基于反应元件的调控因子筛选——双荧光报告基因法

Dual Fluorescence Reporter-based siRNA Screening of Transcription Regulators of Response Elements

郝子健, 李正威, 杨凡, 胡荣贵*

中国科学院分子细胞科学卓越创新中心, 分子生物学国家重点实验室, 生物化学与细胞生物学研究所, 中国科学院大学, 上海

*通讯作者邮箱: coryhu@sibcb.ac.cn

引用格式: 郝子健, 李正威, 杨凡, 胡荣贵. (2021). 基于反应元件的调控因子筛选——双荧光报告基因法. // 高通量筛选实验手册. *Bio-101* e1010839. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010839.

How to cite: Haoi, Z. J., Li, Z. W., Yang, F., Hu, R. G. (2021). Dual Fluorescence Reporter-based siRNA Screening of Transcription Regulators of Response Elements. // High-throughput Screening Protocol eBook. *Bio-101* e1010839. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010839. (in Chinese)

摘要: 生命活动的转录调控, 有时依赖于信息分子与受体结合后, 形成的复合物结合到受体识别的特定 DNA 序列 (反应元件) 上, 启动下游基因的转录。而转录强弱可以通过启动子下游报告基因的表达水平来体现, 比如荧光素酶报告基因(Sun *et al.*, 2017)或绿色荧光蛋白(GFP)(Lingemann *et al.*, 2019)等。但荧光素酶报告基因筛选系统在检测时需要额外加入荧光素作为底物, 增加了筛选成本; 而单独使用一种 GFP 报告基因则不易排除由于细胞状态受损或者非特异的转录过程受到抑制而造成的假阳性结果。为了筛选可能影响某条信号通路转录的调节因子, 我们构建了可以表达两种荧光蛋白的稳

转细胞系, GFP 基因在该信号通路特异的反应元件下游, 作为报告基因反映该信号通路被激活或抑制的状态; mCherry 基因则可以稳定表达, 作为内参排除由于非特异性调节引起的假阳性结果。在细胞系中瞬时转染 siRNA 文库敲低基因后, 检测 GFP 与mCherry 的荧光强度, 通过二者的比值筛选目的基因, 这样既降低了成本, 又提高了筛选结果的可靠性。

关键词: 转录因子, 反应元件, 荧光蛋白, siRNA 筛选

材料与试剂

1. ON-TARGETplus Non-Targeting Pool (siNC-OTP, Dharmacon, catalog number: D-001810-10-05)
2. TOX Transfection Control (si-TOX, Dharmacon, catalog number: D-001500-01-05)
3. si-PC-1 (Genepharma, 20 μ M)
4. si-PC-2 (Genepharma, 20 μ M)
5. Opti-MEM (Gibco, catalog number: 31985088)
6. VPSFM (Gibco, catalog number: 11681020)
7. Lipofectamine RNAiMAX (Gibco, catalog number: 13778150)
8. Puromycin (Invivogen, ant-pr-5b)
9. Hygromycin (Merck, catalog number: 400052)
10. PEI (Polysciences, catalog number: 23966)
11. 小分子刺激物 STI (使用 DMSO 为溶剂配成 100 mM 储存液)
12. DMSO (Sigma-Aldrich, catalog number: D4540)
13. DMEM (Corning, catalog number: 10013035)
14. FBS (Yeaston, catalog number: 40130ES76)
15. 胰酶 (Gibco, catalog number: 25200072)
16. DPBS (源培, catalog number: K210704)
17. 5 $\times$ siRNA buffer (Thermo Fisher, catalog number: B-002000-UB)
18. 16% PFA (Alfa Aesar, catalog number: 43368)
19. Hoechst 33342 (Invitrogen, catalog number: H3570)
20. 0.45 μ m 滤器 (Sartorius Stedim, catalog number: 16533-K)
21. 一次性无菌注射器 (上海康德莱企业发展集团股份有限公司, 10 mL)
22. 0.5-10 μ L 排枪 (BRAND, catalog number: SP0025)
23. 透明圆底 96 孔板 (Corning, catalog number: 3879)
24. 黑边底透 384 孔板 (Corning, catalog number: 3764)
25. 200 目尼龙网

