

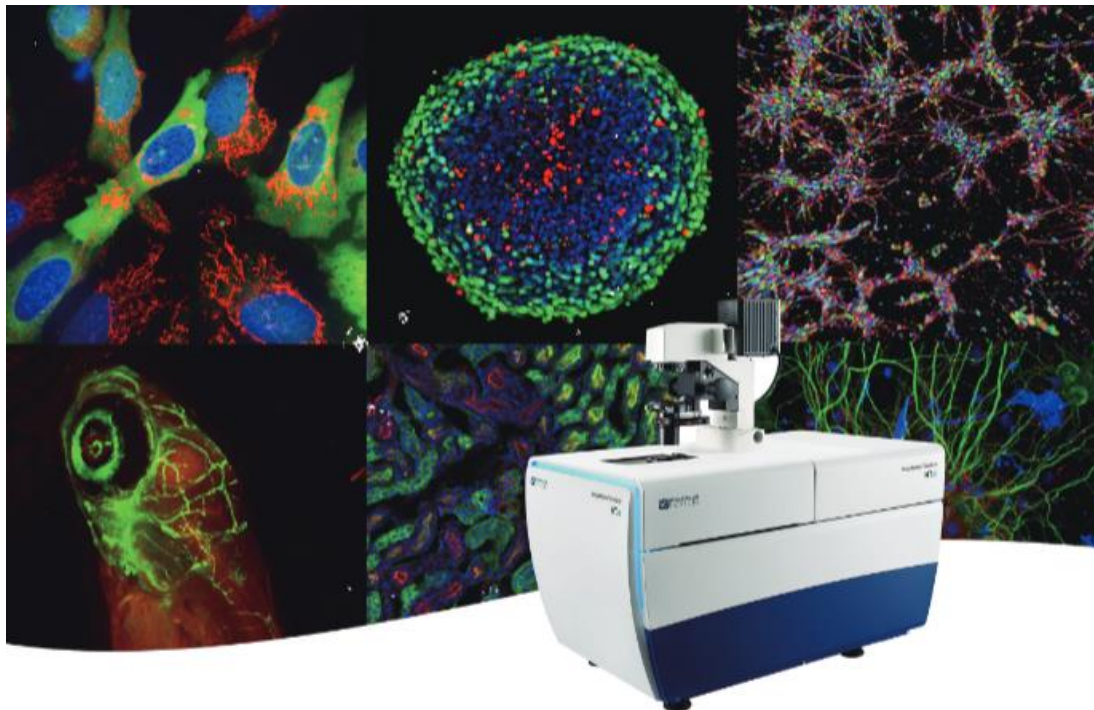
# 环境学院分析测试中心明星仪器推介

## 【第一期】共聚焦高内涵成像分析系统

推介人：肖艳红 18686489327

为充分利用仪器设备资源，提高服务科研和人才培养水平，促进资源共享和优化配置，学院分析测试中心特开展“明星仪器设备与技术推介”系列专题活动。

首期推出的明星仪器为共聚焦高内涵成像分析系统 (ImageXpress® Micro Confocal, 美谷分子公司)



