1 为例进行研究。强氧化剂 (过氧化氢) 处理细胞后, 会引起 DNA 损伤, 产生断裂。处理后的细胞依次与抗 PAR 抗体、荧光二抗孵育, 检测不同浓度小分子抑制剂作用下, Capan-1 细胞平均荧光强度的变化情况。本次实验使用阳性小分子奥拉帕尼 (Olaparib) 与待检测的小分子木犀草素 (Luteolin) 进行检测。具体实验步骤如下:

一、实验操作部分

1. 第 1 天

将处于对数生长期的 Capan-1 细胞以 90 μ l, 20,000 个/孔接种于 96 孔培养板, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 静置培养过夜。

2. 第 2 天

2.1 每孔加入 10 μ l 不同浓度的小分子药物, 每个浓度至少设三个重复。放置于培养箱中继续培养 4 h (使用前先将阳性小分子 Olaparib 与待检测的小分子木犀草素溶解于 DMSO, 配置成浓度为 10 mM 的母液; 根据小分子浓度梯度, 加

- 样前用含 10% DMSO 的 PBS 溶液配置 10 倍工作浓度的小分子溶液，依次加到对应的孔中，每个孔 DMSO 终浓度为 1%)。
- 2.2 每孔加入 2 μ l 过氧化氢 (终浓度为 200 μ M)，设置加与不加过氧化氢的对照；细胞在培养箱中继续培养 5 min。
 - 2.3 弃去上清，每孔加入 100 μ l 预冷甲醇，4 $^{\circ}$ C 固定 20 min。孵育结束后 PBS 洗 6 遍，每孔 300 μ l。
 - 2.4 加入一抗 pADPr (10H) (稀释比例为 1:200)，用含 1 mg/ml BSA 及 0.05% Tween-20 的 PBS (B-PBST) 稀释，室温震荡孵育 1 h。之后 B-PBST 清洗 3 遍。
 - 2.5 加入 Alexa Fluro 488 耦连的抗鼠 IgG 二抗，稀释比例为 1:200，室温震荡孵育 20 min。
 - 2.6 按照稀释比列为 1:2,000 加入 1 mg/ml 的核染料 DAPI，室温下避光静止 15 min。B-PBST 洗 6 遍。
 - 2.7 孵育结束后，加入 100 μ l B-PBST，使用高内涵成像系统 (Operetta High-Content Imaging System) 进行检测。抑制率% = $(I_{\text{max}} - I_{\text{treated}}) / (I_{\text{max}} - I_{\text{blank}}) \times 100\%$ 。
- I 为高内涵成像系统给出的平均荧光强度 (Luminescence)。 I_{blank} 为未加入过氧化氢处理，加入 1% DMSO 处理的细胞的平均荧光强度。 I_{max} 为加入过氧化氢处理，加入 1% DMSO 处理的细胞的平均荧光强度。 I_{treated} 为实验组平均荧光强度。统计每个孔的平均荧光强度，利用 Graphpad 软件统计绘制，计算对应的 IC_{50} 值 (见图 2)。

二、高内涵成像系统操作部分

1. 将上述实验板用擦镜纸分别将孔板底部擦拭干净后放入 PE 高内涵成像仪 Operetta 中进行成像。
2. 使用 10x 长工作距离物镜，打开 Harmony 软件，添加 A488 绿色 (Ex460-490/Em500-550)，DAPI 蓝色 (Ex360-400/Em410-480) 成像通道，选择空白细胞孔 (未加过氧化氢处理，未加小分子)、阳性对照孔 (加过氧化氢处理，未加小

分子) 进行预扫后确定成像条件：曝光时间，聚焦高度，激发光强度。确定条件后每孔选择 6 视野进行拍摄。

3. 成像后利用 Columbus 软件进行分析计算。计算流程及说明见表 1 及图 1。

图 1. Columbus 软件高内涵分析界面

表 1. Columbus 软件高内涵分析流程及说明

Image Analysis step in Harmony software	
Input image 输入 A488 绿色、DAPI 蓝色通道成像图。
Find nuclear 在蓝色通道下找核，此模块可通过调节不同的找核方法及核面积、核与核之间的分离度、核与周边的对比度等参数进行筛选和调节。

<div>Select cell region</div> <div>在上步骤中的核群体内，选择需要分析的细胞区域，可通过外扩内缩的功能对需要分析的区域大小进行调节。</div>
<div>Calculate Intensity Properties</div> <div>在绿色通道下，命名为核的群体内，上步骤选中的细胞区域内，计算细胞内平均荧光强度。</div>
<div>Define Results</div> <div>结果的输出</div> <div>输出参数，每个孔的平均荧光强度，每个孔细胞数。</div>	<table><tr><th>Field</th><th>Nuclei - Number of Objects</th><th>Nuclei - Intensity Nucleus Region Green Mean - Mean per Well</th></tr><tr><td>1</td><td>323</td><td>99.2934566395</td></tr></table>	Field	Nuclei - Number of Objects	Nuclei - Intensity Nucleus Region Green Mean - Mean per Well	1	323	99.2934566395
Field	Nuclei - Number of Objects	Nuclei - Intensity Nucleus Region Green Mean - Mean per Well					
1	323	99.2934566395					

结果与分析

如图 2，高内涵检测结果：蓝色为使用 DAPI 染色的细胞核，绿色为使用荧光抗体孵育染色后的 PAR 染色结果。olaparib 与木犀草素抑制曲线，纵坐标为根据归一化之后每个孔样品平均 FITC 荧光强度计算的抑制率。细胞内 PAR 的形成与木犀草素与阳性对照奥拉帕尼都具有一定的剂量依赖效果。两种小分子对细胞内 PAR 形成抑制的 IC₅₀ 分别约为 25.4 μM 与 2.5 nM。

图 2. 高内涵成像结果与半数抑制浓度 IC_{50} 计算

致谢

感谢免疫化学研究所高通量平台对于高内涵成像的技术支持。该研究受到了国家自然科学基金 (21977070, 31500632, U19A2011) 资助。本实验已发表于文章 Li *et al.* (2020)。该实验方案也参考了 Yuan *et al.* (2017) 文章。

参考文献

- Brenner, S. and Lerner, R. A. (1992). [Encoded combinatorial chemistry](#). *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(12): 5381-5383.
- Li, J., Li, Y., Lu, F., Liu, L., Ji, Q., Song, K., Yin, Q., Lerner, R. A., Yang, G., Xu, H. and Ma, P. (2020). [A DNA-encoded library for the identification of natural product binders that modulate poly \(ADP-ribose\) polymerase 1, a validated anti-cancer target](#). *Biochem Bioph Res Co* 533(2): 241-248.
- Ma, P., Xu, H., Li, J., Lu, F., Ma, F., Wang, S., Xiong, H., Wang, W., Buratto, D., Zonta, F., Wang, N., Liu, K., Hua, T., Liu, Z. J., Yang, G. and Lerner, R. A. (2019). [Functionality - Independent DNA Encoding of Complex Natural Products](#). *Angew Chem Int Edit* 131(27): 9355-9362.

4. Yuan, B., Ye, N., Song, S. S., Wang, Y. T., Song, Z., Chen, H. D., Chen, C. H., Huan, X. J., Wang, Y. Q., Su, Y., Shen, Y. Y., Sun, Y. M., Yang, X. Y., Chen, Y., Guo, S. Y., Gan, Y., Gao, Z. W., Chen, X. Y., Ding, J., He, J. X., Zhang, A. and Miao, Z. H. (2017). Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibition and anticancer activity of simmiparib, a new inhibitor undergoing clinical trials. *Cancer Lett* 386: 47-56.