

用于定量细胞健康的自动化动力学成像分析

安捷伦 BioTek Cytation 9 与 BioSpa 8 结合使用，为细胞增殖与活力高通量分析提供更丰富的时间分辨信息

作者

Rebecca Mongeon 博士

Joe Clayton 博士

安捷伦科技有限公司

摘要

对细胞增殖和活力进行长期、高通量监测，对于理解药物效应及细胞作用机制至关重要。用于测量细胞健康的终点法检测通常依赖间接读数，所能提供的信息有限；而基于成像的传统方法则可能受限于环境稳定性、焦点漂移、多重分析能力和分析复杂性。为了应对这些挑战，我们基于安捷伦 BioTek Cytation 9 细胞成像多功能微孔板检测仪实现了自动化动力学分析工作流程；该仪器在成像速度、宽场图像质量、激光自动聚焦稳定性和环境控制方面均有提升。将 Cytation 9 与安捷伦 BioTek BioSpa 8 全自动培养箱配合使用，实现了完全无人值守的长期活细胞研究。集成的安捷伦 BioTek Gen5 软件负责图像采集和分析，简化多参数工作流程，并加速数据解析。

在这项概念验证研究中，我们采用多功能无标记和荧光成像策略，将明场成像与多重活力染色相结合，对 96 孔和 384 孔板中的 HT-1080 细胞进行监测。每 2 小时一次、持续 4 天的全自动成像实现了对细胞健康和剂量-响应的纵向定量分析，并测定了细胞增殖、早期凋亡和不可逆细胞死亡的 IC_{50} 值。该工作流程揭示了多种抗肿瘤化合物的独特动力学特征，能够以高灵敏度捕捉到细胞分裂停滞、凋亡激活、裂解性细胞死亡和延迟细胞毒性反应。

前言

调节性细胞死亡对于组织的正常发育和维持至关重要，而失调则会导致多种疾病。肿瘤学面临的一大挑战是，恶性细胞会在治疗干预过程中逃避或延迟进入程序性细胞死亡途径^[1]。无论是通过化疗药物、靶向药物还是免疫调节疗法，许多癌症疗法的目的都是促使癌细胞走向不可逆的细胞死亡。开发灵敏可靠的细胞生长和活力监测方法对于药物发现、基础研究和转化研究至关重要。解析决定细胞进入不可逆死亡的分子事件，以及癌细胞用来抵抗这些事件的机制，仍然是这些领域的重要研究方向。

活细胞成像技术的进步实现了对细胞死亡过程的连续监测，并提升了对驱动细胞死亡的信号的表征能力。早期凋亡的一个标志是磷脂酰丝氨酸 (PS) 从细胞质膜内叶翻转到外叶^[2]。本研究使用 eAnnexinV Green 荧光探针针对早期凋亡的 PS 外翻进行可视化；该探针与 PS 结合后荧光增强，可实时指示凋亡通路的激活情况^[3]。当与无标记增殖测量相结合时，这些读数能更全面地展现细胞如何生长、对治疗的反应以及走向不可逆细胞死亡的过程。

细胞膜完整性丧失通常发生于细胞死亡的后期阶段，代表一个关键的转折点^[4]。这一变化可通过细胞核摄取膜不可透过性染料（如碘化丙啶 (PI)）来检测，从而实时可视化不可逆的细胞死亡。将早期凋亡指标与晚期死亡标志物整合，可构建一种多参数方法，提供比传统终点法测量更丰富的见解。

由于细胞死亡是随时间动态进展的过程，动力学成像能更全面地反映治疗反应。长时间成像可揭示细胞反应的时间节点、速率和顺序，为研究药物作用机制、治疗敏感性和恢复潜力提供支持。然而，在高通量研究中开展长时间活细胞成像，需要在整个实验期间保持环境稳定、防止焦点漂移并维持图像质量。

本文展示了一种稳健的增殖和活力检测方法，在 96 和 384 孔板中整合了长时间无标记成像和荧光成像（图 1）。Cytation 9 细胞成像多功能微孔板检测仪整合了多通道荧光成像、明场成像和激光自动聚焦，可确保长时间成像过程中，稳定可靠地采集高质量图像。宽场相机与更高的成像速度简化了高内涵动力学工作流程。与 BioSpa 8 全自动培养箱集成，能够实现稳定的环境控制和完全无人值守的操作，从而能够以高通量模式进行稳健的长时间动力学成像实验。

实验部分

材料

试剂

除非另有说明，所有化学品均购自 Sigma Aldrich，包括甲氨蝶呤（货号 A6770）、Hoechst 33342（货号 B2261）和碘化丙啶（货号 P4170）。星形孢菌素（货号 1285）、长春碱（货号 1256）和诺考达唑（货号 1228）均购自 Tocris Biosciences。eAnnexinV Green 购自安捷伦科技公司（货号 8711006）。

细胞培养

HT-1080 纤维肉瘤细胞购自 ATCC（货号 CCL-121），并在添加了 10% FBS、1x GlutaMAX（Thermo Fisher Scientific，货号 35050061）和 primocin 抗生素（InvivoGen，货号 ant-pm-1）的 Advanced DMEM 培养基（Thermo Fisher Scientific，货号 12491015）中培养。将细胞在 37 °C、含 5% CO₂ 的加湿培养箱中维持培养，并在 80% 汇合度下常规传代。为进行增殖和活力测定，将 HT-1080 细胞接种于 96 孔（Corning，货号 3904）和 384 孔（Revvity，货号 6057600）微孔板中。

仪器

Cytation 9 细胞成像多功能微孔板检测仪配备以下附件：4x 平场扩展型复消色差物镜（货号 1220573）、10x 平场萤石物镜（货号 1220518）、DAPI 滤光片和 LED 模块（货号 1225100 和 1225013）、GFP 滤光片和 LED 模块（货号 1225101 和 1225001）、碘化丙啶滤光片和 LED 模块（货号 1225111 和 1225003），以及激光自动聚焦选项。

