

安捷伦 BioTek 活细胞动态荧光分析

应用文集



目录

前言	3
荧光探针	4
荧光蛋白	5
仪器	6
活细胞动态荧光分析	7
结合细胞周期/荧光蛋白融合检测细胞周期阶段	7
活细胞的凋亡和坏死动力学成像	9
使用动态活细胞成像表征钙流	11
基于 2D 共培养细胞模型的划痕愈合分析	13
通过活细胞成像监测线粒体动力学	15
结论	18
参考文献	18

前言

生物体由多种不同的组织和细胞类型组成，天然具有动态性。因此，活细胞成像是各种研究学科实验室的重要工具。自 17 世纪 Antonie van Leeuwenhoek 首次使用显微镜观察活兔耳朵毛细血管中的血流以来，研究细胞的方法发生了许多变化^[1,2]。大量早期的细胞分析都以终点法进行实验，即将细胞与测试分子共同孵育一段时间后再进行微孔板读数或成像步骤以确定效果。虽然终点法提供了一个易于参考的方案，但是往往由于共培养时间过短或过长，导致无法获得真实有效的结果，例如准确的 EC_{50} 值（图 1）。

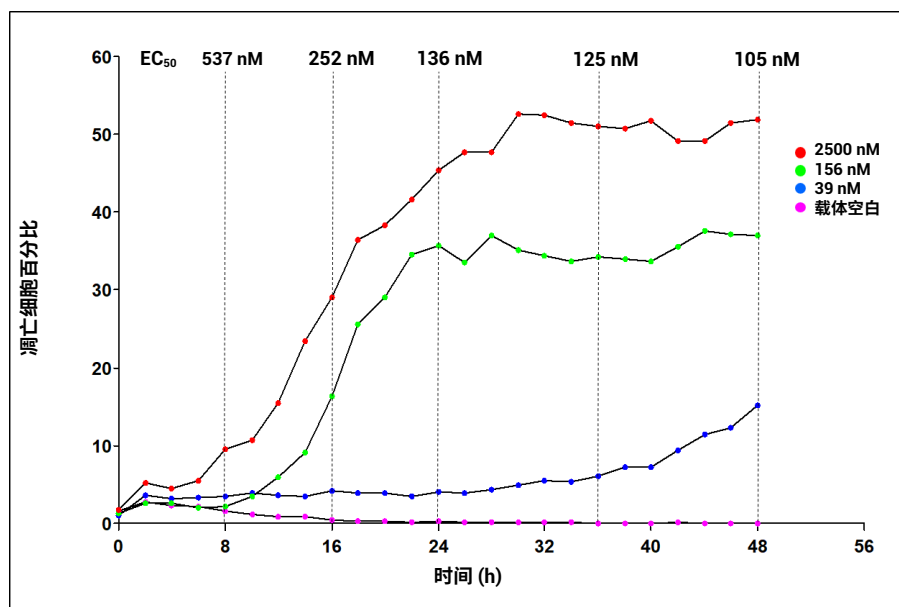


图 1. 通过动态监测用不同浓度喜树碱孵育的 HT1080 细胞测定的凋亡细胞百分比。根据孵育 8、16、24、36 和 48 小时后的全药物滴定曲线下面积计算 EC_{50} 值

使用动力学分析评估处理对测试细胞模型的影响，对整个孵育期间进行监测，可以更深入地了解细胞响应的生物相关性（图 1）。除了能够检测细胞事件随时间的信号调节外，动力学成像分析还允许观察细胞形态和表型的变化。结合这两种信息类型可以更全面地理解分子对细胞产生的影响。动力学成像还可用于确定适当的孵育时间，以便纳入下游的高通量终点分析。这项技术带来了许多发现，包括证明了源性内皮细胞的存在^[3,4,5]，证明了细胞因子对谱系定向的指导作用^[6]，以及在神经发生^[7,8,9,10]和免疫学^[11,12,13]领域取得了许多突破。

此外，动力学实时成像与传统荧光显微镜技术的结合已成为细胞分析方法中不可或缺的一部分。荧光成像依赖于用特定波长的光照射荧光分子，最好接近荧光物质激发光谱的峰值，并检测在较长波长处的发射光。常用的活细胞荧光探针、染料和荧光标记蛋白为研究几乎任何感兴趣的细胞过程提供了一系列的研究工具。

荧光探针

目前已开发出广泛应用于活细胞动力学成像的荧光探针。这些探针大致可分为以下三类：1) 用于标记整个细胞或细胞结构以进行识别和鉴定；2) 追踪特定细胞结构的变化；或 3) 追踪细胞内的表型变化。

第一类荧光探针旨在标记整个细胞或亚细胞器以便进行计数，例如 DRAQ5 (Biostatus Limited, Leicestershire, UK)、MitoTracker (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) 和 Cytopainter (Abcam, Cambridge, UK) 等染料，它们分别用于标记细胞核、线粒体和溶酶体。而 CellTracker 染料 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) 则标记整个细胞，以便识别。

第二组探针用于追踪特定细胞器的变化。这类探针最常用于检测线粒体膜电位的变化。可渗透细胞 TMRE 等探针聚集在具有高膜电位的活性线粒体中，而失去极性或不活跃且膜电位降低的线粒体无法固定 TMRE。

最后，研究人员开发了大量的探针来追踪细胞凋亡、坏死、自噬和氧化应激等多种表型细胞事件。这些探针会在表型变化时产生相应的荧光信号。

例如，荧光凋亡探针或与细胞凋亡阶段存在的分子结合，如磷脂酰丝氨酸的外部暴露，或被这些分子裂解，如通过 caspase-3 裂解产生荧光最终产物。碘化丙啶等坏死探针是非渗透性细胞染料，因此只有在坏死细胞的细胞膜受损后，染料才能进入细胞，与细胞核酸结合并产生荧光信号。

荧光蛋白

虽然大部分动力学荧光活细胞成像通常使用荧光探针完成，但整合基因编码的荧光蛋白标签（荧光蛋白）也发挥着重要作用。Prasher 及其同事^[14] 首次报道了从 *Aequorea victoria* 中克隆出绿色荧光蛋白 (GFP)，并因此获得 2008 年诺贝尔化学奖。在过去的几十年中，已经设计出数十种具有不同激发和发射波长范围的荧光蛋白，覆盖了紫外-可见光谱和近红外光谱范围^[15,16,17,18]。不仅可以设计发射不同波长信号的荧光蛋白，还可以将其定位到特定亚细胞位置，如核、核膜或线粒体。广泛的光谱特性和定向定位能力使这些蛋白非常适用于多重细胞分析，可以同时追踪多种目标和表型现象。

动态活细胞荧光成像技术的结合为监测各种细胞现象提供了一种理想的方法，这些现象的持续时间可能为几秒、几小时、几天甚至几周。在本应用文集的其余部分，我们将介绍如何使用 Agilent BioTek 细胞成像和自动化仪器优化和执行不同的荧光动力学活细胞分析程序。

仪器



Agilent BioTek Lionheart FX 全自动智能成像分析系统

Lionheart FX 全自动智能成像分析系统是一款结构小巧的显微镜系统，可用于广泛的成像工作流程。该系统具有高达 60 倍的空气镜放大倍率；60 倍和 100 倍油镜放大倍率，具有荧光、明场、彩色明场和相差通道，可大大扩展应用范围。环境控制包括温控至 40 °C、CO₂/O₂ 控制和湿度控制仓，优化了动力学活细胞成像应用的条件。



