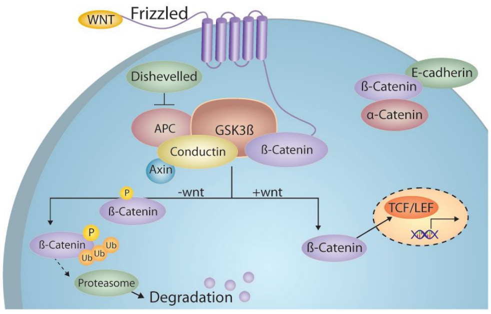
ß –Catenin 的核转位筛选实验

优点



- *可重复性表型检测*
- *既高通量又不牺牲质量的图像获取*
- *应用交互式预览，大大减少分析设置时间*
- *统一的统计方法使结果更准确*

躁郁症（BD）是一种高度遗传性的心理疾病，它影响到全球大概 1%的人口。1949 年锂被第一次应用于躁郁症，到目前为止锂仍是治疗 BD 的主要药物。然而在一半的病例中，锂并不能起到很好的治疗效果，同时此药的毒性和副作用也值得关注。

目前为止人们对于锂的治疗机制还未完全了解，已知锂会阻断糖原合成酶激酶 3 (GSK-3) 的活性并激活 Wnt 信号通路，后者直接或者间接地减少蛋白酶对ß-catenin 的降解。我们可以利用 Wnt/ß-catenin 信号通路中新的蛋白以及药理学调节分子对ß-catenin 的阻断作用来鉴别这些蛋白，这种方法是通过检测残留在细胞中的ß-catenin 量来达到的。

可以通过高效系统的成像技术使这种定量技术变得简单，从而进一步提高检测和分析的质量。为了有助于这一研究，利用 Molecular Devices 公司的高内涵成像系统基于细胞水平的检测技术，我们已经建立了包含 1856 种新蛋白的库，这使我们能准确的通过 wnt 信号通路的影响程度来检测细胞核中ß-catenin 的量。

终点法高通量实验流程

U2OS 细胞可以表达融合了绿色荧光蛋白（EGFP）的人源ß-catenin，我们在 384 孔板中每孔加入 1500 个细胞。细胞 37 度培养 48 小时后，加入库中筛选的蛋白。细胞继续培养 24h 然后用含 5μg/mL Hoechst 33342 DNA 染料的 4%多聚甲醛进行固定染核。在此基础上，我们对库中的活性蛋白进行了进一步的筛选，结果后面会显示。

获取大量细胞数据进行统计分析

ImageXpress® Micro Widefield System 可以对目标进行高通量成像测定。采用 10 倍物镜双波长光分别检测 EGFP 荧光和 Hoechst 核染料，每孔检测 4 个位点。在每个视野中捕获到放大 10 倍超过 1000 个细胞的数据，而且还可以持续的保持这种高质量的分析结果。

鉴定对化合物刺激的表型变化

由于蛋白酶持续的降解ß-catenin，在正常表达ß-catenin-EGFP 的细胞系的胞质和胞核中

我们无法观测到绿色荧光。在这种情况下我们仅能在与残留的钙粘素作用的胞膜上观察到微弱的信号（图 2，左）。如果抑制了 Wnt 信号通路（例如用 GSK-3ß抑制剂），在核中就会根据所用抑制剂的剂量积累对应的ß-catenin-EGFP （图 2，右）。

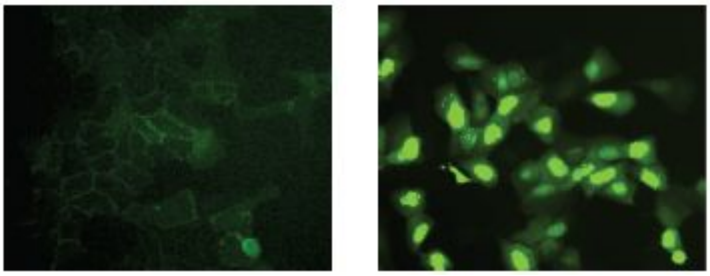


图 2 所示图像由 10 倍物镜获得。正常表达 Wnt 蛋白，EGFP 模糊可见分散在细胞膜上，并没有在细胞核中积累（左）。GSK-3ß处理后，EGFP 荧光转移到核中（右）。

利用交互式的灵活的软件分析数据

MetaXpress® 软件中的 Translocation-Enhanced 应用模块可以被用来鉴定核中以及定量与细胞核相关的其余部分中ß-catenin-EGFP 的量（图 3）。对细胞核区间的划分来源于被 Hoechst 核染料染色的区域。然后用第二种波长的光（EGFP）将细胞划分出新的区间，这一区间的大小和宽度可以满足特异性的检测。这保证了每个区间都有足够的绿色荧光强度，如细胞核，细胞质和细胞膜都可以进行定量分析。交互式模块随着参数的调整可以及时的反馈信息，这也使我们能对每个特定的检测结果进行准确分析。