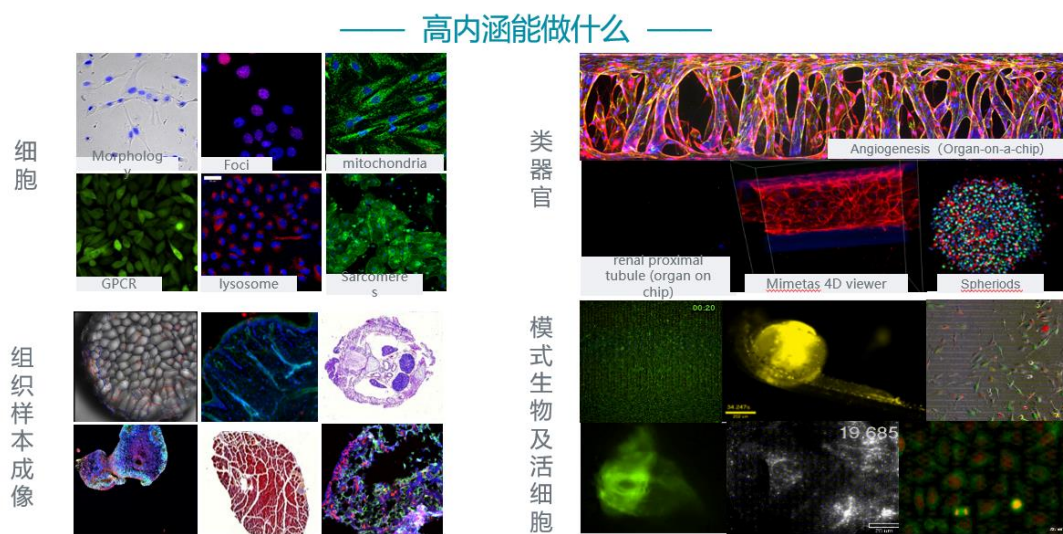
## 仪器简介

高内涵成像分析系统同时具备自动化高速显微成像功能及自动化图像定量分析功能，可对多个活细胞、干细胞、植物、组织切片、完整生物体（如斑马鱼）和复杂 3D 基质样品快速成像，并从图片中提取大量的数据信息，例如基于单个细胞或细胞群体的细胞形态、亚细胞结构、荧光信号、空间分布等。

ImageXpress® Micro Confocal 系统是一个高内涵解决方案，可在固定细胞和活细胞的宽场和共聚焦成像之间一键切换。它可捕获完整生物体、厚组织、2D 和 3D 模型以及细胞或细胞内事件的高质量图像。转盘式共聚焦和 sCMOS 相机可对心肌细胞跳动和干细胞分化等快速和罕见事件进行成像。由于具备 MetaXpress 软件且有水镜等灵活配置可供选择，该系统可支持从 3D 实验开发到筛选的多种共聚焦成像应用。



具体应用方向包含：**细胞计数分析**，如细胞增殖、细胞毒性、克隆形成、细胞分类；**细胞状态**，如细胞周期、细胞凋亡、有丝分裂；**细胞转移能力**，如细胞粘附性、Transwell、划痕实验、3D 细胞球；**形态分析**，如血管生成、神经生长；**亚细胞结构**，如染色体、细胞骨架、核内亚细胞器、微核检测；**信号通路研究**，如转位/共定位、激酶活性、Transfluor、离子通道；**其它如组织切片、小型模式动物（斑马鱼）等。**



## 仪器配置

- 物镜：空气物镜 (4x、10x、20x、60x)和水浸物镜 (20x、60x)
- 滤光片：DAPI、FITC、TRITC、Texas Red、CY5、CFP、YFP、CY7
- 成像模式：明场成像、宽场荧光成像、宽场实时数字共聚焦成像、针孔转盘共聚焦成像、转盘共聚焦与实时数字共聚焦荧光成像。
- 软件：MetaXpress
- 支持耗材：多孔板、玻片、Transwell 孔板、圆底多孔板、细胞芯片、组织芯片、微流控芯片、梯度细胞培养板—SciFlowTM1000 流体培养系统等。

## 典型应用

### ● 斑马鱼毒性研究



APPLICATION NOTE

## 使用人类疾病模型生物斑马鱼的高通量成像实验

### 为什么使用斑马鱼进行筛选?

目前，基于斑马鱼的筛选由于花费、通量和伦理原因作为一种哺乳动物筛选的替代受到欢迎。

斑马鱼由于其与人类的高度生物相似性，成为一种有用的药物开发模型。在个体学和器官形成研究中体现了其主要器官系统与人类极其相似，且斑马鱼和人类的相似度高达 70 - 80%。

斑马鱼由于其繁殖力强，胚胎透明能看到器官结构且易于基因操作的特性对筛选有益。由于其体积小，所以可以放入微孔板中用化合物处理。然后表型能使用高内涵筛选系统来进行检测。

ImageXpress® 高内涵筛选系统提供更好的灵活性来拍摄大视野的高质量图像。

MetaXpress® 高内涵图像获取和分析软件允许以简单的工作流程来实现宽范围的实验应用的图像分析。并且结合用于数据挖掘的 AcuityXpress 高内涵信息学软件，这种端到端的解决方案显著的增强了基于斑马鱼的体内实验的通量。