Agilent BioTek Cytation 7 细胞成像多功能微孔板检测系统

Cytation 7 细胞成像微孔板检测系统将全自动的数字化正置和倒置宽场显微成像系统与传统的多功能微孔板检测仪相结合。倒置显微镜可对样品进行可视化，支持 1.25 到 60 倍的荧光、明场、彩色明场成像；而具备反射光成像功能的正置显微镜则可实现 ELISpot 或快速切片扫描以及 ROI 检测工作流程等应用。



Agilent BioTek Cytation 5 细胞成像多功能微孔板检测系统

Cytation 5 细胞成像多功能微孔板检测系统将自动化数字显微成像和常规微孔板检测结合到了一个可配置、可升级的平台中。显微成像模块可在荧光、明场、高对比度明场、彩色明场和相差通道成像下提供高达 60 倍的放大倍率；温控至 65 °C 和 CO₂/O₂ 控制可助力活细胞成像工作流程。



Agilent BioTek BioSpa 活细胞分析系统

BioSpa 活细胞分析系统配备 Agilent BioTek 全自动培养箱和 Agilent BioTek Cytation 成像仪，可在多达 8 块微孔板或其他样品容器中实现动力学活细胞分析工作流程的自动化。温度和 CO₂/O₂ 控制以及湿度监测可为活细胞成像工作流程提供支持。可集成液体处理，实现进一步的流程自动化。



Agilent BioTek AutoScratch 全自动微孔板细胞划痕仪

AutoScratch 全自动微孔板细胞划痕仪可在微孔板培养的单层细胞上自动划出宽度均一的划痕。简单的一键式操作和无需工具即可便捷更换的划痕针头使其能轻松处理 96 或 24 孔板，用于常见的迁移和侵袭试验。这一紧凑系统还提供了内置的划痕针清洗程序，防止划针粘附细胞和污染。

活细胞动态荧光分析

结合细胞周期/荧光蛋白融合检测细胞周期阶段

检测原理

Premo 荧光泛素化细胞周期指示剂 (FUCCI) 技术 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) 基于两种细胞周期调控蛋白, 即 geminin 和 Cdt1, 它们分别与绿色 (emGFP) 和红色 (TagRFP) 荧光蛋白融合^[19]。由于 Cdt1 和 geminin 只存在于细胞周期的特定阶段, 因此荧光蛋白嵌合体也具有类似的依赖性。特异性泛素 E3 连接酶对这些嵌合结构进行泛素化降解, 并表现出活性的时间调控, 导致 geminin 和 Cdt1 的水平在细胞周期中循环。Geminin-GFP 在 G1 期降解, 而核内红色荧光表示存在 Cdt1-TagRFP。在 S、G2 和 M 期, Cdt1-TagRFP 被降解, 仅保留 geminin-GFP, 导致细胞核出现绿色荧光。在 G1/S 转换期, 当 Cdt1 水平降低而 geminin 水平升高时, 两种蛋白均存在, 产生黄色荧光核信号。这种周期性的颜色变化 (红色到黄色到绿色) 可用于追踪细胞周期和分裂过程中的进展 (图 2)。

图 2. Premo FUCCI 细胞周期传感器的动态颜色变化。FUCCI 是活细胞中细胞周期进展和分裂的双色荧光传感器。细胞从 G1 期的红色变为 G1/S 间期的黄色, 以及 S、G2 和 M 期的绿色, 因为 geminin 和 Cdt1 分别与一种绿色和红色荧光蛋白融合, 在细胞周期的特定时点表达

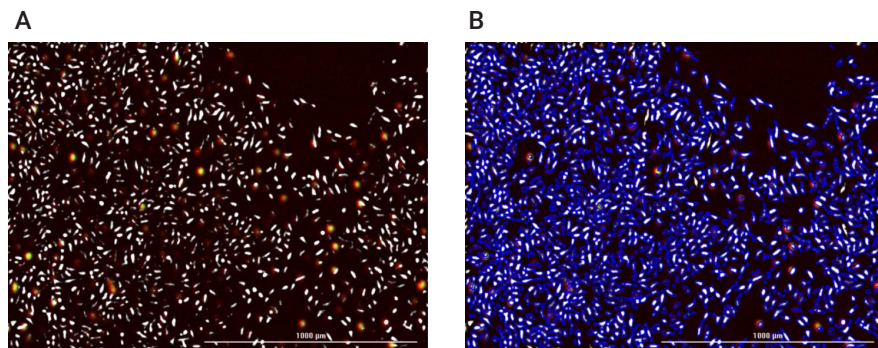
方法概述

使用 BacMam 2.0 转染 FUCCI 传感器, 并在处理过程中加入潜在的细胞周期抑制剂, 通过 Agilent BioTek 细胞成像仪的 4 倍物镜和高对比度明场、GFP 和 RFP 成像通道, 每隔 90 分钟捕获一次图像, 动态监测细胞周期进程。高对比度明场通道捕获图像内的所有细胞, 而 GFP 通道捕获 S、G2 和 M 期的细胞, RFP 通道捕获 G1 和 S 期的细胞。

分析和结果

在图像捕获后, 对所有图像进行预处理, 以去除背景信号 (图 3A)。然后利用高对比度明场通道的信号变化, 自动在图像中的所有细胞周围放置一级对象 Mask (图 3B)。

图 3. 通过细胞分析应用对象 Mask 之前 (A) 和之后 (B) 的预处理高对比度明场、GFP 和 RFP 图像叠加图



在二级 Mask 处理过程中，一级 Mask 被放大以捕获 GFP 和 RFP 信号（图 4A）。进行亚群分析以识别 G1 或 G2/M 期的细胞。使用 RFP 成像通道在二级 Mask 内捕获到 Cdt1-TagRFP 蛋白最小峰值信号的细胞被识别为处于 G1 期（图 4B），而使用 GFP 成像通道在二级 Mask 内捕获到 Geminin-GFP 蛋白的最小峰值信号的细胞则被识别为处于 G2/M 期（图 4C）。在 S 期，当两种细胞周期融合蛋白同时存在时，细胞呈黄色。要符合进入 S 期的标准，细胞必须满足两种蛋白的最小峰值信号（图 4D）。

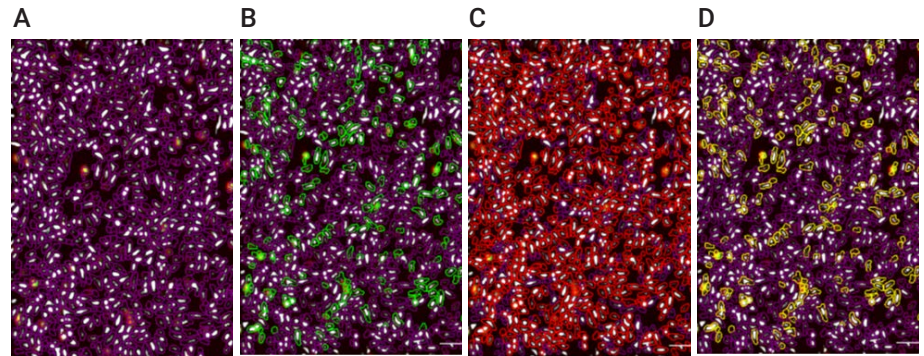


图 4. (A) 在二级 Mask 处理过程中扩大的一级 Mask。然后使用峰 RFP 和/或 GFP 信号识别处于 (B) G1、(C) G2/M 或 (D) S 细胞周期阶段的细胞亚群