方法

细胞培养与检测设置

实验接种时，收集 HT-1080 细胞，将细胞悬液分别加入 384 孔板和 96 孔板，使每孔最终细胞数分别约为 500 个和 1000 个。接种培养基含有 Hoechst 33342 (30 nM)，以确保有足够的时间让标记物被细胞摄取并达到平衡。接种后的培养板在室温下静置 30 分钟，使细胞贴壁并保持孔内均匀分散，随后转移至组织培养箱。过夜培养（约 14 小时）后，从培养箱中取出培养板，加入配制好的含待测化合物的培养基，并加入活力指示剂。eAnnexinV Green 以 0.25 µg/mL 的终浓度（1:200 稀释）加入培养板，碘化丙啶以 1.5 µM 的终浓度加入培养板。加入待测化合物和活力指示剂后，立即开始成像。

系统概述与环境管理

为实现全自动、长时间成像，将安捷伦 BioTek Cytation 9 与 BioSpa 8 全自动培养箱联用。BioSpa 8 在加湿培养舱中长期维持 37 °C、5% CO₂ 的环境条件，最多可容纳八块微孔板。安捷伦 BioTek BioSpa OnDemand 软件根据预设时间表安排并传送 96 孔板和 384 孔板至 Cytation 9，连续多日定时成像。在成像期间，Cytation 9 通过 Gen5 软件中的可调节机载控制功能，维持 37 °C、5% CO₂ 的环境条件。

自动图像采集与处理

为同时进行增殖和活力分析，在 Cytation 9 与 BioSpa 8 活细胞分析平台上，每 2 小时对 96 孔和 384 孔板中的 HT-1080 培养细胞进行一次动力学成像，持续 4 天。以 4x 放大倍率在孔中心采集图像，涵盖三个荧光通道、高对比度明场，以及用于细胞计数分析的失焦（-300 µm 偏移）高对比度明场图像。同时以 10x 放大倍率在三个荧光通道和标准明场模式下采集图像，用于更详细的形态学观察。

图像与数据分析

所有图像采集和分析均使用 Gen5 软件完成。利用 Gen5 软件中的细胞分析步骤，对所有图像通道（包括无标记、细胞核标记、eAnnexinV 和 PI 图像）进行细胞计数。各通道的细胞识别设置见表 1。图像分析完成后，使用 Gen5 软件中的下游数据分析工具进行归一化、动力学计算（例如曲线下面积积分）、最大生长速率计算、倍增时间以及剂量-响应分析。进一步的统计分析使用 Prism GraphPad 软件完成。

表 1. 安捷伦 BioTek Gen5 软件细胞分析步骤设置

参数	无标记 细胞计数	核细胞计数	eAnnexinV+ 细胞计数	PI+ 细胞计数
一级 Mask				
检测通道	明场： 高对比度[2]	DAPI	GFP	碘化丙啶
阈值	6000	3000	6000	8000
背景	黑	黑	黑	黑
拆分接触对象	是	是	是	是
填充 Mask 上的孔	是	是	是	是
最小对象尺寸	8	5	15	7
最大对象尺寸	100	100	100	100
包括主边缘对象	是	是	是	是
分析整个图像	是	是	是	是
先进的检测选项				
滚球直径	20	30	30	30
图像平滑强度	5	1	3	2
评估背景	5	5	5	5
一级 Mask	使用阈值 Mask	使用阈值 Mask	使用阈值 Mask	使用阈值 Mask



图 1. 安捷伦 BioTek Cytation 9 多功能微孔板检测仪和 BioSpa 8 全自动培养箱上的通用增殖与活力检测工作流程。将相关细胞模型接种至检测板并加入处理化合物，在成像开始前加入活力指示剂。BioSpa 8 全自动培养箱将微孔板传送至 Cytation 9，随时间进行自动化多重成像和分析。Gen5 软件提供分析工具，用于详细的动力学增殖和活力分析，从而获得关于处理特征的定量信息

结果与讨论

工作流程概述

图 1 显示了在 Cytation 9 自动化微孔板检测仪和集成式 BioSpa 8 全自动培养箱上进行自动化增殖和活力分析的一般检测设置和工作流程。在这项概念验证研究中，将 HT-1080 纤维肉瘤细胞接种于 96 孔板和 384 孔板中进行高通量评估。细胞培养板用七个浓度梯度的多种抗肿瘤药物处理，并加入荧光活力指示剂以追踪细胞死亡机制随时间的变化。连续数天，每 2 小时自动采集多通道图像，包括无标记明场图像。Cytation 活细胞分析平台利用 Gen5 软件进行集成的图像采集和下游分析，包括细胞分割、特征提取、动力学绘图、积分分析和剂量-响应评估。

基于汇合度的细胞增殖分析

基于汇合度的评估无需标记即可轻松衡量细胞群增长状态。人工估计汇合度可能存在差异，而基于自动图像分析的汇合度定量则能实现客观且重现的细胞群增长测量。图 2 展示了利用 Cytation 9 微孔板检测仪和 Gen5 软件分析获得的 HT-1080 细胞培养在不同时间点的明场图像及相应汇合度分析结果。利用这一方法，可评估并比较药物处理后汇合度百分比随时间的变化（图 2D）。然而，汇合度仅能为细胞群增长提供相对参考，并不等同于细胞的真实计数，这限制了其在多重、高通量研究中的实用性。

