免疫荧光成像筛选胞质染色质片段产生的潜在调控因子

Screening Regulatory factors for Production of Cytoplasmic Chromatin Fragments by Immunofluorescence

罗群^{1, #}, 付雨栋^{1,3 #}, 韩帅⁴, 王涛^{1, 2 *}

¹ 华南干细胞与再生医学研究所, 广东省干细胞与再生医学重点实验室, 中国科学院广州生物医药与健康研究院, 广州, 510530; ² 生物岛实验室, 广州再生医学与健康广东省实验室, 广州, 510530; ³ 中国科学院大学, 北京, 100049; ⁴ 化学生物学技术平台, 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心, 上海;

*通讯作者邮箱: wang_tao@gibh.ac.cn

#共同第一作者/同等贡献

引用格式: 罗群, 付雨栋, 韩帅, 王涛. (2021). 免疫荧光成像筛选胞质染色质片段产生的潜在调控因子. // 高通量筛选实验手册. *Bio-101* e1010887. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010887.

How to cite: Luo, Q., Fu, Y. D., Han, S. and Wang, T. (2021). Screening Regulatory factors for Production of Cytoplasmic Chromatin Fragments by Immunofluorescence. // High-throughput Screening Protocol eBook. *Bio-101* e1010887. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010887. (in Chinese)

摘要: DNA 损伤及细胞衰老时, 一些染色质片段会从细胞核中逸出来进入细胞质, 该胞质染色质片段上带有 H3K9me3 蛋白及 DNA 损伤标志物 rH2AX 蛋白 (Chien *et al.*, 2011; Ivanov *et al.*, 2013; Dou *et al.*, 2015)。它使细胞产生一系列应激反应, 形成复杂的网络信号调控通路 (Wiley *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2018; Vizioli *et al.*, 2020)。在已知的经典信号通路的基础上, 为揭示维持基因组稳定性的新调节因子, 我们应用高通量全基因组 siRNA 筛选技术, 在全基因组范围内对所有编码蛋白的基因进行干扰并检测胞质内游离染色质片段出现的频率。通过免疫荧光实验对胞质染色体片段进行 rH2AX 和 H3K9me3 染色标记, 并对细胞进行 DAPI 染色, 结合高内涵仪器自带的软件对拍摄的照片进行分析, 分别计算 DAPI、rH2AX 和 H3K9me3 单阳性及三阳性的胞质染色质片段数目, 并计算三阳性的胞质染色质片段数目占细胞总数百分比, 找出百分比具有明显变化的基因。该方法优势主要是涵盖范围广 (包括全基因组基因), 并且利用高内涵高通

量仪器进行自动拍照和分析，能极大程度加快实验进度，提高结果分析精确度并减少误差。

关键词：高通量 siRNA 筛选技术，胞质染色质片段

材料与试剂

1. 384 孔板（品牌：ViewPlate，货号：6007460）
2. 胎牛血清（品牌：NTC，货号：SFBE）
3. DMEM/HIGH GLUCOSE（品牌：Hyclone，货号：SH30022.01）
4. MEM NEAA（100×）（品牌：Gibco，货号：11140-050）
5. GlutaMAX（100×）（品牌：Gibco，货号：35050-061）
6. 0.25% Trypsin-EDTA（1×）（品牌：Gibco，货号：25200-056）
7. Penicillin-Streptomycin Solution（品牌：Hyclone，货号：SV30010）
8. Opti-MEM（1×）（品牌：Gibco，货号：31985-070）
9. H3K9me3 抗体（品牌：Abcam，货号：ab8898）
10. rH2AX 抗体（品牌：Santa Cruz Biotechnology，货号：sc-517348）
11. Alexa Fluor 568 goat anti- rabbit IgG（H+L）（品牌：Invitrogen，货号：A11011）
12. Alexa Fluor 488 goat anti- mouse IgG（H+L）（品牌：Invitrogen，货号：A11001）
13. DAPI（品牌：碧云天，货号：C1002）
14. Triton X-100（品牌：碧云天，货号：ST795）
15. Tween-20（品牌：碧云天，货号：ST825）
16. 10× PBS 缓冲液（品牌：BBI，货号：E607016-0500）
17. 4%组织固定液（广州晶欣生物科技有限公司，货号：JX0100）
18. 即用型正常山羊血清（品牌：博士德生物，货号：AR009）
19. Dharma FECT1 Transfection Reagent（品牌：Dharmacon，货号：T-2001-01）
20. 5× siRNA Buffer（品牌：Dharmacon；货号：B-002000-UB-100，使用时用去离子水稀释为 1× siRNA Buffer）
21. 全基因组 siRNA 试剂（Human ON-TARGET plus siRNA Library-Genome-SMARTpool，货号 G-105005-E2-025）
22. 培养 IMR90 细胞的培养基（见溶液配方）

