

ClonePix 技术快速筛选和开发

高表达 GPCR 的哺乳细胞系



ClonePix™ 2 系统提供了一种全新、快速评估哺乳细胞系 GPCR 靶蛋白表达水平的方法

- 用哺乳表达系统快速评估 GPCR 靶蛋白的内源表达水平
- 增加发现最优细胞反应器的可能性
- 减少细胞系/抗体开发的时间—避免有限稀释法

背景

哺乳细胞 GPCRs 的内源表达通常是非常低的，一般不超过 3,000 拷贝/细胞。这些内源表达水平足够维护正常的受体功能，但在 GPCR 药物发现的应用存在挑战。大部分的筛选试验要求更高浓度的功能 GPCRs 呈现在细胞表面。例如，结构的研究，小分子药物设计和天然 GPCR 的功能抗体生产均需要 GPCR 表达水平是内源表达水平的几个数量级。在“低等”生物中尝试建立表达系统取得的成功非常有限，由于细菌的无效折叠；酵母的低产和杆状病毒不正确的翻译后修饰。这些挑战激发了药物发现应用中高表达 GPCR 蛋白哺乳细胞系的市场需求。

关于细胞系的开发，从转染细胞库中发现和筛选高表达 GPCR 克隆是非常有挑战的。ClonePix 技术是已被证明的，一步法快速筛选大量异源细胞（3 周 10,000 个克隆）。由于极大容量的细胞库能够被筛选，大大增加了发现最优细胞生产器的可能性。利用白光和荧光的原位成像技术，ClonePix 2 系统具有足够的灵敏性能够检测细胞表面有限表达的内源性蛋白。

方法

表达内源 G 蛋白偶联毒草碱 1 胆碱受体 (GPCR-M1) 的转染细胞系 CHO-M1 被选择来演示 ClonePix2 系统检测细胞表面表达蛋白的可行性。CHO-M1 表达克隆用 PE 标记的抗-M1 的抗体来筛选，ClonePix2 基于荧光强度选择和挑选细胞。野生型的 CHO-K1 细胞系作为阴性对照。客观评价细胞生长及无标记技术的 CloneSelect Imager 系统，用来监控 ClonePix2 系统挑选细胞的增殖。FLIPR Tetra 高通量细胞筛选系统和 FLIPR Calcium 6 试剂盒用来验证 ClonePix2 系统分离细胞克隆的功能。FLIPR Tetra 系统使用钙敏感荧光报告染料进行高通量功能细胞测定，是药物发现研究中评估 GPCR 激活引起的胞内钙反应的首选工具。

材料

- 细胞系：CHO-M1 细胞系，表达内源 G 蛋白偶联毒草碱 1 胆碱受体 (ATCC,M1)

WT3-CRL1985)。亲本 CHO-K1 细胞用作阴性对照。

- 抗体：兔抗 ChRM1-PE 标记，多抗 (Bioss, Cat.#ABIN668656)；兔抗-CHRM1 多抗，无标记；(Bioss, Cat.#bs-1150R)；山羊抗兔 IgG-PE 标记，多抗 (Life Technologies, Cat.#P2771MP)。
- 培养基：Ham's F12 培养基 (Corning cellgro, Cat.#10-080-CV)；CloneMedia-CHO-S (Molecular Devices,Cat. #K8710)；Fetal Bovine Serum (Hyclone, Cat.#SH30071.03), 1% Pen/Strep/Glutamine (Life Technologies,Cat. #10378016), 450 µg/mL Geneticin, G418 (LifeTechnologies, Cat. #10131035)。
- 反应缓冲液：10X HBSS (Life Technologies, Cat.#14065056) 无菌水稀释，注射用。(Irvine Scientific, Cat. #9309), 20 mM HEPES (Life Technologies, Cat. #15630080). pH 调整到 7.4。
- FLIPR® Calcium 6 Assay Kits (Molecular Devices, Cat.#R8190)。
- 微孔板：6-well non-TC treated, clear-bottom plates (Greiner Bio-One, Cat. #657185)；384-well black-wall, sterile,TC-treated, clear-bottom plates (Corning, Cat. #3072)。
- M1 AChR agonist: Carbamoylcholine chloride or Carbachol(Sigma, Cat. #C4382)。

仪器概述

ClonePix 2 系统

- 筛选和挑取哺乳细胞克隆的自动化系统
- 白光和荧光成像
- 透射光支持低对比度克隆如单层贴壁细胞成像
- 软件控制 5 对激发/发射滤光片的切换
- 用户自定义标准进行克隆排序
- 目标克隆识别和挑取到 96 孔目标板
- 支持悬浮和贴壁细胞的多种应用
 - 筛选和挑取分泌抗原特异性抗体的杂交瘤细胞
 - 细胞系开发