仪器设备

1. Operetta 高通量细胞成像分析系统 (Perkin Elmer, Operetta)
2. Multidrop Combi 自动分液器 (Thermo Fisher, Multidrop Combi)
3. 通用型离心机 (HermLe, model: Z 300K)
4. 高速冷冻离心机 (Eppendorf, model: 5810R)
5. 干细胞多色流式检测仪 (Beckman, CytoFlex LX)
6. 荧光倒置显微镜 (Olympus, model: IX51)
7. 倒置相差显微镜 (Olympus, model: CKX31SF)
8. 二氧化碳细胞培养箱 (Thermo Fisher, model: 3111)
9. 全自动细胞分析计数仪 (Beckman Coulter, Z2)
10. 生物安全柜 (ESCO, model: FHC-1200A)
11. 离心式自动洗板机 (BlueCatBio, BlueWasher)

实验步骤

注：细胞中存在的一些信息分子（比如雌激素，cAMP，甲状腺激素等），当它们和对应的受体结合时，其受体可以与位于启动子上游的、一段特异的保守的 DNA 序列进行结合，启动下游基因的转录，这段序列被称作反应元件(response element, RE)。比如，雌激素(estrogen)受体结合的反应元件简称为 ERE，甲状腺激素(thyroid hormone)受体结合的反应元件简称为 TRE 等。

由于这份 protocol 涉及到的筛选结果尚未发表，因此具体筛选的信号通路以及筛选时使用的刺激该信号通路的小分子都没有给出具体的信息，我用“RE”来指代筛选涉及通路的反应元件序列，而用“STI”来指代可以激活这条信号通路的信息分子。

一、构建稳转细胞系

1. 将所需要的片段 RE、EGFP、SV40 polyA、SV40 promoter、Hygromycin Resistance(Hygro^r)等通过 PCR 扩增，酶切，连接接入 pGL4 载体中，得到 pGL4-RE-EGFP-SV40 polyA-SV40 promoter-Hygro^r-SV40 polyA(以后简称为 REPHP)质粒。

注①:载体可以是 pGL4 或 pGL3, 这是双荧光素酶报告基因系统最常用的载体, 也可用于 GFP 报告基因。与普通的真核生物表达载体(如 pcDNA3.0)相比, 它们减少了很多非特异的转录因子结合位点, 可以降低检测背景, 提高信噪比。

2. 准备一盘 10 cm 培养皿的 SH-SY5Y 细胞, 在汇合度达到 80%左右时进行转染, 如图 1A。在两个 15 mL 管中分别加入 1.5 mL Opti-MEM 培养基, 向其中一管加入 15 µg 的 REPHP 质粒, 向另一管加入 45 µL PEI 转染试剂, 静置 5 min 后, 将两管液体混合后使用移液器吹打混匀, 室温静置 20 min。吸除培养皿中的培养基, 加入 5 mL Opti-MEM 培养基后, 再将静置后的质粒-PEI 混合液转移到培养皿中, 置于 37 °C 二氧化碳细胞培养箱中培养, 5 小时后吸除 Opti-MEM 培养基, 加入 10 mL 含有 10%FBS 的 DMEM 培养基继续培养。转染 24 小时后, 将长满的细胞用胰酶消化, 按 1 比 3 传代到一盘新的 10 cm 培养皿中, 此时培养基为含有 100 µg/ mL Hygromycin 的完全培养基 (DMEM + 10% FBS)。

注②: Hygromycin 的使用浓度需要提前摸索, 不同的细胞耐受程度不同。可以准备一盘 6 cm 培养皿的 SH-SY5Y 细胞, 传代到 12 孔板中, 传代时每个孔中加入含有不同浓度抗性的培养基 (按储存浓度的 1:100, 1:200, 1:500, 1:1,000, 1:2,000, 1:4,000, 1:6,000, 1:8,000 稀释), 72 小时后观察, 选择有 95%以上细胞死亡的最低浓度为筛选时使用的浓度。传代时细胞对抗性的耐受度低, 可以更有效的杀死不含有抗性基因的细胞。

3. 使用 Hygromycin 处理 3 天后, 将细胞传代到 6 cm 培养皿中, 使用含有 100 µg/mL Hygromycin 的培养基持续培养 1-2 周。