### 基于斑马鱼的体内实验应用

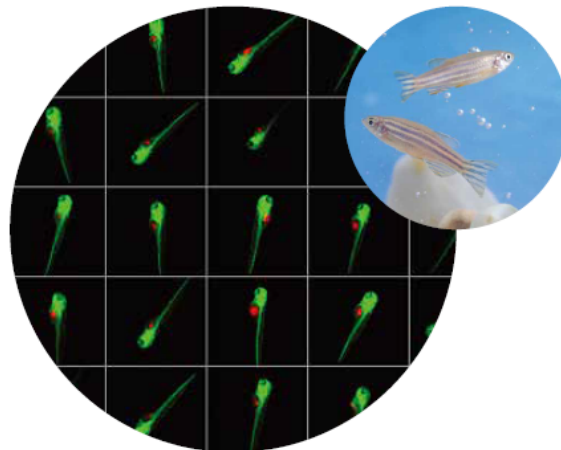
大量的已开发的人类疾病斑马鱼模型如：

- 代谢综合症: 肥胖 (内脏肥胖), 血脂异常, 脂肪肝, 糖耐受失调
- 人类癌症细胞异种移植: 肿瘤血管生成, 远端转移
- 循环疾病: 心力衰竭, 药物诱导的心率失调
- 中枢神经系统失调: 耳聋, 视力障碍, 嗅觉失调, 癫痫, 发育紊乱, 睡眠唤醒障碍, 肌营养不良 (ALS)

一系列例子能用来展示如何将高内涵用于研究以上失调。

### 优点

- 完整生命体在三维环境下几天就能评价成千上万的化合物。
- 筛选宽范围的疾病和毒性模型。
- 单图像能可视化和测量完整表型。
- 通过自动化高速 Z 堆叠拍摄从头到尾保持拍摄在最佳焦平面。



● 斑马鱼毒性研究

人类肿瘤细胞异种移植后的转移模型

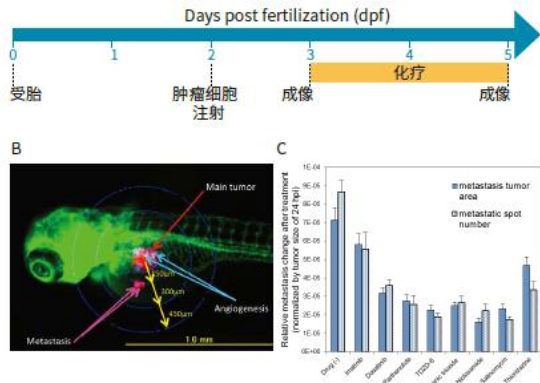


图 1 (A) 斑马鱼植入人肿瘤细胞工作流程。(B) 标记 Kusabira-orange (红色) 的人白血病干细胞移植入斑马鱼胚胎的图像 (绿色)。(C) 测量肿瘤大小和转移并于柱状图中展示不同化合物的抑制程度。

显示抑制血管生成

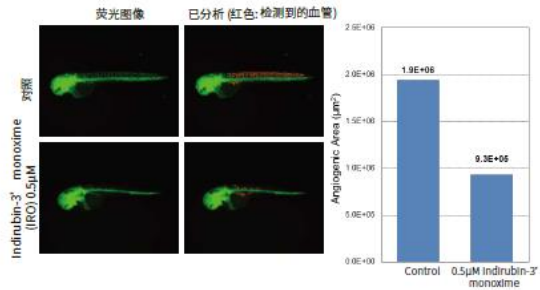


图 2 血管上皮细胞表达GFP的斑马鱼暴露在化合物中 12 - 48 小时。节间血管，细的背部和腹部血管和躯干区分开，使用 MetaXpress 软件血管生成应用模块分析。生成的血管生长在化合物处理后明显抑制。

心脏功能分析

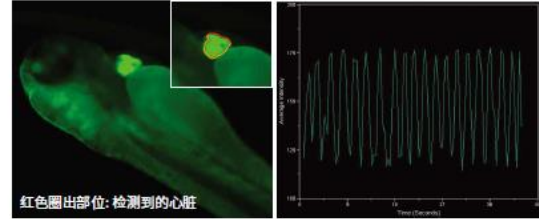


图 3 心脏中带有表达 GFP 标记蛋白的细胞的斑马鱼的心脏功能通过将心脏圈出来作为所关心的区域并序拍摄并测量面积和亮度随时间的变化来表示心跳。MetaXpress 展示荧光随时间的波动。

