

라이브셀 증식 및 생존력 분석

응용 개요서



목차

서론	3
기기 구성	4
세포 증식 및 생존력 응용 분야	5
무표지 세포 계수를 이용한 키네틱 증식 어세이	5
장시간 증식 어세이에서 pH 모니터링	10
증식 어세이의 형광 마커	14
자동화된 다중 파라미터 분석법을 활용한 키네틱 세포 사멸 분석 정량화	24
명시야 현미경을 이용한 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 성장 실시간 모니터링	32
참고 문헌	38

서론

시료에서 생존 가능한 세포 수를 세는 것은 정규화부터 세포 증식에 미치는 약물 효과 측정에 이르기까지 많은 생물학적 어세이의 핵심 단계입니다.^{1,2} 세포 배양의 일상적인 과정은 또한 세포 성장을 모니터링하고 후반 단계 실험을 위해 일관된 세포 분주 밀도를 계산하는 과정도 포함됩니다. 라이브셀 어세이에서 증식이 유효성의 주요 지표인 경우, 비파괴적 방식 또는 표지가 없는 세포 계수 분석법이 바람직합니다. 또는 세포에 영향을 주는 분석법을 사용할 수도 있으며, 그 중 가장 간단한 분석법은 세포를 수집하고 정량화를 위해 계수 챔버를 사용하는 것입니다. 세포에 영향을 주는 또는 엔드포인트 분석법의 다른 예로는 총 단백질(예: BCA) 및 세포 대사(예: MTT, CellTiter-Glo)와 같은 세포 수에 따른 대사물을 측정하는 것이 있습니다.^{3,4} 그러나 이 전략은 시간대 별 여러 번의 반복 수행이 필요하며 처리량이 많은 연구에는 도움이 되지 않습니다.

생존 가능한 세포를 높은 처리량으로 계수하는 일은 어려운 문제입니다, 이 문제를 해결하기 위해 수년에 걸쳐 많은 솔루션이 개발되었습니다. 고처리량 현미경 기기가 점차 보편화되면서 세포를 직접 계수하는 것이 세포 수와 밀도를 결정하는 더 정확한 분석법으로 사용되고 있습니다(다핵 세포 제외). 라이브셀과 죽은 세포를 표지하기 위해 형광 염색 또는 형광 단백질(핵 위치 또는 히스톤 표지)을 사용하는 분석법은 단기 또는 엔드포인트 어세이에서 일반적입니다.⁵ 또한, 세포 사멸이나 괴사를 표시하는 염색은 세포의 비생존성에 대한 더 자세한 정보를 제공합니다.

그러나 일반적인 DNA 라이브셀 염색(예: Hoechst 33342 및 DRAQ5)은 세포 분열을 방해하여 증식의 작용 기전을 교란시킬 수 있습니다. 또한 Hoechst 33342를 사용하면 염료의 UV 여기가 세포에 직접적으로 영향을 줍니다.⁶ 또한 직접적인 명시야 또는 위상차 측정을 통한 컨플루언스 측정은 총 세포 수를 왜곡시킬 수 있는데, 세포가 자라는 배양 공간의 크기에 따라 부피를 조정하기 때문입니다. 고대비 명시야는 핀홀이 있는 명시야 조명으로 대비를 증가시켜 세포체, 특히 핵 주변 영역에 추가적인 대비를 제공하는 기술입니다.⁷ 고대비 명시야를 사용한 무표지 세포 계수는 이 증가된 대비를 통해 세포 수를 직접적으로 정량화합니다. 대부분의 부착 세포와 많은 비부착 세포는 무표지 세포 계수 분석법에 대해 고대비 명시야 신호를 나타냅니다(그림 1). 세포핵을 계수함으로써, 형광 염료를 사용하지 않고도 세포 증식에 대한 보다 정확한 그림이 나타납니다.

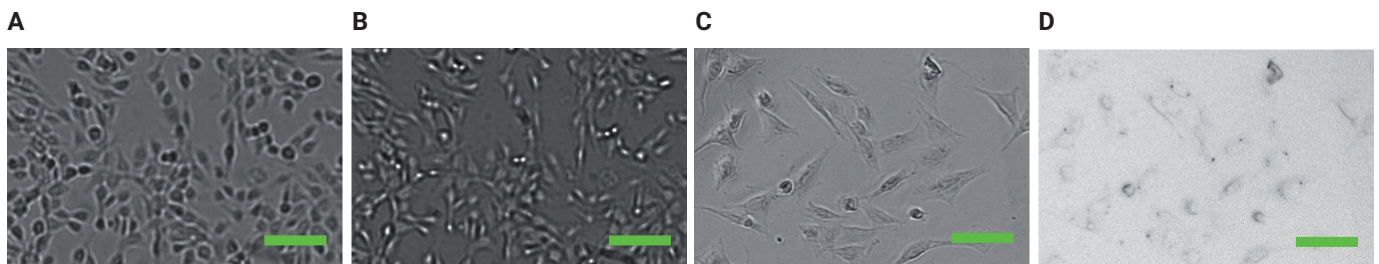


그림 1. 고대비 명시야 (A,B), 위상차 (C) 및 표준 명시야 (D)를 사용하여 Agilent BioTek Lionheart FX 자동화 현미경에서 4배로 포착한 ANIH3T3 세포 이미징. (B)의 약간 초점이 흐려진 이미지는 무표지 세포 계수에 사용된 증가된 대비를 보여줍니다. 스케일바, 100µm.

이 응용 개요서에서는 Agilent BioTek Lionheart FX 자동화 현미경과 Agilent BioTek Cytation 세포 이미징 멀티모드 리더를 사용하여 세포 증식 및 생존력에 관한 여러 실험을 제시합니다. 약물 치료에 대한 반응인 세포 증식의 키네틱 모니터링은 증식 억제 약물과 관련하여 무표지로 세포를 계수하는 한 예입니다. 추가 실험에서는 무표지 계수와 세포 사멸 및 괴사를 포함한 세포 사멸 지표를 결합하여 약물 치료가 세포 생존력에 미치는 영향에 대한 더 큰 그림을 나타냅니다. 세포 실험에서 정확한 분주를 위해 Agilent BioTek 세포 계수 및 생존력 스타터 키트를 사용하여 자동화된 세포 계수와 생존력 실험을 제시합니다. 마지막으로, 명시야 현미경으로 효모 증식을 계수하고 측정하여 미생물의 이미징을 보여줍니다.

기기



Agilent BioTek Lionheart FX 자동화 현미경

Agilent BioTek Lionheart FX 자동화 현미경은 광범위한 이미징 워크플로를 지원하는 컴팩트하고 포괄적인 현미경 시스템입니다. 최대 적용 범위를 위해 형광, 명시야, 컬러 명시야, 그리고 위상차 채널을 갖춘 이 현미경은 60x 및 100x 오일 이멀전 렌즈를 포함하여 최대 60x 에어 렌즈 배율을 제공합니다. 40°C까지 배양, CO₂/O₂ 제어 및 습도 챔버를 포함한 환경 제어는 키네틱 라이브셀 이미징 응용을 위한 조건을 최적화합니다.



