

# DNA 甲基化抑制剂在报告细胞系中的去甲基化活性验证

## Demethylation Activity Validation of the DNA Methylation Inhibitors in Reporter Cell Line

杜文龙\*

生物大分子国家重点实验室，中国科学院生物物理研究所，北京市

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

引用格式: 杜文龙. (2021). DNA 甲基化抑制剂在报告细胞系中的去甲基化活性验证. // 高内涵成像及分析实验手册. *Bio-101 e1010844*. Doi: 10.21769/BioProtoc. 1010844.

How to cite: Du, W. L. (2021). Demethylation Activity Validation of the DNA Methylation Inhibitors in Reporter Cell Line. // High-Content Imaging and Analysis Protocol eBook. *Bio-101 e1010844*. Doi: 10.21769/BioProtoc. 1010844. (in Chinese)

**摘要:** DNA 甲基化异常常见于多种癌症和神经系统疾病，并在其中发挥着重要的调控作用。开发新型 DNA 甲基化抑制剂得到的先导化合物需要在细胞中进一步验证和定量评估其在体内的潜在去甲基化活性。我们实验室此前建立了 DNA 甲基化报告细胞系 B2-17，即在 HEK293 细胞基因组中插入了被 DNA 甲基化沉默的 CMV 启动子以及由其驱动的 EGFP 绿色荧光报告基因。启动子 DNA 甲基化是表观遗传学中导致基因沉默的一种经典调控机制，DNA 甲基化修饰可通过甲基化结合蛋白招募组蛋白去乙酰化酶，组蛋白去乙酰化会改变组蛋白所带的电荷特性以及染色质的开放程度，最终导致基因沉默。使用 DNA 甲基化抑制剂处理报告细胞可以诱导 CMV 启动子发生被动去甲基化，从而激活 EGFP 报告基因的表达。使用 Opera 高内涵成像系统可以定量评估 DNA 甲基化抑制剂在细胞中的去甲基化活性，从而指导对抑制剂的后续改造和优化。

**关键词:** DNA 甲基化，抑制剂，去甲基化

### 材料与试剂

1. 100 mm Cell Culture Dish with Clear Lid, Sterile (NEST, catalog number: 704001)
2. CellCarrier-96 Black, Optically Clear Bottom, Tissue Culture Treated (PerkinElmer, catalog number: 6005550)
3. Poly-D-Lysine (PDL) (Beyotime, catalog number: C0312)

4. Hoechst 33342 (Beyotime, catalog number: C1022, stored at -80 °C)
5. DMEM medium (Hyclone, catalog number: SH30243.01, stored at 4 °C)
6. Fetal Bovine Serum (Biological Industries, catalog number: 04-001-1ACS, stored at -80 °C)
7. Penicillin-streptomycin (ThermoFisher, catalog number: 15140148, stored at 4 °C)
8. Decitabine (Selleck, catalog number: S1200, aliquoted and stored at -80 °C)
9. DMSO (MP Biomedicals, catalog number: 196055)
10. 1x DPBS (ThermoFisher, catalog number: 14190144)
11. Trypsin-Versene mixture (Lonza, catalog number: 17-161E, stored at 4 °C)
12. Trypan Blue 0.04% solution (Gibco, catalog number: 15250061)
13. DMEM 培养基 (见溶液配方)
14. PDL 溶液 (见溶液配方)
15. Hoechst 33342 工作溶液 (见溶液配方)

## 仪器设备

1. 二氧化碳细胞培养箱 (Memmert, CO<sub>2</sub> incubator ICO50)
2. 无菌超净工作台 (ESCO, model: AC2-4S1)
3. 水平转子低速离心机 (ThermoFisher, model: Labofuge 400)
4. 八连排移液枪 (ThermoFisher, model: 14-386-352N))
5. Bright Line Hemocytometer (Weber Scientific, model: 3048-11)
6. Opera Phenix High-Content Screening System (PerkinElmer, model: HH14000000)