基因敲除定量<sup>2</sup>

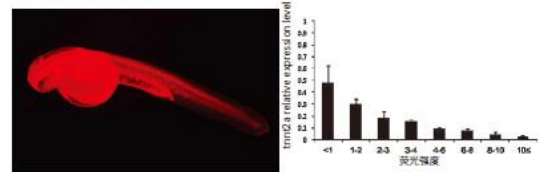


图 4 丽丝胺荧光用于表示与注射的反义吗啉环核苷酸 (MO) 相关的敲除程度。

测量耳毒性

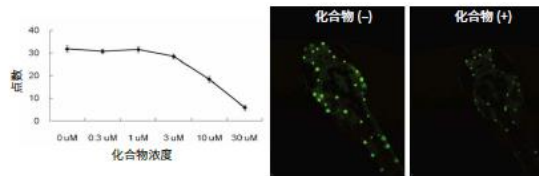


图 5 斑马鱼毛发细胞的破坏可作为耳毒性的指示。对斑马鱼进行已知毒性化合物处理之后导致耳毒性，荧光标记的毛发细胞使用点计数法测量。

## ● 斑马鱼毒性研究

### 鉴定神经毒性

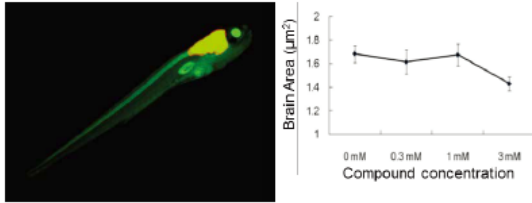


图6 以神经毒性化合物处理神经元标记了荧光的斑马鱼(图像中的黄色)并测量药物处理后的脑面积作为神经毒性的指示。在高浓度的化合物条件下测量的荧光脑面积明显小于未处理的对照组胚胎。

### 孔中或斑马鱼特定区域靶目标图像获取

对于那些可能不在每个孔中相同区域物体,靶目标成像能够使用低放大倍数标记出关心的物体然后返回到相应坐标来拍摄更高放大倍数的图像。

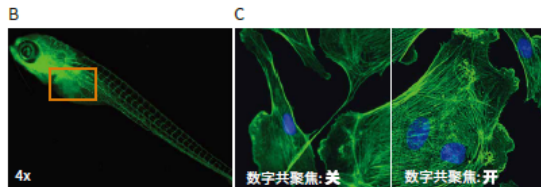
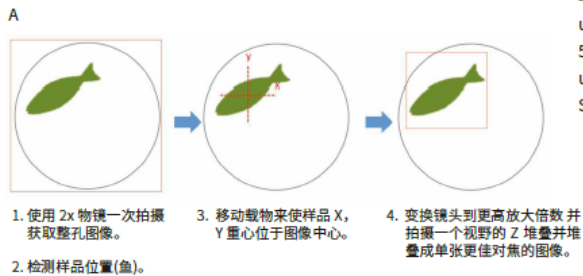


图7. 单视野完整鱼成像。(A) 为实现的完整的在焦图像, 拍摄多 z 轴层面并使用 best-focus 算法组合成一张图像。(B) 关心区域(橙色框)使用高放大倍数再次成像。(C) 数字共聚焦特性是一种实时反卷积方法能用来加强分辨率并利于亚细胞结构分区。

### 总结

斑马鱼胚胎作为一种有价值的表达研究脊椎动物模型。使用 ImageXpress 高内涵筛选系统来, 再焦的、从头到脚大视野拍摄斑马鱼并高速 Z 轴系列堆叠成像, 这种能力可实现检测疾病或毒性表型测量。高内涵进行斑马鱼体内成像并结合 MetaXpress 高内涵分析软件强显著的增加通量来强化实验室, 并使其几天筛选成千上万的化合物。建立并运行自动化成像筛选来显示血管生成的抑制, 定量基因敲除, 并以端到端的解决方案来检测耳毒性和神经毒性。

### 参考文献

1. Zhang, B., et al., Quantitative phenotyping-based in vivo chemical screening in a zebrafish model of leukemia stem cell xenotransplantation, PLoS One, 2014 Jan 15; 9(1).
2. Umemoto, N., et al., Fluorescent-based methods for gene knock-down and functional cardiac imaging in zebrafish, Mol Biotechnol, 2013 Oct; 55(2): 131-42.
3. Kanungo, J., et al., In vivo imaging and quantitative analysis of changes in axon length using transgenic zebrafish embryos. Neurotoxicol Teratol, 2011 Nov-Dec; 33(6): 618-23.
4. Diekmann, H., et al., Characterization of optic nerve regeneration using transgenic zebrafish. Front Cell Neurosci, 2015 April 9; 9:118.
5. Huan, H., et al., High-throughput screening for bioactive molecules using primary cell culture of transgenic zebrafish embryos. Cell Rep, 2012 Sep 27; 2(3):695-704.

