

利用荧光素酶报告系统高通量筛选影响蛋白表达的活性小分子

High Throughput Screening for Active Small Molecules Affecting Protein Expression by Luciferase Reporter System

林德颖*

中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心，上海

*通讯作者邮箱: dylin@ion.ac.cn

引用格式: 林德颖. (2021). 利用荧光素酶报告系统高通量筛选影响蛋白表达的活性小分子. Bio-101 e1010865. Doi: 10.21769/BioProtoc. 1010865.

How to cite: Lin, D. Y. (2021). High Throughput Screening for Active Small Molecules Affecting Protein Expression by Luciferase Reporter System. Bio-101 e1010865. Doi: 10.21769/BioProtoc. 1010865. (in Chinese)

摘要: 荧光素酶 (luciferase) 报告基因系统是一种以荧光素 (luciferin) 为底物来检测荧光素酶活性的报告系统。荧光素酶可以催化底物荧光素形成氧化荧光素，在这个过程中会发出生物荧光 (Gould and Subramani, 1988)。该系统具有灵敏度高，读数结果稳定等优点。相比于荧光蛋白，其结果经多次检测仍能保持稳定，而荧光蛋白经多次激光激发后，荧光强度会减弱。本实验欲筛选能够抑制靶蛋白 A 表达水平的活性小分子，而靶蛋白 A 表达水平很低，敲入荧光蛋白 EGFP 后，未能检测到荧光。因而我们引入荧光素酶报告基因系统，利用 CRISPR/Cas 9 技术将荧光素酶编码序列插入到神经母细胞瘤细胞系 (SH-SY5Y) 靶蛋白 A 编码基因的 3'端。构建好的敲入细胞系将表达靶蛋白 A 与荧光素酶的融合蛋白。敲入细胞系经过活性小分子处理后，加入含荧光素的裂解液，检测荧光值 (luminescence) 即可判断该小分子对靶蛋白 A 表达水平的影响。

关键词: 荧光素酶，敲入细胞系，蛋白表达水平，活性小分子

材料与试剂

1. 384 孔板 (Corning, catalog number: 3765)
2. 96 孔板 (Corning, catalog number: 3879)

3. 15 ml 离心管 (Thermo Scientific Nunc, catalog number: 339650)
4. 50 ml 离心管 (Thermo Scientific Nunc, catalog number: 339652)
5. 10 cm 培养皿 (Thermo Scientific Nunc, catalog number:150466)
6. 野生型 SH-SY5Y 细胞系 (American Type Culture Collection, ATCC)
7. 敲入荧光素酶编码序列的 SH-SY5Y 敲入细胞系 (利用 CRISPR/Cas 9 系统编辑野生型细胞系基因组而获得)
8. ONE-Glo™ Luciferase Assay System (Promega, catalog number: E6130)
9. 0.25% Trypsin-EDTA (Gibco, catalog number: 25200072)
10. FBS (Gibco, catalog number: 10099141)
11. Penicillin/Streptomycin (Hyclone, catalog number: SV30010)
12. PBS (Gibco, catalog number: 10010023)
13. DMEM (Gibco, catalog number: 11965092) (见溶液配方)

仪器设备

1. Multidrop™ Combi 自动分液器 (Thermo Fisher)
2. Bravo 自动化液体处理平台 (Agilent)
3. Envision 多标记微孔板检测仪 (PerkinElmer)
4. 全自动细胞计数仪 (Bodboqe)