注③: 超螺旋结构的质粒, 通常在转染后 3 天内会逐渐丢失, 有很低的概率会随机整合到基因组中, 形成稳转细胞株。为了提高质粒的整合效率, 可以将质粒通过酶切的方式线性化后, 再转染细胞。在选择酶的时候需要注意, 线性化质粒所用的限制性内切酶不能破坏启动子、增强子、终止子等, 不能影响目的基因的表达。3 天后, 由于游离的质粒从细胞中丢失, 可以开始观察到细胞在逐渐死亡, 剩余的细胞越来越少, 而整合到基因组上的细胞则会活下来。Hygromycin 杀死细胞的速度较慢, 因此比 Puromycin 需要更长的起效时间。直到细胞可以在 Hygromycin 的筛选压力下正常生长, 得到的就是在基因组内整合了 Hygromycin 抗性基因的细胞群。

4. 铺细胞于 12 孔板内，加入不同浓度（0.1 μ M, 1 μ M, 10 μ M）的小分子刺激物 STI，分别在处理 24 小时和 48 小时后，通过荧光显微镜观察表达 EGFP 的细胞数目以及 EGFP 的荧光强度。若随着 STI 的浓度升高，表达 EGFP 的细胞增多，且 EGFP 的亮度增强，则该细胞不仅整合了 Hygromycin 抗性基因筛选标记，而且可以通过 EGFP 的荧光强度来反映转录强度的变化。暂定名为 REPHP 细胞。

图 1 细胞汇合度示意图。

A. SH-SY5Y 细胞（200 $\times$ ，标尺为 500 μ m） B. HEK 293T 细胞（200 $\times$ ，标尺为 500 μ m）

5. 构建 pCDH-CMV-mCherry-EF1A promoter-Puro^r 质粒。PCR 扩增 mCherry 表达基因，与慢病毒载体 pCDH 连接。在 6 孔板内培养 HEK 293T 细胞，当汇合度达到 90%（图 1 B）时进行转染。准备两个 1.5 mL EP 管，向每管加入 250 μ L Opti-MEM 培养基，其中一管加入 12 μ L PEI，吹打混匀后静置 5 min；另一管加入 2 μ g pCDH-mCherry 质粒、1.2 μ g δ 8.91 质粒、0.8 μ g VSVG 质粒，吹打混匀后，与静置后的、含有 PEI 的 Opti-MEM 混合，用移液器吹打混匀后，室温静置 20 min。吸除 6 孔板中细胞培养基，向孔内加入 1 mL Opti-MEM 培养基后，再加入静置后的质粒-PEI 混合液，在 37 $^{\circ}$ C 二氧化碳细胞培养箱中培养 5 小时后，将上清换为 2 mL 含 10%FBS 的 DMEM 培养基。转染 24 小时后，补充 2 mL 含 10%FBS 的 DMEM 培养基。转染 48 小时后，将 6 孔板内的细胞培养基全部转移到 15 mL 管中，约 4 mL，此时培养基中含有包装成功的病毒，用作病毒液。采用孔径为 0.45 μ m 的滤器过滤病毒液以去除残留的 293T 细胞。将前一天接种在 6 孔板中的 REPHP 细胞培养基吸除，加入 2 mL 过滤后的病毒液进行感染，8 小时后吸除病毒液，加入含 10%FBS 的 DMEM 培养基，24 小时后，

将细胞从 6 孔板中传代到 6 cm 培养皿内，在培养基中加入 100 $\mu\text{g/mL}$ Hygromycin 和 2.5 $\mu\text{g/mL}$ Puromycin。

注④: *Puromycin* 的使用浓度需提前按照注②的方式摸索。

6. 72 小时后，在荧光显微镜下观察细胞表达 mCherry 荧光情况。此时，我们得到了在基因组中整合了 RE-EGFP-Hygromycin 与 mCherry-Puromycin 的细胞，暂定名为 REHmCP 细胞。

7. 将 REHmCP 细胞消化后，进行细胞计数，转移 100-200 个细胞到 10 cm 培养皿中，水平来回移动培养皿使细胞均匀分散，培养基为含有 100 $\mu\text{g/mL}$ Hygromycin 和 2.5 $\mu\text{g/mL}$ Puromycin 的完全培养基。在 37 °C 二氧化碳细胞培养箱中培养一周。细胞成团生长为单克隆。