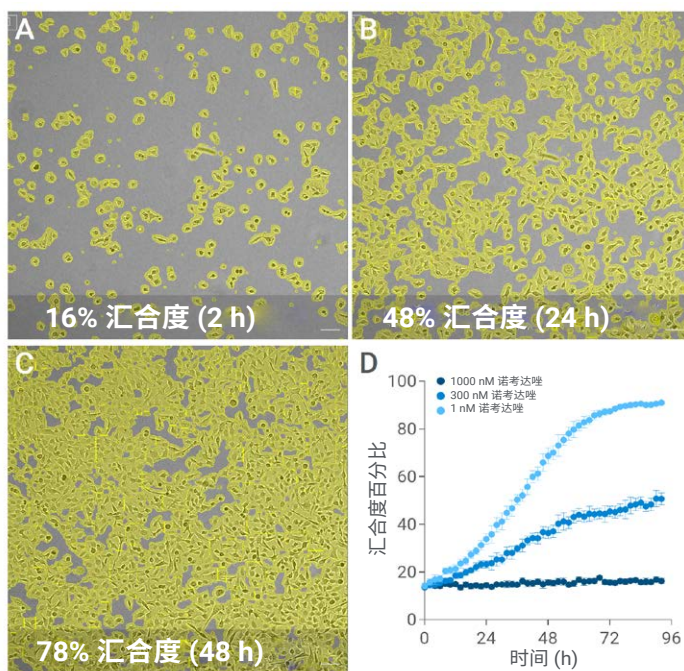
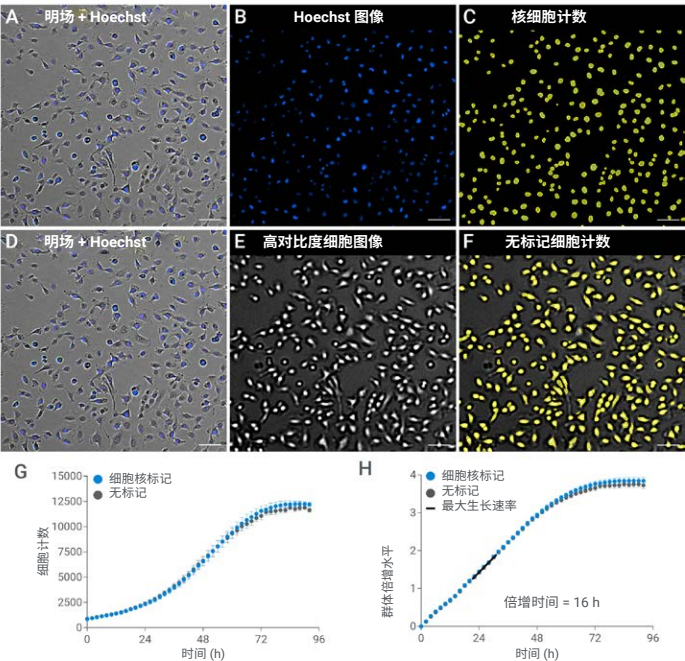


图 2. 通过汇合度测量评估细胞增殖。(A-C) 在 Cytation 9 上以 4x 放大倍率采集的 HT-1080 细胞培养板的高对比度明场图像。Gen5 软件自动图像分析确定细胞所占面积（黄色叠加），并计算每张图像的汇合度百分比。比例尺 = 100 μ m。(D) 绘制 HT-1080 细胞暴露于不同浓度诺考达唑后的汇合度百分比随时间变化曲线，显示汇合度随剂量增加而降低。数据点代表重复孔的平均值和标准偏差 (n = 12)

基于细胞计数的细胞增殖分析

通过在不同时间点对单细胞进行识别，可为增殖检测提供群体水平的定量分析。Cytation 9 仪器（及 Gen5 软件）通过多重成像和分析，支持标记和无标记两种细胞计数方法（图 3）。将 HT-1080 细胞在含 30 nM Hoechst 33342 的培养基中培养，进行细胞核标记，并测定细胞数量随时间的变化（图 3A–C）。细胞计数时通常首选细胞核标记，因为与细胞质标记相比，它能提供更清晰的细胞分离效果。Gen5 图像分析软件对细胞核标记图像进行分割并提供单个细胞核计数（图 3C）。



多重细胞活力指标分析

细胞增殖通常是药物效应的灵敏指标，因为它能从整体层面综合反映各类细胞生理过程。将细胞增殖与多重细胞活力指标同步分析，能够更全面的解析药物作用机制和治疗效果，弥补仅凭细胞增殖数据无法区分的生物学效应。本研究将细胞增殖与细胞活力标志物相结合，进行多重、高通量、动力学活细胞分析。

研究采用三种活细胞荧光指示剂结合无标记分析技术，评估 HT-1080 对一组抗肿瘤药物的反应（图 4）。首先，应用 Hoechst 33342 进行细胞核分割和总细胞标记（图 4A 和 E）。

Cytation 9 还支持通过高对比度明场细胞计数技术进行无标记细胞计数，如图 3 所示。在聚焦（图 3D）和失焦（图 3E）状态下采集高对比度明场图像，以提供用于细胞计数的高对比度细胞图像。Gen5 软件自动检测并计数高对比度细胞图像中的细胞（图 3F）。在 96 小时增殖检测中，HT-1080 细胞的核标记和无标记计数方法获得的细胞数量相当（图 3G）。可使用 Gen5 软件进一步分析细胞计数，确定群体倍增时间（图 3H）：经核标记和无标记两种计数方法分析，HT-1080 细胞的最快倍增时间约为 16 小时。

图 3. 通过荧光和无标记细胞计数技术评估细胞增殖。(A) 以 4x 放大倍率采集的活细胞明场与 Hoechst 33342 荧光细胞核染色叠加图像。(B) Hoechst 染色（终浓度 30 nM）为标记活细胞核随时间变化提供了一种可靠的方法。(C) 安捷伦 BioTek Gen5 数据分析软件自动识别低放大倍率图像中的单个细胞核（黄色叠加），并报告随时间变化的细胞计数。(D) 以 4x 放大倍率采集的活细胞明场与 Hoechst 荧光细胞核染色叠加图像。(E) 在安捷伦 BioTek Cytation 9 细胞成像多功能微孔板检测仪上采集失焦高对比度明场图像，可实现无标记细胞定量。(F) Gen5 软件自动检测高对比度细胞计数图像中的单个细胞（黄色叠加）。(G) 绘制 HT-1080 细胞培养中细胞计数随时间变化曲线，结果表明使用细胞核染色（蓝色）和高对比度细胞计数技术（灰色）可获得高度可比的结果。数据点代表重复孔的平均值和标准偏差 (n = 10)。(H) 通过 Gen5 中的群体倍增和最大速率分析进一步评估生长速率，使用标记或无标记方法均得出 HT-1080 细胞的倍增时间约为 16 小时。数据点代表重复孔的平均值和标准偏差 (n = 10)。比例尺 = 100 μm

