

# 细胞周期调控因子筛选---FUCCI 活细胞标记法

## Screening for Cell Cycle Regulators-FUCCI Live Cells Labeling Method

鲁家骏<sup>1</sup>, 韩帅<sup>2</sup>, 杨巍维<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> 分子生物学国家重点实验室, 中科院分子细胞卓越创新中心 (生物化学与细胞生物学研究所), 上海;

<sup>2</sup> 中科院上海生化与细胞所化学生物学技术平台, 中科院分子细胞卓越创新中心 (生物化学与细胞生物学研究所), 上海

\*通讯作者邮箱: [weiweiyang@sibcb.ac.cn](mailto:weiweiyang@sibcb.ac.cn)

引用格式: 鲁家骏, 韩帅, 杨巍维. (2021). 细胞周期调控因子筛选---FUCCI 活细胞标记法. // 高通量筛选实验手册. *Bio-101* e1010852. Doi: 10.21769/BioProtoc. 1010852.

How to cite: Lu, J. J., Han, S. and Yang, W. W. (2021). Screening for Cell Cycle Regulators-FUCCI Live Cells Labeling Method. // High-throughput Screening Protocol eBook. *Bio-101* e1010852. Doi: 10.21769/BioProtoc. 1010852. (in Chinese)

**摘要:** 细胞周期是细胞生命活动的基本过程, 细胞周期的精准运行是真核生物的生存、发育和繁殖的基础。荧光泛素化细胞周期指示物 (Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator, 简称 FUCCI) 是将两个细胞周期调节因子 Cdt1 和 Geminin 分别与红色荧光蛋白以及绿色荧光蛋白相融合, Cdt1 和 Geminin 会随细胞周期的运行含量不断变化, 可以通过检测细胞内两种荧光信号来判定细胞所处的细胞周期阶段。目前哺乳动物细胞周期的分子调控机制研究尚不充分, 为此我们将 FUCCI 技术 (Sakaue, 2008) 和 siRNA 文库相结合, 建立了高通量筛选细胞周期调控因子的方法。

**关键词:** 细胞周期, FUCCI, 高通量筛选

### 材料与试剂

1. 6 cm 培养皿 (NEST, catalog number: 700501)
2. 96 孔板 (Nunc, catalog number: 167008)
3. 384 孔黑边底透板 (Corning, catalog number: 3764)
4. 胰酶 (GEBICO, catalog number: 25200072)
5. 胎牛血清 (Gemini, catalog number: 900-108)
6. DMEM 培养基 (Hyclone, catalog number: SH3002201)

7. DMSO (MP, catalog number: 0219605580)
8. Hoechst33342 (Invitrogen, catalog number: 1985413)
9. 16%多聚甲醛 (Alfa Aesar, catalog number: #43368)
10. siCDK1 序列: ACUUCGUCAUCCAAUAUA (Genepharma)
11. RISC-free siRNA (Dharmacon, catalog number: #D-001220-01-05)
12. ON-TARGETplus Non-targeting Pool siRNA 序列:
13. UGGUUUACAUGUCGACUAA, UGGUUUACAUGUUGUGUGA,  
UGGUUUACAUGUUUUCUGA, UGGUUUACAUGUUUCCUA
14. DharmaFECT1 (Dharmacon, catalog number: T-2001-03)
15. 5x siRNA buffer (Dharmacon, catalog number: B-002000-UB)
16. RNase-free Water (Qiagen, catalog number: 129117)

## 仪器设备

1. 流式分选仪 (BD, Aria II)
2. 流式检测仪 (BD, LSR II)
3. 自动化分液仪 (Thermo Fisher, Multidrop Combi)
4. 洗板机 (BioTek, ELx405 Select Deep Well Microplate Washer)
5. 高内涵细胞分析仪 (PerkinElmer, Operetta)