## ● 细胞计数分析



# 使用自动成像技术进行荧光标记 或无标记的细胞计数

Jayne Hesley | Imaging Applications Scientist | Molecular Devices

### 介绍

在多孔微板中精确地定量细胞数量的能力使得能够研究细胞的健康或增殖。这些应用可以利用终点测定法来成像荧光染色的细胞核，或者可以要求未染色的活细胞或固定细胞的可靠透射光成像。在这两种情况下，通过软件分割的细胞计数都应该是快速和可靠的。ImageXpress® Pico 个人型高内涵成像分析系统与 CellReporterXpress™ 图像采集和分析软件是理想的量化检测工具，无论细胞是 label-free 或荧光染色。在这个应用说明中，我们演示了用户选择的透射光分割 (分析) 算法如何提高计数不同细胞类型的准确性，并将结果与使用核染色时发现的结果进行比较。

### 方法

在接下来的实验中，一些细胞类型被铺在 96 孔板中，按照 1:2 进行系列稀释并过夜培养，然后 5 $\mu$ M Hoechst 或 DRAQ 5 核染色在 37°C，5% 的二氧化碳孵育 30-60 分钟。在 ImageXpress Pico 系统上用 4x 或 10x 物镜整板成像，每孔一个视野。荧光和透射光的图像被连续地采集 (透射光优先)，并且使用即时分析 (on-the-fly) 计数细胞。即时分析允许在获取过程中同时分析图像。

### 优势

- 适用于荧光染色或无标记细胞
- 可计数不同类型、不同大小的细胞
- 可在运行实验分析前，确定移液伪影或非均一性的细胞生长状况

细胞类型	CRX 模块
CHO	Small
PC-12	Large
U2OS	Large
HEK-293	Large
HeLa	Large
NIH-3T3	Large
HepG2	Large
THP-1*	Small

图 1. 通过对 156-20000 个细胞/孔不同细胞类型的比较，显示出 CellReporterXpress 软件模块对透射光图像的分割最为准确。透射光图像获得的 z 轴聚焦补偿值为 -40  $\mu$ m，使用 10 倍的物镜。

\* THP-1为悬浮细胞。

## ● 细胞计数分析

### 为您的细胞选择更合适的透射光分析模块

CellReporterXpress 软件中包含三个模块，用于计算透射光中的细胞数。“Transmitted Light Cell Count, General”适用于大多数单层细胞培养(CHO, HeLa, PC-12)，即不太融合也不太稀疏。然而，在图1中所报告的实验中，细胞被铺到96个孔里，从完全融合到仅仅几个细胞。相应的TL模块产生的细胞计数与核染色在最广泛的细胞密度范围内实现的定量最接近。对于聚集生长的HepG2这样的细胞，在高密度的情况下，精确的分割是有挑战性的，因此，为了获得更准确的结果，最好使用测量“Area covered”而不是“Cell count”。

### 贴壁或悬浮细胞计数

根据细胞大小或细胞计数模块检测荧光染色细胞核的三种透射光(TL)细胞计数分析模块中的一种，可以定量贴壁单层细胞或悬浮细胞(图2和图3)。在未过度融合的孔中，使用染色细胞核检测细胞与未标记细胞的比较是一致的(图4)。

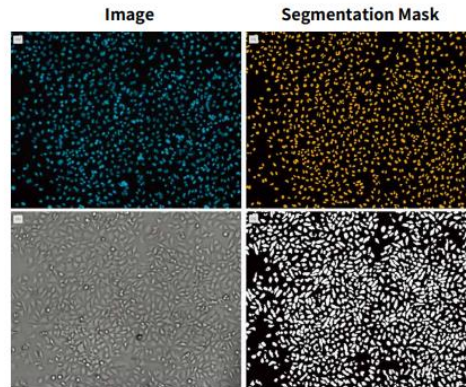


图 2. 利用荧光和透射光比较 HeLa 细胞的细胞计数。最上面的图像显示，在左边有一个 10x 物镜的贴壁 HeLa 细胞 (蓝色的核染色) 以及最终的分析 mask (橙色) 在右边。较低的面板显示了同一区域与透射光成像 (左) 和结果分析分割 (白色) 在右边。使用核计数的细胞总数为 1710 个，而使用透射光图像的细胞总数为 1790 个。