注⑤: 由于在病毒感染或质粒随机整合到基因组上时，每个细胞被整合的基因拷贝数是不同的，所以每个细胞间的荧光强度存在差异，需要挑取单克隆。

8. 吸除培养基，用 4 mL DPBS 润洗细胞，吸除 DPBS，用移液器吸取 2 μL 胰酶，吹打单克隆，将脱离后的细胞转移到 48 孔板中，每个单克隆细胞团对应一个孔，孔内加入 300 μL 含 100 $\mu\text{g/mL}$ Hygromycin 和 2.5 $\mu\text{g/mL}$ Puromycin 的培养基。共挑取 20 个以上单克隆。在 37 °C 二氧化碳细胞培养箱中培养数日，直到培养基呈现黄色，且细胞已经超过孔底面积的 50%。此时，将细胞消化后传代到 24 孔板内，继续培养，当细胞密度超过孔底面积 70%时，将每孔细胞等分为 2 份，一份传代到 12 孔板，另一份传到 24 孔板内进行流式检测。用于流式检测的细胞，每株细胞等分到两个孔内，一个孔加入小分子刺激物 STI 使其终浓度达到 2 μM ，另一个孔加入相同体积的 DMSO 作为对照组，处理 24 小时。

注⑥: 除了挑取的各个 REHmCP 细胞株外，还需要野生型的 SH-SY5Y 细胞作为对照，以确定门的设定范围。

9. 当 24 孔板内的各个细胞株长满，胰酶消化，150 $\times g$ 离心 3 min，弃上清，加入 500 μL DPBS 吹打重悬，用尼龙网过滤为单细胞后，进行流式检测。

9.1 上机检测对照细胞 SH-SY5Y。先用前向 (FSC) 和侧向 (SSC) 圈出活细胞群，横坐标为 FSC-A，纵坐标为 SSC-A。再去除黏连细胞，横坐标为 FSC-A，纵坐标为 FSC-H。如图 2 所示。最后用荧光通道设置阳性细胞群区域，

横坐标为 B525-FITC-A 或 Y610-mCherry-A，纵坐标为 Histogram。

图 2. 流式检测圈门策略

9.2 对每个细胞株进行检测，选择绿色（FITC）与红色（mCherry）荧光强度均为单峰，且加入小分子刺激物后绿色荧光强度有明显增强、而红色荧光强度基本不变的细胞株。

10. 用流式软件统计每株细胞绿色荧光蛋白（GFP）的平均荧光强度，算出加入 STI 刺激前后，GFP 荧光强度的比值大小，选择比值变化最大的细胞株进行后续 siRNA 文库筛选实验。

二、siRNA 文库初筛

正式筛选实验开始前，请进行预实验，摸索最适的筛选条件（包括阴性对照 siRNA 的种类、转染试剂的种类和体积、细胞接种的密度等），见表 1。

表 1. 优化后的筛选条件

阴性对照 siRNA (20 μ M)	siNC OTP
转染试剂	RNAiMAX 0.075 μ L/孔
细胞密度	5,500 cells/孔
血清 FBS 浓度	10%
小分子刺激物 STI	2 μ M

第一天

1. 将 siRNA 文库（384 孔板）从 -20 °C 冰箱取出于室温解冻，分散放在桌面的吸水纸上。

将文库移入超净台 A 中，擦净盖子内外侧的冷凝水。130 ×g 离心 1 min，将可能粘在膜上的 siRNA 甩入孔内。

注⑦：若离心后仍有残余，可用 800 ×g 离心 1 min，若依然无法将液滴完全甩入孔内，则放弃。对实验结果不会有明显影响。

2. 将文库移入超净台 A 内，将板盖内侧朝上放置；将无盖的多孔板移入超净台 B 内。超净台 A 开紫外照射 10 min。
3. 10 min 后，将 384 孔板由超净台 B 转移到超净台 A 中，压住 384 孔板的边缘避免晃动，从一侧缓慢撕除覆盖的膜，将板盖盖好。
4. 用泵吸除每块板的第 2 列和第 19 列中的液体。
5. 稀释 siRNA。在 EP 管内按照表 2 稀释好 siRNA 的阳性对照(positive control, si-PC，2 个阳性对照都是敲低后可以抑制所研究的信号通路的基因)、阴性对照(negative control, si-NC)以及转染效率参照(si-TOX)。使用移液器吹打混匀后，转移 150 μL 到 96 孔板的对应孔（表 3），再用排枪从 96 孔板转移 10 μL 到 384 孔板的第 2 列和第 19 列（表 4）中。