## 实验步骤

### 一、单克隆 FUCCI 稳转株的构建

1. 将 mKO2-hCdt1 和 mAG-hGem 的 DNA 片段亚克隆至 pCDH-CMV-MCS-puro 载体上, 利用构建好的载体包装慢病毒 (见注意事项 1, 2)。
2. 将上述两种包装好的病毒同时感染 HeLa 细胞, 感染 6 h。
3. 48 h 后将感染过的 HeLa 细胞用胰酶消化, 中止消化,  $200 \times g$  离心 2 min, PBS 清洗一遍后, 用预冷的 DMEM 培养基重悬。
4. 通过 Aria II 进行细胞分选, 分选出 mKO2 阳性的细胞。(见注意事项 3)。
5. 步骤 4 中的细胞继续培养 48 h, 重复步骤 3, 通过流式分选仪分选出 mAG 阳性的细胞, 并将筛选模式调为单细胞分选模式, 将 GFP 阳性的细胞分选于 5 个预先装有 200  $\mu$ l DMEM 完全培养基的 96 孔板中 (见注意事项 4, 5)。

6. 将分好的每孔含有单个细胞的 96 孔板培养 10-14 天左右；显微镜下观察单克隆细胞株生长情况，将细胞形态正常，具有明显细胞群落特点的单克隆细胞株传代，扩增至 6 cm dish 中 (见注意事项 6)。
7. 分别取  $2 \times 10^5$  个单克隆细胞和野生型 Hela 细胞铺于 6 cm dish，培养 36 h，加入 Hoechst33342 至终浓度为 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 20 min，消化收集细胞。用流式检测仪检测单克隆细胞的 Hoechst/mKO2/mAG 的信号，根据 mKO2/mAG 荧光的分布，hoechst33342 信号指示的细胞周期分布挑选出最适合用来筛选的单克隆细胞株 (见注意事项 7, 8)。

## 二、siRNA 文库转染

经转染优化实验，确定最适转染条件为：在 384 孔板中，使用 DharmaFECT1 0.05  $\mu\text{l}$ /孔，细胞接种密度 650 个/孔，转染 72 h 后进行表型检测 (见注意事项 9)。

siRNA 转染的具体操作步骤如下：

1. 阴阳性对照 siRNA 的制备：
  - 1.1 使用 1x siRNA buffer 分别稀释 RISC-free siRNA 和 Non-targeting Pool siRNA 以及 siCDK1 (阳性对照) 至 0.1  $\mu\text{M}$ 。
  - 1.2 将阴阳性 siRNA 按照图 1 (384 孔板排布表) 方式加入对应孔内，每孔 10  $\mu\text{l}$  (见注意事项 10)。