仪器设备

1. Multidrop Combi 自动分液器 (Thermo Fisher Scientific)
2. Blue Washer 洗板机
3. Operetta 高内涵成像分析仪

仪器如图：

4. 水平离心机

实验步骤

一、全基因组 siRNA 文库转染

经过预实验的多次优化，确定最适转染条件为：在 384 孔板中，使用 Dharma FECT1 Transfection Reagent 0.075 μ l/孔，细胞接种密度 2,000 个/孔，转染 72 h 后进行表型检测。

siRNA 转染的具体操作步骤如下：

1. 转染对照 siRNA 的制备：

siRNA 筛选实验中完整的对照系统应包括：转染对照、阳性对照、阴性对照、空白对照。

- a. 使用 1 $\times$ siRNA buffer 分别稀释 Non-targeting Pool siRNA (阴性对照)、Tox (转染对照) 及经过多次验证的可信的阳性 siRNA 至 0.1 μ M;
- b. 将各对照 siRNA 加入对应孔内，每孔 10 μ l;

2. 转染试剂的制备：

- a. 按照 7.5 μ l/ml 的浓度，将 Dharma FECT1 Transfection Reagent 稀释在 Opti-

MEM 中;

- b. 使用自动化分液仪 Multidrop Combi 将上述转染试剂溶液加入 siRNA 板内 (第 2 列至第 23 列, 货号 G-105005-E2-025), 10 μ l /孔;
- c. 水平离心机 129 x g 离心, 2 min, 将 siRNA 与 Dharma FECT1 混匀;
- d. 室温静置 20 min;

3. 细胞悬液的制备:

- a. 用 DMEM 完全培养基将 IMR90 细胞 (p10-p15 代次) 密度调整为 67,000/ml;
- b. 使用自动化分液仪 Multidrop Combi 将上述细胞悬液加入 siRNA 板 (第 2 列至第 23 列, 货号 G-105005-E2-025) 30 μ l /孔;
- c. 为减少边缘效应, 在 384 孔板第 1 列及第 24 列加入 50 μ l 1 $\times$ PBS 或 DMEM;
- d. 将加好转染试剂和细胞的 384 板经水平离心机 129 x g 离心 2 min, 放置于 CO₂ 培养箱中, 培养 72 h。

二、免疫荧光实验方法

1. 固定: 在孔内直接加入 16% PFA (4 $\times$) 室温固定 20 min, 吸去固定液然后用 PBS 洗 3 min;
2. 通透: PBS-TritonX100 (0.5%) 通透 25 min, 吸去通透剂而后加入 PBS 洗 3 min;
3. 使用即用型正常山羊血清按照 1:2,000 稀释一抗, 每孔 15 μ l, 4 $^{\circ}$ C 过夜;
4. PBST(Tween20, 0.1%)洗一抗, 洗三次, 15 min/每次;
5. 使用即用型正常山羊血清按照 1:2,000 稀释二抗, 每孔 15 μ l, 室温孵育 2 小时;
6. PBST(Tween20, 0.1%)洗二抗, 洗三次, 15 min/每次;
7. DAPI(1 mg/ml), 用 PBS 稀释 DAPI(1:1,500), 每孔 15 μ l, 室温孵育 30 min, PBS 洗 10 min, 孔里加入 PBS 后应用高内涵仪器进行拍照。转染前细胞状态图片, 转染 siRNA 后 65 h 细胞状态如图 1 所示; 相对应的免疫荧光图片如图 2 所示。