Hoechst 33342 会在活细胞和死细胞中积累，提供随时间变化的总细胞读数。其次，应用 eAnnexinV Green 作为早期凋亡指示剂（图 4B 和 F）。eAnnexinV Green 可与磷脂酰丝氨酸结合，后者通常位于细胞质膜内叶，可用于报告早期凋亡过程中的膜翻转事件。最后，应用碘化丙啶 (PI) 作为不可逆、已确定的细胞死亡的指示剂（图 4C 和 G）。PI 仅在膜完整性丧失时进入细胞，可作为已确定且不可逆的细胞死亡的指示剂。多种活细胞指示剂共同描绘出细胞增殖和死亡机制随时间变化的详细图景。

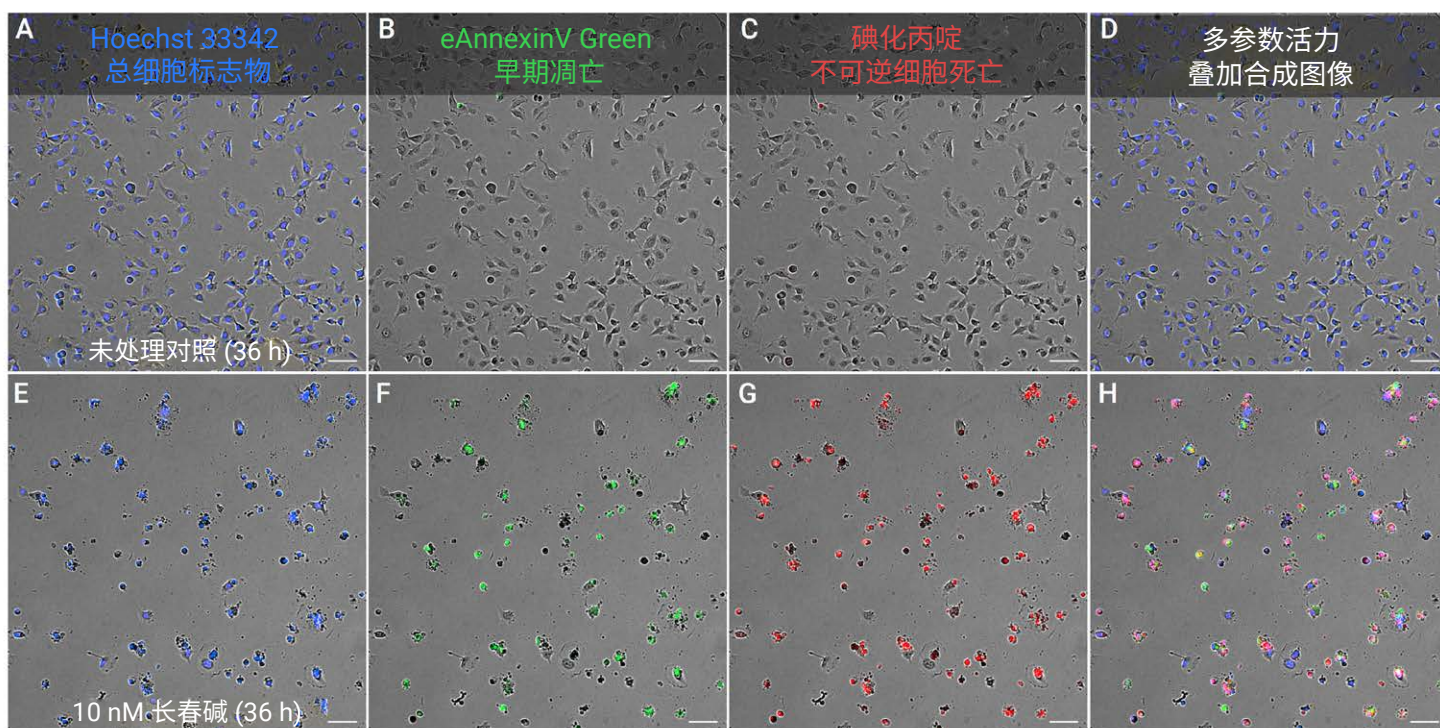


图 4. eAnnexinV 和 PI 信号分析的荧光读数揭示活细胞检测中的细胞毒性机制。(A 和 E) 使用 Hoechst 33342 (30 nM) 进行活细胞染色，为细胞核分割和总细胞计数提供标记。Hoechst 染色在 A 图所示的未经处理的 HT-1080 细胞和 E 图所示的应答细胞毒性处理的凝聚细胞核中均得以保留。(B 和 F) eAnnexinV Green 标记早期凋亡细胞，可提供与凋亡通路激活相关的早期膜翻转事件的信息。B 图所示的未经处理的 HT-1080 细胞培养板几乎未呈现 eAnnexinV Green 染色，而 F 图所示的细胞毒性处理则显示明显染色。(C 和 G) 碘化丙啶 (PI) 是晚期凋亡和坏死事件的公认标志物，可报告膜破裂和不可逆细胞死亡。C 图中未经处理的 HT-1080 细胞排斥 PI，而 G 图中经处理的细胞则被 PI 强烈标记。(D 和 H) Hoechst、eAnnexinV Green 和 PI 染色的叠加合成图像。比例尺 = 100 μm

细胞增殖和细胞死亡机制的同步动力学分析

在配备 BioSpa 8 全自动培养箱的 Cytation 9 细胞成像多功能微孔板检测仪上，对 HT-1080 细胞培养板进行自动化、多重成像，并随时间推移进行监测。通过随时间变化的细胞计数生成增殖曲线，并取重复孔平均值（图 5A）。利用 Gen5 软