完成分析之后，确定孵育期间每个时间点的总细胞计数、G1（红色）、G2/M（绿色）和 S（黄色）细胞计数。从初步确定的红色或绿色细胞数中减去黄色细胞，计算最终的红色细胞和绿色细胞计数，以避免重复计数（图 5A）。然后将亚群细胞计数除以每个时间点的总细胞值，计算红色、绿色和黄色细胞百分比（图 5B）。然后，最后的动力学图揭示了添加的化合物所完成的细胞周期阻滞阶段。

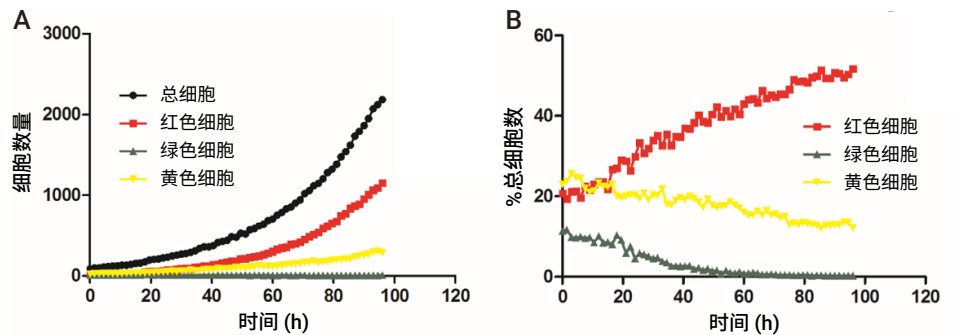


图 5.(A) 对总细胞、G1 期（红色）、G2/M 期（绿色）和 S 期（黄色）细胞进行动力学计数。(B) G1、G2/M 和 S 期细胞占总细胞数的百分比

使用 Agilent BioTek 全自动智能活细胞成像分析系统的最新出版物

1. Mehta, Sunali, et al. "Dephosphorylation of YB-1 Is Required for Nuclear Localisation During G2 Phase of the Cell Cycle." *Cancers*, vol. 12, no. 2, Jan. 2020, p. 315. Doi: 10.3390/cancers12020315.
2. Van den Berg, Jeroen. Product of the Surrounding: Location Dependent Effects on DNA Double Strand Break Responses. Utrecht University, 2019.

活细胞的凋亡和坏死动力学成像

检测原理

动力学细胞凋亡试剂盒 (Abcam, Cambridge, UK) 基于两种不同的技术来分别检测凋亡和坏死细胞活性。pSIVA-IANDB (活力和凋亡的极性敏感指示剂) 是一种基于 Annexin XII 的极性敏感探针, 用于细胞凋亡的时空分析。质膜外磷脂酰丝氨酸 (PS) 暴露是细胞凋亡早期的标志性现象。当 PS 转位至外膜小叶时, pSIVA-IANDB 就会与 PS 结合。然后, IANDB 标签暴露于膜的非极性脂质环境中, 导致 IANDB 绿色荧光信号“开启”。如前所述, 碘化丙啶 (PI) 是一种非细胞渗透性荧光嵌入坏死探针。只有在坏死细胞的细胞膜受损后, 染料才能进入细胞, 与细胞核酸结合并产生荧光信号。

方法概要

向培养基中分别加入浓度为 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 和 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 的 pSIVA-IANDB 和 PI 荧光探针, 通过连续 1:4 滴定, 制备从 10000 到 0 nM 范围内的 8 个不同剂量的喜树碱。然后将含有化合物和探针的培养基加入每孔含有 2000 个 HT-1080 细胞的孔中。使用 4 倍物镜和 Agilent BioTek 细胞成像仪的高对比度明场、GFP 和 RFP 成像通道, 在 48 小时内每 2 小时捕获一次图像, 动态监测细胞凋亡和坏死的诱导情况。高对比度明场通道捕获图像内的总细胞, 而 GFP 通道捕获凋亡细胞的绿色 pSIVA-IANDB 信号, RFP 通道捕获坏死细胞的 PI 信号。

分析和结果

拍摄完成后, 对所有图像进行预处理, 以去除背景信号 (图 6A)。然后利用高对比度明场通道的信号变化, 自动在图像中识别并使用一级 Mask 标记所有细胞 (图 6B)。

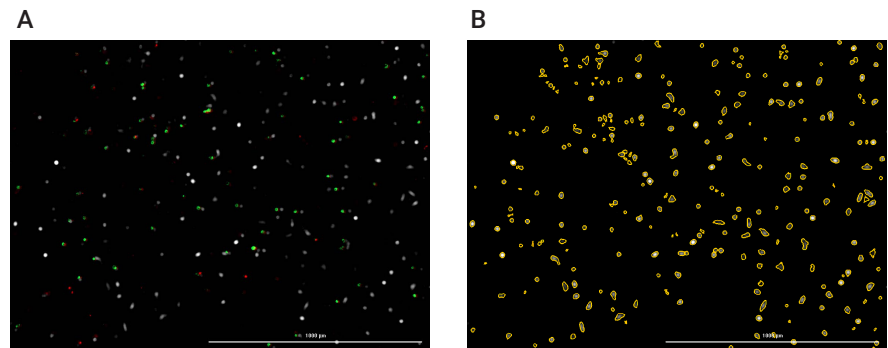


图 6. (A) 预处理高对比度明场、GFP 和 RFP 图像的叠加图。(B) 高对比度明场图像仅显示在细胞分析过程中根据明场信号变化自动应用的对象 Mask

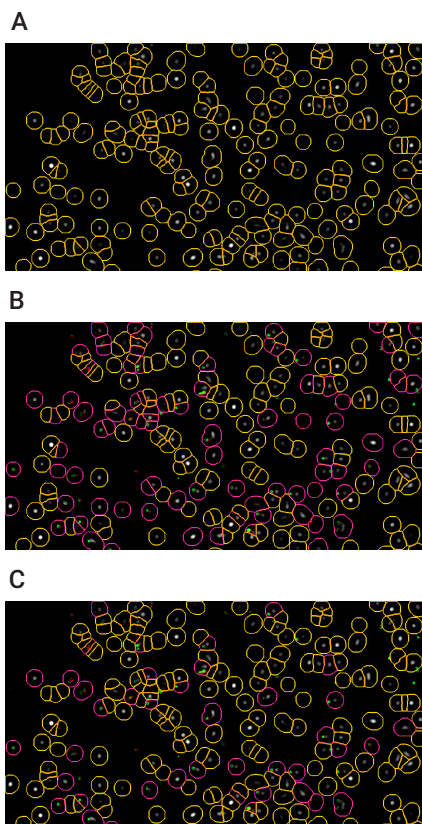
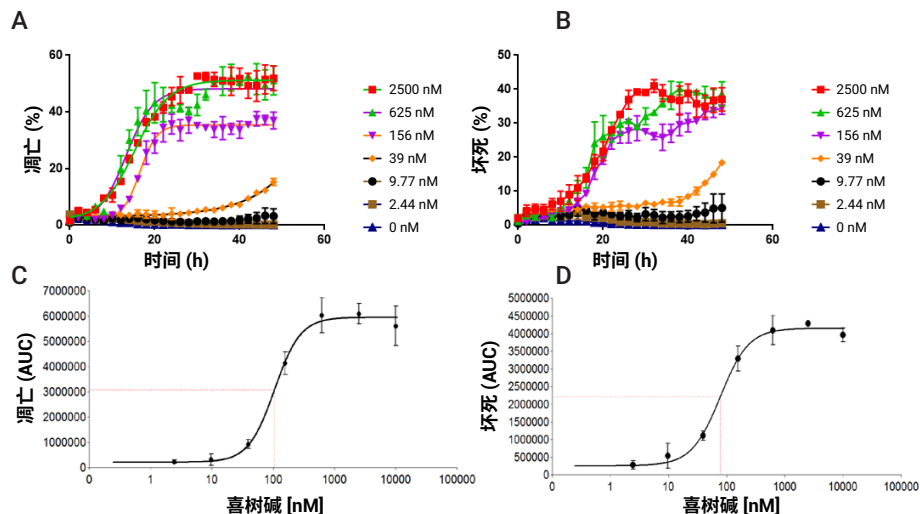