本次筛选文库含有 6 块 384 孔板。96 孔板的每个孔对应 384 孔板的 2 孔*6 块板=12 孔。384 孔板的每个孔对应 0.05 μL siRNA + 9.95 μL siRNA buffer。为了避免转移时出现损失，按照 1 个 96 孔板的孔对应 384 孔板的 15 个孔（非 12 孔）计算，每个 96 孔板的孔应该含有 0.75 μL siRNA+149.25 μL siRNA buffer，共 150 μL 混合液。同样，为了避免从 EP 管向 96 孔板中转移出现损失，在配制 EP 管中的液体时，用于计算的孔数会比实际的孔数多（见表 2 第 2 列和第 3 列）。

种类	实际孔数	计算孔数	siRNA+ siRNA buffer
si-NC	8 孔	10 孔	7.5 μ L + 1492.5 μ L
si-PC-1	3 孔	4 孔	3 μ L + 597 μ L
si-PC-2	3 孔	4 孔	3 μ L+597 μ L
si-TOX	1 孔	1 孔	0.75 μ L + 149.25 μ L
siRNA buffer	1 孔	1 孔	0 + 150 μ L

[illegible]

表 4. 384 孔板的版型分布

	1	2	3														18	19	20
A	VPSFM	NC																Buffer	VPSFM
B																			
C																			
D																			
E																			
F																			
G																			
H																			
I		PC-1																	
J																			
K																			
L																			
M																			
N																			
O																			
P																			
		TOX																	

- 在 50 mL 管中，用 26 mL Opti-MEM 培养基稀释 130 μ L RNAiMAX 转染试剂，静置 5 min。
- 采用超净台内 Multidrop 仪器的 small cassette，将稀释后的转染试剂，按照每孔 10 μ L 的体积，加入到每块 384 孔板的第 2-19 列中。130 $\times$ g 离心 1 min。室温静置 20 min 以上，充分形成 siRNA-转染试剂复合物。

一块板按照 340 个孔计算，共有 6 块板，则按 7 块板来算， $340 \times 7 = 2380$ 孔，每孔的体积为 0.05 μ L RNAiMAX + 9.95 μ L Opti-MEM 培养基，共 10 μ L，则需要 23.8 mL。Multidrop 仪器的 small cassette 的死体积为 1 mL，所以使用 26 mL Opti-MEM 培养基稀释转染试剂 RNAiMAX，需要的 RNAiMAX 的体积为 $0.05 \mu\text{L}/10 \mu\text{L} \times 26,000 \mu\text{L} = 130 \mu\text{L}$ 。

- 使用胰酶消化 REHmCP 细胞，150 $\times$ g 离心 3 min，弃上清。用 1 mL 含有 10% FBS 的 VPSFM 培养基重悬。进行细胞计数。

注⑧：摸索条件与正式实验时，应该用相同的仪器或设备进行细胞计数，以保证实验结果的可重复性。比如，摸索条件时若使用的是细胞计数板，那么正式实验时也要用同一个细胞计数板进行细胞计数。

这里使用的 **VPSFM** 培养基, 全称是 **Virus Production Serum-free Medium**, 是无血清超低蛋白培养基, 不含蛋白质、肽或其它动物或人来源的成分。使用这种培养基, 是因为此前摸索过培养基的血清浓度 (1%-10%), 而该培养基能够在低血清的浓度下比普通的 **DMEM** 更有利于细胞存活。但最终发现, **10%FBS + VPSFM** 是最好的条件。因此, 我们推测, 可能使用 **DMEM+10%FBS** 进行筛选也是可以的, 不一定非要使用 **VPSFM**。

