APPLICATION NOTE

使用 ImageXpress Micro 进行 QuickID 靶向性图像获取

Christian Holz | Field Application Scientist | Molecular Devices
Dr. Mirko Jaumann | University of Tuebingen

简介

在以高分辨率，多个波长和 z 平面范围成像样本时，执行基于图像的高内涵筛选的研究人员面临很大的技术挑战。

实验通常需要较长的采集时间，较大的存储能力和较高的计算能力。靶向性图像获取的实施使科学家们能够找到稀缺的目标，特别是当整个孔中分布不均匀时。

QuickID 靶向性图像获取的工作原理是通过低倍镜成像样品，然后通过快速图像分析过程找到感兴趣的物体或罕见事件，然后在高倍放大下重新采集这些图像。

QuickID 可以使用所需的波长，z-stacks 或时间点自动完成。它由MetaXpress 软件执行，可与ImageXpress Micro 4 和 ImageXpress Micro Confocal 一起使用。

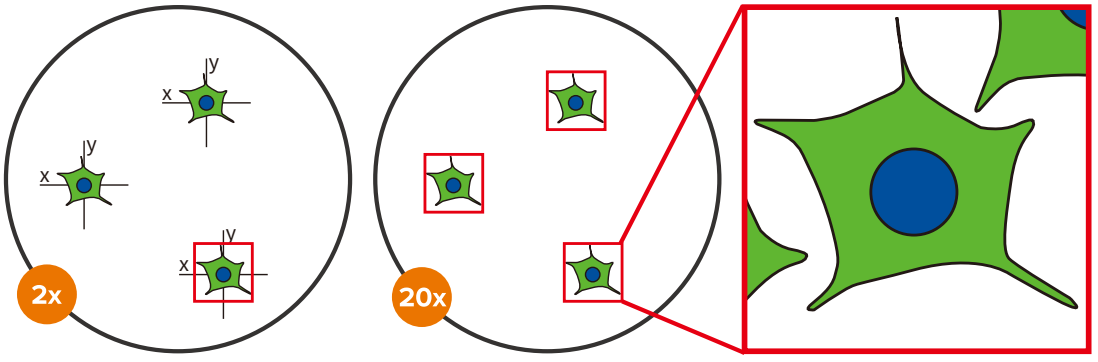
在蒂宾根大学医院的耳毒性研究中靶向性成像内耳类器官（“迷你耳朵”）

用于研究耳毒性的哺乳动物体外模型已利用内耳细胞系和组织培养。然而，组织培养作为用于使用内耳衍生细胞系或斑马鱼侧线的筛选努力产生的越来越多的潜在耳毒性剂的验证工具具有有限的应用。对于药物治疗，细胞系可能与原代细胞具有不同效应。

蒂宾根大学医学中心的一项研究利用体外标准化分析法测定来自 Corti 祖细胞鼠器官的耳毒性药物筛选，代表“迷你耳朵”。

优势

- 缩短图像采集时间
- 更快地获取目标图片
- 降低成像存储要求
- 自动压缩 Z-stack



1. 2x 获取 96-孔板的整孔
2. 找到感兴趣物体的 XY-位置
3. 20x 重新获取感兴趣的物体

附加优势：在重新获取时，感兴趣的对象集中在图像的中间，因此不需要图像拼接。在分析时忽略图像边缘处的对象，以使它们不被计数两次

实验方案

在出生后第 0 天从 Corti 器官分离来自已知产生干细胞衍生的耳球的 NMRI 小鼠的细胞。用表皮生长因子 (EGF) 在体外培养原代细胞 (DIV) 5 天。
然后将 Otospheres 涂布在 96 孔板上，用 γ-分泌酶进行 14 DIV 分化，以获得分化的上皮岛。这些“迷你耳朵”用新霉素等耳毒性药物治疗 3 DIV，然后固定并用 DAPI (细胞核)，肌球蛋白 VIIa (毛细胞样细胞)，Sox2 (支持细胞样细胞) 和 EdU (增殖细胞) 染色。