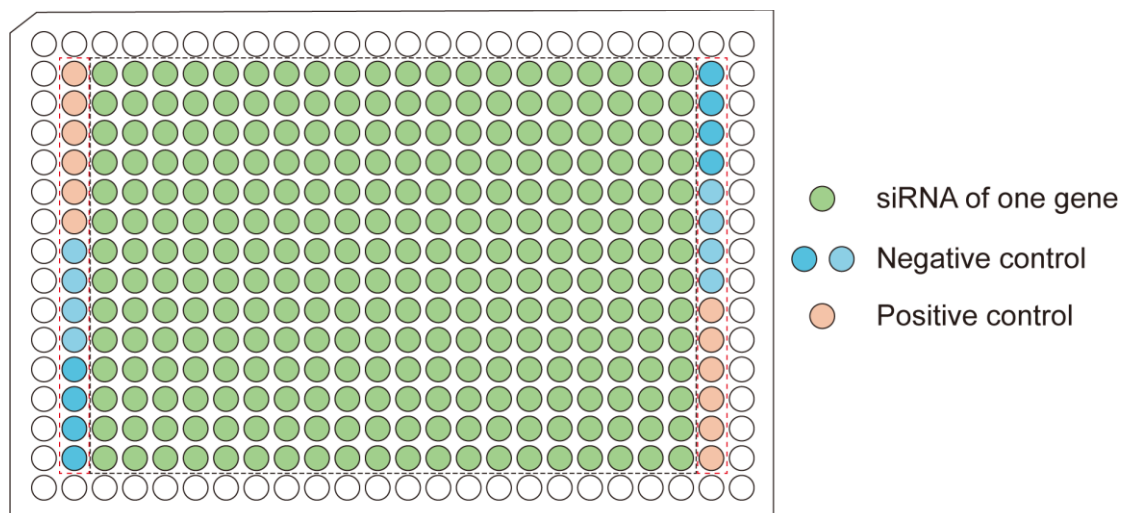


图 1. 384 孔板排步表

## 2. 转染试剂的制备:

- 2.1 用 Opti-MEM 按照体积比 1:200 稀释 DharmaFECT1。
- 2.2 使用自动化分液仪 Multidrop Combi 将上述转染试剂溶液加入含有 siRNA 孔内, 10  $\mu$ l /孔。
- 2.3 水平离心机 200  $\times$  g 离心, 2 min, 将 siRNA 与转染试剂混匀。
- 2.4 室温静置 20 min。

## 3. 细胞悬液的制备:

- 3.1 将单克隆 FUCCI 稳转株细胞配制成浓度为 650 个细胞/30  $\mu$ l DMEM 完全培养基的悬液。
- 3.2 使用 Multidrop 将上述细胞悬液加入 siRNA 板 (30  $\mu$ l/孔)。
- 3.3 为减少边缘效应, 在 384 孔板最外围的孔内加入 50  $\mu$ l PBS。
- 3.4 将加好转染试剂和细胞的 384 板经水平离心机中 200  $\times$  g 离心 2 min, 放置于细胞培养箱中培养 72 h。

## 三、筛选实验

1. 用 DMEM 完全培养基配制浓度为 100  $\mu$ g/mL 的 Hoechst33342 溶液, 用 Multidrop 将 Hoechst33342 染液加入板中, 5  $\mu$ l/孔。
2. 200  $\times$  g 离心 2 min, 置于培养箱中孵育 30 min。
3. 用 Multidrop 将 16%多聚甲醛加入板中, 12.5  $\mu$ l/孔; 200  $\times$  g 离心 2 min, 室温固定孔板内细胞 30 min (见注意事项 11)。
4. 用 FLx405 洗板机将 384 孔板内的液体更换成 PBS 溶液 (见注意事项 12, 13)。
5. 用高内涵细胞分析仪 Operetta 拍摄细胞图像。

## 四、结果与分析

### 图像拍摄:

Operetta 的 355/488/561 nm 激光器分别对应 Hoechst/mAG/mKO2 的三种荧光信号, 使用 10 倍物镜拍摄, 见图 2。

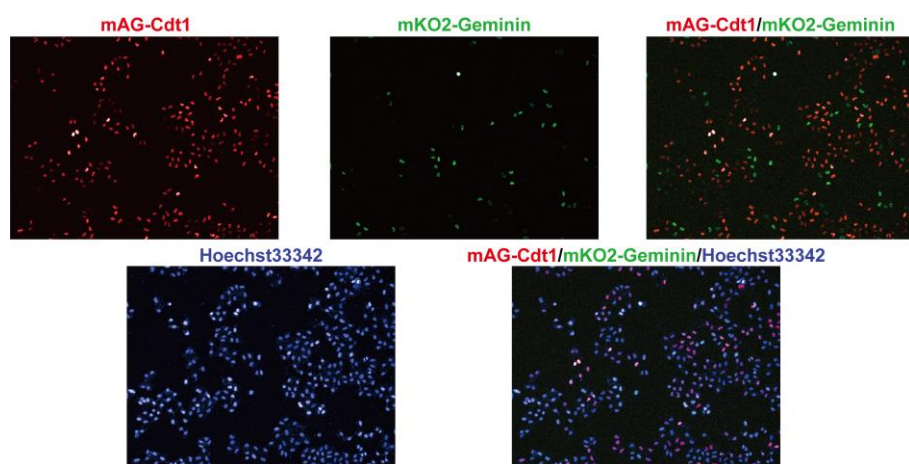


图 2. Operetta 拍摄结果示例图

图像分析:

1. 根据 Hoechst 信号的强度和面积设定条件遴选出视野中所有符合标准的细胞核。
2. 在选择出的细胞核区域中, 计算去背景后每个细胞核区域内 mKO2 和 mAG 信号值 (见注意事项 14)。
3. 根据前期实验条件摸索过程中确定细胞周期各个阶段, 如 G1 期, S 期等阶段的 mAG/mKO2 的荧光强度比值范围, 计算出孔内 G1 期细胞所占百分比。如本方法中采取的 G1 期细胞判定标准为 mAG/mKO2 小于等于 2。 (见注意事项 15)。
4. 计算出每个基因的 Z-score, p 值以及 FDR 值 (见参考文献 2), 并根据最终分析结果的排名挑选出潜在的细胞周期调控因子。

## 五、注意事项

1. FUCCI 体系中的 mKO2 荧光蛋白与 RFP 类似, mAG 荧光蛋白与 GFP 类似, 大部分情况下可以用 RFP/GFP 通道来收集 mKO2/mAG 的信号。
2. 待分选的细胞置于冰上有利于保持活力, 提高单克隆成活率。
3. 分好的 96 孔板迅速置于冰上, 可以提高分选出的单个 HeLa 细胞形成单克隆的成功率。
4. 96 孔板的最外围一圈边孔由于边缘效应不建议使用, 本方法中分选只用了 96 孔板中间 60 个孔。
5. 单克隆细胞位于 96 孔板培养过程中, 推荐每隔 5-7 d 更换 150  $\mu$ l 完全培养基, 具体时间视蒸发速度而定。

6. 分选出符合要求的单克隆稳转株应及早冻存，防止传代次数过多导致的荧光比例变化。
7. 单克隆细胞株的筛选标准详情请见参考文献 1。
8. 转染过程需要优化的条件有转染试剂的种类，转染试剂的用量，孔内细胞数量，确定最终检测的时间点等。
9. 通常情况下，由于实验安排的限制，一般分好 siRNA 的 384 孔板都放于 -80 ℃ 冰箱保存，待正式筛选实验开始时，提前拿出恢复至室温。
10. 高浓度多聚甲醛会释放甲醛，请在通风橱内进行操作。
11. 孔板内的 DMEM 培养基会使背景升高，用 PBS 溶液可以降低背景。
12. 不同的洗板机由于洗板原理不同，可能会造成孔内细胞脱落，需要提前优化洗板流程。
13. 在前期进行的预实验中，需要优化曝光时间，以获得最佳的信噪比。
14. 预实验要对 FUCCI 细胞株进行多种细胞周期同步化处理，获取细胞周期各个阶段细胞，据此计算出各个周期 mAG/mKO2 荧光比值范围。

## 溶液配方

1. PBS (见溶液配方) :

1.06 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.144 g/L
155.17 mM	NaCl	9 g/L
2.97 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	1.064 g/L

用 HCl 调节 pH 至 7.4，高温高压灭菌。

2. 1× siRNA buffer:

5× siRNA buffer 与 RNase-free Water (Qiagen, 129117) 体积比 1:4 混合。

3. DMEM 完全培养基

胎牛血清与 DMEM 培养基以 1:9 比例混合

4. 细胞冻存液

DMSO 和 DMEM 完全培养基以 1:9 比例混合，冻存细胞前新鲜配制。

## 致谢

本项目得到中科院生化与细胞所基金的支持。感谢中科院生化与细胞所化学生物学技术平台在高通量 siRNA 文库筛选及高内涵成像分析实验中给予的帮助，感谢细胞分析技术平台在流式细胞实验中给予的帮助。

### 参考文献

1. Sakaue-Sawano, A., Kurokawa, H., Morimura, T., Hanyu, A., Hama, H., Osawa, H., Kashiwagi, S., Fukami, K., Miyata, T., Miyoshi, H., Imamura, T., Ogawa, M., Masai, H. and Miyawaki, A. (2008). [Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression](#). *Cell* 132: 487-498.
2. Goktug, A. N., Chai, S. C. and Chen, T. (2013). [Chapter7: Data analysis approaches in high throughput screening](#). *Drug Discovery*. IntechOpen.