9. 按照之前优化的筛选条件, 每孔对应 5,500 个细胞和 30 μ L **VPSFM+10% FBS** 培养基, 根据孔的数量计算所需的细胞量。
10. 准备好超净台内的 **Multidrop** 仪器, 使用 **standard cassette**, 先在每块板的第 1 列、第 20 列中, 加入 60 μ L **VPSFM + 10% FBS** 培养基, 以抵消边缘效应。再在第 2-19 列的每孔内加入 30 μ L 细胞悬液。孔内液体总体积为 50 μ L。
11. 将 384 孔板平稳地转移至恒温培养箱中进行培养。

第三天 (转染 48 小时后)

1. 加入适当体积的小分子刺激物 **STI** 于 **VPSFM** 培养基中, 使小分子刺激物的浓度达到 20 μ M, 且溶剂 **DMSO** 的含量不超过 1%。
2. 准备超净台内 **Multidrop** 仪器的 **small cassette**, 向 384 孔板的第 2-19 列的孔内加入 5.5 μ L 稀释后的小分子刺激物 **STI**, 使终浓度达到 2 μ M, 且溶剂 **DMSO** 终含量不超过 0.1%。
3. 130 $\times$ g 离心 1 min, 将 384 孔板转移至培养箱中继续培养。

第四天 (转染 72 小时后)

1. 准备细胞房外 **Multidrop** 仪器的 **small cassette**, 向 384 孔板第 2-19 列的孔内加入 18.5 μ L 的 16% **PFA**, 使 **PFA** 的终浓度达到 4%。
2. 130 $\times$ g 离心 1min, 室温静置固定 30 min。
3. 准备细胞房外 **Multidrop** 仪器的 **standard cassette**, 按照 1:750 的比例, 用 **PBS** 缓冲液稀释 **Hoechst 33342** 染色液, 包好锡箔纸避光。
4. 使用 **Bluwasher** 洗板机去除细胞上清, **PBS** 缓冲液清洗细胞。清洗程序选择 “light spin wash”, 循环次数为 2 次, 体积为 70 μ L, 管道为 **Blue Channel**。

5. 用 Multidrop 仪器向清洗后的孔板中，每孔加入 30 μ L 稀释后的 Hoechst 33342 染色液，130 $\times g$ 离心 20 s。
6. 用锡箔纸包裹离心后的多孔板避光，室温静置染色 20 min。
注⑨：其余板离心后室温避光染色 20 min 后，在 4 $^{\circ}$ C 避光保存。拍摄之前半小时从 4 $^{\circ}$ C 取出平衡到室温。
7. 用酒精湿润过的无尘纸擦拭 384 孔板底面，将其放入 Operetta 仪器中进行图像采集。共设置三个通道，分别是 GFP, mCherry 和 Hoechst。拍摄时选择中间 3 个视野。
8. 图像采集后，根据孔内细胞的实际情况，调整分析方法，设置合适的阈值区分孔内细胞与背景，尽量选中所有的细胞。分析图像中的 EGFP 与 mCherry 的荧光强度，还有 Hoechst 对应的细胞数目，以得到每个孔细胞的相对荧光强度（荧光强度/细胞数目）。

结果与分析

1. 根据流式检测结果挑选细胞株。细胞株应该具有以下特点：（1）GFP 和 mCherry 的峰图应该是单一且窄的峰。（2）加入小分子刺激物 STI 后，GFP 荧光强度增强，峰向右侧移动；而 mCherry 的荧光强度基本不变，峰的位置不发生改变。

图 3 是选出的阳性细胞株的流式结果。Control 是未进行过任何处理的 SH-SY5Y 细胞，DMSO 组是 REHmCP 细胞株用 DMSO 处理 24 小时，而 STI 组是用 2 μ M 小分子刺激物 STI 处理 24 小时后的同一株细胞。细胞在 mCherry 通道(Y610-MCHERRY) 和 GFP 通道(B525-FITC) 的平均荧光强度见表 5。

这株细胞的 mCherry 荧光强度，在经过 2 μ M STI 刺激后，几乎没有变化，表明 mCherry 可以作为内参；而 GFP 的荧光强度，在 2 μ M STI 刺激后，升高为对照组的两倍，表明在 GFP 启动子区域的调节序列 RE，可以响应 STI 引起的转录增强，即可以通过 GFP 的荧光强度来反映该通路转录活性的变化。