Agilent BioTek Cytation 5 세포 이미징 멀티모드 리더

Agilent BioTek Cytation 5 세포 이미징 멀티모드 리더는 자동화된 디지털 현미경과 기존 마이크로플레이트 검출을 구성 및 업그레이드 가능한 플랫폼에 결합할 수 있습니다. 현미경 모듈은 형광, 명시야, 고대비 명시야, 컬러 명시야 및 위상차 이미징에서 최대 60x 배율을 제공합니다. 65°C까지의 온도 제어 및 CO₂/O₂ 제어로 라이브셀 이미징 워크플로가 간단해집니다.



Agilent BioTek BioSpa 라이브셀 분석 시스템

Agilent BioTek BioSpa 라이브셀 분석 시스템은 Agilent BioTek BioSpa 8 자동 인큐베이터와 Agilent BioTek Cytation 세포 이미징 멀티모드 리더로 구성되어 최대 8개의 마이크로플레이트 또는 기타 랩웨어에서 키네틱 라이브셀 분석 워크플로를 자동화합니다. 온도 및 CO₂/O₂ 제어와 습도 모니터링은 라이브셀 이미징 워크플로를 지원합니다. 추가 프로세스 자동화를 위해 액체 처리를 통합할 수 있습니다.

세포 증식 및 생존력 응용 분야

무표지 세포 계수를 이용한 키네틱 증식 어세이

어세이 원리

세포 증식을 특성 규명하는 것은 생물학적 연구 및 치료 약물 개발의 중요한 측면입니다. 대부분의 최신 세포 증식 어세이는 간접적인 생화학적 측정법에 의존하는데, 여기에는 아티팩트 또는 이미징 기반 엔드포인트 측정에 의한 제한이 따릅니다. 여기에서는 BioSpa 8 및 Cytation 5와 고대비 명시야 키트를 사용하여 세포 증식 프로파일을 결정하기 위한 연속 라이브셀 어세이에 대해 설명합니다. 이 완전 자동화된 분석법을 사용하면 무표지 직접 세포 계수를 사용하여 세포 성장에 대한 정확한 정량적 및 표현형적 장기 분석이 가능해집니다.⁷

고대비 명시야 키트는 각 세포에서 빛을 굴절시켜 밝은 점을 생성하므로 핵 염색 없이도 정확한 세포 계수가 가능합니다(그림 2).

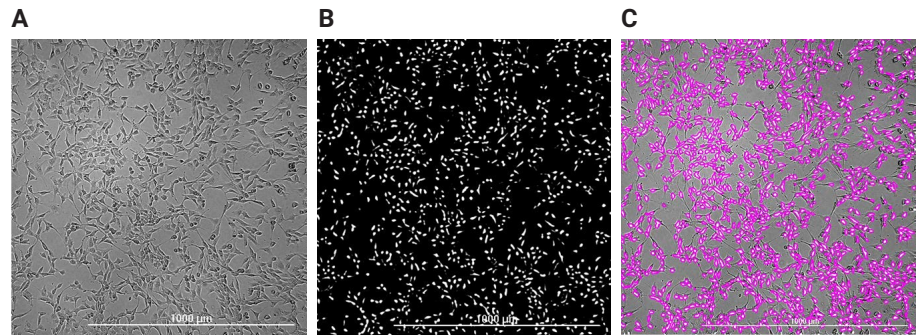


그림 2. 고대비 명시야 직접 세포 계수. (A) NIH3T3 세포의 정확한 초점 이미지. (B) 초점이 흐려진 이미지는 각 세포에 해당하는 하나의 밝은 점을 생성합니다. (C) Agilent BioTek Gen5 마이크로플레이트 리더 및 이미지 소프트웨어의 개체 마스크 도구. 각 밝은 지점을 쉽게 식별하여 세포 계수를 생성할 수 있습니다.

고대비 명시야 세포 계수는 Hoechst 및 DAPI(그림 3)와 같은 핵 염료를 사용하여 얻은 계수와 대등할 뿐만 아니라 장기적인 증식 연구도 가능합니다.⁸

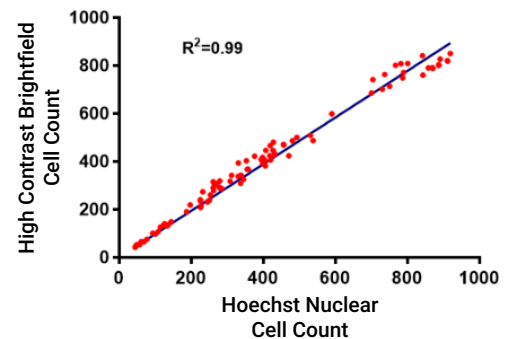


그림 3. Hoechst 표지 핵을 사용한 세포 계수와 고대비 명시야 무표지 세포 계수 비교. Hoechst 염색된 NIH3T3 세포에 대한 두 기술의 세포 계수는 광범위한 분포 밀도에 걸쳐 매우 유사했습니다. R2 값이 0.99이고 기울기가 0.97인 비선형 회귀 방정식에 점을 피팅했습니다.

NIH3T3, HCT116 및 HeLa 세포 성장을 5일 동안 모니터링했습니다. 세 가지 세포 유형 모두 완전한 컨플루언스까지 강력한 대수성장을 나타냈습니다. 약리학적 제제를 스크리닝하는 이 시스템의 효과를 입증하기 위해, 8가지 농도의 2가지 항암 약물로 배양된 세포에 대한 세포 증식 프로파일을 생성했습니다. 농도-반응 곡선 및 IC₅₀ 값을 사용하여 각 세포 유형에 대한 항증식 효과를 정량화했습니다.

재료 및 분석법

세포 배양

NIH3T3 및 HeLa 세포를 10% FBS(Gibco) 및 1x PenStrep-Glutamine(Cellgro, Manassas, VA)을 포함하는 Advanced Dulbecco의 Modified Eagle's Medium (DMEM)(Gibco, Grand Island, NY)에서 배양했습니다. HCT116 세포를 10% FBS 및 1x PenStrep-Glutamine을 포함하는 McCoys 5A 배지(Gibco)에서 배양했습니다. 세포를 검은색 면의 투명한 바닥 96웰 마이크로플레이트(Corning, Corning, NY)에 웰당 2000개의 세포로 분주하였습니다. BioSpa 8을 사용하여 5일간 배양하는 동안 온도 (37°C), 가스(5% CO₂) 및 습도(90%)를 포함한 환경 조건을 유지했습니다.

세포 이미징

두 개의 고대비 명시야 이미지를 각 시점에서 캡처했습니다. 하나는 참조용으로 사용되는 초점이 맞춰진 이미지이고, 다른 하나는 세포 계수를 위한 초점이 흐려진 이미지입니다.⁹ 간단히 말해서, 고대비 명시야 키트를 사용하여 세포의 초점을 맞추고 "정확한 초점" 초점 높이를 기록했습니다. 그런 다음 라인 프로파일 도구를 사용하여 세포와 세포가 없는 이미지 필드의 백그라운드 섹션을 교차하는 선을 그렸습니다. 그런 다음 세포와 백그라운드 밝기 사이의 최대 대비가 얻어지는 초점 높이를 결정하기 위해 라인 프로파일을 관측하면서 초점 높이를 줄였습니다.