图 7. (A) 在二级 Mask 处理过程中扩大的一级 Mask。使用 GFP 或 RFP 积分信号识别 (B) 凋亡细胞或 (C) 坏死细胞亚群

图 8. 喜树碱 (2500-0 nM) 与 HT-1080 细胞孵育 48 小时后, (A) 细胞凋亡; (B) 细胞坏死的动力学百分比曲线。然后根据喜树碱浓度绘制曲线下面积值, 确定化合物诱导 (C) 细胞凋亡; 或 (D) 坏死的效果

在二级 Mask 处理过程中, 一级 Mask 被放大以捕获 GFP 和 RFP 信号 (图 7A)。为了进行凋亡或坏死细胞的亚群分析, 使用 GFP 成像通道捕获的 pSIVAINDB 探针积分信号最小值被用来确定次级 Mask 内的凋亡细胞 (图 7B), 而使用 RFP 成像通道捕获的 PI 积分信号最小值则被用来确定次级 Mask 内的坏死细胞 (图 7C)。

分析后, 用凋亡或坏死细胞数除以每张图像计数的细胞总数, 确定每张图像在每个时间点的凋亡和坏死细胞百分比, 并以百分比表示每个值。然后绘制这些值随时间的变化图, 以显示不同浓度的测试物质 (此处为喜树碱) 在细胞模型中诱导细胞凋亡 (图 8A) 和坏死 (图 8B) 的效果。利用动力学曲线, Agilent BioTek Gen5 还可以计算每条动力学曲线下的面积, 生成与所测试的喜树碱浓度相对应的曲线总面积值。然后可绘制这些数值与喜树碱浓度的关系图, 得到 EC_{50} 值, 以显示该化合物诱导细胞凋亡 (图 8C) 和坏死 (图 8D) 的能力。



使用 Agilent BioTek 全自动智能活细胞成像分析系统的最新出版物

1. Taabazuing, Cornelius Y., et al. "Pyroptosis and Apoptosis Pathways Engage in Bidirectional Crosstalk in Monocytes and Macrophages." *Cell Chemical Biology*, vol. 24, no. 4, Apr. 2017, pp. 507-514.e4. Doi: 10.1016/j.chembiol.2017.03.009.
2. Akbarzadeh Khiavi, Mostafa, et al. "PEGylated Gold Nanoparticles-Ribonuclease Induced Oxidative Stress and Apoptosis in Colorectal Cancer Cells." *BioImpacts*, vol. 10, no. 1, July 2019, pp. 27-36. Doi: 10.15171/bi.2020.04.
3. Filali, Samira, et al. "Live-Stream Characterization of Cadmium-Induced Cell Death Using Visible CdTe-QDs." *Scientific Reports*, vol. 8, no. 1, Dec. 2018, p. 12614. Doi: 10.1038/s41598-018-31077-2.
4. Inde, Zintis, et al. Large-Scale Analysis of Cell Death Phenotypic Heterogeneity. *preprint, Cancer Biology*, 29 Feb. 2020. Doi: 10.1101/2020.02.28.970079.

使用动态活细胞成像表征钙流检测

检测原理

G 蛋白偶联受体 (GPCR) 活化后细胞内钙离子的流动对于细胞响应细胞间和环境条件至关重要。信号分子与 GPCR 结合会激活相关的三聚体 GTP 结合蛋白 (G 蛋白)，该蛋白由一个 α -亚基以及 β - 和 γ -亚基复合物组成。 α -亚基的 Gs 和 Gq 亚家族的活化触发细胞内钙离子释放到细胞质中，细胞质通过调节钙依赖性蛋白传播信号^[20]。Fluo-4 是一种钙指示剂，已被广泛用于检测钙水平的变化。Fluo-4 AM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) 是 Fluo-4 的乙酰氧基甲基酯衍生物，可渗透细胞膜。Fluo-4 AM 分子进入细胞后，其亲脂性封闭基团就会被非特异性细胞脂酶裂解，形成一种不易从细胞中渗出的带电复合物。在有钙存在的情况下，游离的 Fluo-4 在 494/506 nm 波长处会发出更强的荧光。

方法概要

将 4 μM 的 Fluo-4 AM 添加到已铺种的细胞中，让其渗透细胞一小时，然后移除未结合的探针并加入 DPBS。然后将孔板载入 BioTek 成像仪中，使用 4 倍物镜和 GFP 成像通道以每秒 3 帧的速率进行动力学荧光成像。以该速率采集基线图像共 5 秒。此时，保持孔板位于成像位置不动，使用（成像仪配置的）自动进样器向孔板内添加 ATP，终浓度 10 μM 。然后以相同速率再进行 30 秒钟的动力学成像，监测对钙信号转导的影响。

分析和结果

捕获图像后，对所有图像进行预处理，以去除背景信号。通过 GFP 通道检测，识别并使用 Mask 标记染色细胞中 Fluo-4 基础信号高于背景的细胞（图 9A）。通过这种方法，可以捕获和定量每个细胞在整个孵育期间所产生的总 Fluo-4 信号（图 9B）。然后将 ATP 刺激后图像中所有对象的总荧光除以刺激前基础信号图像的平均总荧光，得出归一化的相对荧光比。绘制随时间变化的曲线可以观察到钙流水平（图 9C）。

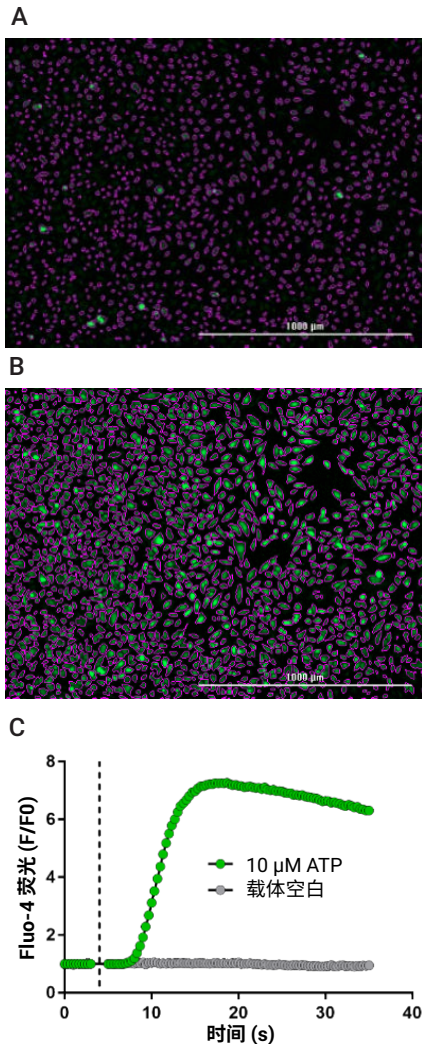
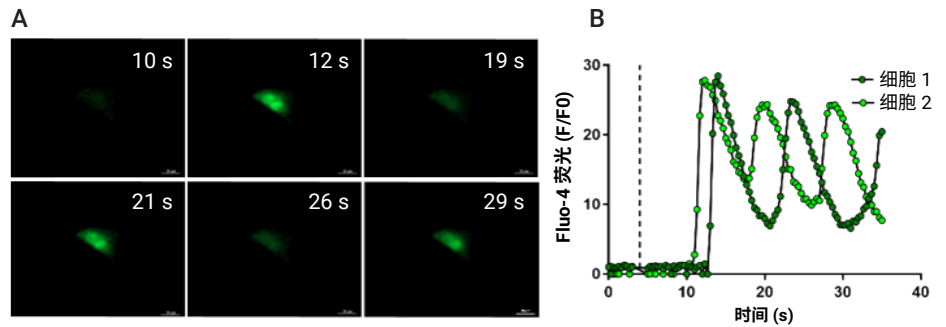


