利用高内涵筛选系统进行线粒体膜电位检测 (TMRM 染色)

Mitochondrial Transmembrane Potential ($\Delta\Psi_m$) Detection Using High Content Screening System

麻宁宁, 陈静, 任进*

药物安全评价研究中心, 中国科学院上海药物研究所, 上海

*通讯作者邮箱: jren@cdser.simm.ac.cn

引用格式: 麻宁宁, 陈静, 任进. (2021). 利用高内涵筛选系统进行线粒体膜电位检测 (TMRM 染色). // 高内涵成像及分析实验手册. *Bio-101* e1010834. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010834.

How to cite: Ma, N. N., Chen, J. and Ren, J. (2021). Mitochondrial Transmembrane Potential ($\Delta\Psi_m$) Detection Using High Content Screening System. // High Content Imaging and Analysis eBook. *Bio-101* e1010834. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010834. (in Chinese)

摘要: 线粒体膜电位的高低可以反应线粒体功能的完整性, 是反应线粒体功能状态的重要指标之一。四甲基罗丹明甲酯 (tetramethylrhodamine methyl ester; TMRM) 是一种细胞渗透性阳离子亲脂性红色荧光染料, 其进入细胞后, 被细胞内酯酶切离, 产生四甲基罗丹明。四甲基罗丹明进入线粒体后, 被线粒体俘获, 分布和结合在线粒体内膜上, 呈现强烈荧光。线粒体膜电位的高低变化决定了 TMRM 的分布浓度。电位高, TMRM 在线粒体的浓度高, 显示为强力红色或桔红色; 反之, TMRM 弥散在胞浆内, 荧光减弱表明线粒体膜电位受到损害。(Creed and McKenzie, 2019)。棕榈酸 (palmitate, PA) 作为一种动植物体内常见的高级饱和脂肪酸, 已被发现可以通过其脂毒性诱导细胞凋亡。PA 造成的脂毒性会引起细胞线粒体膜的去极化, 膜电位降低 (Jun *et al.*, 2011)。本实验在细胞内转染 miRNA mimics 后, 加入可导致细胞线粒体膜电位损伤的 PA, 然后利用 TMRM 染色检测红色荧光强度以指征线粒体膜电位的高低, 使用 Operetta CLSTM (PerkinElmer, USA) 对细胞中的荧光进行信号采集和定量, 通过基于图像的高内涵筛选 (high content screening, HCS) 分析从而筛选可以缓解或加重 PA 导致的线粒体膜电位损伤的 miRNAs (Massey, 2015)。

关键词: 线粒体膜电位, TMRM, 棕榈酸 (PA), Operetta CLSTM

材料与试剂

1. 96 Well Black Assay Plate, Clear Bottom with Lid, 3603 (Corning Costar, Cambridge, MA, catalog number: 04119005)
2. HepG2 细胞 (ATCC, USA)
3. Opti-MEM (Gibco, catalog number: 11058021)
4. Lipofectamine® RNAiMAX (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, catalog number: 13778075)
5. miRNA mimics (上海吉玛制药技术有限公司)
6. MEM/EBSS 培养基 (Hyclone, Logan, UT, USA, catalog number: AF29549370)
7. Penicillin/Streptomycin (Gibco, Germany, catalog number: 15240-062)
8. 四甲基罗丹明甲酯 TMRM (Sigma, catalog number: T5428)
9. CCCP (Sigma, catalog number: C2759)
10. Hoechst 33342 (上海翌圣生物科技有限公司, Yeason, catalog number: 40731ES10)
11. 20x PBS (上海生工生物工程有限公司, catalog number: B548117)
12. DMSO (Sigma, catalog number: BCBZ1685)
13. 棕榈酸钠 Sodium palmitate (Sigma, catalog number: P9767)
14. BSA, Fatty Acid Free 牛血清白蛋白 (上海翌圣生物科技有限公司, Yeason, catalog number: 9048-46-8)
15. 200 μ M TMRM (见溶液配方)
16. 1 mM CCCP (见溶液配方)
17. 10 mg/ml Hoechst 33342 储存液 (见溶液配方)
18. MEM/EBSS 完全培养基 (见溶液配方)
19. 1x PBS (见溶液配方)
20. 10 mM PA (见溶液配方)
21. 9% BSA (见溶液配方)