成像和分析

使用靶向性图像获取工作流程在 ImageXpress Micro 系统上对“迷你耳朵”进行成像 (图 2)。

首先，使用 4x 物镜，在单个焦平面中并且仅在 DAPI 通道中获取具有 10% 重叠的 2x2 位点的图像阵列。对于整个 96 孔板，这种快速采集仅需约 4 分钟。然后，拼接 2x2 孔位点并通过 MetaXpress 鉴定“Mini Ears”的 XY 平板坐标 (<1% 假阴性检测率; 7-25% 假阳性检测率)。然后在第二次采集运行中对这些位置进行成像，其中 20x 物镜具有四种颜色 (DAPI，FITC，TRED 和 Cy5)，范围为 24µm (2µm 间隔)。

MetaXpress 允许在采集期间自动压缩 Z-stack 到最大强度图像。为了减少存储空间和分析时间，仅保存了 Z-stack 的最大强度投影。每个孔平均出现 10 个“迷你耳朵”，靶向性图像重新获取的速度比采集 84 个位点的整个孔快 8 倍 (图 4)。此外，存储要求和分析时间可减少八倍以上。

MetaXpress 软件的自定义模块编辑器用于构建用于识别和计数“迷你耳朵”的分析工作流程、个体生物标志物的鉴定、以及染色强度、面积和分布的测量 (图 3)。使用 MetaXpress PowerCore 分布式分析解决方案以高通量进行整个板的分析。

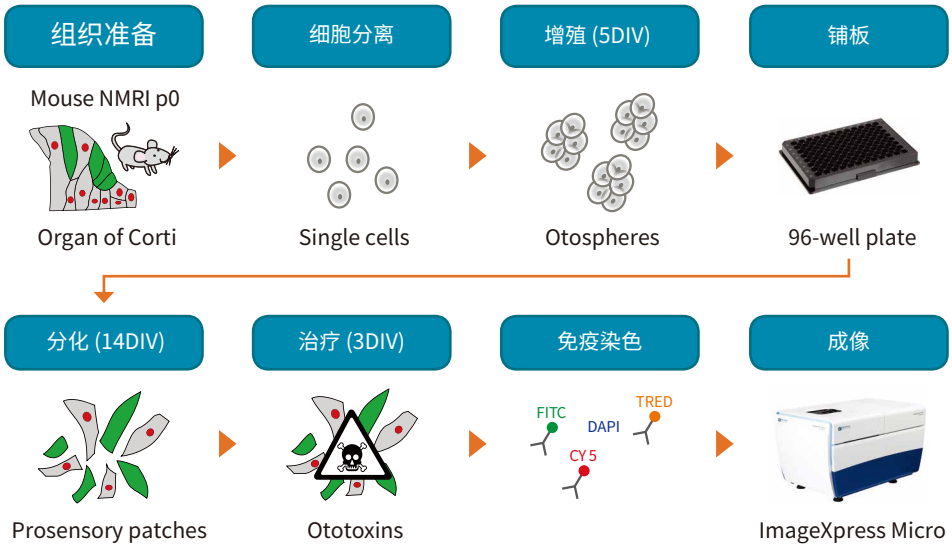


图1 "迷你耳朵" 实验方案.