이미지 분석

대비를 최대한 향상시키기 위해 이미지 전처리를 사용하여 각 세포를 하나의 밝은 점으로 축소시켰습니다. 그런 다음 계수를 위해 개체 마스크 임계값을 설정하여 각 세포를 식별했습니다(표 1).

이미지 전처리	
이미지 세트	명시야_2
백그라운드	어두움
롤링 볼 직경	20µm
이미지 세트	3x3 평균 필터 3 사이클
세포 분석 파라미터	
채널	Tsf[명시야_2]
임계값	5000
백그라운드	어두움
접촉 개체 분할	체크됨
마스크의 홀 채우기	체크됨
최소 개체 크기	5µm
최대 개체 크기	100µm
1차 엣지 개체 포함	체크 해제됨
전체 이미지 분석	체크됨
고성능 분석 파라미터	
롤링 볼 직경	50µm
이미지 스무딩 강도	3x3 평균 필터 1 사이클
백그라운드 평가 커짐	5%
1차 마스크	임계값 마스크 사용

표 1. Agilent BioTek Gen5 마이크로플레이트 리더 및 이미지 소프트웨어 설정. 이미지 전처리로 대비가 향상되어 백그라운드가 줄어듭니다. 정확한 세포 계수를 위해 각 세포 식별을 최적화하도록 세포 분석 파라미터와 고성능 분석 파라미터가 설정됩니다

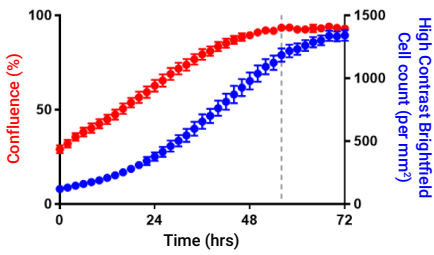


그림 4. 컨플루언스를 기준으로 시간 경과에 따라 고대비 명시야 세포를 계수합니다. NIH3T3 직접 세포 계수와 시간 경과에 따른 컨플루언스 비율을 비교하면 2개의 세포 성장 지표의 서로 다른 특성을 알 수 있습니다. 무표지 세포 계수는 최대 컨플루언스(점선)까지 강력한 대수적 세포 성장을 나타냅니다

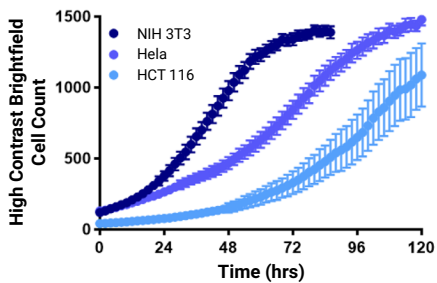


그림 5. NIH3T3, HeLa 및 HCT116에 대한 무표지 직접 세포 계수 프로파일. 세포를 2시간마다 이미지화하고 배양 성장을 5일 동안 또는 세포 계수가 안정될 때까지 모니터링했습니다

결과 및 토의

무표지 직접 세포 계수를 이용한 세포 증식의 정량적 평가

세포 성장 키네틱을 측정하는 무표지 분석법은 증식 속도에 영향을 줄 수 있는 염료를 사용하는 분석법보다 바람직합니다. 일부 응용 분야에 동위원소 수준을 사용할 수 있지만 세포 계수는 광범위한 세포 집단 밀도에 걸쳐 세포 증식을 가장 직접적으로 정량 측정하는 분석법입니다(그림 4).

세 가지 세포 유형에 걸친 세포 증식 프로파일 비교

NIH3T3, HeLa 및 HCT116 세포를 낮은 밀도로 분주하고 BioSpa 8에서 5일 동안 배양했습니다. 고대비 명시야 세포 계수를 사용하여 각 세포 유형에 대한 증식 프로파일을 정의했습니다(그림 5). 모든 세포는 이러한 조건 하에서 완전한 컨플루언스까지 강력한 대수성 성장을 나타냈습니다.

세포 성장 속도에 미치는 항증식 화합물의 효과 측정

키네틱 세포 증식 연구를 통해 암 치료제의 정량적 평가가 가능해졌습니다. Doxorubicin은 DNA에 삽입되어 거대분자 생합성을 억제함으로써 세포 분열을 방해하는 안트라사이클린계 항증양 항생제입니다.^{10,11} 이는 광범위한 암 치료에 일반적으로 사용됩니다.¹⁰ Cercosporamide는 번역 개시 인자 4E(eIF4E)의 강력하고 선택적인 억제제인 MAPK 상호작용 키나제(Mnk)입니다.¹² 최근 연구에서는 cercosporamide가 HCT116 결장암종 이종이식 종양을 포함한 악성 종양의 증식을 억제한다고 보고했습니다.^{12,13} NIH3T3, HeLa 및 HCT116 증식에 대한 doxorubicin 및 cercosporamide의 효과를 조사하기 위해 세포를 96웰 형식에서 8가지 약물 농도로 처리하고 5일 동안 모니터링했습니다(그림 6).

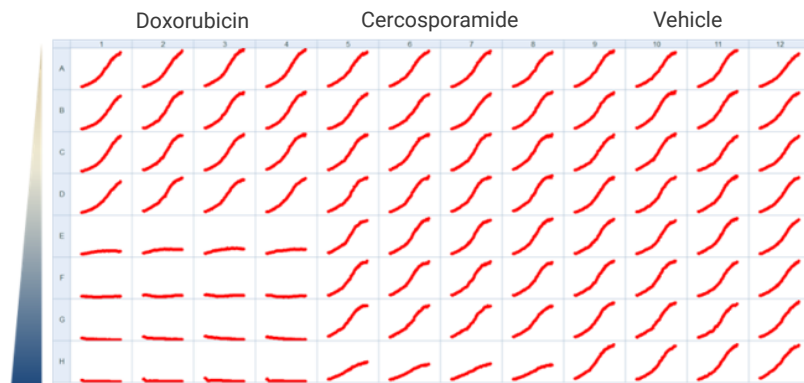


그림 6. 5일에 걸친 HeLa 세포 증식의 96웰 마이크로플레이트 매트릭스. 8개 농도의 doxorubicin 및 cercosporamide(각각 4개 반복)를 음성 대조군과 함께 테스트했습니다.

키네틱 세포 증식 프로파일은 세 가지 세포 유형에 걸쳐 doxorubicin 및 cercosporamide에 대한 차등적 반응을 보여줍니다(그림 7).