CloneSelect Imager

- 无标记的白光细胞成像技术
- 客观、定量评价细胞生长
- 简单、容易使用的软件界面
- 准确获取 96 孔板每个孔细胞的生长率
- 支持多种应用：
 - 监控细胞生长
 - 单克隆验证

FLIPR Tetra 系统

- 标准 EMCCD 荧光检测或可选 ICCD 荧光和化学发光检测
- 用户可配置 96-、384-、和 1536 孔板
- 用户可更换的悬浮细胞选项
- 独特的，可配置激发光学拓展了荧光种类的应用
- 直观、容易使用的软件界面
- TetraCycler 内置的抓板器可增加系统的通量

半固体培养基培养细胞

CHO-M1 和 CHO-K1 细胞系: CHO-M1 和亲本 CHO-K1 细胞种在 CloneMedia CHO(K8710) 培养基中, 每孔 1000 个细胞, 37°C 培养 8-10 天直到离散克隆形成。新传代的细胞和前几代的细胞分别种在培养基中, 观察 M1 GPCR 的不同表达水平。

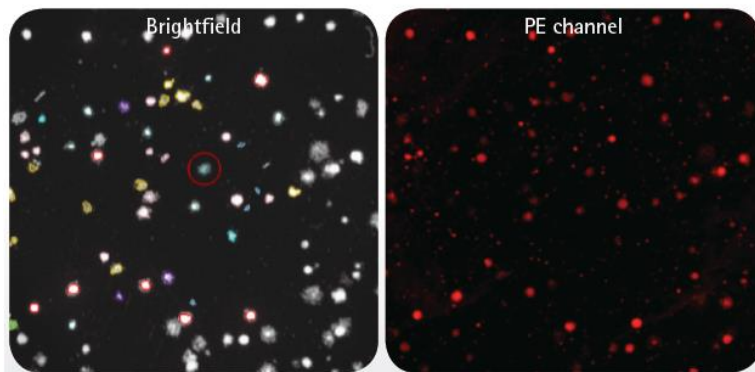
直接标记的方法: PE 标记的 CHRM1 抗体随细胞直接加到半固体培养基中。对照孔包括细胞但是没有抗体。

双抗体方法: 直接标记的方法没有效果的时候, 用一抗和二抗测试可行性。非标记的 rabbit anti-muscarinic 抗体和 PE 标记的抗兔多克隆二抗随细胞直接加到半固体培养基中。对照孔包含细胞但没有抗体, 连同仅仅含有二抗的对照孔。

ClonePix2 系统成像和挑取表达 GPCR(M1)的细胞克隆

ClonePix2 成像和挑取阳性 (CHO-M1) 和阴性 (CHO-K1) 细胞。明场成像识别每个克隆的位置和形态, 荧光成像识别高表达的 M1。对 PE 标记的抗体, 使用 Cy5 通道曝光 6,000ms。无论是直接标记方法还是双抗体方法, 根据 ClonePix2 的记录, CHO-M1 阳性细胞产生大范围的荧光信号。图 1 显示了 M1 GPCR 不同程度的表达。正如预期, 亲本 CHO-K1 细胞没有产生荧光信号。

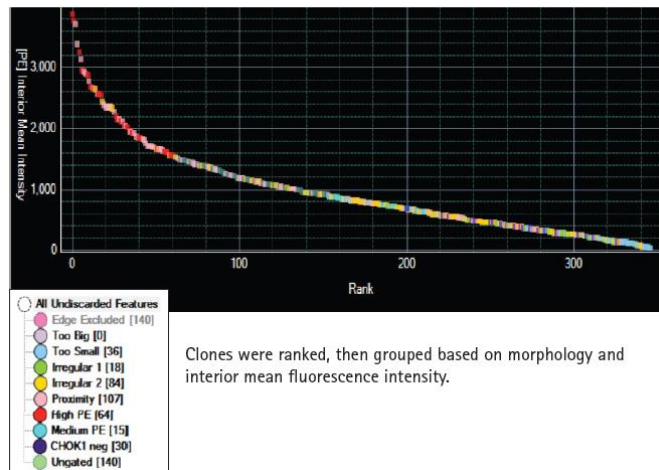
Figure 1. Detection of CHO-M1 cells on ClonePix 2 System



The ClonePix 2 System reveals diverse levels of fluorescent intensity with CHO-M1 cell line, demonstrating it can distinguish between various levels of expression of GPCR M1 protein. Colonies recognized by the software are outlined in color under the brightfield channel. Fluorescence intensity is calculated based on the physical location of colonies.