件通过图像分析识别 eAnnexinV Green 阳性细胞，并评估阳性细胞百分比随时间的变化（图 5B）。同样，对 PI 阳性细胞进行鉴定、定量，并绘制阳性细胞百分比随时间变化的曲线（图 5C）。

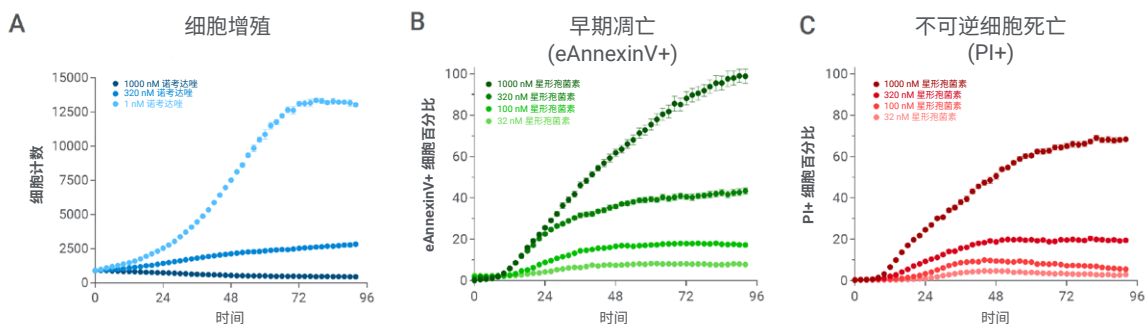


图 5. 细胞计数和归一化活力指标的动力学分析。(A) 不同浓度长春碱下评估的增殖曲线。数据点代表重复孔的平均值和标准偏差 ($n = 3$)。 (B) 在四种浓度长春碱下评估的凋亡标志物 eAnnexinV Green 阳性细胞百分比。数据点代表重复孔的平均值和标准偏差 ($n = 10$)。 (C) 在四种浓度长春碱下评估的不可逆细胞死亡标志物 PI 阳性细胞百分比。数据点代表重复孔的平均值和标准偏差 ($n = 10$)

不同处理的特征性细胞毒性反应谱

安捷伦 BioTek 自动化平台可进行同步多重细胞增殖和活力分析，揭示多种代表性抗肿瘤处理的特定图谱（图 6）。未经处理的对照 HT-1080 培养板快速增殖，凋亡或不可逆细胞死亡信号阳性细胞百分比可忽略不计（图 6A 和 E）。星形孢菌素处理导致显著且快速的凋亡，而不可逆细胞死亡相对延迟（图 6B 和 F）。诺考达唑处理引发快速普遍细胞毒性，表现为

裂解性细胞死亡和凋亡信号同步增加（图 6C 和 G）。膜破裂后，PI 和 eAnnexinV Green 均可进入并共同标记细胞。甲氨蝶呤的处理图谱显示，其主要效应是细胞分裂停滞和生长阻滞，在检测窗口内未检测到显著的细胞凋亡或不可逆的细胞死亡信号增加，该动力学特征与已知的作用抑制 — 通过抑制二氢叶酸还原酶干扰嘌呤合成，从而诱导 S 期阻滞 — 相符^[5]。