仪器设备

1. PerkinElmer Operetta CLSTM (PerkinElmer, USA)

2. 移液器 (Eppendorf)

实验步骤

1. 转染与铺细胞

- 1) 对于 96 孔板的每一个转染孔，将 0.25 μ l 的 Lipofectamine RNAiMAX 转染试剂加入 25 μ l Opti-MEM 减血清培养基中进行稀释配成转染试剂混合液，轻轻吹打混匀，室温放置 5 min。
- 2) 在上述转染试剂混合液中加入合成的 miRNA mimics 使其终浓度为 30 nM，轻轻吹打混匀，室温温育 20 min，加入 96 孔板中。
- 3) 从培养箱中取出 HepG2 细胞，吸去培养液，用无菌的 PBS 洗涤细胞一次，以去除残余的血清，加入含 EDTA 的胰酶并放入细胞培养箱中消化 3 min。
- 4) 用含有 10% FBS 的完全 MEM/EBSS 培养基终止消化，1000 rpm，离心 3 min。
- 5) 弃去上清，细胞沉淀用 2 ml 完全 MEM/EBSS 培养基重悬并进行细胞计数。
- 6) 将细胞密度稀释为 1×10^5 个/ml 并铺在 96 孔板中 (100 μ l/孔)，同时预留 1 列细胞进行 CCCP 处理，将细胞放于 37 °C 培养箱中培养。

2. 药物处理

- 1) 细胞贴壁培养 48 h 后，用完全 MEM/EBSS 培养基稀释 10 mM PA 母液至终浓度为 0.2 mM，同时稀释 9% BSA 母液作为对照。
- 2) 将 96 孔板取出，吸去培养基，分别加入配制好的含有 PA 及 BSA 的培养基 (各 3 复孔)，继续放回培养箱中培养。
- 3) 药物处理 24 h 后，在 MEM/EBSS 完全培养基中 1:1000 稀释 CCCP (终浓度为 10 μ M)，加入预留的细胞孔中 (DMSO 作为对照)，37 °C 孵育 30 min。

3. TMRM 染色

- 1) 30min 后，取出 96 孔板，吸去培养基，加入含有 TMRM (终浓度为 100 nM)，Hoechst (终浓度 2 μ g/ml) 的 MEM/EBSS 完全培养基，37 °C 孵育 30 min。
- 2) 30 min 后，取出 96 孔板，吸去含有染料培养基，避光条件下用 PBS 洗 3 次。

4. 高内涵成像

- 1) 依次打开 Operetta 主机，Harmony4.9 软件，将 96 孔板放入仪器中，设置图像采集条件 (孔板型号及物镜倍镜)，添加所需的荧光通道 (TMRM: 549 nm 激

发波长; 573 nm 发射波长; Hoechst 33342: 360 nm 激发波长; 460 nm 发射波长)。

- 2) 调整 time (曝光时间), power (光源强度) 及 height (聚焦高度)。
- 3) 选择要拍摄的孔和视野, 点击 Run Experiment 进行图像采集。
- 4) 拍摄完成后, 点击 Image Analysis 进行图像分析, 依次点击 Find Nuclei, Find cytoplasm, 然后点击 calculate intensity properties 选择荧光强度计算的范围 (细胞浆), 最后通过 select population 功能, 筛选阳性细胞并输出结果。
- 5) 点击 Evaluation 进行多孔分析。
- 6) 最后, 点击 Data management 输出数据。