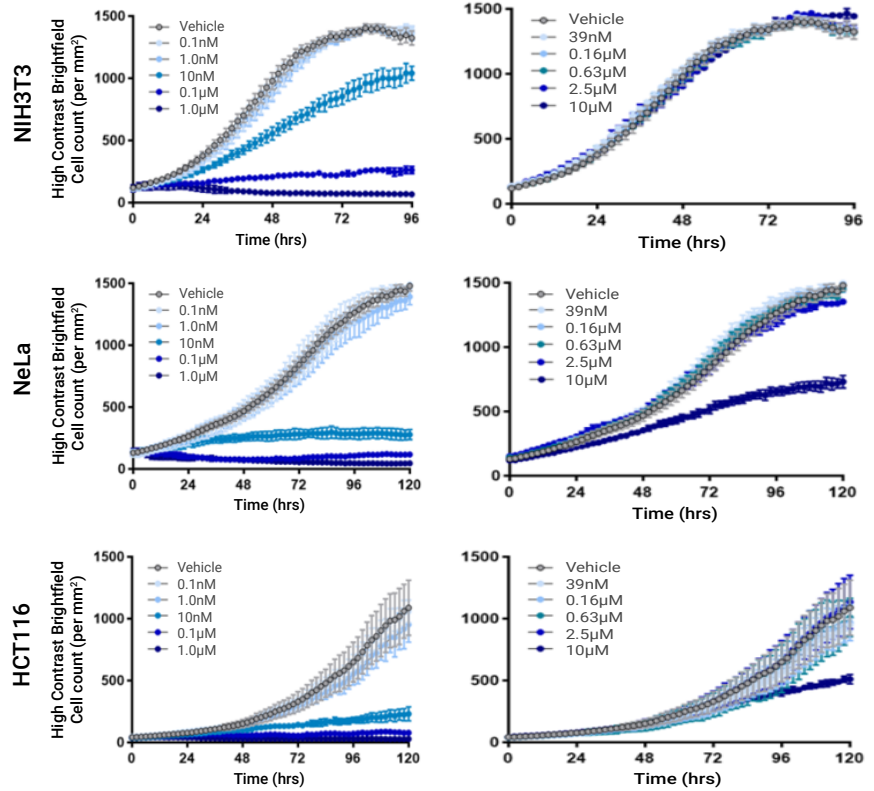


그림 7. NIH3T3, HeLa 및 HCT116 세포 증식 프로파일을 통해 약물 반응을 정량적으로 분석할 수 있습니다. 5일 동안, 또는 세포가 완전한 컨플루언스에 도달할 때까지 2시간마다 mm²당 세포 수를 계산했습니다. 5가지 약물 농도의 프로파일은 세포 유형에 따른 차등적 용량 반응을 보여줍니다.

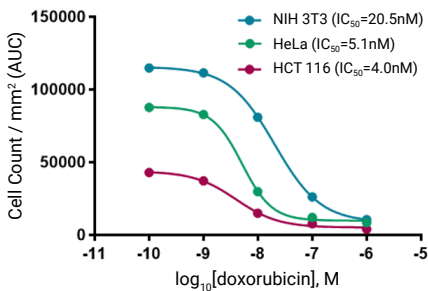


그림 8. Doxorubicin에 의한 세포 증식의 용량에 따른 억제 측정. mm² 증식 프로파일당 세포 계수의 AUC를 사용하여 IC₅₀ 값을 계산했습니다.

NIH3T3 세포는 테스트 농도에서 모두 cercosporamide의 영향을 받지 않았습니다. 그러나 두 가지 암세포 유형인 HeLa와 HCT116의 증식은 10µM cercosporamide에 의해 억제되었습니다. Doxorubicin으로 처리하면 NIH3T3, HeLa 및 HCT116 세포 증식이 용량에 따라 억제됩니다. 시간 경과에 따른 doxorubicin 처리 효과의 정량 분석은 각 증식 프로파일의 검량선 아래 면적(AUC)을 사용하여 IC₅₀ 값을 결정함으로써 얻었습니다(그림 8). HCT116은 doxorubicin에 대해 가장 높은 감도를 보였으며 HeLa와 NIH3T3이 다음으로 높았습니다(각각 4nM, 5.1nM 및 20.5nM의 IC₅₀ 값을 보임).

항증식 약물에 대한 세포 반응의 키네틱적 표현형 분석

Doxorubicin 처리 효과를 더 자세히 조사하기 위해 실험 동영상을 사용하여 약물의 억제 농도에서 각 세포 유형에 대한 정성 평가를 수행했습니다. 10nM doxorubicin에서 36시간 이내에 NIH3T3 세포 수의 현저한 감소가 관측되었지만, 세포 사멸의 명백한 징후는 존재하지 않았습니다. 이러한 발견은 이 농도에서 doxorubicin이 명백한 세포독성을 일으키지 않고 세포 분열을 억제한다는 것을 나타냅니다. 대조적으로, 1µM doxorubicin으로 처리된 NIH3T3 세포는 24시간 이내에 상당한 세포독성과 세포 사멸 징후를 나타냈습니다(그림 9).

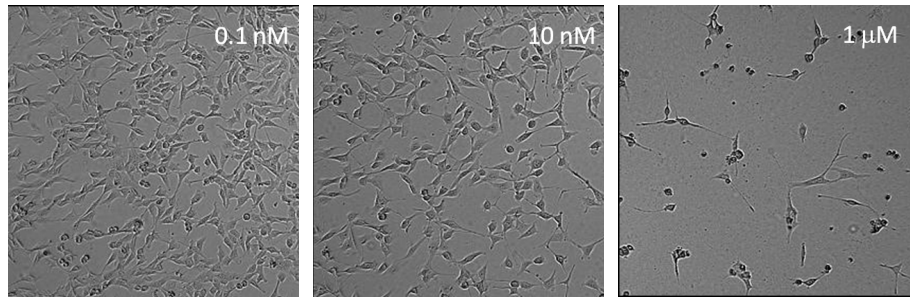


그림 9. 키네틱 세포 증식의 정성적 분석은 약물 치료에 대한 표현형 반응에 대한 유익한 정보를 제공합니다. 표시된 농도의 doxorubicin으로 처리하고 36시간이 지난 후 NIH3T3 증식 이미지. 10nM doxorubicin에서는 명백한 세포독성을 일으키지 않고 세포 분열이 억제됩니다. 100nM 이상 농도에서는 세포독성의 징후가 분명합니다.

결론

BioSpa 8의 세포 처리 능력과 Cytation 5의 이미징 기능을 결합하면 정확하고 재현 가능한 장기 증식 연구를 수행할 수 있는 완전 자동화된 시스템이 구성됩니다. 고대비명시야 세포 계수를 통해 방해가 되는 표지 없이도 세포 성장을 정량적으로 분석할 수 있습니다. 정량적 측정 외에도 이 시스템은 시간 경과에 따른 세포 표현형의 정성적 분석을 수행하고, 약물 치료 반응을 추가로 특성 규명하거나 표적 유전자 파괴 연구를 수행하는 데 사용할 수 있습니다. 증식 어세이는 중간에서 높은 처리량의 스크리닝을 위해 96웰 또는 384웰 마이크로플레이트에서 실행할 수 있습니다.

