

APPLICATION NOTE

使用ImageXpress Pico自动细胞成像系统进行细胞表型的多参数评估

Matthew Hammer and Oksana Sirenko, PhD | Application Scientist | Molecular Devices

简介

自动细胞成像是一种分析化合物对包括细胞形态、活力和标志物表达在内的细胞表型的影响的有效方法。这里，我们将展示ImageXpress® Pico自动细胞成像系统和CellReporterXpress自动成像分析软件如何应用于化合物影响的表型分析。成像和分析方法可提供工具来鉴定细胞活力，细胞形态，细胞黏附和伸展，细胞骨架完整性和线粒体膜电位等多种参数。

材料

- HeLa细胞 (ATCC P/N: CCL-2)
- HeLa 培养基
 - DMEM: CellGro, with L-谷氨酰胺 (Corning)
 - 10% FBS (BenchMark™; Gemini P/N 100-106)
 - 1% penicillin/streptomycin
- Staurosporine (Sigma P/N S5921)
- Mitomycin C (Sigma P/N M4287)
- Paclitaxel (Sigma P/N T7402)
- Etoposide (Sigma P/N E1383)
- Doxorubicin (Sigma P/N D1515)
- Calcein AM
- EarlyTox Live Cell Assay Kit (Explorer Kit, Molecular Devices P/N R8342)
- Hoechst 33342 (Thermo Fisher, Carlsbad, CA P/N H3570)
- MitoTracker Orange cMTMRos (Thermo Fisher, Carlsbad, CA, M7510)

方法

为了检测化合物对细胞表型的影响，用已知的抑制细胞增殖且诱导细胞死亡的药物处理 HeLa 细胞。以 2000 细胞每孔的密度将 HeLa 细胞铺在 384 孔黑壁底透微孔板中，每孔 25 微升体积的培养基，并孵育在 37 度，5% CO₂ 环境中 24 小时。然后用梯度稀释的化合物 staurosporine, mitomycin, paclitaxel, etoposide 和 doxorubicin 处理细胞 72 小时，每处理 3 或 4 个重复。72 小时药物处理后，使用以下染料的对细胞进行染色：核染料 Hoechst 33342，活力染料 Calcein AM，还有使用 MitoTracker Orange™ CMTMRos 试剂来检测线粒体完好膜的电位 (MMP)。向培养基中直接加入 2x 染色溶液。所有孔中染料终浓度为：3 μM Hoechst 33342，0.2 μM MitoTracker Orange CMTMRos，还有 1 μM Calcein AM。细胞与染料溶液在 37 度，5% CO₂ 环境一起孵育 30 分钟。