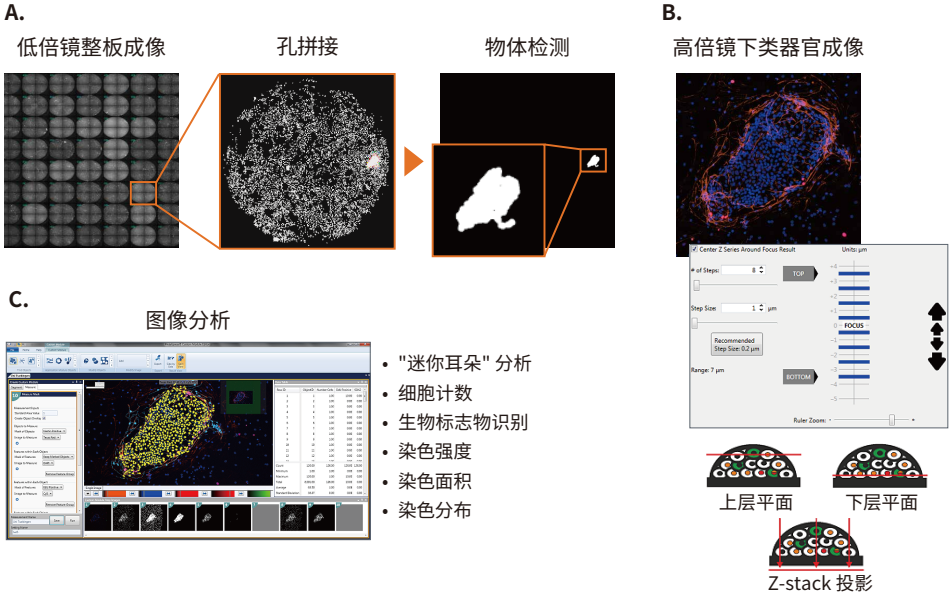


图2 成像和分析工作流程. (A) 低倍率下的全孔单色采集，图像拼接和物体检测 **(B)** 高倍率下的目标多色 z-stack 叠层采集和 2D 最大投影图像的生成。**(C)** 使用 MetaXpress 自定义模块编辑器进行图像分析。

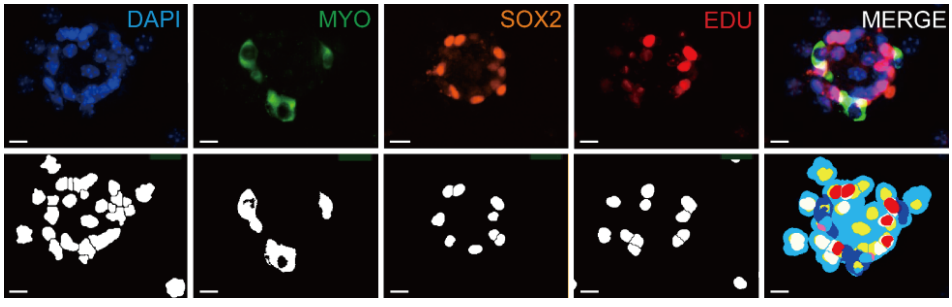


图3 自动检测“迷你耳朵”和其中的几种生物标志物。 DAPI 信号 (蓝色) 识别细胞核并确定每个“迷你耳朵”的面积。肌球蛋白 VIIa (绿色) 识别毛发细胞样细胞。 Sox2 (橙色) 标记支持细胞样细胞。增殖细胞用 EdU (红色) 染色。例如，进行了几次跨通道检测。如果毛发细胞样细胞位于“迷你耳朵”区域 (右下图中浅蓝色)，或核染色与 DAPI 染色重叠。比例尺：10µm。

结果

用耳毒性氨基糖苷类新霉素处理“迷你耳朵”诱导毛细胞样细胞的损失 (EC_{50}≈1μm)，如图 5 所见 MyosinVIIa 阳性细胞与 DAPI 阳性细胞的比率降低。

- 5 个耳蜗产生 2700 个耳球，分化成 1000 个“迷你耳朵”
- 37% 的otosphere 到“迷你耳朵”转换率
- 70% 的“迷你耳朵”为 Sox2 阳性，30% 为 MyosinVIIa 阳性，29% 两者皆有

通过共聚焦成像提高分辨率

使用 ImageXpress Micro Confocal 系统的 60μm 针孔共聚焦模式实现了改善的图像质量和物体分辨率 (图 6)。观察到细胞轮廓更清晰，z 平面之间的串扰更少，从而在图像分析期间产生更好的物体分割。

结论

靶向性图像获取可以大大减少采集时间，图像存储要求和分析时间。

这种“迷你耳朵”应用展示了一种强大的筛选试验，用于进行体外高内涵的耳毒性筛查。

扩展测定以包括额外的生物标志物，报道小鼠品系和人 iPS 细胞将进一步增加数据集的相关性。

致谢

本应用简报中提供的数据由蒂宾根大学医院蒂宾根听力研究中心 Mirko Jaumann 博士提供。.

参考文献

1.Oshima, K. et al. Differential distribution of stem cells in the auditory and vestibular organs of the inner ear. JARO 8, 18-31, (2007).

2.Mizutari, K. et al. Notch inhibition induces cochlear hair cell regeneration and recovery of hearing after acoustic trauma. Neuron 77,58-69, (2013).

96 孔板, 4 个波长, 13 Z-planes	成像时间	图像存储 (z-stack 投影)	分析时间
整孔成像 (每孔 84 个位点，20x 物镜)	67.25 h	290 Gb	10.25 h
靶向性图像获取 (首先每孔 4 个位点，4x 物镜，然后 20x 物镜，每孔 10 个物体)	8.15 h	34 Gb	1.25 h

图 4　成像和分析的通量与存储的需求.