图 9. (A) ATP 刺激前，软件识别并 Mask 标记的表达 Fluo-4 荧光细胞的 4 倍物镜图像。(B) 加入 ATP 15 秒后，Mask 细胞的 Fluo 信号（放大）。(C) 整个动力学实验过程中总 Fluo-4 信号比的动力学图。虚线表示 ATP 注入的时间

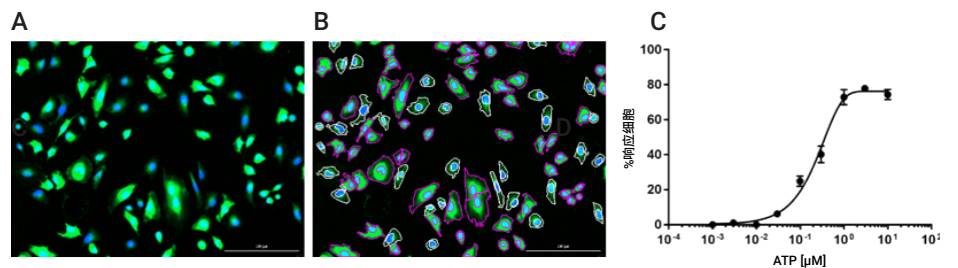
在使用 Gen 5 软件进行细胞分析过程中，通过在图像中的单个细胞周围放置一个 plug，就可以在整个动力学实验过程中仅分析来自该细胞的信号，可以表征单个细胞的钙流（图 10A）。利用这种方法，能够以高时间分辨率确定细胞内钙释放速率和钙水平峰值之间的间隔。由此得到的激活曲线可用于比较不同条件下或不同细胞类型之间的细胞响应(图 10B)。

图 10. 单细胞钙流特征。(A) 设置 plug 的细胞 2 在 6 个时间点的图像。(B) 细胞 1 和 2 表现出相似的激活特征。注入 ATP (最终 10 μ M) 后 5-7 秒，钙离子迅速释放引起剧烈波动 (虚线)，随后 Fluo-4 荧光在 6-8 秒内逐渐下降，然后钙离子水平再次上升



除了 Fluo-4 AM，还可以通过添加核染料（如 Hoechst 33342）来实现每个细胞的钙流检测（图 11A）。Gen5 在图像中的每个细胞核周围添加一级 Mask 标记。然后在 Fluo-4 探针捕获的 GFP 信号周围添加二级 Mask（图 11B）。对每个二级 Mask 内的总 GFP 信号进行定量。使用最小总信号值排除图像中无响应的细胞，从而得到对刺激作出反应的细胞数。通过将其与用 Hoechst 33342 染色确定的图像中所有细胞总数相除，计算出响应细胞的百分比。然后可以根据加入孔中的刺激剂或抑制剂浓度将其与钙流结果进行比较。

图 11. (A) Hoechst 33342 和 Fluo-4 染色细胞的 4 倍图像。(B) ATP 刺激后的染色细胞，一级 Mask 使用 Hoechst 33342 信号，二级 Mask 使用 Fluo-4 信号。(C) 每种处理的响应细胞百分比图，显示了钙流的效果



使用 Agilent BioTek 全自动智能活细胞成像分析系统的最新出版物

1. Zhou, Wenqing, et al. "Mitofusin 2 Regulates Neutrophil Adhesive Migration and the Actin Cytoskeleton." *preprint, Cell Biology*, 13 Apr. **2019**. Doi: 10.1101/608091.
2. Harlen, Kevin M., et al. "Live-Cell Assays for Cell Stress Responses Reveal New Patterns of Cell Signaling Caused by Mutations in Rhodopsin, α -Synuclein and TDP-43." *Frontiers in Cellular Neuroscience*, vol. 13, Dec. **2019**, p. 535, Doi: 10.3389/fncel.2019.00535.
3. Jeon, Bo-Hui, et al. "Dexamethasone Treatment Increases the Intracellular Calcium Level Through TRPV6 in A549 Cells." *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 21, no. 3, Feb. **2020**, p. 1050. Doi: 10.3390/jms21031050.

基于 2D 共培养细胞模型的划痕愈合分析

检测原理

划痕愈合或划痕试验是一种简单且广泛使用的测量细胞迁移的方法。在该方法中，对达到融合度的单层细胞进行机械划伤，从而形成一个无细胞区域，即模拟一个划痕区域。然后对细胞集体迁移到无细胞区的过程进行动态成像，以表征细胞在未受抑制或在测试分子影响下的运动情况。基质细胞（如成纤维细胞）负责沉积 ECM 的成分，在实体瘤微环境中影响癌细胞的迁移、侵袭和其他致瘤过程^[21]。由于基质细胞在体内发挥着重要作用，因此在进行体外细胞迁移研究时，除靶标癌细胞外，还应纳入这些细胞，以提高生成数据的相关性。通过使每种共培养细胞类型表达单独的荧光蛋白，很容易在共培养细胞模型内对单个相对动力学划痕愈合速率进行成像和分析。

方法概要

将表达 GFP 的 U-87 胶质母细胞瘤和表达 RFP 的原代成纤维细胞稀释至 3.0×10^5 个细胞/mL，以 1:1 的比例混合，然后加入 96 孔板中。贴壁形成汇合单层细胞后，将孔板转移到 AutoScratch 工具上，机械臂上的针头在每个孔中创建一致的无细胞区域（划痕）。然后将微孔板置于 BioSpa 8 中，环境条件预先设定为 $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$ 。对 BioSpa 8 软件进行编程，使微孔板自动转移到 Cytation 5 上对测试孔进行荧光成像。使用 GFP 和 RFP 通道拍摄单张 4x 图像，分别捕获 U-87 和成纤维细胞进入原始划痕区域的运动情况。然后将孔板移回 BioSpa 8，每 90 分钟重复一次动力学成像循环，共持续 48 小时。

分析和结果

捕获图像后，对动力学荧光图像进行预处理，以去除背景信号（图 12）。

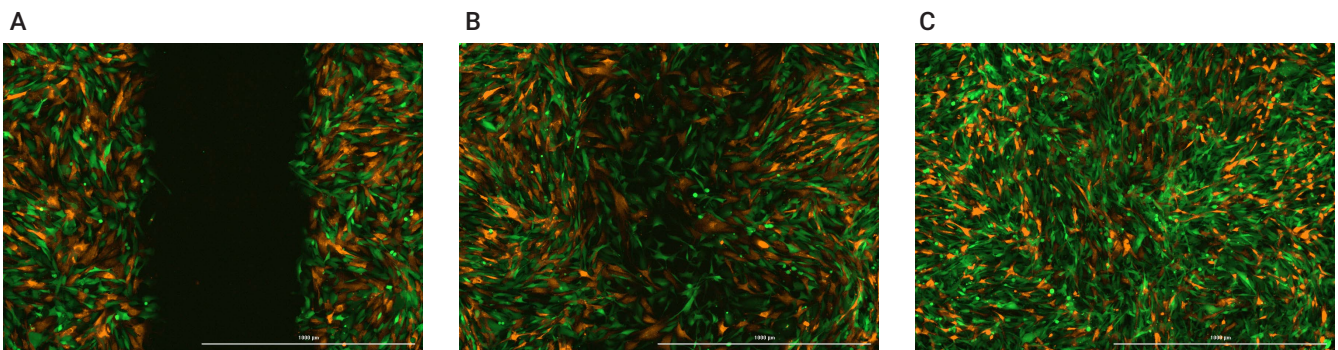


图 12. 成纤维细胞和 U-87 共培养划痕愈合的荧光图像。展示了未受抑制的 RFP 表达的纤维母细胞和 GFP 表达的 U-87 细胞迁移过程。这些动力学图像分别对应 (A) 0小时、(B) 18小时和 (C) 48小时孵育时间。