表 5 细胞内 mCherry 与 GFP 的平均荧光强度

图例	样品名称	平均荧光强度 (mCherry)	平均荧光强度 (GFP)
□	Control	429	565
□	DMSO	1.48×10^6	104478
□	2 μ M STI	1.54×10^6	198701

图 3. 用于筛选的阳性细胞株的 mCherry 与 GFP 的荧光强度

2.图 4 为第一块板的 E2 孔 (si-NC) 与 E19 孔 (si-PC-2) 中间一个视野的图像。如图所示, 阴性对照 (si-NC) 孔 EGFP 的荧光强度明显高于阳性对照 (si-PC-2) 孔, 阴性对照孔的细胞数量也明显高于阳性对照孔, 所以需要对所有细胞的相对荧光强度而不是视野中的荧光总强度进行比较。

图 4. 阴性对照孔与阳性对照孔的三个通道的示例图

3.通过 Operetta 软件对图片进行分析，流程为“Find Nucleus”，“Find Cytoplasm”，“Calculate EGFP Intensity”，“Calculate mCherry Intensity”。图 5 为软件分析时，选择合适的程序与阈值之后，对图片中的细胞进行寻找和统计。表 6 是经过软件计算后的各参数，第 1 列是“孔号”，第 2 列是“所圈细胞数目”，第 3 列是“所圈细胞的平均 EGFP 荧光强度”，第 4 列为“所圈细胞的平均 mCherry 荧光强度”。阳性对照孔 E19 的 GFP 强度约为阴性对照孔 E2 的 41%，而 mCherry 的荧光强度则没有明显差异，提示 GFP 荧光强度的降低，是由于反应元件 RE 特异调节的信号通路的转录受到抑制而引起，而抑制作用则来自敲低 PC-2 基因，由此推测，PC-2 是调节该通路的关键蛋白，与之前的结论相吻合。

图 5. Operetta 软件分析过程示意图

表 6. 软件计算的各参数值

Well Name	Nuclei - Number of Objects	Nuclei - Intensity Cell EGFP Mean - Mean per Well	Nuclei - Intensity Cell mCherry Mean - Mean per Well
E2 (si-NC)	1106	1839.40241	1246.443872
E19 (si-PC-2)	790	765.3840386	1077.454355

4.将图像分析的结果导出到 Excel 软件后，先对每块板的结果分别进行分析。从 C 行开始，到 N 行为止，将第 2 列到第 19 列每个孔的孔号“Well Name”、去除背景后的 EGFP 平均荧光值“Nuclei-EGFP Mean”、去除背景后的 mCherry 平均荧光值“Nuclei-mCherry Mean”，转移到一张新的工作表 A 中，排成 3 列。

5.根据版型排布，将阴性对照孔和阳性对照孔的上述三个参数的值挑出，分别计算它们的平均值（mean）、标准偏差（SD，函数为 STEDV）、变异系数（CV，公式为

SD/mean*100%), 以及阳性对照孔的 Z'值 ($Z' = 1 - 3 * (\text{阴性 SD} + \text{阳性 SD}) / (\text{阴性 mean} - \text{阳性 mean})$)。如果 CV 小于 10% 或者 Z' 值大于 0.2, 则认为还是比较稳定的筛选结果。图 6 是阳性对照 si-PC-2 在每一块板的 CV 与 Z' 值, 其中每块板的 CV 都小于 10%, 并且大部分板的 Z' 值大于 0.2, 这说明本次筛选结果的稳定性较好。

图 6. 各筛选板阳性对照孔 si-PC-2 的 CV 与 Z' 值

6. 因为每条 siRNA 的 3 个复孔分布在 3 块不同的 384 孔板, 为了比较不同板的数据, 需要对每块板的数据进行标准化 (normalization) 处理, 即某块板上每个孔的荧光值, 都需要除以这块板的阴性对照孔的平均荧光值, 得到标准化后的绿色荧光强度值