实验步骤

1. 向培养于 10 cm 培养皿中的野生型 SH-SY5Y 细胞系和 luciferase 敲入细胞系 (密度约为 90%) 加入 1 ml 0.25% Trypsin-EDTA, 置于 37 °C 培养箱消化 5 min, 再加入等量的 DMEM 培养液终止消化, 用移液枪吹散成单细胞悬液, 400 × g, 室温离心 2 min。
2. 去除包含胰酶的上清液, 加入适量 DMEM 培养液将细胞重悬, 并使用细胞计数仪测量细胞数量。最后将细胞悬液稀释至约 2.86×10^5 个/ml。
3. 使用 Multidrop 自动分液器将细胞铺到 384 孔板中, 每孔 35 μ l (约 10,000 个细胞)。其中, 最左侧两列为野生型 SH-SY5Y 细胞 (阴性对照, 图 1), 其余为基因敲入细胞系。
4. 400 × g, 室温离心 2 min, 辅助细胞贴壁。之后置于 37 °C 培养箱培养。

5. 细胞培养约 18 h 后，使用 Bravo 自动化液体处理平台将待筛选的活性小分子加入 384 孔板中， $400 \times g$ ，室温离心 2 min 后，置于 37°C 培养箱培养。
注：1 μl 体积的 1mM 活性小分子分装在 96 孔板中，使用前需将其解冻，再加入 100 μl DMEM 溶液进行稀释。最终取 3.5 μl 加入到 384 孔板中，终浓度为 10 μM 。另外，一般分装活性小分子的 96 孔板最外侧两列为 DMSO，故最终 384 孔板最左侧及最右侧两列孔中的细胞为 DMSO 处理组。
6. 经活性小分子处理 48 h 后，将 37°C 预热的 ONE-Glo™ 荧光素酶底物原液加入 384 孔板中，每孔 35 μl 。在震动摇床上以 300 rpm 的速度混匀 2 min 后， $400 \times g$ ，室温离心 2 min。
注：若离心后孔内仍有气泡，可去掉 384 孔板的盖子，提高转速，继续离心。
7. 用 Envision 多标记微孔板检测仪检测 luminescence，每孔检测时长为 0.2 s。
8. 根据 luminescence 结果，与对照组 (DMSO 处理组) 进行比较，本实验设定 luminescence 值小于对照组平均值的 50% 即为初筛阳性活性小分子。在进行数据的统计与分析时，需计算对照组各孔 luminescence 值的变异系数 (Coefficient of Variation)。本实验设定，若一块 384 孔板上对照组的变异系数小于 20%，表明这块板上的实验结果较为稳定，可按照“luminescence 值小于对照组平均值的 50%”这一标准去筛选阳性结果；相反，若变异系数大于 20%，则需考虑重做实验，或者放松这一标准 (例如，luminescence 值小于对照组平均值的 60%)，以免错过某些重要的活性小分子。之后，从 96 孔板中将初筛阳性小分子逐一挑出，整合至新的 96 孔板中，进行复筛。
9. 复筛实验流程同初筛。
注：本实验中初筛未设置复孔，复筛设置了 2 个复孔。部分小分子在高浓度下对细胞具有较强毒性，若初筛阳性小分子数量不多，在复筛阶段可增设低浓度组。

结果与分析

本实验中一块 384 孔板经 Envision 多标记微孔板检测仪检测 luminescence 的读数如图 1 所示。1、2 列 (绿色区域) 为野生型 SH-SY5Y 细胞读数结果，即阴性对照；23、24 列 (蓝色区域) 为 DMSO 处理的敲入细胞系读数结果，中间 (3-22 列) 为敲入细胞系经活性小分子处理 48 h 后的读数结果。对照组 (蓝色区域) 读数的平均值为 13,066.91，