BioSpa 8과 Cytation 5는 강력한 Gen5 이미지 분석 도구와 함께 광범위한 키네틱 세포 증식 응용을 위한 우수하고 강력한 솔루션을 제공합니다.

세포 증식의 무표지 측정을 위해 Agilent BioTek 현미경을 사용한 최근 발행물

1. M. A. Altemus et al., "Breast cancers utilize hypoxic glycogen stores via PYGB, the brain isoform of glycogen phosphorylase, to promote metastatic phenotypes," *PLOS ONE*, vol. 14, no. 9, p. e0220973, Sep. **2019**, doi: 10.1371/journal.pone.0220973.
2. A. C. Little et al., "IL-4/IL-13 Stimulated Macrophages Enhance Breast Cancer Invasion Via Rho-GTPase Regulation of Synergistic VEGF/CCL-18 Signaling," *Front. Oncol.*, vol. 9, p. 456, May **2019**, doi: 10.3389/fonc.2019.00456.

장기 증식 어세이에서 pH 모니터링

어세이 원리

세포 증식을 특성 규명하는 것은 생물학적 연구 및 치료 약물 개발의 중요한 측면입니다. 대부분의 최신 세포 증식 어세이는 간접적인 생화학적 측정법에 의존하는데, 여기에는 아티팩트 또는 이미징 기반 엔드포인트 측정에 의한 제한이 따릅니다. 예를 들어, BrdU, EdU 및 IdU와 같은 Thymidine 유사체의 통합을 통해 DNA 합성을 평가할 수 있습니다. 이후, 특정 항체 또는 화학물질을 사용하여 이러한 유사체를 검출합니다. 세포 대사는 세포 효소의 작용에 의해 유색 화합물로 전환되는 tetrazolium 염을 사용하여 평가할 수 있습니다. PCNA, Ki67 및 MCM-2와 같은 여러 가지 다른 증식 마커 단백질은 면역형광법으로 검출할 수 있습니다. 이러한 기술은 세포 성장의 일부분을 제공할 수 있지만 장기적인 증식에 관한 정보를 제공할 수는 없습니다.

장기 세포 *체외* 증식 어세이는 항증식제 테스트와 관련하여 매우 유익한 것으로 나타났습니다.¹⁴ 이러한 어세이는 일반적으로 *체내*에서 공급되는 영양소를 모방하도록 의도된 조직 배양 배지 제제에서 며칠에 걸쳐 수행됩니다.

대부분의 포유류 조직은 중성에 가까운 pH로 존재합니다. 인간의 동맥혈은 정상적인 신체 호흡을 통해 조절되는 중탄산염 완충 시스템을 통해 7.4(7.35-7.45)로 유지됩니다. 정상 범위에서 벗어나면 CO₂ 배출을 변경하기 위해 신체가 폐 활동을 증가시키거나 감소시키게 됩니다.¹⁵ 또한 세포와 조직의 *체외* 배양은 동일한 pH 수준에서 진행됩니다. 배양은 주로 중탄산 완충 시스템을 사용하여 생리학적 pH로 유지됩니다. 중탄산염-CO₂ 시스템은 인공적인 수준의 이산화탄소 가스와 일치하는 농도의 용해된 중탄산염을 사용합니다. 이산화탄소는 배지에 용해되고 물과 반응하면서 탄산을 형성합니다. 또한 탄산과 중탄산염이 상호 작용하여 생리학적 수준에서 pH를 유지할 수 있는 평형을 형성합니다.

사용되는 완충제에 관계없이 조직 배양 배지에는 종종 페놀 레드 염료가 보충됩니다. 페놀 레드는 일부 조건에서 약한 에스트로겐으로 설명되어 있지만¹⁶ 대부분의 경우 시각적 pH 지표로 *체외* 배양 배지에 첨가되는 불활성 화합물입니다. 농도는 다양한 배지 조성에 따라 다르지만 존재하는 경우 일반적으로 5-15mg/mL 범위입니다.

세포가 죽어서 생성된 노폐물이나 오염물질의 과증식으로 인해 pH가 감소하여 표지 색상이 변경됩니다. 예를 들어, 상대적으로 천천히 분열하는 포유동물 세포 배양물의 오염은 박테리아에 의해 빠르게 증가하여 배지가 산성화되고 지시약이 노란색으로 변할 수 있습니다. 포유류 세포 노폐물 자체는 pH를 천천히 감소시켜 용액이 점차 주황색으로 변한 다음 노란색으로 변합니다. 이러한 색상 변화는 오염이 없더라도 배지를 교체해야 함을 나타냅니다.

라이브셀 이미징 실험은 전적으로 생물학에 초점을 맞춥니다. 이미지가 명시야, 위상차 또는 형광인지에 관계없이 배지의 백그라운드 환경은 관측되지 않으며 일반적으로 무시됩니다. 여기에서는 Cytation 5 세포 이미징 멀티모드 리더를 사용하여 세포 배양 pH 상태를 모니터링하는 동시에 디지털 현미경 이미지를 캡처하는 분석법을 설명합니다. 이는 리더의 고유한 기능을 활용하여 세포 이미징과 함께 웰 흡광도를 측정합니다.



그림 10. 페놀 레드 함유 배지가 포함된 일반적인 조직 배양 플라스크.

재료 및 분석법

DMEM, FBS(Fetal Bovine Serum) 및 penicillin-streptomycin-glutamine은 Life Technologies에서 구입했습니다. 투명한 바닥, 검정색 측면의 96웰 마이크로플레이트 (3904)는 Corning 회사의 제품입니다.

라이브셀 실험

핵 H2B-GFP 키메라 형광 단백질을 발현하는 HCT116-GFP 결장암 세포를 10% 태아 소 혈청 및 penicillin-streptomycin이 보충된 Advanced DMEM에서 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양했습니다. 배양물은 80% 컨플루언스에서 정기적으로 트립신 처리되었습니다(0.05% Trypsin-EDTA). 실험을 위해 세포를 Corning 3904(검정색 면이 있는 투명한 바닥) 96웰 마이크로플레이트에 플레이팅했습니다. 장기 성장 측정은 Cytation 5와 인터페이스된 BioSpa 8을 사용하여 수행되었습니다. BioSpa 시스템은 리더 스케줄링을 제어하고 이미징과 플레이트 흡광도 측정 사이에 가습 제어 환경(37°C, 5% CO₂)에서 세포를 유지합니다. 필요에 따라 BioSpa는 이미징 및 흡광도 측정을 위해 마이크로플레이트를 Cytation 5로 이송하고 나중에 이를 인큐베이터로 반환합니다. HCT116-GFP 세포를 웰당 500개 또는 2,000개 세포로 분주하였습니다. 성장 측정이 시작되기 전에 세포가 밤새 부착되도록 했습니다. HCT116-GFP 세포는 GFP 광 큐브로 구성된 Cytation 5 세포 이미징 멀티모드 리더를 사용하여 이미징했습니다. 이미저는 판독 챔버 내에서 37°C 및 5% CO₂를 유지하며 대역 통과 필터 및 이색성 거울과 함께 LED 광원을 결합 사용하여 적절한 파장의 빛을 제공합니다. GFP를 발현하는 세포를 이미징하기 위한 469/35 여기 필터와 525/39 방출 필터로 구성된 GFP 광 큐브입니다. 4x 대물렌즈를 사용하여 몽타주(2 x 2) 디지털 이미지를 제작했고 Gen5 마이크로플레이트 리더 및 이미저 소프트웨어를 사용하여 단일 파일로 스티칭했습니다. 캡처된 디지털 이미지의 1차 마스크 분석을 사용하여 세포 수를 결정했습니다. 핵은 크기가 5-100 μm 사이이고 형광이 임계값 1,500을 초과하는 형광 개체로 식별됩니다. 이미징 직후, Cytation 5의 UV-Vis 모노크로메터 모듈을 사용하여 560nm에서의 웰 흡광도를 측정했습니다.