“Normalized-GFP” 与标准化后的红色荧光强度值 “Normalized-mCherry”。

7. 建一个新的工作表 B, 包含 siRNA 靶向的基因名、siRNA 在三块板的 3 个复孔对应的 Normalized-GFP 值这 4 列, 并算出其平均值 (mean)、P 值 (P value) 以及 -LOG10(P value) 值。同时, 将每个阴性对照孔和阳性对照孔的三次重复的复孔对应的 Normalized-GFP 值也列出。P 值的计算需要用到 T.TEST 函数 “T.TEST (每条 siRNA 对应的 3 个复孔的 Normalized-GFP, 所有阴性对照孔的 Normalized-GFP, 2, 3)”, 其中, “2” 的意思是双尾检验, “3” 为双样本异方差假设。

此外, 该工作表 B 中列出 siRNA 在三个复孔中的 Normalized-mCherry 值, 并求出其平均值。因为 mCherry 只是作为参照, 所以无需计算 P 值。

8.建立新的工作表 C，用于作图，包含 siRNA 靶向的基因名称、Normalized-GFP 的平均值、P value 以及-LOG10(P value)值，以及 Normalized-mCherry 平均值。以 Normalized-GFP 平均值与-LOG10(P value)值做散点图（火山图）。

9.Hits 孔的选取：

将 siRNA 对应的基因按照 P value 从小到大排序，P value <0.05 认为是有显著差异的基因，选择这些基因，再将其按照 Normalized-GFP mean 值从小到大排序。

至于 Hits 孔所在范围，通常是用除了对照孔以外的所有孔的 Normalized-GFP 的 mean 值和所有孔的 SD 值进行计算，选择平均值大于等于 $\text{mean}+5*SD$ 、小于等于 $\text{mean}-5*SD$ 区间范围内的基因作为 hits。阳性对照 PC-1 和 PC-2 的孔的平均值，应该落在这个范围内。

为了排除 RE-EGFP 的荧光强度的降低或升高是由广谱的转录或翻译抑制或激活引起的，而非所研究的信号通路特异性变化，可以将作为内参的 mCherry 的荧光强度平均值引入。计算 Hits 孔 EGFP/mCherry 的值，选择比值依然较小或较大的基因（可以参考阴性对照孔的比值的平均值，比最高值大或比最小值低的则可以接受）。

注意事项

1. 在挑选细胞株的时候，可能会有不止一个细胞株具备“荧光为单峰且加入刺激小分子后荧光强度变化较大”的特点，这时可以对不同细胞株进行 siRNA 筛选预实验，使用阳性与阴性 siRNA 进行处理，看每个细胞株在 siRNA 筛选体系中的表现（CV 与 Z' 值）。因为即使用流式检测的方式得到的荧光强度变化很接近的细胞株，在 siRNA 筛选体系下，也会出现较大的差异。
2. 合适的细胞接种密度，最好是当细胞转染 72 小时后进行检测时达到 70%-80%，如果太密，Operetta 软件进行分析的时候，会出现无法区分信号与背景的情况，此时就无法准确的设定圈细胞的阈值。我本次实验的细胞密度其实有些偏高，细胞挤在一起会细胞与细胞之间的边界不清晰，软件在分析细胞数目时会比实际偏少，但是由于统计的是 GFP 平均荧光强度，所以对最后的结果没有造成明显影响。

溶液配方

1. PBS 缓冲液

NaCl 8 g
KCl 0.2 g
Na₂HPO₄·12H₂O 1.54 g
KH₂PO₄ 0.2 g
去离子 H₂O 1 L
用盐酸调节 pH 为 7.4

致谢

该研究得到了国家自然科学基金(91853128, 31900804)、科技部(2018YFA0508200)、中国科学院战略重点研究计划 (XDB19040102)、博士后科学基金 (2018M642109, 2020M670976)的资助, 受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、细胞分析技术平台及分子生物学技术平台的大力支持。

参考文献

1. Lingemann, M., McCarty, T., Liu, X., Buchholz, U. J., Surman, S., Martin, S. E., Collins, P. L. and Munir, S. (2019). [The alpha-1 subunit of the Na⁺,K⁺-ATPase \(ATP1A1\) is required for macropinocytic entry of respiratory syncytial virus \(RSV\) in human respiratory epithelial cells.](#) *PLoS Pathog* 15(8): e1007963.
2. Sun, J., Katz, S., Dutta, B., Wang, Z. and Fraser, I. D. (2017). [Genome-wide siRNA screen of genes regulating the LPS-induced TNF-alpha response in human macrophages.](#) *Sci Data* 4: 170007.