优点

- 通过了解采集多个细胞表型了解自动化成像的效率
- 使用预设分析模块来得到数字化的结果
- 评估药物处理后的一系列形态变化

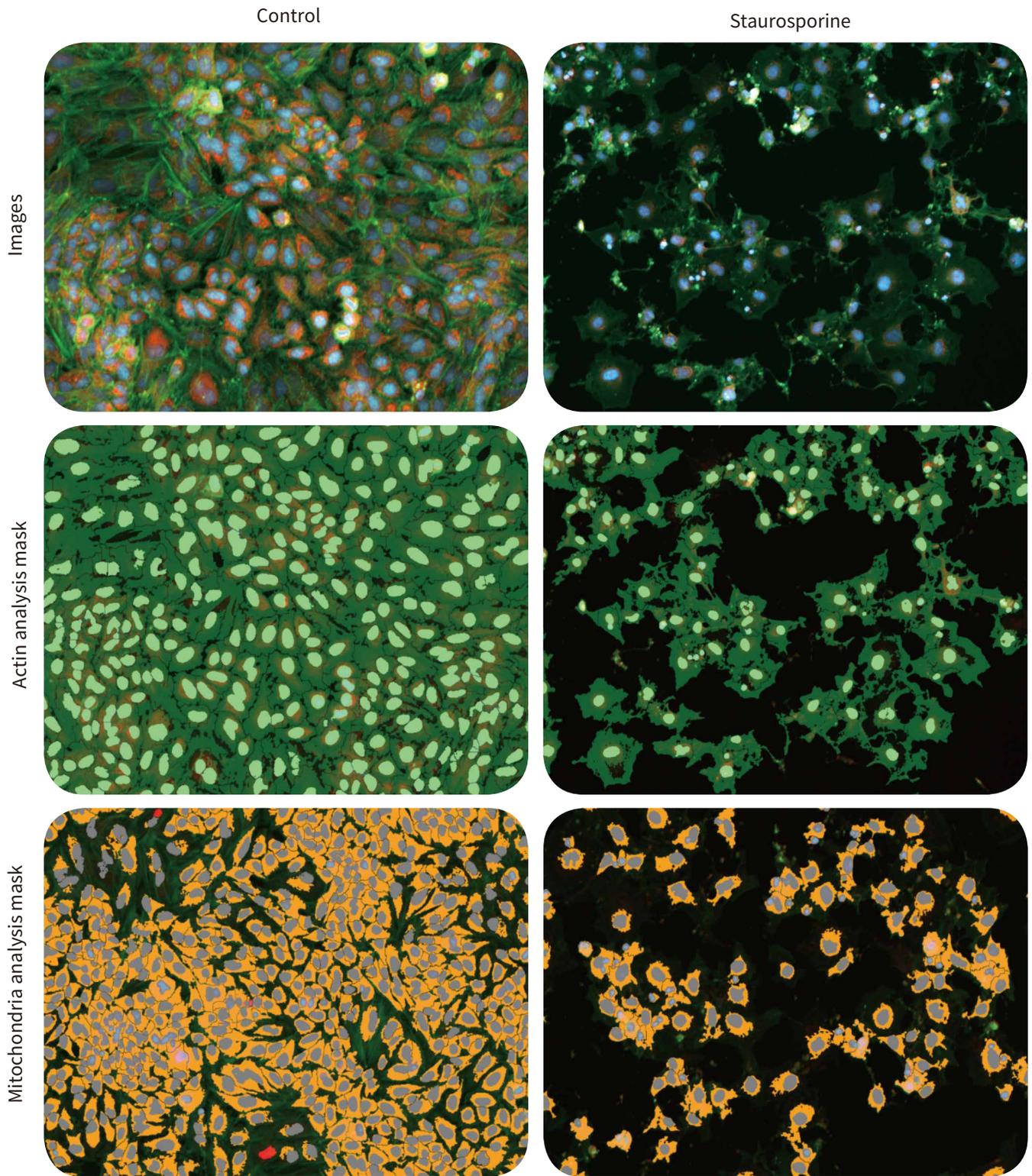


图 1: 多参数分析细胞活力和形态学的图像和分析图例。用多种药物处理 HeLa 细胞 72 小时然后, 使用核染料 (Hoechst 33342), Actin 细胞骨架染料 (AlexaFluor 488 (AF488) 标记的鬼笔环肽) 还有线粒体染料 (MitoTracker Orange CMTMRos) 染色。代表性的图像和分析图例展示了对照细胞和 0.1 μM staurosporine 处理后的细胞的对比。细胞使用 ImageXpress Pico 系统的 DAPI, FITC 和 TRITC 通道和 10x Plan Fluor 物镜拍摄。图像 (上) 标记了细胞核 (蓝色), actin 细胞骨架 (绿色), 还有线粒体 (桔色)。图像使用 CellReporterXpress 软件中为了定量鬼笔环肽阳性细胞 (中) 和 MitoTracker Orange 阳性细胞 (下) 而优化的 Cell Scoring 分析模块进行分析。分析结果图例如图所示 (浅绿 = actin-阳性的核, 深绿 = actin细胞骨架, 蓝色 = 线粒体-阳性核, 红色 = 线粒体-阴性核, 桔色 = 完整线粒体)。

细胞可实时分别使用 DAPI, FITC 还有 TRITC 通道对 Hoechst, Calcein AM 还有 MitoTracker Orange 染色进行成像。用 10x 物镜来拍摄每孔中一个视野的图像为单独一张图像。曝光时间设为 DAPI 通道 20 ms, FITC 通道 10 ms, TRITC 通道 200 ms。细胞也可以固定后以后成像或进一步染色额外细胞标志物。注意: Calcein AM 用来评估活细胞且固定以后检测不到 (数据未展示)。MitoTracker Orange 和 Hoechst 33342 染色固定后是稳定的。

为鉴定 actin 细胞骨架完整性, 进而将细胞固定。Mitotracker Orange 和 Hoechst 33342 染色后, 使用 4% 甲醛溶液固定细胞然后用 PBS 洗两遍。而后用 DPBS + 0.01% saponin + 1% FBS 对细胞膜进行穿孔处理 10 分钟。AlexaFluor® 488 (AF488) 连接的鬼笔环肽染料用来评估细胞骨架完整性。鬼笔环肽用穿孔缓冲液 (1:50) 稀释并与细胞一起在 37 度孵育 2 小时。细胞用 PBS 洗涤然后使用 CellReporterXpress 软件中为定量 AF488 染色的细胞骨架优化的 Cell Scoring 分析模块进行成像分析。使用 ImageXpress Pico 系统成像活细胞或固定细胞, 并用 CellReporterXpress 软件进行分析。细胞图像使用两个 Cell Scoring 程序进行分析: 一个以 FITC 作为标记来定量 Calcein AM 或鬼笔环肽阳性细胞数, 第二个程序以 TRITC 为标记分析线粒体染色阳性细胞。两套程序都以核染色进行细胞计数和核特征鉴定。