转染前照片:

转染后照片:

图 1. 转染 siRNA 前后 IMR90 细胞状态

图 2. 转染 siRNA 后进行免疫荧光染色后的代表性照片

拍照图片：（左侧为转染 Control siRNA 结果，右侧图为转染 BLM 基因 siRNA 结果，绿色通道为 rH2AX 蛋白，红色通道为 H3K9me3 蛋白，蓝色通道为 DAPI）

8. 分别计算 DAPI、rH2AX 和 H3K9me3 单阳性及三阳性的胞质染色质片段数目，并计算三阳性的胞质染色质片段数目占细胞总数百分比，找出百分比具有明显变化的基因。

溶液配方

1. 培养 IMR90 细胞的培养基

90% DMEM

10% FBS

1% MEM NEAA

1% GlutaMAX

1% Penicillin-Streptomycin Solution

siRNA 转染前给 IMR90 细胞换上新鲜的培养基中不添加 Penicillin-Streptomycin Solution。

参考文献

1. Chien, Y., Scuoppo, C., Wang, X., Fang, X., Balgley, B., Bolden, J. E., Premisrur, P., Luo, W., Chicas, A., Lee, C. S., Kogan, S. C. and Lowe, S. W. (2011). [Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF-kappaB promotes senescence and enhances](#)

- [chemosensitivity](#). *Genes Dev* 25(20): 2125-2136.
2. Ivanov, A., Pawlikowski, J., Manoharan, I., van Tuyn, J., Nelson, D. M., Rai, T. S., Shah, P. P., Hewitt, G., Korolchuk, V. I., Passos, J. F., Wu, H., Berger, S. L. and Adams, P. D. (2013). [Lysosome-mediated processing of chromatin in senescence](#). *J Cell Biol* 202(1): 129-143.
3. Dou, Z., Xu, C., Donahue, G., Shimi, T., Pan, J. A., Zhu, J., Ivanov, A., Capell, B. C., Drake, A. M., Shah, P. P., Catanzaro, J. M., Ricketts, M. D., Lamark, T., Adam, S. A., Marmorstein, R., Zong, W. X., Johansen, T., Goldman, R. D., Adams, P. D. and Berger, S. L. (2015). [Autophagy mediates degradation of nuclear lamina](#). *Nature* 527(7576): 105-109.
4. Wiley, C. D., Velarde, M. C., Lecot, P., Liu, S., Sarnoski, E. A., Freund, A., Shirakawa, K., Lim, H. W., Davis, S. S., Ramanathan, A., Gerencser, A. A., Verdin, E. and Campisi, J. (2016). [Mitochondrial Dysfunction Induces Senescence with a Distinct Secretory Phenotype](#). *Cell Metab* 23(2): 303-314.
5. Liu, H., Zhang, H., Wu, X., Ma, D., Wu, J., Wang, L., Jiang, Y., Fei, Y., Zhu, C., Tan, R., Jungblut, P., Pei, G., Dorhoi, A., Yan, Q., Zhang, F., Zheng, R., Liu, S., Liang, H., Liu, Z., Yang, H., Chen, J., Wang, P., Tang, T., Peng, W., Hu, Z., Xu, Z., Huang, X., Wang, J., Li, H., Zhou, Y., Liu, F., Yan, D., Kaufmann, S. H. E., Chen, C., Mao, Z. and Ge, B. (2018). [Nuclear cGAS suppresses DNA repair and promotes tumorigenesis](#). *Nature* 563(7729): 131-136.
6. Vizioli, M. G., Liu, T., Miller, K. N., Robertson, N. A., Gilroy, K., Lagnado, A. B., Perez-Garcia, A., Kiourtis, C., Dasgupta, N., Lei, X., Kruger, P. J., Nixon, C., Clark, W., Jurk, D., Bird, T. G., Passos, J. F., Berger, S. L., Dou, Z. and Adams, P. D. (2020). [Mitochondria-to-nucleus retrograde signaling drives formation of cytoplasmic chromatin and inflammation in senescence](#). *Genes Dev* 34(5-6): 428-445.