## 实验步骤

### 一、铺被 PDL

1. 使用紫外线照射 30 min 对超净工作台进行灭菌。
2. 准备终浓度为 0.1 mg/ml 的 PDL 溶液用于处理 96 孔板 CellCarrier-96 (黑色透明底)。
3. 用八连排移液枪向每孔中加入约 40  $\mu$ l 的 PDL 溶液, 轻轻晃动使其润湿底部。
4. 室温孵育 30 min 后吸弃。

## 二、B2-17 报告细胞系计数

1. 吸弃 10 cm 细胞培养板中的培养基，加入 4 ml DPBS 溶液，前后左右轻轻晃动后吸弃。
2. 加入 1.5 ml Trypsin 溶液，轻轻晃动后室温消化 1 min。
3. 加入 1.5 ml DMEM 培养基终止消化并吹吸几下，将细胞吹散为单细胞。
4. 室温  $800 \times g$  离心 3 min。吸弃上清后加入 1 ml DMEM 培养基重悬，另准备一只离心管将细胞悬液以 1:5 稀释于其中。
5. 取 90  $\mu$ l 稀释后的细胞悬液，加入 10  $\mu$ l Trypan Blue 溶液。
6. 使用 Hemocytometer 进行细胞计数。

## 三、接种 B2-17 报告细胞系

1. 将细胞悬液使用 DMEM 培养基梯度稀释为终浓度为 6,000 cell/ml 的稀释液。
2. 使用排枪向经 PDL 预处理的 96 孔板中加入细胞稀释液，每孔中加入 200  $\mu$ l (最终每孔约 1,200 cells)。可设置 2-3 个技术重复孔，或另单独重复做 2 次生物学重复实验，用于统计分析。
3. 将 96 孔板暂时放置于二氧化碳培养箱中。

## 四、化合物处理细胞

1. 梯度稀释化合物，以阳性化合物 decitabine 为例。
2. 使用 DMSO 对 decitabine 以 1:2 的倍比进行梯度稀释，从 31.25  $\mu$ M 至 16 mM 共十种浓度。
3. 向 96 孔板细胞中以 1:200 的比例加入待检测化合物，如阴性对照 DMSO 和阳性化合物 decitabine 等。decitabine 的终浓度为 0.15625  $\mu$ M 至 80  $\mu$ M，2 倍倍比梯度，共十种浓度。
4. 前后左右多次晃动 96 孔板以混匀化合物，必要时可用排枪轻柔吹吸混匀，避免吹打出气泡。将 96 孔板放置于 37  $^{\circ}$ C，5% CO<sub>2</sub> 二氧化碳培养箱中培养 4 d。

## 五、Hoechst 染色

1. 使用 DPBS 将 hoechst 33342 稀释至终浓度 5  $\mu\text{g/ml}$ 。如拍照样品较多时间长，可将浓度降低到 1  $\mu\text{g/ml}$ 。
2. 吸弃 96 孔板中的培养基 (包含化合物)，可贴着 96 孔侧壁吸弃以避免吸起细胞。
3. 将稀释后的 hoechst 溶液轻轻加入孔中，每孔约 100  $\mu\text{l}$ 。
4. 在培养箱中孵育 15 到 30 min 后拍照。

## 六、Opera 高内涵成像

1. 打开 Opera phenix 仪器，打开电脑以及 Harmony 软件。
2. 将 96 孔板底部用擦镜纸擦干净后置于 Opera phenix 检测舱内。
3. 提前设置仪器检测环境参数 37  $^{\circ}\text{C}$ ，3%  $\text{CO}_2$ ，达到设定条件后再开始检测。
4. 选择 10x 物镜进行成像，软件内选择 Alexa 488 绿色荧光通道和 Hoechst 33342 蓝色荧光通道，并将聚焦高度设置为 2  $\mu\text{m}$ ，曝光时间为 100 min。每孔选择 21 个视野进行成像和统计。
5. 根据拍照效果对聚焦高度和曝光时间调整后拍照并保存。

## 结果与分析

1. 使用 Harmony 软件进行高内涵成像分析

### 1.1 选择实验的 input images:

本方案中选择 Alexa 488 绿色荧光通道和 Hoechst 33342 蓝色荧光通道的成像结果。

### 1.2 Find nuclei:

使用 Hoechst 33342 通道成像结果对细胞核区域“nuclei”进行定义和选择。DNA 甲基化抑制剂 decitabine 对细胞的生长和形态均有影响，并且细胞生长 4 d 后细胞间隙会变小。根据“nuclei”定义的效率以及准确性，选择最合适的分析“method”，如本方案中可选择“method C”。示意图见图 1。