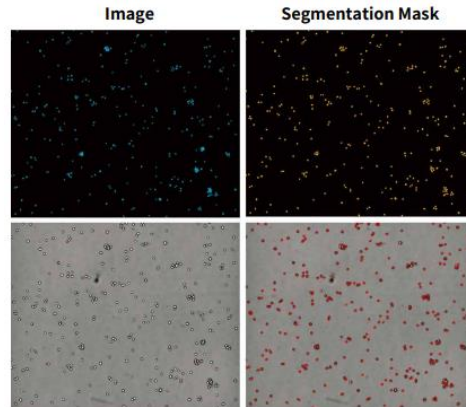


图 3. 荧光与透射光悬浮细胞的比较。顶部图像显示用 10x 物镜获得的 THP-1 白细胞 (蓝核染色) 和右侧得到的分析 mask (橙色)。下面板显示的是用透射光成像的相同区域 (左侧)，结果分析分割 (红色) 显示在右侧。使用核计数的细胞总数为 325 个，使用 TL 图像的细胞总数为 320 个。

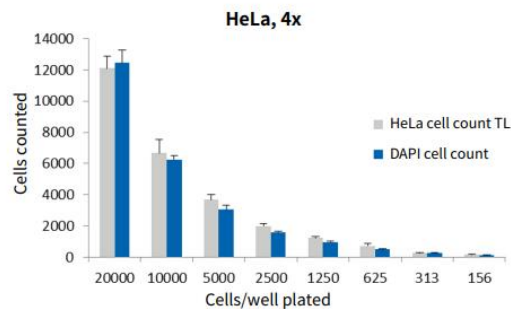


图 4. 透射光分割细胞定量与 Hoechst 染色细胞核定量的比较。使用 4x 物镜获取单个图像/孔 (n=6 孔)，使用 CellReporterXpress 软件预配置模块进行分析。



## ● 细胞计数分析

### 通过全板缩略图观察移液伪影

在透射光 (或荧光, 如果染色) 下, 可以低放大倍率扫描整个平板。可以使用 CellReporterXpress 软件直观地识别或即时 (on-the-fly) 检测细胞层中显示不均匀的孔 (图 5)。

### 结论

ImageXpress Pico 系统允许研究人员使用配套的软件在支持即时分析 (on-the-fly) 的逻辑工作流程中定量各种活细胞或固定细胞。采用低放大倍率扫描方法, 可即时检查铺板均匀性。此外, 通过观察复合处理或加入试剂对细胞密度的影响, 可以对实验结果进行更程度的验证。

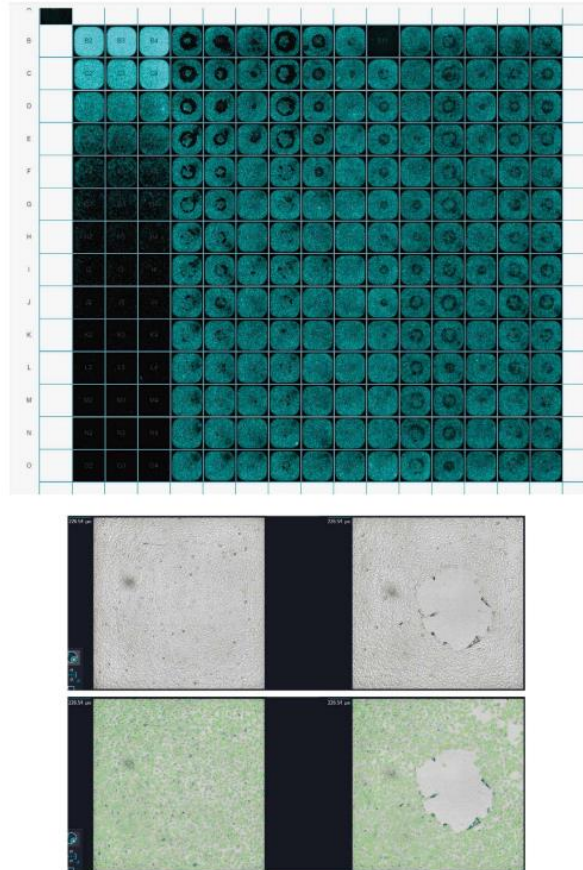


图 5. 利用低放大率扫描整个板来识别移液伪影。(顶部) Hoechst染色核的板块蒙太奇视图。在这张 384 孔板 4 倍成像的蒙太奇图中, 移液伪影非常明显。(底部) 透射光图像 (上图) 可被进行分割分析, 分析结果 (绿色 mask 叠加于下图) 突出显示那些不含有均一细胞数量的孔。