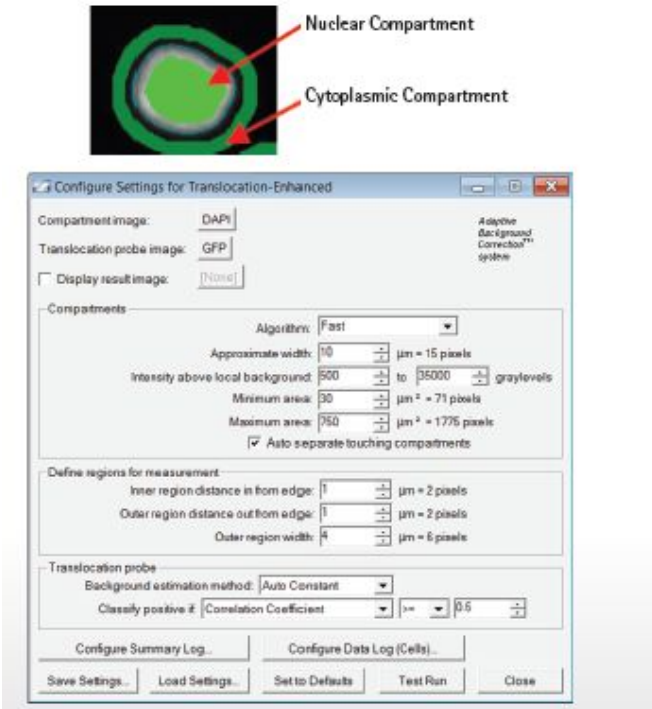


图 3 应用 Translocation-Enhanced 分析模块，根据核染色确定核区域及细胞质区域（上）。MetaXpress 软件支持自由调整设置参数，从而精确圈定出各组分的范围，通过评分得到阳性或阴性结果（下）。

MetaXpress®软件的 Translocation-Enhanced 应用模块可以通过一系列的算法将细胞的计分标准规范化。除了检测特定细胞区域所有检测波长下每个细胞和图像的平均以及总体的荧光强度，系统还可以从整个细胞区域中两种染料的荧光强度计算出皮尔森相关系数。系数的范围从-1（负相关）到 1（完全相关）。在这个例子中，可以看到核与ß-catenin-EGFP 高度相关（图 4）。随后，通过计算核区域和胞质平均荧光强度的比率可以得到剂量效应曲线（图 5）。检测结果的稳定性可以通过计算 z 值来评估。

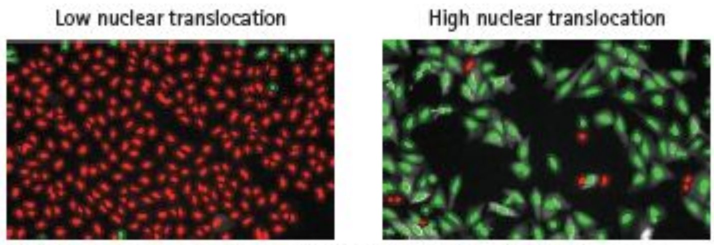


Figure 4. Segmentation masks created in MetaXpress Software for DMSO-treated negative control (left) and treated, MG132 positive control (right) conditions using the Translocation-Enhanced Application Module. In the images above, cells were scored positive (green) if they received a Pearson's correlation coefficient of 0.5 or above and negative (red) if below 0.5.

图 4 应用 Translocation-Enhanced 分析模块，DMSO 处理的阴性对照和 MG132 处理的阳性对照依据转位情况产生蒙板，若计算出的皮尔斯系数大于 0.5 被记为阳性，图中显示为绿色，若小于 0.5 则为阴性，显示为红色。

高通量方法检测蛋白转位

这种通过检测待测化合物影响相关信号通路从而干扰ß-catenin 运输的技术仅仅是高效检测细胞间运输情况的一个特例。即使低倍率放大，也可得到高质量图片的技术，可以从统计意义上对相关化合物进行准确的测定。将细胞水平上的报告基因检测技术和 Molecular Devices 提供的高通量筛选技术结合在一起，实验者就可以完美解决细胞不同区域间的蛋白运输活动的测定。

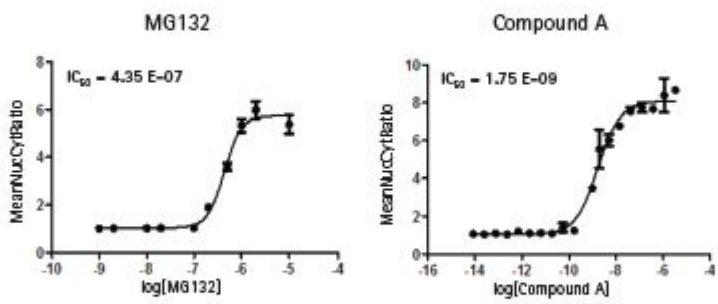


图 5 浓度相关曲线如图所示，左为阳性化合物 MG132，右为样品化合物 A。根据细胞核和细胞质的平均荧光强度比值得出 IC50。阳性化合物的 Z 值大于 0.7 说明实验重复性好。