结果与分析

首先在 HepG2 细胞给予不同浓度的 PA (0.05 mM, 0.1 mM, 0.2 mM, 0.5 mM) 处理 24 h, 摸索导致膜电位损伤的合适浓度。结果表明, CCCP 处理 30 min 可明显降低 TMRM 荧光强度, 导致线粒体膜电位损伤 (图 1 A)。不同浓度 PA 也可导致膜电位降低, 但 0.5 mM PA 处理条件下, 细胞死亡较多, 造成的线粒体损伤较严重, miRNA mimics 可能无法有效逆转该损伤, 故选用 0.2 mM PA 作为诱导膜电位损伤的条件进行高内涵筛选 (图 1 B)。

图 1. PerkinElmer Operetta CLSTM 采集荧光信号 A. 阳性对照 CCCP 处理 HepG2 细胞，TMRM 荧光图及荧光强度定量；B. 不同浓度 PA 处理 HepG2 细胞，TMRM 荧光图及荧光强度定量。

失败经验

1. 由于将 Hoechst 与 TMRM 共孵育 30 min，所以 Hoechst 的浓度不能过高，否则会导致细胞核过曝，影响统计结果。
2. 用 PBS 洗去剩余染料时，应该动作尽量轻，否则会导致细胞被吹起，影响实验结果。
3. TMRM 及 Hoechst 染色时，可能会存在杂质及死细胞等的异常染色，因此在分析荧光强度时可以在"filter by property"方法下通过设定 intensity 范围来筛选阳性细胞，排除阴性结果。

溶液配方

1. 200 μ M TMRM: 用 DMSO 溶解配成 200 μ M 母液，-20 $^{\circ}$ C 避光保存。
2. 10 mM CCCP: 用 DMSO 溶解配成 10 mM 母液，-20 $^{\circ}$ C 避光保存，配置成母液后尽量在一个月内使用。

3. Hoechst 33342 储存液:用无菌超纯水溶解配制 10 mg/ml Hoechst 33342 的储存液, -20 °C 避光保存。
4. MEM/EBSS 完全培养基:
MEM/EBSS 培养基 450 ml
FBS 50 ml
Penicillin/Streptomycin 5 ml
5. 1x PBS:
取 50 ml 20x PBS 加入 ddH₂O 并定容至 1 L, 高压蒸汽灭菌, 冷却后室温保存。
6. 10 mM PA:
称取 27.841 mg 棕榈酸钠 (Sodium palmitate), 加入 1 ml PBS 中, 70 °C 加热溶解成 100 mM 的母液; 称取 2 g 不含脂肪酸的 BSA 溶解于 20 ml PBS 中, 55 °C 加热; 将 1 ml PA 母液加入 9 ml BSA 中, 55 °C 加热至溶液澄清即得到 10 mM PA, 冻存于 -20 °C, 使用时用培养基稀释至所需浓度。

致谢

感谢中国科学院上海药物研究所李佳老师课题组对该实验方法的 PerkinElmer Operetta CLSTM 仪器设备的支持。基金项目 (Foundation): 国家科技部"重大新药创制"科技重大专项 (No 2018ZX09101001-003-007)。

参考文献

1. Creed, S. and McKenzie, M. (2019). [Measurement of mitochondrial membrane potential with the fluorescent dye tetramethylrhodamine methyl ester \(TMRM\)](#). In: Haznadar M. (Ed.). In: *Methods in molecular biology*. Humana Press, New York, NY. ISBN: 9781493990276.
2. Jun, D. W., Cho, W. K., Jun, J. H., Kwon, H. J., Jang, K. S., Kim, H. J., Jeon, H. J., Lee, K. N., Lee, H. L., Lee, O. Y., Yoon, B. C., Choi, H. S., Hahm, J. S. and Lee, M. H. (2011). [Prevention of free fatty acid-induced hepatic lipotoxicity by carnitine via reversal of mitochondrial dysfunction](#). *Liver Int* 31(9): 1315-1324.
3. Massey, A. J. (2015). [Multiparametric cell cycle analysis using the operetta high-content imager and harmony software with PhenoLOGIC](#). *PLoS One* 10(7): e0134306.