细胞基于形态和荧光强度被分组。挑取克隆的形态基于大小、形状和克隆之间的邻近度。形态学理想的克隆根据内部荧光强度排名, 并设门分为四个荧光组: 高、中、CHO-K1 阴性和 ungated (图 2)。CHO-K1 阴性组被定义为背景荧光信号。所有的克隆识别对应于阴性对照孔。Ungated 克隆是指低荧光信号但高于背景荧光信号的克隆。

Figure 2. Fluorescent ranking of CHO-M1 expression



Clones were ranked, then grouped based on morphology and interior mean fluorescence intensity.

直接标记抗体和双抗体的方法（图 3）显示了阳性样品（表达 M1）的荧光信号和无荧光信号的亲本细胞系（图 4）。正如预期，由于一抗和二抗结合，双抗体的方法在 PE 通道产生了更高的背景信号。然而 ClonePix2 在明场检测细胞，然后再看细胞克隆内的荧光信号。在 PE 通道中识别到但在明场识别不到的物体不被当做是克隆。因此，ClonePix2 系统好处是具有从背景信号中区分真实克隆的能力。

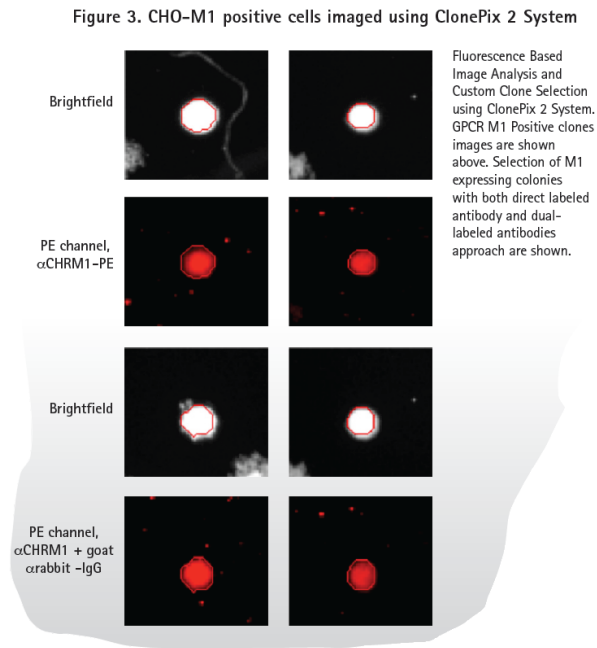
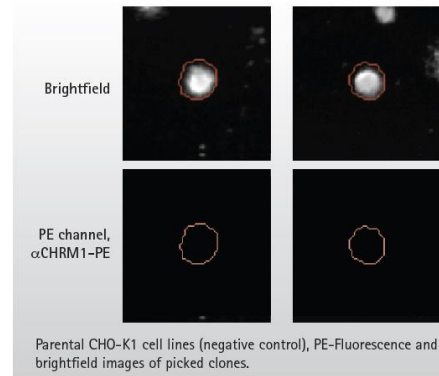
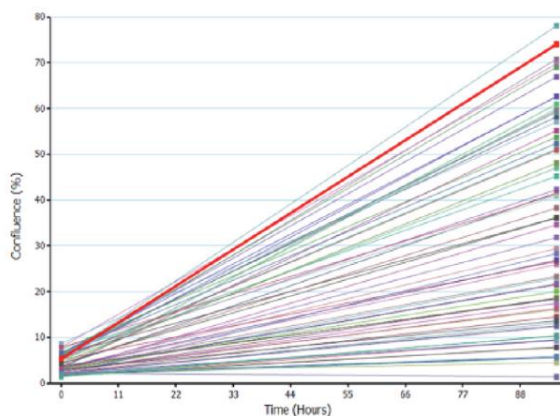


Figure 4. CHO-M1 negative cells



ClonePix2 系统挑取的克隆 CHO-M1 储存到含 200 μ L Ham's F12 media+10%FBS+G418 的 96 孔 Greiner 板，而 CHO-K1 克隆储存到同样的微孔板但不包括 G418。这些 96 孔板在 CloneSelect Imager 系统中成像确认细胞的转移和生长（图 5）。细胞培养一周后再使用 CloneSelect Imager 分析确保细胞已经增殖（图 5 和 6）。细胞随后转移到 384 孔板，用 FLIPR Tetra 系统和钙 6 试剂进行功能确认。

Figure 5. Growth curve of CHO-M1 cells



Growth curve generation by CloneSelect Imager demonstrating proliferation of picked cells.