## ● 细胞毒性评价和细胞活死测定



APPLICATION NOTE

# 使用自动细胞成像系统进行细胞毒性评价和细胞活/死测定

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

### 简介

细胞活/死测定被广泛应用于各种研究领域，包括各种化合物的细胞毒性作用、实验处理或基因表达变化的研究。自动细胞成像和分析系统提供了一种评价细胞活性和细胞死亡的最佳方法。在本篇应用文献中，我们介绍了使用 ImageXpress®Pico 自动细胞成像系统以及 CellReporterXpress 自动图像采集和分析软件对 EarlyTox™ Live/Dead 检测试剂处理的细胞进行成像。

EarlyTox Live/Dead 检测试剂盒包含了针对哺乳动物活细胞和死细胞的标记物。活细胞可在细胞质中能够发出强烈绿色荧光的 Calcein AM 染色。不发荧光的 Calcein AM 可穿透完整细胞膜且其乙酰羟甲基酯 (AM) 基团可被细胞内的酯酶裂解，得到可发出荧光的钙黄绿素分子。死细胞标记物乙啶二聚体-III (EthD-III) 对完整细胞质膜而言既无荧光也无穿透能力。当与死亡细胞相关的细胞膜完整性受到损伤时，EthD-III 进入细胞并与细胞核结合，在细胞中产生明亮的红色荧光。影响细胞膜完整性的细胞毒性事件可以使用这种方法准确的评估。

该检测试剂盒可对测试化合物的全浓度响应特性进行表征。这种免洗、均相实验可减少因为洗涤步骤导致的死细胞被冲洗掉的情况。使用 ImageXpress Pico 系统和 CellReporterXpress 软件能准确检测到来自钙黄绿素和 EthD-III 的荧光信号并获得高质量的图像及分析结果。

### 材料

- EarlyTox Live/Dead Assay Kit
  - Explorer Kit (2-Plate Size, Molecular Devices P/N R8340)
  - Bulk kit (10-Plate Size, Molecular Devices P/N R8341)
- HeLa 细胞 (ATCC P/N CCL-2)

### • HeLa 培养基

- 补充谷氨酰胺和血清的最低必需培养基
- Staurosporine (Sigma P/N S5921)
- Mitomycin C (Sigma P/N M4287)
- 384-孔黑色, 底透微孔板 (Corning Falcon P/N 62406-490)
- ImageXpress Pico 自动细胞成像系统和 CellReporterXpress 软件

### 方法

HeLa 细胞以 5,000 细胞/孔接种于黑色 384 孔底透微孔板中，37°C, 5% CO<sub>2</sub> 孵育箱内生长过夜。用十字孢碱 (staurosporine) (通用蛋白激酶抑制剂和潜在的抗癌治疗药物) 或丝裂霉素 C (强效 DNA 交联剂与化疗药物) 处理细胞 24 小时，做 4 个平行，按 1:3 梯度稀释，起始最高浓度为 10 μM 十字孢碱和 300 μM 丝裂霉素 C。

化合物处理完成后，用 Live/Dead 检测试剂结合 Hoechst33342 核染料 (Thermo Fisher) 对细胞进行染色。每孔移去一半体积液体并替换成 2x Calcein AM 和 EthD-III 染色液。染色液终浓度为 2 μM Calcein AM 和 3 μM EthD-III。在添加 Hoechst (6 μM 终浓度) 前，孔板在 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 下孵育 30 分钟。细胞再次以 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 孵育 15 分钟。最后一次孵育结束后立即将孔板在 ImageXpress Pico 系统上用 10x Plan Fluor 物镜进行成像，荧光通道分别为针对 Calcein AM 的 FITC 通道、针对 EthD-III 的 Texas Red 通道和针对 Hoechst 染料的 DAPI 通道。在此放大倍数下，一张单独的图像一个视野下可以采集多达

### 优势

- 利用一种高效免洗实验方法来测定细胞活性
- 准确定量活细胞或死细胞
- 通过预设分析模块快速获得相关统计学结果

## ● 细胞毒性评价和细胞活死测定

4000-4500 个细胞，足以获得统计学相关结果。

### 使用细胞分类模块进行图像分析

利用 CellReporterXpress 软件中的细胞分类分析模块对图像进行分析。此模块可识别和区分活细胞或死细胞。Hoechst 染色用于识别总细胞，而 Calcein AM 或 EthD-III 作为特异性染色用于将细胞分类为阳性或阴性。图1展示了用十字孢碱处理和未处理的阳性细胞和阴性对照以及相关分析所识别的阳性和阴性细胞。分别进行分析，以确定活细胞或死亡细胞的数量和百分比。