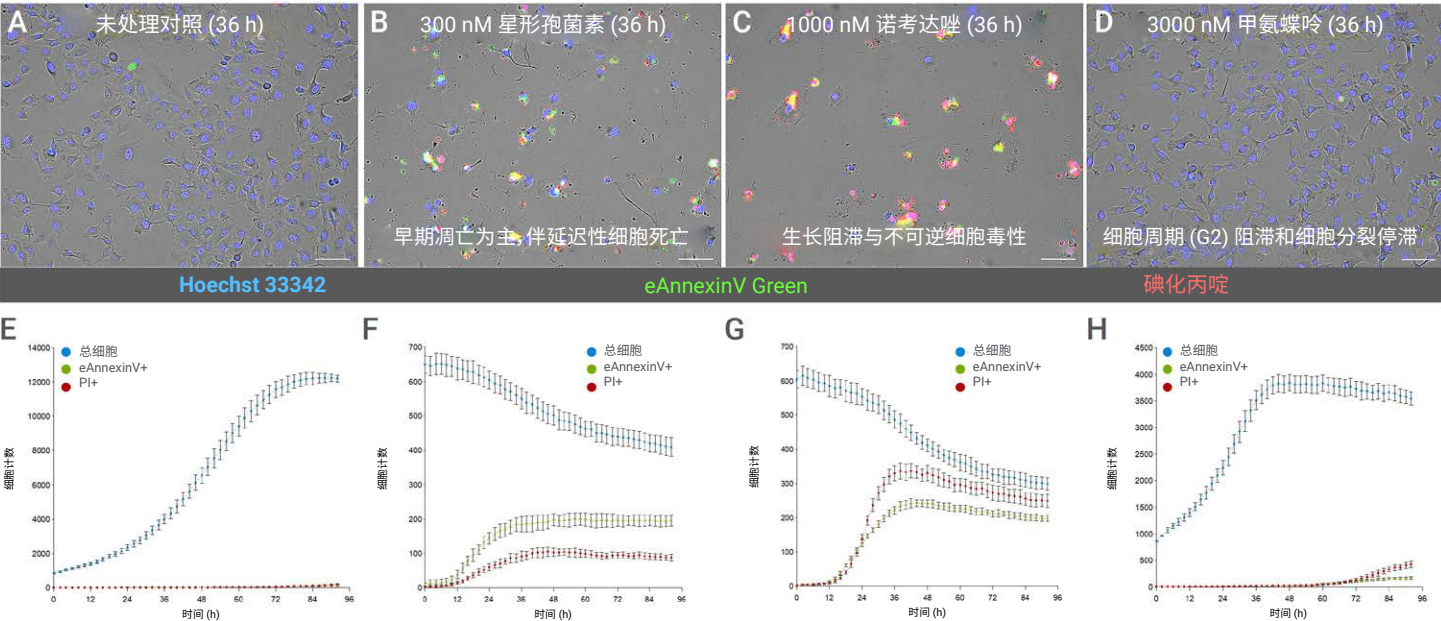


图 6. 连续多重输出揭示随时间变化的独特药物响应特征。(A 和 E) A 中示例图像为未经处理的 HT-1080 细胞培养板在 10x 放大倍率下的明场和多通道荧光叠加合成图像。示例图像取自 36 小时时间点，该时间点对应于各处理下药物响应的峰值时间。E 图为未经处理的 HT-1080 细胞培养板的相应动力学增殖和活力标志物分析。数据点表示重复孔的平均值和标准偏差 (n = 8)。(B 和 F) B 图中示例图像描绘星形孢菌素的代表性响应，包括增殖丧失以及凋亡和细胞死亡信号增加。F 图为相同浓度星形孢菌素对应的细胞增殖与活力标志物动力学分析曲线。数据点表示重复孔的平均值和标准偏差 (n = 10)。(C 和 G) C 图中示例图像描绘诺考达唑的代表性响应，包括增殖丧失以及凋亡和细胞死亡信号增加。G 图为相同浓度诺考达唑对应的细胞增殖与活力标志物动力学分析曲线。数据点表示重复孔的平均值和标准偏差 (n = 10)。(D 和 H) D 图中示例图像描绘甲氨蝶呤的代表性响应，包括初始增殖、平台期生长，且未伴随细胞死亡。H 图为相同浓度甲氨蝶呤对应的细胞增殖与活力标志物动力学分析曲线。数据点表示重复孔的平均值和标准偏差 (n = 3)。比例尺 = 100 μ m

延迟和低剂量暴露效应

图 5 中呈现的多种药物的主要效应，可通过同种药物的延迟和低剂量暴露分析进一步补充佐证（图 7）。未经处理的对照 HT-1080 细胞增殖至完全汇合（图 7A），而长时间暴露或低浓度药物处理则导致了若干可捕捉到的继发效应。低纳摩尔浓度的

星形孢菌素导致增殖减少和细胞形态的显著变化（图 7B）。同样，较低剂量的诺考达唑也导致增殖减少并伴随形态改变（图 7C）。在后期时间点，甲氨蝶呤表现出因持续细胞周期阻滞而导致的延迟细胞毒性（图 7D）。

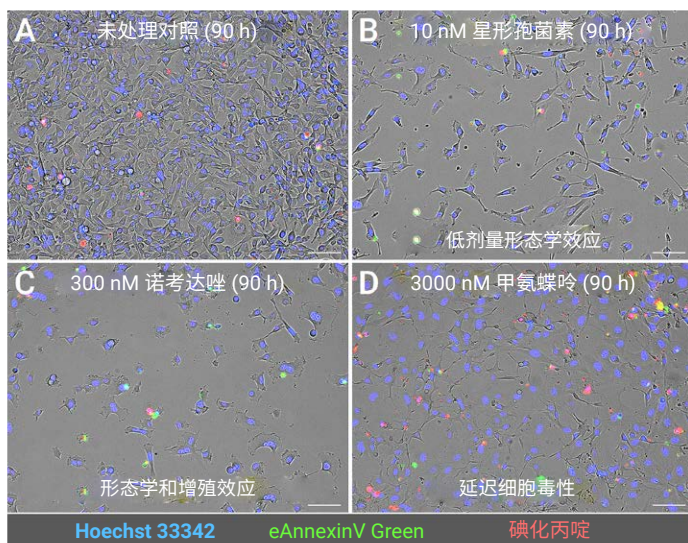


图 7. 动力学成像捕捉延迟和低剂量处理效应。(A) 未经处理的 HT-1080 细胞在生长达到完全汇合的后期时间点的多通道叠加合成图像。(B) 极低剂量星形孢菌素处理的相应时间点图像，可以看到对细胞增殖和形态的影响，但凋亡及细胞死亡程度轻微。(C) 长期暴露于较低剂量诺考达唑可捕捉到对形态和增殖的影响。(D) 主要导致细胞周期阻滞的甲氨蝶呤浓度在后期时间点表现出延迟的细胞毒性。比例尺 = 100 μ m

增殖和活力的剂量依赖性定量分析

虽然动力学曲线提供了相关测量值随时间变化的详细见解，但更深入的药理学理解还需要额外的剂量-响应分析。通过积分分析对细胞计数和活力信号的动力学曲线进行定量，提供曲线下面积 (AUC) 值用于剂量-响应分析。图 8 并列展示了四种抗肿瘤药物的增殖、早期凋亡和不可逆细胞死亡测量的剂量-响应分析。

剂量-响应评估显示，细胞增殖 (图 8A) 是最灵敏的药物效应指标，所有受试药物在此指标下测得最低的 IC_{50} 值。除甲氨蝶呤外，所有处理中早期凋亡标志物 eAnnexinV Green 的信号均随药物浓度增加而显著增强 (图 8B)。凋亡信号 IC_{50} 值通常高于增殖 IC_{50} 值，星形孢菌素甚至高出两个数量级。通过 PI 信号剂量-响应分析评估不可逆细胞死亡，结果显示该指标下所有药物测得的 IC_{50} 值最高 (图 8C)。所观察到的 IC_{50} 效