Figure 6. Cells imaged with CloneSelect Imager

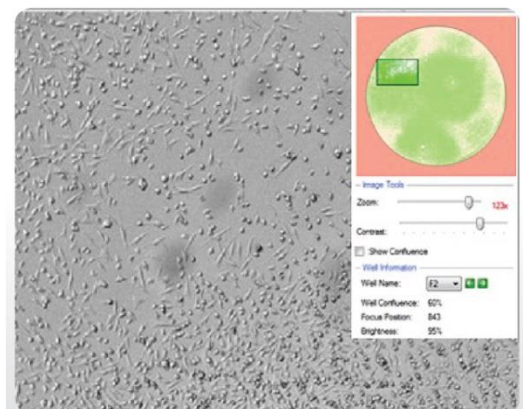


Image of CHO-M1 cells acquired on CloneSelect Imager. Confluence is automatically calculated by software.

FLIPR Tetra 系统验证 ClonePix2 挑取细胞的 M1 GPCR 表达

细胞准备

ClonePix2 系统挑取的细胞种到 384 孔，每孔 25 μ L 培养基，5,000 个细胞，37°C,95%湿度和 5%CO₂ 过夜培养。这些细胞分选为四个组：高、中、低和 no M1 表达。

加入钙敏感荧光染料

从培养箱中取出细胞培养板，室温平衡。25 μ L 的 FLIPR Calcium 6 染料直接加入含培养基的细胞板。这些板孔中加入 2.5Mm 的丙磺舒阻止有机离子转运，37°C 孵育 2 小时。室温保持直到荧光读数。

FLIPR Tetra 荧光成像读板仪

孵育和室温平衡后，放一块板到 FLIPR 系统中，FLIPR 系统 ICCD 相机捕获荧光钙信号，成像参数如下：

曝光 (sec)	0.53
激发 LED(nm)	470-495
发射滤光片(nm)	515-575
LED 强度(%)	80%

FLIPR 钙 6 试剂盒

每秒荧光读数，分别在加 Carbachol 之前读 10 个点，加 40nm 的 Carbachol 之后读 60 点。Carbachol 的起始浓度是终浓度的 5 倍。Carbachol 的加入体积是 12.5 μ L，分液速度是 20 μ L/sec.

FLIPR Calcium 6 试剂盒验证挑好的 CHO-M1 和 CHO-K1 细胞克隆

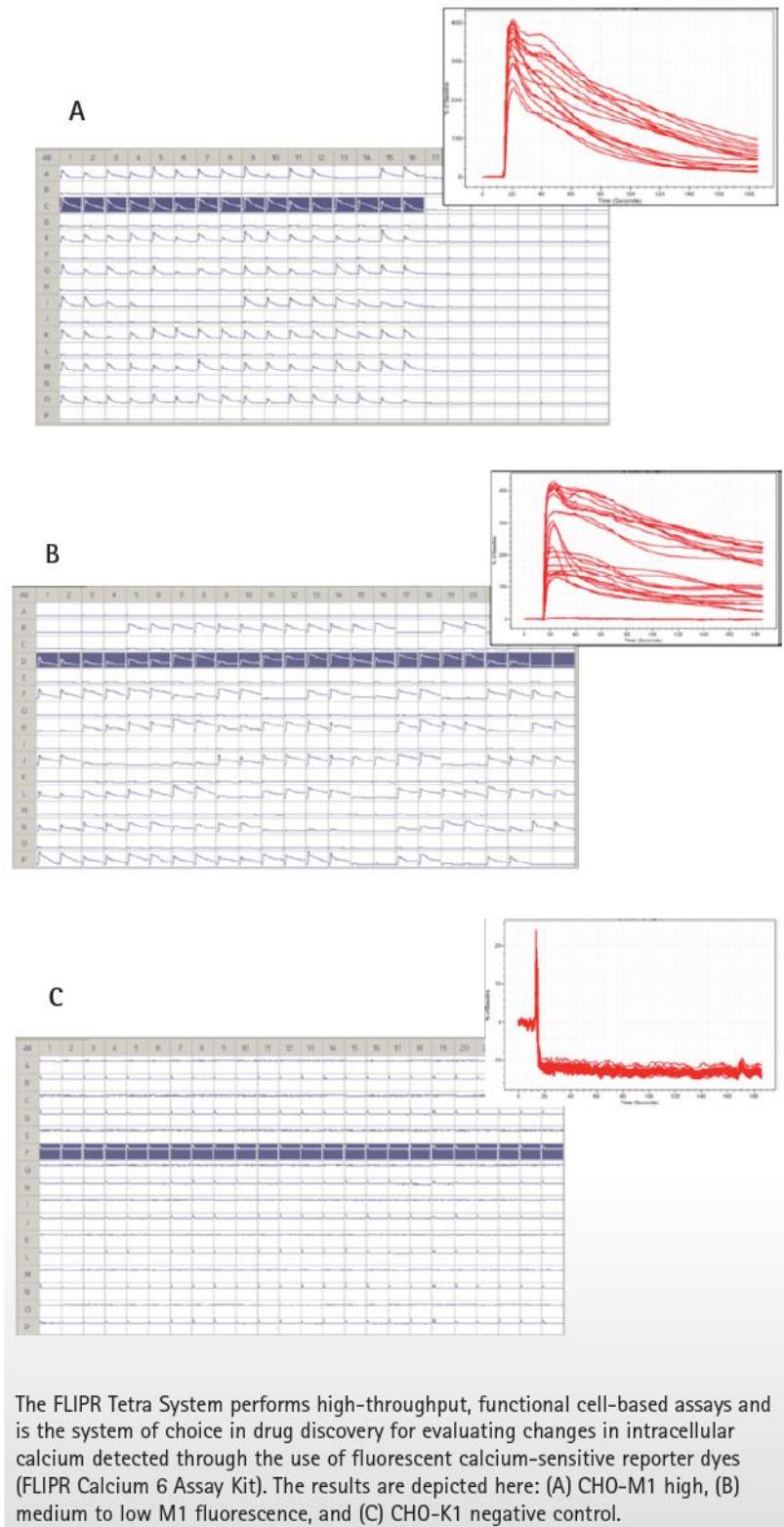
膜结合 G 蛋白偶联毒草碱受体表达水平用标记 PE 的抗 M1 最新传代细胞和初始的 CHO-M1 细胞，预期的结果是初始的 CHO-M1 细胞 M1 GPCR 的表达水平将大大低于最新传代的细胞。亲本的 CHO-K1 细胞作为阴性对照。