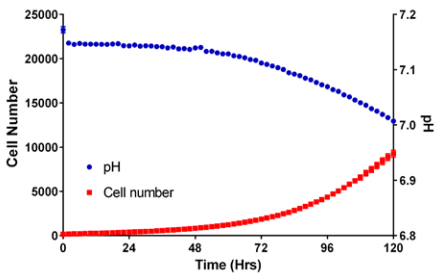


그림 11. 비컨플루언스 배양에서 시간 경과에 따른 HCT116 세포 계수 및 pH의 변화. HCT116 세포를 웰당 500개 세포의 밀도로 분주하였습니다. 24시간 동안 부착되도록 둔 후에 5일 동안 2시간마다 96웰 플레이트 배양물에 대해 이미지 기반 및 흡광도 분석을 수행하고 결과를 표시했습니다. 이전에 생성된 검량선의 데이터를 보간하여 pH를 결정했습니다. 데이터는 각 데이터 포인트에서 96개의 결정에 대한 평균과 SEM을 나타냅니다.

결과 및 토의

핵에서 GFP를 발현하는 살아있는 HCT116 세포는 이미지 분석을 사용하여 쉽게 계수됩니다. 녹색 형광은 세포 성장에 영향을 미칠 수 있는 핵산 결합 염색이 필요 없이 각 세포를 식별합니다. HCT116-GFP 세포를 저밀도로 분주하고 5일 동안 모니터링하는 경우, 560 흡광도를 사용하여 이전에 결정된 pH 검량선을 통해 각 웰의 pH를 계산했습니다. 이들 배양물의 pH는 계수된 세포 수가 50배 증가했음에도 불구하고 5일 동안 약 0.15만 감소했습니다(그림 11).

이 실험에서 세포는 5일이 지나도 컨플루언스에 도달하지 않는 밀도로 분주되었습니다(그림 12). 이 상태에서는 세포의 접촉이 억제되지 않고 자유롭게 분열할 수 있습니다. 분열을 막는 유일한 제한은 배지 영양분과 배지 pH 상태입니다.

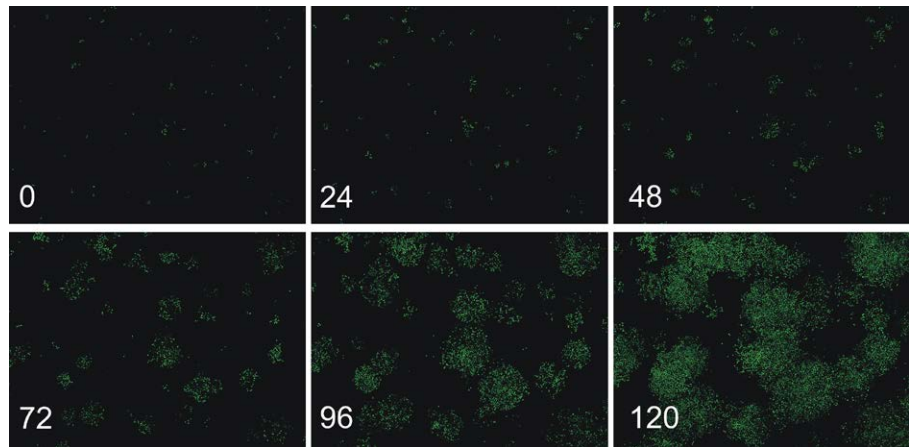


그림 12. 5일 동안 배양된 HCT116-GFP 세포의 몽타주 이미지. HCT116-GFP 세포를 웰당 500개 세포로 96웰 플레이트에 분주하고 24시간 동안 부착되도록 했습니다. 몽타주 이미지(2 x 2)는 GFP LED 큐브를 사용하여 24시간마다 4x 대물렌즈로 만들어졌습니다.

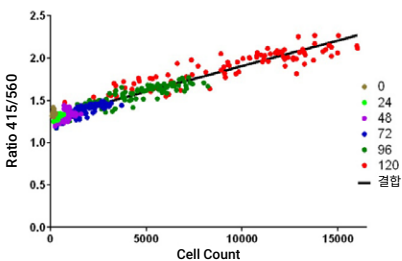


그림 13. 낮은 세포 밀도 분주에서 배지 착색과 세포 수의 관계. 5일 동안 배양된 96웰 플레이트의 각 웰에 대한 세포 수를 415/560 흡광도 비율에 대해 나타낸 플롯. 각 데이터 포인트는 개체의 웰을 나타냅니다.

이는 세포 수를 415/560 흡광도 비율과 비교하여 확증됩니다. 이 비율은 배지 색상의 함수이며 이전에 pH와 반비례 관계가 있는 것으로 나타났습니다.¹⁷ 그림 13에서 볼 수 있듯이 이러한 세포 배양에서 세포 수는 시간이 지남에 따라 증가합니다. 이러한 조건에서 세포는 방해받지 않고 성장하고 분열할 수 있으며 시간이 지남에 따라 결정된 세포 수가 증가합니다. 개별 웰 세포 수는 세포의 물리적 위치 변화뿐 아니라 초기 세포 수의 차이로 인해 달라질 수 있습니다. 세포 계수에 사용되는 스티칭 이미지는 웰의 중앙 부분만 포함하므로 웰 주변에 부착된 세포는 반드시 계수된다는 보장이 없습니다. 마찬가지로, 초기 분주로 약간 더 많거나 약간 더 적은 세포를 받는 웰은 이후 시간 간격에서 다른 세포 수를 가질 것으로 예상됩니다. 세포 수의 가변성에도 불구하고 세포 계수는 시간이 지남에 따라 선형으로 증가합니다. 시간이 흐르고 세포 수가 증가함에 따라 웰의 pH는 낮아집니다.