标准差为 1316.96，变异系数为 10.08%，对照组平均值的 50%为 6533.45。图中黄色区域读数小于 6533.45，对应的活性小分子即为阳性小分子。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	158	358	11063	11592	12740	14948	11935	12588	12465	12784	13284	7860	14125	12533	12860	13013	13656	12454	13368	12488	13440	13690	13167	14101
B	237	343	14596	11474	12022	11453	12227	11764	11778	11669	11085	11047	11038	13466	12889	13728	13923	13116	16791	14821	17785	14614	14355	13920
C	157	316	11122	7234	13168	867	12443	6100	3051	11402	6518	11913	5754	11207	12186	12888	13409	12671	16034	13068	16013	16187	14538	15483
D	357	399	10158	9780	10275	10496	12512	11077	11544	10840	10027	11439	11481	10317	10775	13383	12658	14770	13720	11241	15285	13099	14756	14518
E	196	352	12122	10637	11986	4672	12079	14425	12261	10924	7601	10674	4837	11412	3752	12305	8331	12899	12686	12374	12868	14402	13622	14167
F	237	435	11195	10837	10879	11464	12330	12579	12228	11872	11890	10560	11208	10515	11761	11420	13994	13684	14047	14123	16042	14499	16478	13841
G	237	397	10755	11966	9885	9266	4927	10616	10238	10965	11080	10223	4523	11081	6717	11329	11820	12660	12220	11416	12607	13773	13238	13054
H	236	437	10602	10761	10332	10212	9783	11726	10487	9083	10885	11325	10501	10642	10618	11197	11232	11628	11108	11390	11628	10658	12017	13059
I	276	477	10441	10607	9725	11252	10526	11156	10725	10769	10963	10795	11482	10998	10316	11596	11388	12149	11787	12347	12301	12462	13255	13575
J	276	476	10962	10886	10373	10088	9999	12086	10080	10529	10640	11403	10872	12037	11756	12032	12028	11869	11750	11824	12581	12381	12612	13579
K	237	358	10445	10129	9612	10019	11290	10878	10610	9754	10976	10521	11045	10960	10639	10676	11758	10914	11035	11388	12392	11380	12304	12421
L	277	359	10125	10453	10102	7571	10257	10326	10238	2340	8555	10177	10008	10205	10646	10361	10636	10795	11036	11721	10547	12274	11704	12152
M	236	399	10168	9970	10129	10422	9886	10732	9889	9878	10701	10169	10130	10810	10802	11641	11873	12639	11476	10423	10961	11752	11634	11032
N	277	478	10126	10366	10769	10003	10724	10402	10569	10408	9403	10214	10009	9922	10167	10440	10760	9794	10738	3161	10784	11035	11033	11437
O	156	559	10124	11330	10760	11078	12318	11270	10638	11807	11649	10364	11003	12404	10708	11200	11555	11339	14437	11522	11827	11510	11632	11753
P	238	482	9765	9844	10764	11239	11426	13318	10839	9322	9728	9769	10284	11109	13320	11188	11786	13915	11087	13828	13703	12065	11790	11914

图 1. Envision 多标记微孔板检测仪检测 luminescence 读数

注意事项

1. 需依据所选用的细胞系生长情况设置 384 孔板中每孔铺细胞的数量、培养液体积以及培养时长。
2. 使用 Multidrop 自动分液器铺细胞前，需用 10% 84 消毒液将分液盒软管消毒，再用灭菌水清洗软管，最后用细胞培养液等渗溶液（如 PBS 或细胞培养液）清洗软管。
3. 若 Multidrop 自动分液器的分液盒使用年限较长，个别孔道出液量明显大于/小于其他孔道，便会影响 384 孔板上对应位置的实验结果，在数据分析时需单独分析。
4. 不少活性小分子对细胞具有较强毒性，处理后导致细胞死亡，造成靶蛋白表达下降的假阳性结果。为了排除这一影响，本实验在复筛过程中设置了复板，所有处理与上述实验流程相同，仅在培养 48 h 后，由加入 ONE-Glo™ 荧光素酶底物改为加入 PrestoBlue™ 细胞活力检测试剂 (Invitrogen, A13261) 进行染色，通过检测其荧光值来判断细胞活性。

溶液配方

1. DMEM 培养液
DMEM 94%

FBS 5%
Penicillin/Streptomycin 1%

致谢

感谢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的兰姝珏老师与慈云青老师在实验过程中提供的指导与帮助。

参考文献

1. Gould, S. J. and Subramani, S. (1988). [Firefly luciferase as a tool in molecular and cell biology](#). *Anal Biochem* 175(1): 5-13.