使用自动成像分析定量分析表型影响

一个典型的自动化细胞实验流程包括在微孔板中铺细胞, 化合物处理细胞, 和自动化成像。对于多色, 多参数实验, Calcein AM 可用于鉴定活细胞数或完好的细胞数, 描述细胞伸展和鉴定细胞形态学。核染料用于细胞计数, 确定增殖和测量核亮度和形状。

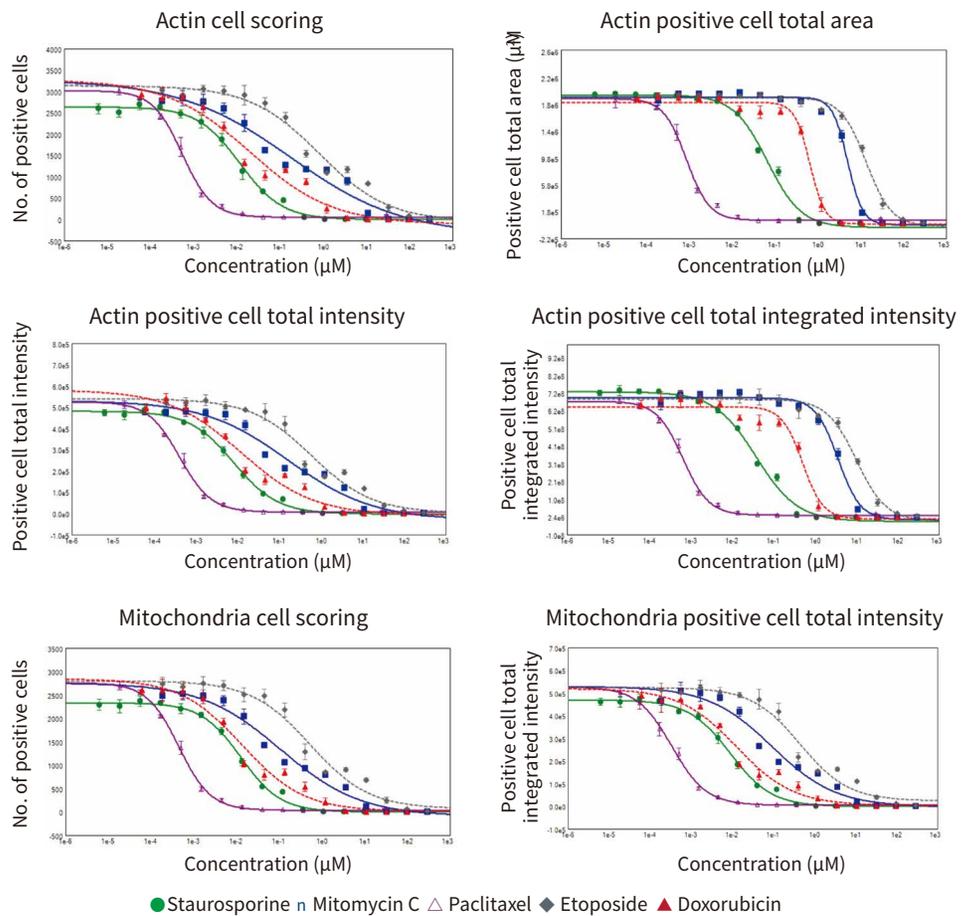


图 2: 剂效曲线展示针对多个参数的药物处理效果。HeLa 细胞使用 ImageXpress Pico 系统成像并使用 CellReporterXpress 软件进行分析。Cell Scoring 模块优化过用于测量 actin 细胞骨架完好的细胞以 AlexaFluor 488 连接鬼笔环肽染色, 以 MitoTracker Orange 标记的完整线粒体。使用 SoftMax® Pro 软件创建的 4-参数拟合曲线使用 CellReporterXpress 产生的数据点。剂效曲线展示了每个化合物对于多个读出参数的效果。相关的 EC₅₀ 值展示在表 1。

MitoTracker 染料能用来鉴定线粒体完整度或膜电位。细胞可以活细胞成像也能固定并染色额外试剂（如鬼笔环肽）来提供关于细胞骨架或其他参数信息。鬼笔环肽染色 actin 细胞骨架可用来确定细胞骨架组织结构，细胞伸展，形态学和定量完好细胞的数量。