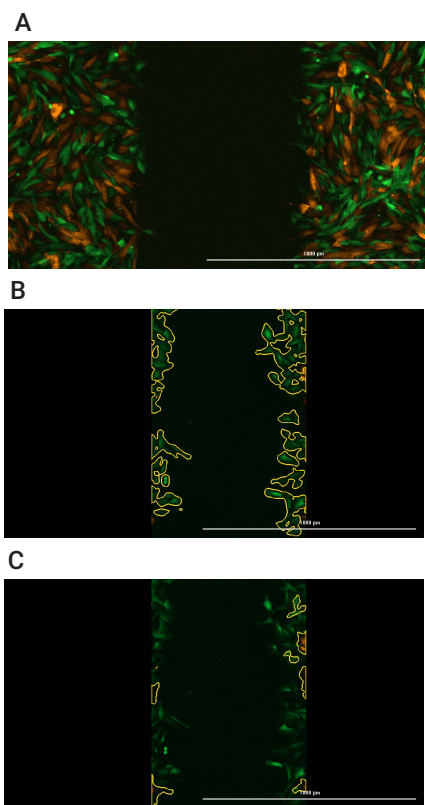


图 13. 创建的划痕内单个共培养细胞类型的细胞分析。(A) 划痕创建后立即表达 RFP 的成纤维细胞和表达 GFP 的 U-87 细胞的荧光图像叠加图。(B) 孵育 3 小时后 U-87 细胞 GFP 信号的分析。(C) 孵育 3 小时后成纤维细胞 RFP 信号的分析

然后进行两个单独的细胞分析步骤，以评估每种细胞的迁移特征。然而，由于成纤维细胞或 U-87 细胞在创建的划痕两侧均未形成汇合单层细胞，因此采用了一种新的分析方法。在分析步骤中，使用 plug 覆盖 AutoScratch 创建的划痕左右两侧区域，仅留下无细胞区域。通过这种方式，分别使用 GFP 或 RFP 信号的变化来分析仅迁移到划痕区域的 U-87 或成纤维细胞（图 13）。

然后，Gen5 会自动计算原始划痕区域内细胞的归一化比例，即划痕汇合度值。然后绘制动力学划痕汇合度曲线，以确定共培养细胞模型的细胞迁移模式之间可能存在的差异（图 14）。比较划痕创建后最初 6 小时的两条动力学曲线（图 14B），除 Gen5 在此期间产生的最大划痕汇合速率外，还可以明显看出 U-87 胶质母细胞瘤细胞的初始迁移率 ($404 \mu\text{m}^2/\text{min}$) 高于成纤维细胞 ($122 \mu\text{m}^2/\text{min}$)，后者的迁移率相对较低，尤其是在最初 4 小时。

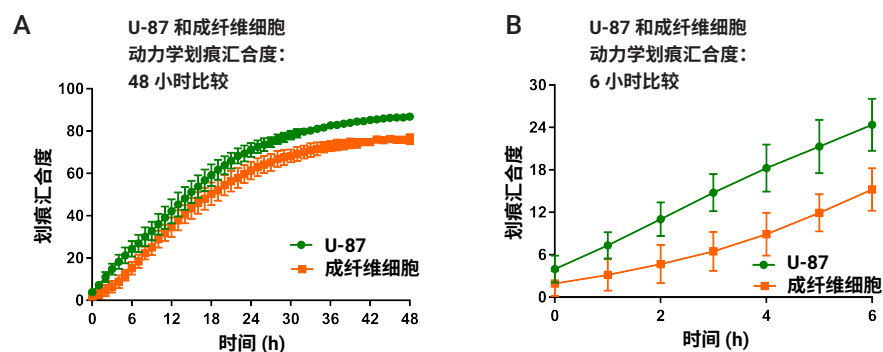


图 14. 共培养细胞模型的未受抑制细胞迁移曲线。表达 GFP 的 U-87 细胞和表达 RFP 的成纤维细胞的动力学划痕汇合度曲线。所示为 (A) 48 小时和 (B) 6 小时孵育曲线

使用 Agilent BioTek 全自动智能活细胞成像分析系统的最新出版物

1. Chen, Xuenan, et al. "Panax ginseng total protein promotes proliferation and secretion of collagen in NIH/3T3 cells by activating extracellular signal-related kinase pathway." *Journal of Ginseng Research*, 1 Mar. **2017**.
Doi: 10.1016/j.jgr.2017.02.001.
2. Nanayakkara, Amila K., et al. "Prolonged Inhibition of P-Glycoprotein after Exposure to Chemotherapeutics Increases Cell Mortality in Multidrug Resistant Cultured Cancer Cells." *PLOS ONE*, edited by Jed N. Lampe, vol. 14, no. 6, June **2019**, p. e0217940. Doi: 10.1371/journal.pone.0217940.
3. Sultan, Ahmed S., et al. "Evaluation of the Antifungal and Wound-Healing Properties of a Novel Peptide-Based Bioadhesive Hydrogel Formulation." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 63, no. 10, July **2019**, pp. e00888-19, /aac/63/10/AAC.00888-19.atom. Doi: 10.1128/AAC.00888-19.

通过活细胞成像监测线粒体动力学

检测原理

细胞渗透性 MitoTracker 探针含有一种轻度巯基反应性氯甲基基团，用于标记线粒体。MitoTracker Red CMXRos 是一种红色荧光染料，能够轻松透过细胞膜并聚集在健康、活跃的线粒体中。如果线粒体膜去极化或无活性，染料会扩散到整个细胞中，并且信号会减弱。

方法概要

将 HT-1080 细胞加入半面积 96 孔板中，使其贴壁。然后用 10 μM Hoechst 33342 和 100 nM MitoTracker Red CMXRos 对细胞染色 20 分钟。将孔板载入 Agilent BioTek 成像仪中，在处理前，先使用 40 倍物镜采集单个初始图像，DAPI 成像通道采集 Hoechst 33342 探针的信号，Texas Red 通道采集 MitoTracker 探针的信号。然后从成像仪中取出孔板，清洗以除去未进入细胞的染料。使用连续 1:3 稀释，将范围为 10–0 μM 的 FCCP 滴定液加入孔中，并将孔板放回成像仪中，使用 40 倍物镜以及 DAPI 和 Texas Red 成像通道，每 5 分钟再进行一次动态荧光成像。