受配体 GPCR 的激活，受体构象的改变触发胞内 G 蛋白的激活。活化的 G 蛋白具有诱导胞内的不同信使包括钙信使的潜能。

ClonePix2 系统挑取的不同组细胞用 FLIPR Tetra 系统来评价功能活性。在 40nM 的 Carbachol 条件下，钙敏感荧光染料 (FLIPR Calcium 6 Assays kit, Molecular Devices) 用来评估胞浆中钙离子随着激活的 G 蛋白偶联 IP3 敏感通路的变化而变化的可行性研究。历史数据表明，40nM Carbachol 是 EC80 的浓度。

在高荧光的 CHO-M1 细胞克隆中，相对背景，Carbachol 产生了增加 4 倍的荧光读数 (图 7A)。在混合中和低荧光的 CHO-M1 细胞克隆中，Carbachol 分别产生了 4 倍到 2 倍的荧光读数增加 (图 7B)。最后阴性对照的 CHO-K1 细胞，Carbachol 没有引起荧光读数的任何变化 (图 7C)。由于每组细胞，除了中和低表达荧光的混合细胞，是分别种在不同的 384 孔板中，在加入 40nM 的 Carbachol 之前，每孔基线荧光强度的变化都进行了背景荧光的均一化。

Figure 7. Analysis on FLIPR Tetra System



这些结果支持了在膜结合 G 蛋白偶联毒草碱受体表达水平和功能活性之间的正相关性。缺乏荧光信号的 CHO-K1 细胞阴性对照进一步确认了 ClonePix2 系统能准确区分表面表达 M1 GPCR 的细胞和表面没有表达 M1 GPCR 的细胞。

总结

为了满足高通量筛选和选择性需求分析，GPCR 转染细胞系是细胞功能试验强有力、独特和规范的研究平台。本文的结论是初步的研究揭示了 ClonePix2 系统能可靠地检测 GPCR 不同表达水平的细胞克隆。而且，荧光强度和 FLIPR Tetra 系统测定的 GPCR 介导的胞浆内钙离子水平的变化呈现正关联，这些钙离子的变化恰恰膜结合 G 蛋白偶联毒草碱受体 M1 表达差异导致的。

ClonePix2 系统能够有效用于检测和挑取不同 GPCR 表达水平的细胞克隆，因此为需要高质量 GPCR 蛋白的各种应用提供了唯一的资源，这些应用包括（1）使用高表达天然表位的抗原生产相应的抗体；（2）表达 GPCRs 困难的特殊 GPCR 家族的细胞功能分析。