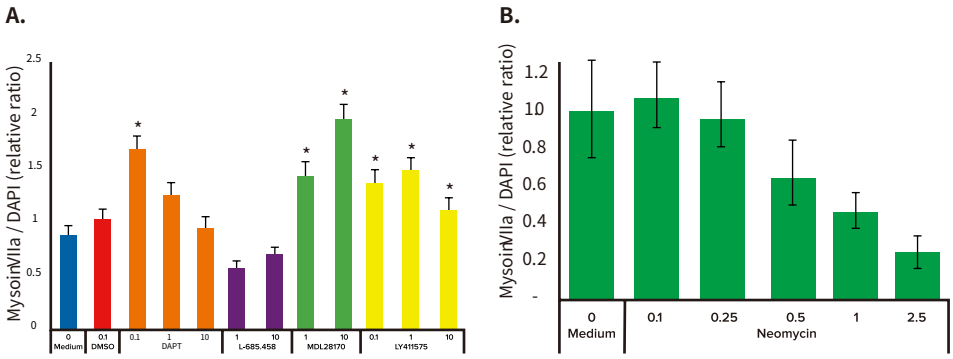


图5　(A) γ-分泌酶抑制的效果。用 γ-分泌酶抑制剂处理“迷你耳朵”后 MyosinVIIa 阳性细胞的数量。治疗持续时间为 24 小时，在分化培养物中接种后 24 小时开始。 * p <0.01 Students-t 检验。**(B) 由肌球蛋白 VIIa 阳性细胞数决定的新霉素耳毒性。**在分化 14 天后，将“迷你耳朵”暴露于新霉素 (24 小时).

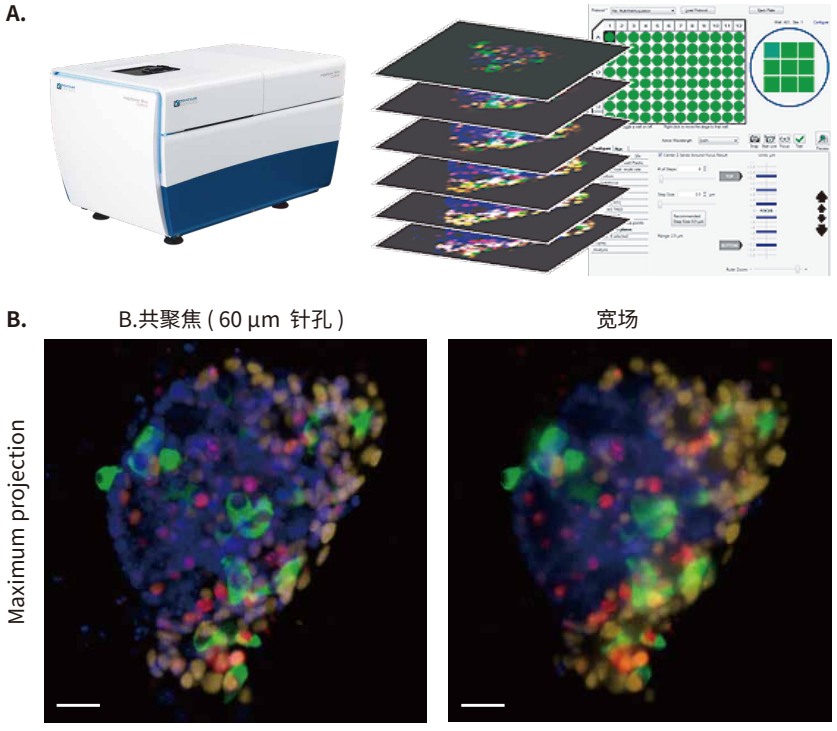


图6　(A) 带有 MetaXpress 软件界面的 ImageXpress Micro Confocal，用于 z-stack 采集。 (B) 60um 针孔共聚焦和宽场模式之间的图像比较。在共聚焦图像中可以看到对象被更好地识别。(比例尺：20μm)

靶向性图像获取的其它应用

纺锤体有丝分裂

在正常细胞群中，仅约 1-5% 的细胞处于有丝分裂中。有针对性的采集可用于识别整个群体中的这些细胞，然后在高倍镜下随时间变化跟踪它们。如果单个细胞在采集时间过程中移出区域，则可以对单个细胞进行跟踪和重新定中心。

3D 微球

微球体通常积聚在平底板的边缘。
可以执行初始透射光采集，然后进行荧光标记物的 z-stack 靶向性图像获取，以大大减少所需图像的数量.