应与时间和浓度依赖性的连续过程一致，即细胞增殖的抑制先于凋亡事件，而凋亡事件又先于或同时伴随不可逆细胞死亡和膜完整性的不可逆丧失。

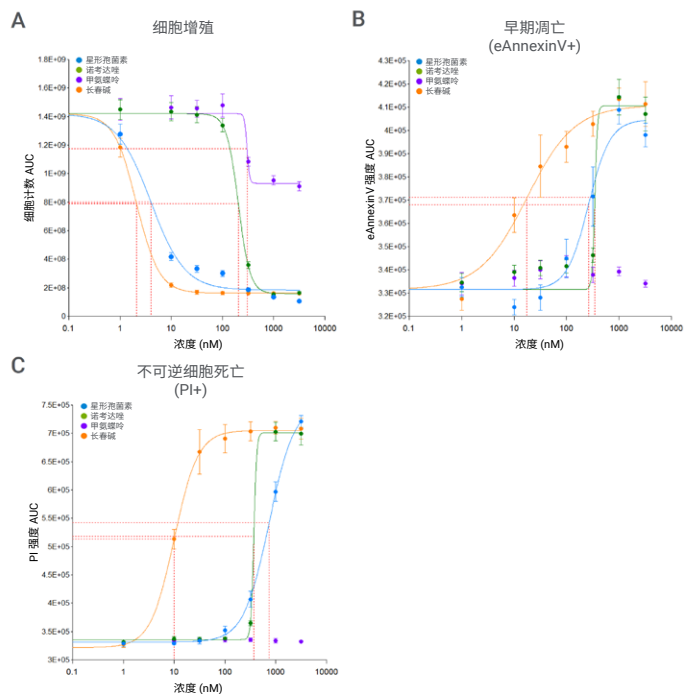


图 8. 药物对增殖、早期凋亡和不可逆细胞死亡影响的剂量-响应分析。(A) 四种药物影响 HT-1080 细胞培养增殖的剂量-响应曲线。将细胞计数曲线下面积 (AUC) 值对药物浓度作图，并在安捷伦 BioTek Gen5 软件中使用四参数拟合 (实线) 确定每种药物的 IC_{50} 值 (红色虚线)。增殖效应 IC_{50} 值分别为：星形孢菌素 4.0 nM，诺考达唑 200 nM，甲氨蝶呤 300 nM，长春碱 2.0 nM。数据点代表重复孔的平均值和标准偏差 ($n = 10$)。(B) 凋亡信号的剂量-响应分析。每个细胞的平均 eAnnexinV Green 信号相对于对照值进行归一化处理。将归一化信号 AUC 值对药物浓度作图，并在 Gen5 软件中使用四参数拟合 (实线) 确定每种药物的 IC_{50} 值 (红色虚线)。凋亡信号 IC_{50} 值分别为星形孢菌素 260 nM，诺考达唑 350 nM，长春碱 18 nM。甲氨蝶呤未显示显著的凋亡响应。数据点代表重复孔的平均值和标准偏差 ($n = 10$)。(C) 不可逆细胞死亡信号的剂量-响应分析。每个细胞的平均 PI 信号相对于对照值进行归一化处理。将归一化信号 AUC 值对药物浓度作图，并在 Gen5 软件中使用四参数拟合 (实线) 确定每种药物的 IC_{50} 值 (红色虚线)。不可逆细胞死亡信号 IC_{50} 值分别为星形孢菌素 740 nM，诺考达唑 370 nM，长春碱 10 nM。甲氨蝶呤未显示显著的不可逆细胞死亡响应。数据点代表重复孔的平均值和标准偏差 ($n = 10$)

跨规格高通量微孔板检测的拓展性验证

安捷伦 BioTek Cytation 9 与 BioSpa 8 自动化平台兼容多种微孔板规格，支持高通量增殖和活力检测。本文提供了在 96 和 384 孔板中进行的示例检测，这两种规格常用于高通量细胞分析（图 9）。本检测所用的 4x 低放大倍率成像在 384（图 9A）和 96（图 9E）孔板中成像的细胞区域大小相近。每张图像的成像区域大小相近意味着使用 Gen5 软件图像分析识别和分析

的细胞数量相似（图 9B 和 F），从而在不同规格的孔板间获得相似的统计效能。与 96 孔（图 9G）相比，384 孔（图 9C）本身具有更大的容量，为增加测试条件数量或技术重复数量提供了机会。本实验中，96 孔和 384 孔两种形式最终在分析结果上表现出优异的一致性，这通过比较增殖效应的剂量-响应分析和 IC_{50} 测定得到了证实（图 9D 和 H）。