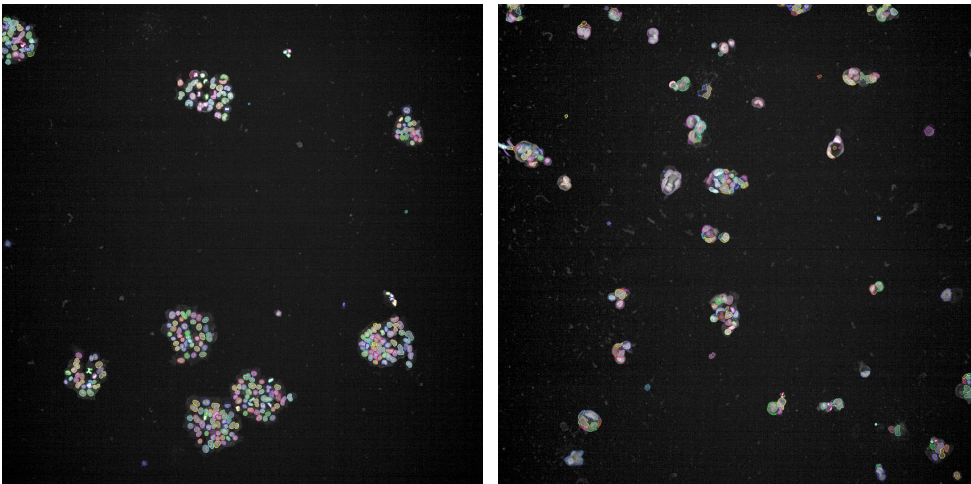


图 1. 定义细胞核 (左图对照组, 右图阳性化合物 decitabine)

### 1.3 Find image region:

使用 Alexa 488 绿色荧光通道的图像定义“GFP region”用于后续抑制剂活性的统计分析。通过设定荧光强度和区域面积的阈值, 尽可能排除假阳性 region 干扰。由于报告细胞生长 4 d 后细胞间隙会变小, “GFP region”以单个细胞为单位的计算准确性低, 因此将相对聚集的细胞群体定义为“GFP region”的单位进行定量。报告细胞系中偶有细胞表达较弱的荧光蛋白背景信号, 可选择在处理化合物之前通过流式细胞分选去除这些细胞, 即可有效降低背景 EGFP 信号。定义“GFP region”示意图见图 2, 左图对照组中的实际荧光强度并不高, 展示的是经过 Harmony 软件增强处理后的图像以方便定义和展示“GFP region”, 后续定量计算采用绝对荧光强度因而不影响最终结果。图中颜色为软件根据荧光信号强度进行拟合之后, 展示的“伪彩”。

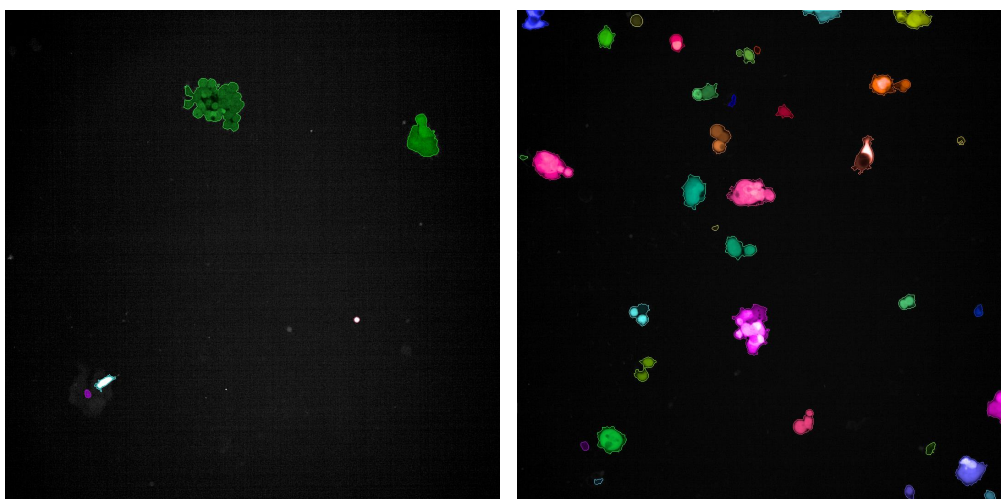


图 2. 定义 GFP region (左图对照组, 右图阳性化合物 decitabine)