CellReporterXpress 软件通过预设分析模块同步成像和分析的能力来流水线化实验结果的产生。Cell Scoring 优化用于分析细胞活力，线粒体健康或细胞骨架完整性。分析能产生多种实验参数包括但不局限于总细胞数，定量具有特定标志物的细胞数，荧光强度和标志物细胞内总荧光强度值，总的和平均细胞面积还有核的平均面积和亮度等特性。

图1 展示了对照细胞和 staurosporine 处理的细胞的核染料 Hoechst, actin 细胞骨架染料 AlexaFluor 488 (AF488) 连接的鬼笔环肽，还有鉴定线粒体膜电位用的 MitoTracker Orange 三种染料的组合图像。两种处理条件的细胞核，完整的 actin 细胞骨架和完好的线粒体分析后的图例也展示在图中。

不同实验参数的浓度相关性显示于图2。通过鬼笔环肽-染色的细胞总数确定的活细胞数随着药物浓度升高而降低了(图2)。MitoTracker 阳性细胞数也观察到相似的趋势。鬼笔环肽和 MitoTracker 染色亮度的降低也与毒性药物的浓度增加趋势一致。对于细胞伸展的影响通过确定细胞面积来鉴定。不同参数读出的 EC₅₀ 值总结在表1。

Analyses readouts	EC ₅₀ (μM) ± Standard Deviation				
	Staurosporine	Mitomycin C	Paclitaxel	Etoposide	Doxorubicin
Number of actin positive cells	0.012 ± 0.001	0.178 ± 0.140	5.46 x 10 ⁻⁴ ± 3.48 x 10 ⁻⁵	0.820 ± 0.340	0.020 ± 0.012
Actin positive cell total area	0.067 ± 0.009	4.952 ± 0.354	8.56 x 10 ⁻⁴ ± 5.69 x 10 ⁻⁵	13.54 ± 1.229	0.649 ± 0.054
Actin positive cell total intensity	0.008 ± 7.45 x 10 ⁴	0.164 ± 0.093	3.95 x 10 ⁻⁴ ± 2.82 x 10 ⁻⁵	0.603 ± 0.239	0.012 ± 0.007
Actin positive cell total integrated intensity	0.038 ± 0.005	3.614 ± 0.378	6.33 x 10 ⁻⁴ ± 4.21 x 10 ⁻⁵	10.10 ± 1.301	0.501 ± 0.078
Number of mitochondria positive cells	0.013 ± 0.001	0.110 ± 0.045	4.50 x 10 ⁻⁴ ± 2.64 x 10 ⁻⁵	0.543 ± 0.190	0.014 ± 0.006
Mitochondria positive cell total integrated intensity	0.017 ± 0.002	1.691 ± 0.222	4.18 x 10 ⁻⁴ ± 2.98 x 10 ⁻⁵	6.336 ± 1.086	0.197 ± 0.053
Mitochondria positive cell total intensity	0.009 ± 9.81 x 10 ⁴	0.094 ± 0.039	3.35 x 10 ⁻⁴ ± 3.00 x 10 ⁻⁵	0.451 ± 0.147	0.013 ± 0.005

表 1: 分析参数的 EC₅₀ 值。Cell Scoring 模块分析描述化合物对多个表型变化影响的多个参数。EC₅₀ 值对应图2 中的 4- 参数曲线拟合曲线。

结论

自动化细胞成像是一种测试化合物对毒性，细胞活力，和形态学影响的有效工具。这种能够研究多种细胞反应的能力能提供关于作用机制的重要信息。ImageXpress Pico 自动细胞成像系统和 CellReporterXpress 软件允许用户分析一系列测量结果并允许分析多参数来更好的鉴定复杂的表型影响。



扫一扫关注我们
的官方微信

The ImageXpress Pico system features optics by Leica Microsystems.

美谷分子仪器 (上海) 有限公司

全国咨询服务热线: 400-820-3586

上海 电话: 86-21-3372 1088

北京 电话: 86-10-6410 8669

成都 电话: 86-28-6558 8820

台北 电话: 886-2-2656 7585

香港

www.MolecularDevices.com.cn Email: info.china@moldev.com

传真: 86-21-3372 1066

传真: 86-10-6410 8601

传真: 86-28-6558 8831

传真: 886-2-2894 8267

传真: 852-2289 5385

地址: 上海市长宁区福泉北路 518 号 1 座 501 室 200335

地址: 北京市朝阳区广渠东路 3 号中水电国际大厦 612 & 613 室 100124

地址: 成都市锦江区东御街 18 号百扬大厦 2208 室 610016

地址: 台北市内湖区堤顶大道二段 89 号 3 楼

地址: 香港中环皇后大道中 15 号置地广场 公爵大厦 21 楼