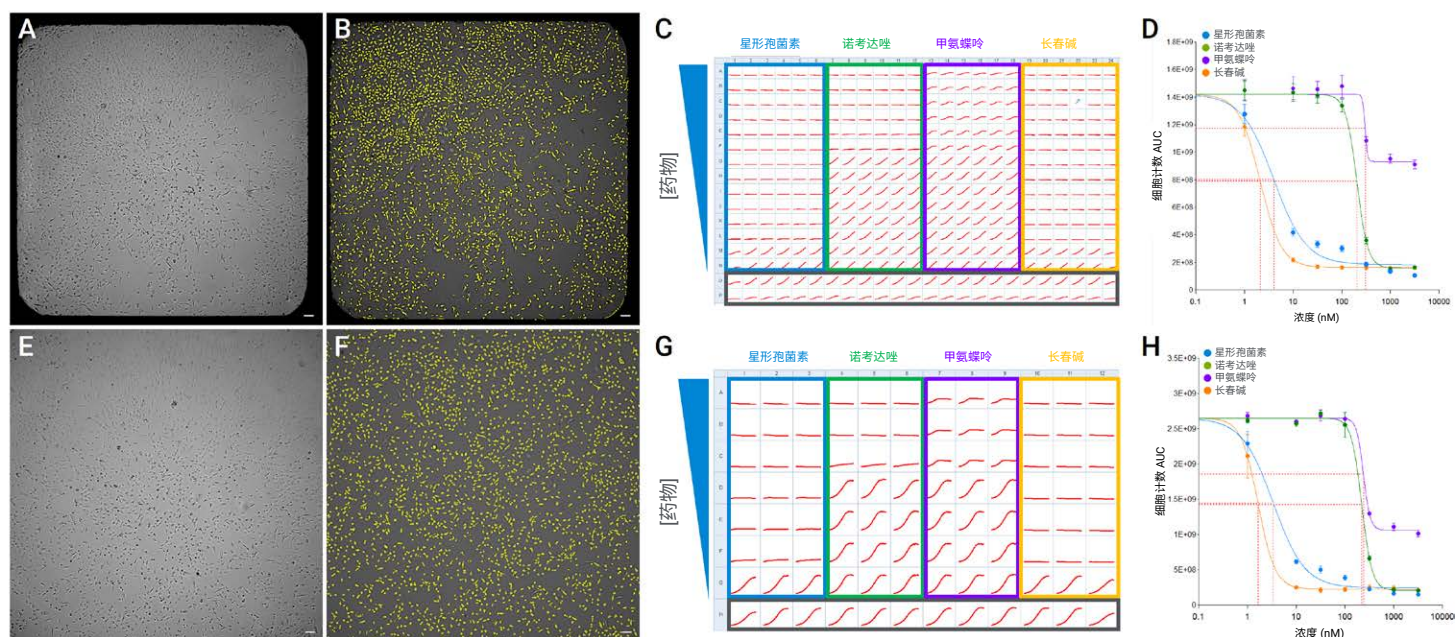


图 9. 灵活支持多种高通量检测形式。(A) 在安捷伦 BioTek Cytation 9 细胞成像多功能微孔板检测仪上以 4x 放大倍率采集的 384 孔板的明场图像。单张 4x 放大倍率图像即可对 384 孔板进行全孔分析。(B) 使用安捷伦 BioTek Gen5 软件进行细胞识别（黄色叠加）的高对比度细胞计数图像，可识别孔内所有细胞。(C) 384 孔板概览图，显示全板的增殖曲线（红色曲线），不同颜色的框标示不同的测试化合物（蓝色、绿色、紫色和金色）及对照孔（灰色）。(D) 384 孔板中四种测试化合物的增殖剂量-响应分析结果。数据点代表重复孔的平均值和标准偏差 ($n = 12$)。增殖效应 IC_{50} 值分别为：星形孢菌素 4.0 nM，诺考达唑 200 nM，甲氧蝶呤 300 nM，长春碱 2.0 nM。(E) 在 Cytation 9 微孔板检测仪上以 4x 放大倍率从 96 孔板单孔中心采集的明场图像。单张 4x 放大倍率图像可覆盖约 40% 的总孔面积，成像的面积与 384 孔板相似但略大，如 A 图所示。(F) 使用 Gen5 软件进行细胞识别（黄色叠加）的高对比度细胞计数图像，可识别图像中所有细胞。比例尺 = 100 μm 。(G) 96 孔板概览图，显示全板的增殖曲线（红色曲线），不同颜色的框标示不同的测试化合物（蓝色、绿色、紫色和金色）及对照孔（灰色）。(H) 96 孔板中四种测试化合物的增殖剂量-响应分析结果。增殖效应 IC_{50} 值分别为：星形孢菌素 3.4 nM，诺考达唑 220 nM，甲氧蝶呤 240 nM，长春碱 1.7 nM。数据点代表重复孔的平均值和标准偏差 ($n = 3$)

结论

安捷伦 BioTek Cytation 9 与 BioSpa 8 平台为长时间活细胞成像提供了全自动、无人值守的解决方案，可提供更快的采集速度、更高的图像质量，以及在持续长时间检测中稳定的环境条件。无标记高对比度明场成像与多重荧光标记相结合，实现了对细胞增殖、活力及死亡通路的同步、多维度评估，并结合直接细胞计数、归一化活力指标和信息丰富的图像，从而在单次实验中获取更全面的细胞表型信息与机制见解。

该方法在 96 和 384 孔板中均表现出稳健的性能，可通过 BioSpa 8 自动管理多达八块微孔板。安捷伦 BioTek Gen5 软件中统一的图像采集与分析界面集成了图像分割、动力学评估和剂量-响应定量功能，提供了强大的分析灵活性。

这些出众性能使 Cytation 9 和 BioSpa 8 系统成为全面活细胞分析的稳健且可扩展的平台。自动化多功能成像、集成分析工具和高通量处理能力，可为药物发现、肿瘤学研究、细胞毒性分析以及作用机制研究等一系列应用提供有力支持。

参考文献

1. Hanahan, D. and Weinberg, R. A. The Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **2011**, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
2. Segawa, K. and Nagata, S. An Apoptotic 'Eat Me' Signal: Phosphatidylserine Exposure. *Trends in Cell Biology* **2015**, 25(11), 639–650. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.08.003>
3. Vermes, I.; Haanen, C.; Steffens-Nakken, H.; Reutelingsperger, C. A Novel Assay for Apoptosis: Flow Cytometric Detection of Phosphatidylserine Expression on Early Apoptotic Cells Using Fluorescein-Labelled Annexin V. *J Immunol Methods* **1995**, 184, 39–51. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(95\)00072-i](https://doi.org/10.1016/0022-1759(95)00072-i)

4. Gong, Y.; Fan, Z.; Luo, G.; Yang, C.; Huang, Q.; Fan, K.; Cheng, H.; Jin, K.; Ni, Q.; Yu, X. et al. The Role of Necroptosis in Cancer Biology and Therapy. *Mol Cancer* **2019**, 18, 100. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-1029-8>
5. Visentin, M.; Zhao, R.; Goldman, D. The Antifolates. *Hematol Oncol Clin North Am* **2012**, 26, 629–48. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2012.02.002>

本应用中使用的产品

安捷伦产品

BioTek Cytation 9 细胞成像多功能微孔板检测系统 [🔗](#)

BioTek BioSpa 8 全自动培养箱 [🔗](#)

BioTek BioSpa 活细胞分析系统 [🔗](#)

用于成像和显微镜的 BioTek Gen5 软件 [🔗](#)

www.agilent.com/lifesciences/biotek

DE-013343

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2026
2026 年 3 月 16 日，中国出版
5994-9060ZHCN

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278（手机用户）

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