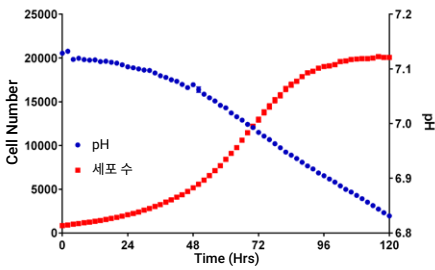


그림 14. 컨플루언스 배양에서 시간 경과에 따른 HCT116 세포 계수 및 pH의 변화. HCT116 세포를 웰당 2,000개 세포의 밀도로 분주했습니다. 24시간 동안 부착되도록 둔 후에 5일 동안 2시간마다 96웰 플레이트 배양에 대한 이미지 기반 및 흡광도 분석을 수행했습니다. pH는 이전에 생성된 검량선에 415/560 비율 값을 보간하여 결정했습니다. 데이터는 각 데이터 포인트에서 96개의 결정에 대한 평균과 SEM을 나타냅니다.

HCT116-GFP 세포를 더 높은 밀도로 분주하면 pH 변화가 더 큰 문제가 되고 세포 수 증가는 결국 중단됩니다(그림 14). 세포가 웰당 2,000개의 세포로 분주되면 세포 수가 증가하여 pH가 낮은 분주 밀도보다 약 2배 더 떨어집니다. 이러한 pH 저하는 약 80시간 후에 세포 수가 정체됨에도 불구하고 실험 기간 동안 계속됩니다. 세포 밀도가 더 높으면 세포 수 증가가 중단됨에도 불구하고 세포는 전 기간에 걸쳐 계속 호흡하여 pH가 감소합니다.

세포 컨플루언스는 그림 15에서 볼 수 있으며, 여기서 96시간과 120시간 사이에 관측된 형광의 증가가 거의 없습니다.

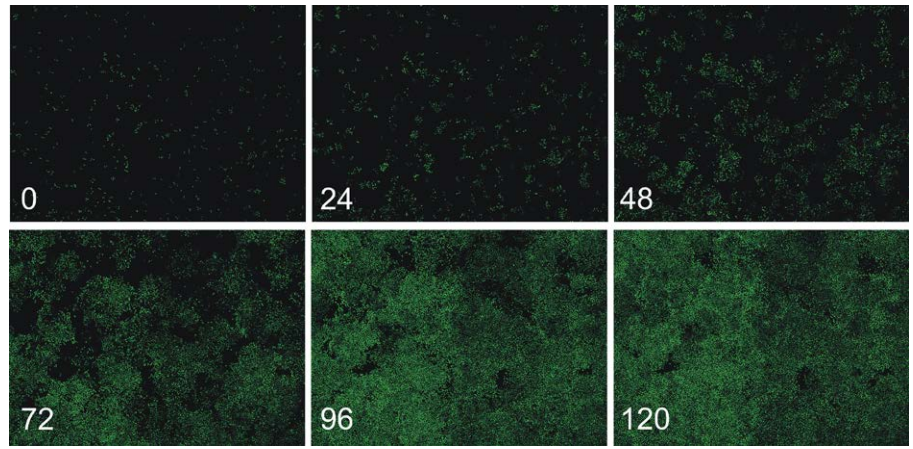


그림 15. 5일 동안 배양된 HCT116-GFP 세포의 몽타주 이미지. HCT116-GFP 세포를 웰당 2,000개 세포로 96웰 플레이트에 분주하고 24시간 동안 부착되도록 했습니다. 몽타주 이미지(2 x 2)는 GFP LED 큐브를 사용하여 24시간마다 4x 대물렌즈로 만들어졌습니다.

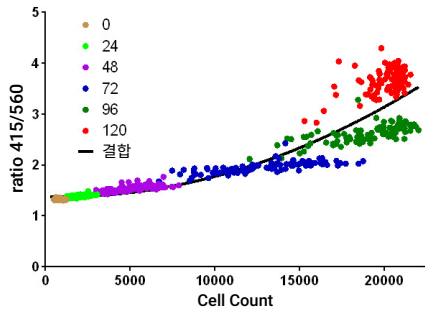


그림 16. 높은 세포 밀도 분주에서 배지 착색과 세포 수의 관계. 5일 동안 배양된 96웰 플레이트의 각 웰에 대한 세포 수를 415/560 흡광도 비율에 대해 나타낸 플롯. 각 데이터 포인트는 개체의 웰을 나타냅니다.

장기 배양에서 세포 컨플루언스로 인한 성장 억제는 세포 계수를 통해 확인할 수 있습니다. 그림 16에서 관측된 바와 같이, 이미지 기반 핵 계수를 통해 결정된 세포 수는 시간이 지나면서 세포가 컨플루언스에 따라 더 이상 증가하지 않습니다. 4-5일 후에도 세포 수는 눈에 띄게 증가하지 않습니다. 그러나 존재하는 배지의 pH는 415/560 흡광도 비율의 증가로 관측되는 것처럼 감소합니다. 세포 수는 거의 또는 전혀 증가하지 않음에도 불구하고 노폐물은 계속해서 배설되고 존재하는 세포는 영양분을 소비합니다.

이러한 데이터는 Cytation 5가 이미징과 동시에 라이브셀 실험에서 세포 배양 pH를 모니터링할 수 있음을 보여줍니다. 세포 배양은 일반적으로 세포 수와 세포 호흡의 증가로 인해 산성이 되어 폐쇄 레드를 함유한 배지 제제의 색상이 황색으로 변합니다. 단기 실험의 경우 pH 변화는 무시할 수 있는 경우가 많지만, 장기 라이브셀 실험에서는 세포 수가 증가하고 지속 시간이 길어질수록 배지 제제의 완충 용량이 압도될 수 있습니다. 배양 pH의 변화를 실시간으로 모니터링할 수 있으면 관측된 실험 결과에 확신을 가지거나 유해한 pH 조건이 있는 실험을 중단할 수 있습니다.

시간 경과에 따른 세포 수 또는 세포 컨플루언스를 모니터링하는 분석법은 항종양제의 세포 성장 예방 효능을 테스트하는 데 일반적으로 사용됩니다. 배지 pH를 모니터링하기 위해 페놀 레드 흡광도를 사용하면 보고된 억제제가 조직 배양 배지 상태의 불량 때문이 아니라 테스트 화합물의 결과라는 확인을 가질 수 있습니다.

Cytation 5는 라이브셀 이미징 실험을 통해 페놀 레드 흡광도 변화를 모니터링하는 데 이상적인 플랫폼입니다. 이 리더는 전용 UV-vis 모노크로매터를 사용한 흡광도 측정 기능과 6-포지션 대물렌즈 터릿 및 LED 광 큐브를 사용한 현미경 이미징 기능을 모두 갖추고 있다는 점에서 독특합니다. 흡광도 판독이 빨라 전체 96웰 이미징 단계가 단 몇 초 늘어나는 것만으로 세포 배양 상태에 관한 효과적인 정보를 얻을 수 있습니다. 리더 기능을 제어하는 외에도 Gen5를 사용하여 이전에 수립된 pH 검량선에서 pH를 계산할 수도 있습니다. 이 독특한 조합을 통해 장기간의 라이브셀 배양 실험을 지속적으로 실시간 모니터링할 수 있습니다.

증식 어세이의 형광 마커

형광 마커를 사용하면 세포 사멸 및 괴사와 같은 세포 사멸 상태에 대한 추가 세부 정보를 측정할 수 있습니다. 또한, 표지 세포 계수는 무표지 계수가 필요하지 않은 다양한 세포 유형에 대해 우수한 결과를 제공합니다.