分析和结果

捕获图像后，对动力学荧光图像进行预处理，以去除背景信号（图 15）。

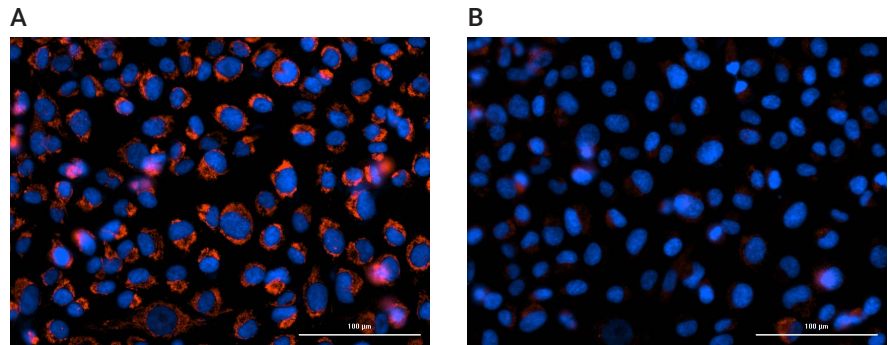


图 15. 10 μM FCCP 处理前 (A) 和处理后 (B) 1 小时预处理 DAPI 和 Texas Red 图像的叠加图，分别捕获 Hoechst 33342 核信号和 MitoTracker 探针信号

然后利用 DAPI 通道的信号变化，自动识别图像中所有的细胞并添加一级 Mask（图 16）。

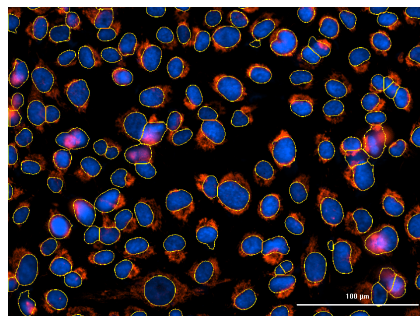


图 16. 预处理 DAPI 和 Texas Red 图像的叠加图，显示在细胞分析过程中根据 DAPI 信号变化自动应用的一级对象 Mask

然后生成二级 Mask，从一级 Mask 延伸，以包含使用 Texas Red 成像通道捕获的 MitoTracker 探针（图 17A）。添加 FCCP（一种强离子载体和线粒体解偶联剂）会使线粒体去极化，从而导致 MitoTracker 信号丢失。由于所有动力学图像的分析都使用了相同的 Δ 信号阈值标准，因此在使用 $10\ \mu\text{M}$ FCCP 处理一小时后，二级 Mask 面积显著减小（图 17B）。

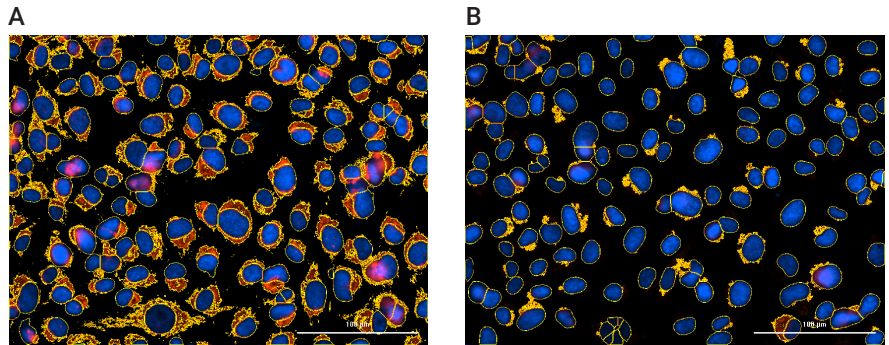


图 17. 预处理 DAPI 和 Texas Red 图像的叠加图，显示 $10\ \mu\text{M}$ FCCP 处理前 (A) 和处理后 (B) 1 小时一级和二级对象 Mask 的识别与标记

然后可以使用 Gen5 创建动力学期间每个时间点的平均面积覆盖率与原始平均面积覆盖率的比值（以百分比表示）。绘制随时间变化的曲线，可以清楚地看出 FCCP 浓度对线粒体极化的影响（图 18）。

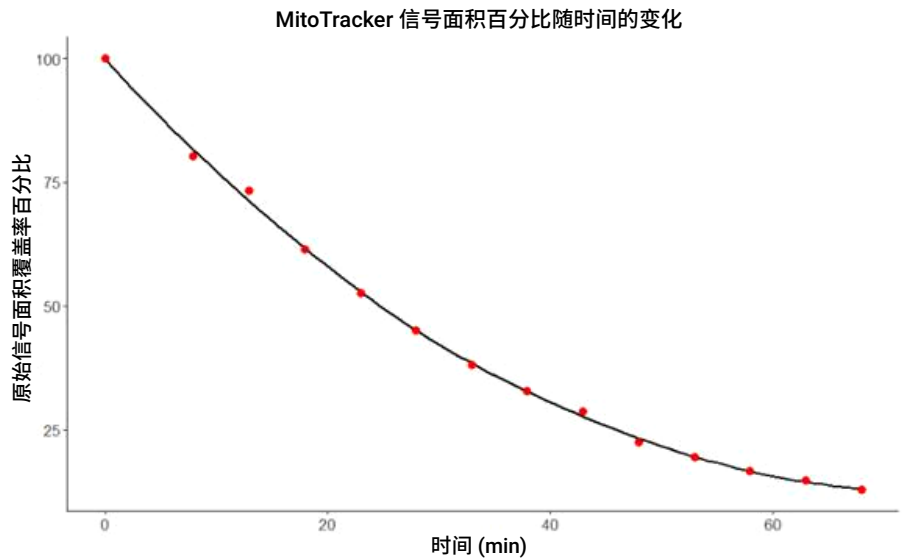


图 18. $10\ \mu\text{M}$ FCCP 处理期间动力学归一化平均 MitoTracker 信号覆盖图

最后，如前所述，Gen5 可以计算动力学曲线下的面积，生成与测试的每种 FCCP 浓度相对应的曲线总面积值。然后可绘制这些数值与 FCCP 浓度的关系图，得出 IC_{50} 值为 4.2 μM ，证明该化合物能够中断线粒体极化（图 19）。

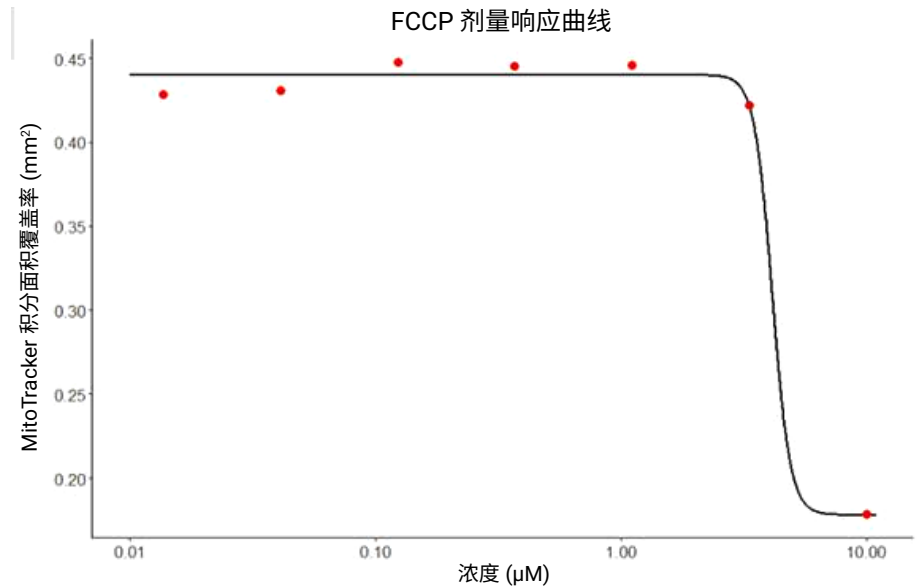


图 19. 根据 FCCP 浓度绘制的曲线下面积值图，以确定化合物对线粒体极化的影响

使用 Agilent BioTek 全自动智能活细胞成像分析系统的最新出版物

1. Martins, A. D., et al. "Ghrelin Acts as Energy Status Sensor of Male Reproduction by Modulating Sertoli Cells Glycolytic Metabolism and Mitochondrial Bioenergetics." *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol. 434, Oct. **2016**, pp. 199–209. Doi: 10.1016/j.mce.2016.07.008.
2. Di Cristo, Francesca, et al. "Meldonium Improves Huntington's Disease Mitochondrial Dysfunction by Restoring Peroxisome Proliferator activated Receptor γ Coactivator 1 α Expression." *Journal of Cellular Physiology*, vol. 234, no. 6, June **2019**, pp. 9233–46. Doi: 10.1002/jcp.27602.
3. Chen, Zongyan, et al. "The Roles of Mitochondria in Radiation-Induced Autophagic Cell Death in Cervical Cancer Cells." *Tumor Biology*, vol. 37, no. 3, Mar. **2016**, pp. 4083–91. Doi: 10.1007/s13277-015-4190-8.