#### 1.4 数据分析与输出:

在 Harmony 软件中按以上设定的参数, 分析并输出: 每孔中所有“GFP region”的荧光信号总强度, 以及 nuclei 总数。

计算均值“EGFP intensities per cell”: 即将每孔“GFP region”的荧光信号总强度除以 nuclei 总数。该指标用于衡量 DNA 甲基化抑制剂在细胞中的活性, 可以同时反映抑制剂激活 EGFP 表达的细胞比例以及激活程度。

#### 1.5 GraphPad 软件分析:

在 GraphPad 软件中, 使用“EGFP intensities per cell”及其对应的化合物浓度做图, 并使用非线性回归拟合模型“[Agonist] vs. response -- Variable slope (four parameters)”对曲线进行拟合, 计算化合物的  $EC_{50}$  (Half maximal effective concentration) 以评估其去甲基化效果。

阳性化合物的 response 曲线分析示意图见图 3:  $EC_{50} = 1.88 \mu\text{M}$ ; 非线性回归拟合分析的  $R^2 = 0.99$  表明曲线拟合较好。

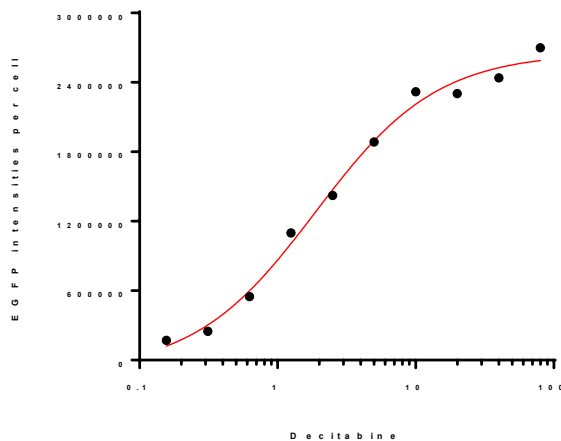


图 3. DNA 甲基化抑制剂的 response 曲线 (横坐标浓度单位为  $\mu\text{M}$ )

### 溶液配方

1. DMEM 培养基: 将以下试剂按比例混匀使用, 89%的 DMEM, 10%的 B1FBS 以及 1%的penicillin-streptomycin 溶液, 保存于  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱, 并于两个月内使用。
2. PDL 溶液: 使用 DPBS 溶液将 Poly-D-Lysine 稀释至  $0.1\text{ mg/ml}$  使用, 可保存于  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱, 并于两个月内使用。
3. Hoechst 33342 工作溶液: 使用 DPBS 溶液将 Hoechst 33342 稀释至终浓度  $5\text{ }\mu\text{g/ml}$ 。现配现用。

### 致谢

感谢中国科学院生物物理研究所蛋白质科学研究平台的设备支持和王娅老师的技术帮助, 以及导师朱冰的指导。该研究项目由以下基金资助: 国家自然科学基金青年科学基金 (项目编号 32000417) 和中国博士后科学基金第 67 批面上资助 (项目编号 2020M670487)。本实验方案所使用报告细胞系 B2-17 此前已在本实验室发表的文章中使用: Li *et al.*, (2018).

## 参考文献

1. Li, X., Shang, E., Dong, Q., Li, Y., Zhang, J., Xu, S., Zhao, Z., Shao, W., Lv, C., Zheng, Y., Wang, H., Lei, X., Zhu, B. and Zhang, Z. (2018). [Small molecules capable of activating DNA methylation-repressed genes targeted by the p38 mitogen-activated protein kinase pathway.](#) *J Biol Chem* 293: 7423-7436