### 从剂量-应答曲线计算EC<sub>50</sub> 毒性

对活细胞和死细胞成像，并基于 Calcein AM (绿色荧光) 或 EthD-III (红色荧光) 的细胞阳性染色进行细胞分类定量分析 (图1)。用十字孢碱和丝裂霉素 C 处理 HeLa 细胞均展示出浓度依赖性的死细胞百分比的增加和活细胞百分比的下降。图2所呈现的剂量应答曲线，活细胞百分比对化合物浓度，其十字孢碱的 EC<sub>50</sub> 值为 0.569 μM，而丝裂霉素 C 是 223 μM。死细胞百分比曲线得到的十字孢碱 EC<sub>50</sub> 值为 0.492 μM 而丝裂霉素 C 为 6.305 μM。

### 总结

EarlyTox Live/Dead 检测试剂盒结合 ImageXpress Pico 系统和 CellReporterXpress 软件，能够通过简单高效的工作流程实现对活细胞和死细胞的精确测定。自动成像和定量分析使得我们能够测试毒性化合物并非常适合于大量生物学检测中对细胞活性的评价。

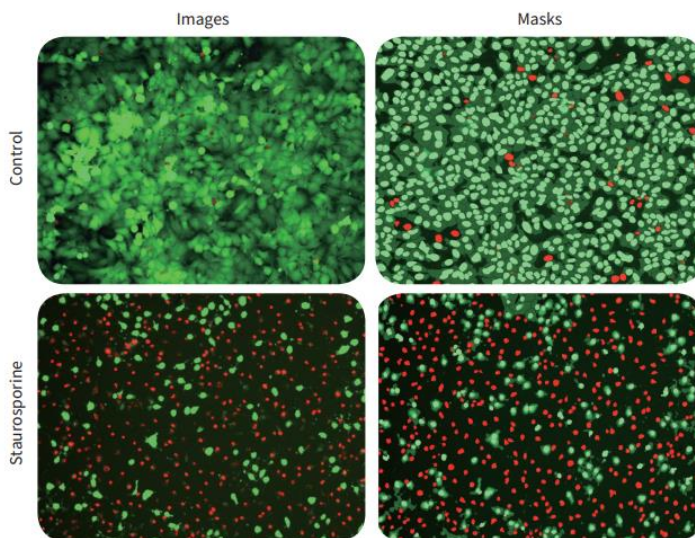


图1：阴性对照细胞和 0.1 μM 十字孢碱处理的细胞的代表性图像。左侧：Hoechst 核染色 (蓝色)、Calcein AM 染色 (绿色) 和 EthD-III 染色 (红色) 的 HeLa 细胞 10x 采集到的图像。右侧：分析识别结果展示了绿色的活细胞核和红色的死细胞核

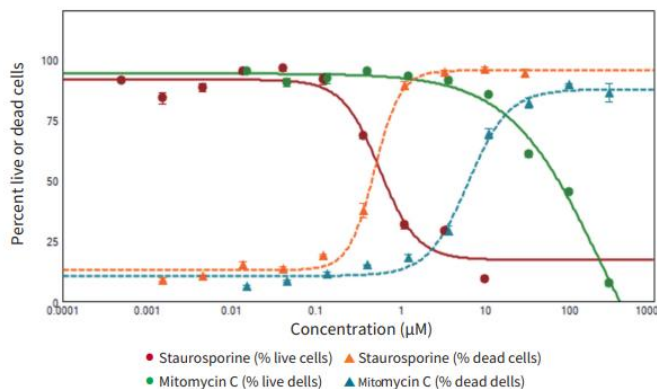


图2：不同浓度十字孢碱或丝裂霉素 C 处理 HeLa 细胞得到的活细胞和死细胞百分比浓度依赖曲线。平均值和标准差来自 4 次重复。从曲线中所得 EC<sub>50</sub> 值如下：0.569 μM 十字孢碱和 223 μM 丝裂霉素 C 的 % 活细胞以及 0.492 μM 十字孢碱和 6.305 μM 丝裂霉素 C 的 % 死细胞。

## 更多应用链接

### 1. 美谷分子官网

<https://www.moleculardevices.com.cn/applications/cell-imaging>

### 2. 高内涵成像及分析实验手册

<https://cn.bio-protocol.org/ebook/web/ebookpdf.aspx?id=13>

### 3. 关注“美谷分子仪器”公众号，在“资源库”内，点击“应用文章”，即可获取更多应用方法。