结论

我们展示了使用基于细胞器、表型探针或荧光蛋白的几种活细胞动力学荧光分析实验。使用 Agilent BioTek 成像仪器和自动化工具，包括 Agilent BioTek BioSpa 和 Agilent BioTek AutoScratch，使每个分析工作流程都能轻松实现自动化。动力学分析化学试剂与自动化仪器的组合可以为各种研究应用生成高质量、准确、可重现的结果。

参考文献

1. Dunn, Graham A., and Gareth E. Jones. "Cell Motility under the Microscope: Vorsprung Durch Technik." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 5, no. 8, Aug. **2004**, pp. 667–72. Doi: 10.1038/nrm1439.
2. Frischknecht, Freddy, et al. "Retrospective: Birth of the Cool - Imaging and Microbiology from Ibn al-Haytham to Jean Comandon." *Biotechnology Journal*, vol. 4, no. 6, June **2009**, pp. 787–90. Doi: 10.1002/biot.200900102.
3. Bertrand, Julien Y., et al. "Haematopoietic Stem Cells Derive Directly from Aortic Endothelium during Development." *Nature*, vol. 464, no. 7285, Mar. **2010**, pp. 108–11. Doi: 10.1038/nature08738.
4. Eilken, Hanna M., et al. "Continuous Single-Cell Imaging of Blood Generation from Haemogenic Endothelium." *Nature*, vol. 457, no. 7231, Feb. **2009**, pp. 896–900. Doi: 10.1038/nature07760.
5. Kissa, Karima, and Philippe Herbomel. "Blood Stem Cells Emerge from Aortic Endothelium by a Novel Type of Cell Transition." *Nature*, vol. 464, no. 7285, Mar. **2010**, pp. 112–15. Doi: 10.1038/nature08761.
6. Rieger, Michael A., et al. "Hematopoietic Cytokines Can Instruct Lineage Choice." *Science*, vol. 325, no. 5937, July **2009**, pp. 217–18. Doi: 10.1126/science.1171461.
7. Asami, Maki, et al. "The Role of Pax6 in Regulating the Orientation and Mode of Cell Division of Progenitors in the Mouse Cerebral Cortex." *Development*, vol. 138, no. 23, Dec. **2011**, pp. 5067–78. Doi: 10.1242/dev.074591.
8. Costa, Marcos R., et al. "Par-Complex Proteins Promote Proliferative Progenitor Divisions in the Developing Mouse Cerebral Cortex." *Development*, vol. 135, no. 1, Nov. **2007**, pp. 11–22. Doi: 10.1242/dev.009951.
9. Costa, Marcos R., et al. "Late Origin of Glia-Restricted Progenitors in the Developing Mouse Cerebral Cortex." *Cerebral Cortex*, vol. 19, no. suppl_1, July **2009**, pp. i135–43. Doi: 10.1093/cercor/bhp046.

10. Costa, Marcos R., et al. "Continuous Live Imaging of Adult Neural Stem Cell Division and Lineage Progression in Vitro." *Development*, vol. 138, no. 6, Mar. **2011**, pp. 1057–68. Doi: 10.1242/dev.061663.
11. Henrickson, Sarah E., et al. "T Cell Sensing of Antigen Dose Governs Interactive Behavior with Dendritic Cells and Sets a Threshold for T Cell Activation." *Nature Immunology*, vol. 9, no. 3, Mar. **2008**, pp. 282–91. Doi: 10.1038/ni1559.
12. Junt, Tobias, et al. "Subcapsular Sinus Macrophages in Lymph Nodes Clear Lymph-Borne Viruses and Present Them to Antiviral B Cells." *Nature*, vol. 450, no. 7166, Nov. **2007**, pp. 110–14. Doi: 10.1038/nature06287.
13. Sung, Jung Hwan, et al. "Chemokine Guidance of Central Memory T Cells Is Critical for Antiviral Recall Responses in Lymph Nodes." *Cell*, vol. 150, no. 6, Sept. **2012**, pp. 1249–63. Doi: 10.1016/j.cell.2012.08.015.
14. Prasher, Douglas C., et al. "Primary Structure of the Aequorea Victoria Green-Fluorescent Protein." *Gene*, vol. 111, no. 2, Feb. **1992**, pp. 229–33. Doi: 10.1016/0378-1119(92)90691-H.
15. Ai, Hui-wang, et al. "Exploration of New Chromophore Structures Leads to the Identification of Improved Blue Fluorescent Proteins †." *Biochemistry*, vol. 46, no. 20, May **2007**, pp. 5904–10. Doi: 10.1021/bi700199g.
16. Cubitt, Andrew B., et al. "Understanding, Improving and Using Green Fluorescent Proteins." *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 20, no. 11, Nov. **1995**, pp. 448–55. Doi: 10.1016/S0968-0004(00)89099-4.
17. Heim, Roger, and Roger Y. Tsien. "Engineering Green Fluorescent Protein for Improved Brightness, Longer Wavelengths and Fluorescence Resonance Energy Transfer." *Current Biology*, vol. 6, no. 2, Feb. **1996**, pp. 178–82. Doi: 10.1016/S0960-9822(02)00450-5.
18. Zhang, Jin, et al. "Creating New Fluorescent Probes for Cell Biology." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 3, no. 12, Dec. **2002**, pp. 906–18. Doi: 10.1038/nrm976.
19. Sakaue-Sawano, Asako, et al. "Visualizing Spatiotemporal Dynamics of Multicellular Cell-Cycle Progression." *Cell*, vol. 132, no. 3, Feb. **2008**, pp. 487–98. Doi: 10.1016/j.cell.2007.12.033.
20. Hepler, John R., and Alfred G. Gilman. "G Proteins." *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 17, no. 10, Oct. **1992**, pp. 383–87. Doi: 10.1016/0968-0004(92)90005-T.
21. Rajaram, Megha, et al. "System-Wide Analysis Reveals a Complex Network of Tumor-Fibroblast Interactions Involved in Tumorigenicity." *PLoS Genetics*, edited by Marshall S. Horwitz, vol. 9, no. 9, Sept. **2013**, p. e1003789. Doi: 10.1371/journal.pgen.1003789.

了解更多信息：

www.agilent.com/lifesciences/biotek

如需获取技术问题的答案和安捷伦社区的资源，请访问：

community.agilent.com

安捷伦客户服务中心：

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

仅供科研使用。不用于临床诊断用途。RA44173.6629282407

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，2021
2021年2月1日，中国出版
5994-2567ZHCN
AG052920_01

