

利用 SpectraMax Paradigm 多功能检测平台同时进行细胞凋亡和细胞坏死的筛选工作

简介:

细胞凋亡和细胞坏死的本质均为细胞死亡,但我们可以通过其发生机制和病理形态学方面所表现出的特征加以区别。细胞凋亡指的是细胞程序性的死亡,不会发生细胞膜损伤,细胞坏死则被认为是因病理而产生的被动死亡,会伴随发生细胞膜损伤,导致细胞质因子的释放并引起炎症反应。进行抗肿瘤药物筛选过程中,区分引起的是细胞凋亡和细胞坏死变得非常重要,因为后者的主要副作用是引起细胞的炎症反应。这里我们介绍了利用 SeptraMax Paradigm (Molecular Devices) 和 Vybrant 凋亡检测试剂盒 (Invitrogen) 进行这方面的研究。

试验描述:

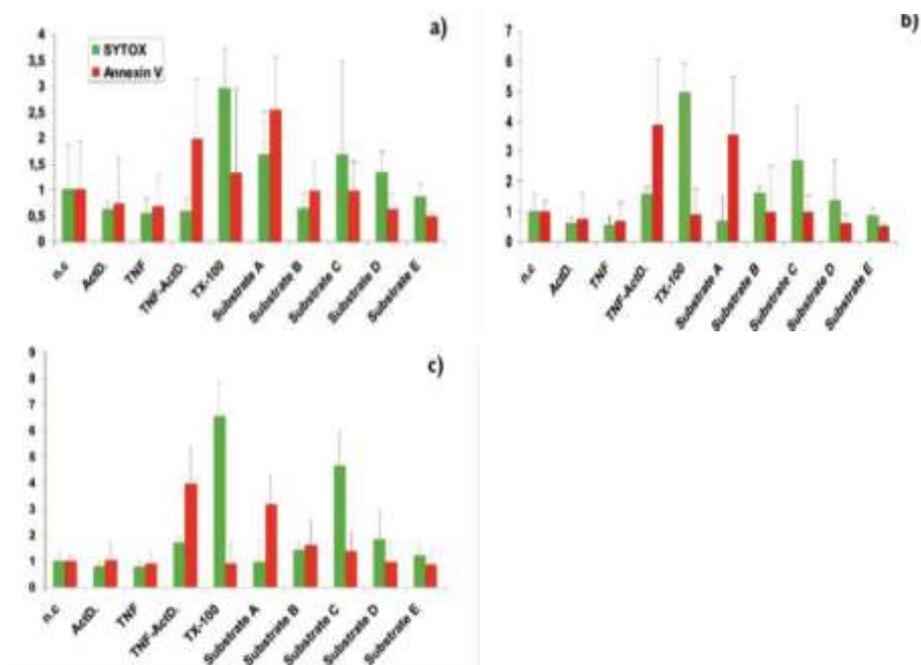
Vybrant 细胞凋亡检测试剂盒是基于 Annexin V 和 Sytox Green 两种标记物的基础上开发出的,可以快速和简便的区分肿瘤细胞的凋亡和坏死情况, Annexin V 一种人类血管抗凝剂,标记有藻红蛋白 (R-PE) 后通常用来检测凋亡细胞的发生,其工作原理是正常细胞中,磷脂酰丝氨酸只分布在细胞膜脂质双分子层的内侧,当细胞发生凋亡早期,膜磷脂酰丝氨酸 (PS) 由脂膜内侧翻向外侧, Annexin V 是一种磷脂结合蛋白,与磷脂酰丝氨酸具有高度的亲和力。相反, Sytox Green 染料不能渗透进入活细胞和凋亡细胞,但可以进入坏死细胞并对其细胞核进行染色,发出很强的绿色荧光。我们提前将肿瘤细胞种在 384 孔板中,然后分别使用肿瘤坏死因子 (TNF) 和更生霉素 (Actinomycin-D) 来诱导细胞凋亡,使用聚乙二醇辛基苯基醚 (Triton X-100) 诱导细胞坏死。此外,我们可通过检测细胞组织表达的不同物质其抗肿瘤特性和分化特性来区分细胞凋亡和细胞坏死。

使用不同的检测方法检测肿瘤细胞的凋亡及坏死

SpectraMax Paradigm 是美国 Molecular Devices 公司推出的一种全新概念的多功能检测平台 (如图一)。它将光源系统和检测系统独立分开,多套检测器同时固定在主机上,针对不同实验要求选用不同的卡盒,每一种卡盒其实就是独立的光路系统,可以提高了检测针对性和灵敏性。针对此试验特点,如仪器具有能够同时检测 Annexin V 和 Sytox Green 两种标记物发射荧光强度话可大大提高检测的效率 (如图二),而 Paradigm 所具有的双通道检测器可同时工作,非常适合此类试验要求。



图一: SpectraMax Paradigm 多功能检测平台



图二. 1:HepG2 细胞提前 24 小时种在平底的 384 孔板中, 这些孔中的一部分细胞未经任何处理, 而另一部分细胞试验前 18 小时分别用 TNF(25ng/ml)、 Actinomycin-D (1ug/ml) 和 Triton X-100(0.1%)孵育, 然后去除微孔板中培养基, 将两种标记物分子溶解在缓冲液中, 37 度孵育 20 分钟。染色后, 分别使用 SpectraMax Paradigm 多功能检测平台的 single-point(1a)、on-the-fly(1b)和 area-scan(1c)模式检测结果, 每个柱高度代表着平均荧光强度值 (RFU) 和 5 个重复孔的标准偏差。可以看出扫描孔内面积越大, 得出结果就会更加的精确, 尤其适合像肿瘤细胞的这种单层不均一类型细胞的检测试验。

结论

综上所述我们可以发现, SpectraMax Paradigm 是基于细胞学应用的理想检测平台, 如使用 Vybrant 细胞凋亡检测试剂盒所呈现的结果中发现, 孔内细胞层的变化非常快速而且对整个试验结果的影响较大, Paradigm 所具有的“On-the-fly”数据收集模式可以很好的解决此问题。高速的双发射检测器可针对每个孔测量的多数据点画出线性图, 从而得到一个更大测量区域的数值, 将会得出更好的数据统计结果。当使用“area scan”功能后可以进一步提高基于细胞学应用试验数据的质量。此外, 此款仪器所具有的双通道同时检测的功能可以大大缩短检测时间, 提高工作的效率。

致谢

非常感谢奥地利克雷姆斯高等专业学院医药生物技术部门所提供的研究数据。