脑切片中的海马

根据样本形态及其制备，海马和大脑的其他部分可能会在切片的各个区域结束。可以在多个波长下执行 z-stack 靶向性图像获取以用于共定位的研究

斑马鱼心跳

斑马鱼在井中的位置和方向可以变化。
可以使用靶向采集来执行心脏，眼睛，脑，卵黄囊，虹膜细胞或血管的高倍镜 z-stack 或延时采集。

微核

在低倍镜下，难以准确地确定物体是否真的是微核或仅仅是人工制品。在高放大倍率下进行有针对性的重新采集有助于减少误报的数量。

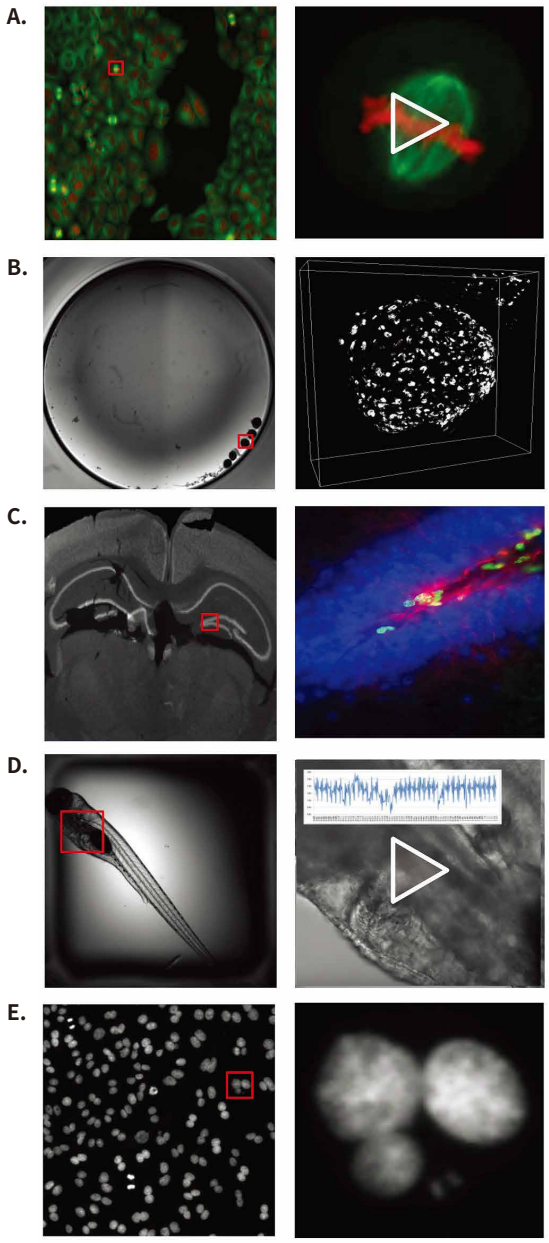


图7 **(A)** 纺锤体有丝分裂 **(B) 3D** 微球. **(C)** 脑切片中的海马. **(D)** 斑马鱼心跳. (E) 微核.

更多精彩内容
尽在官方微信

美谷分子仪器 (上海) 有限公司

全国咨询服务热线: 400-820-3586 www.MolecularDevices.com.cn Email: info.china@moldev.com

上海	电话: 86-21-3372 1088	传真: 86-21-3372 1066	地址: 上海市长宁区福泉北路 518 号 1 座 501 室 200335
北京	电话: 86-10-6410 8669	传真: 86-10-6410 8601	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
成都	电话: 86-28-6558 8820	传真: 86-28-6558 8831	地址: 成都市锦江区东御街 18 号百扬大厦 2208 室 610016
台北	电话: 886-2-2656 7585	传真: 886-2-2894 8267	地址: 台北市内湖区堤顶大道二段 89 号 3 楼
香港		传真: 852-2289 5385	地址: 香港中环皇后大道中15号置地广场 公爵大厦21楼

MOLECULAR DEVICES