384웰에서 세포 증식의 자동 키네틱 이미징 어세이

어세이 원리

생명이 시작될 때부터 모든 다세포 유기체의 적절한 기능은 세포 사멸에 의존해 왔습니다. 잘못 관리된 세포 사멸은 발달 이상부터 암에 이르는 현상의 근본 원인입니다. 암세포가 조절된 세포 사멸을 회피하는 능력은 암 치료에 특히 문제가 됩니다.¹⁸ 방사선, 면역요법, 화학요법 등 암 치료의 목표는 암세포를 선택적으로 사멸시키는 것입니다. 세포 사멸의 다양한 측면, 특히 암세포가 극복할 수 있는 측면을 이해하는 일은 임상, 1차 연구자 및 의약품 개발자 모두가 능동적으로 관심을 갖는 분야입니다.¹⁸ 다양한 세포 사멸 메커니즘을 겪고 있는 세포를 모니터링하는 이미징 기반 도구는 연속적이고 실시간이며 높은 처리량 방식으로 세포 사멸을 조사하는 수단을 제공했습니다.

세포 사멸과 같은 조절된 세포 사멸과 괴사와 같은 우발적인 세포 사멸은 모두 세포 스트레스 요인(예: 영양 결핍 또는 DNA 손상)에 반응하여 발생할 수 있는 과정이지만 각각 서로 다른 특징적인 세포 변화를 생성합니다.¹⁹ 초기 상태 세포 사멸의 특징은 일반적으로 세포막의 내부 옆 내에서만 발견되는 막 성분인 phosphatidylserine이 외부 옆으로 이동할 때 발생합니다. Phosphatidylserine의 이러한 노출은 식세포에 의한 세포 또는 남은 세포 조각의 잡아먹힘을 촉진할 가능성이 있습니다.²⁰ 여기서는 형광

pSIVA-IANBD 프로브의 특정 결합 및 활성화를 통해 라이브셀의 phosphatidylserine 노출을 광학적으로 모니터링합니다. 이 형광 프로브는 세포 사멸을 겪고 있는 세포의 살아있는 키네틱 지표를 제공하고 세포의 사멸을 통해 지속됩니다.²¹

후기 단계의 세포 사멸과 괴사 과정 중 특징적인 변화는 세포막 무결성이 상실된다는 것입니다.¹⁹ 이러한 무결성 손실로 인해 DNA 염색 염료 프로피듐 요오드화물(PI)과 같이 일반적으로 제외되는 세포핵에 분자가 들어갈 수 있습니다. 따라서 핵의 형광 PI 염색은 괴사 및 후기 단계의 세포 사멸 과정을 겪는 세포의 척도로 실시간으로 모니터링할 수도 있습니다.

여기에서는 고처리량 384웰 이미지 기반 어세이에서 며칠 동안 암세포 반응을 모니터링하기 위해 장기간의 키네틱 무표지 세포 계수와 형광 이미징을 결합했습니다. 넓은 시야각 카메라를 갖춘 Cytation 5를 사용하면 전체 384웰을 단일 이미지로 캡처할 수 있습니다. 완전 자동화된 환경 제어를 위해 Cytation 5를 BioSpa와 결합하면 간소화한 고처리량 이미지 기반 세포 분석의 워크플로를 사용할 수 있습니다.

재료 및 분석법

시약

HT-1080 섬유육종 세포는 ATCC(Manassas, VA)로부터 입수했습니다. Advanced DMEM, Fluorobright DMEM, 소태아혈청(FBS) 및 glutamine/penicillin/streptomycin은 Thermo Fisher Scientific(Waltham, MA)에서 구입했습니다. Staurosporine, nocodazole, nigericin 및 camptothecin은 Tocris Bioscience(Minneapolis, MN)에서 구입했습니다. 현미경 검사용 Kinetic Apoptosis Kit(ab129817)는 Abcam(Cambridge, MA)에서 구입했습니다. Greiner 384웰 마이크로플레이트(Cat. 781091)은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)에서 구입했습니다.

세포 배양 및 어세이 준비

HT-1080 세포는 10% FBS, 2mM glutamine 및 penicillin/streptomycin이 보충된 Advanced DMEM 배지에서 5% CO₂가 있는 가습 인큐베이터, 37°C 환경으로 유지되었습니다. 세포는 일반적으로 80% 밀도로 계대배양되었습니다. 384웰 마이크로플레이트에 분주하기 위해 HT-1080 세포를 수집하고 부유물을 웰당 500개 세포 밀도로 첨가했습니다. 세포가 부착된 후(약 4시간), 배지를 Fluorobrite DMEM 배지로 교환했습니다. Kinetic Apoptosis Kit 시약을 각 웰에 첨가하여 최종 농도가 1μL/mL pSIVA-IANBD 및 2μL/mL PI가 되도록 했습니다. 여러 단계로 희석된 항종양성 약물을 마이크로플레이트 전체에 첨가하고, 약물 첨가 직후 이미징을 시작했습니다.

자동화된 장기 라이브셀 이미징

완전 자동화된 장기 이미징을 위해 광시야각 카메라가 장착된 Cytation 5와 결합된 BioSpa 8에서 세포를 유지했습니다. BioSpa 8은 72시간 실험 기간 동안 세포를 37°C, 5% CO₂ 및 80-90% 습도로 유지했으며 환경 파라미터는 BioSpa 소프트웨어를 통해

실시간으로 모니터링 및 보고되었습니다. 마이크로플레이트는 이미징을 위해 2시간 간격으로 BioSpa 인큐베이터에서 Cytation 5로 자동으로 옮겨졌습니다. Cytation 5 내부의 추가 환경 제어는 이미징 절차 전반에 걸쳐 세포를 37°C 및 5% CO₂로 유지했습니다.

단일 이미지 전체 웰 캡처

384웰 마이크로플레이트의 전체 웰 이미징을 위해 광시야각 카메라가 장착된 Cytation 5를 4x 배율 대물렌즈와 결합했습니다. Cytation 5의 넓은 시야를 통해 웰의 전체 배양 영역에 대한 단일 이미지 캡처가 가능합니다(그림 17). Cytation 5는 표 2와 같이 이미징을 위해 구성되었습니다. 이미징 큐브 GFP(469/525nm) 및 PI(531/647nm)는 각각 Kinetic Apoptosis Kit 시약 pSIVA 및 PI 신호의 검출에 사용되었습니다. 무표지 세포 계수를 위해 이전에 설명한 대로 고대비 명시야 키트가 포함된 Cytation 5를 사용했습니다.¹⁴

표 2. 이미지 획득을 위한 Agilent BioTek Gen5 마이크로플레이트 리더 및 이미지 소프트웨어 설정.

이미지 획득	
파라미터	값
채널	명시야(고대비)
	GFP 469,525
	Propidium iodide 531,647
초점	레이저 자동 초점
대물렌즈	4x PL FL
Z-스택	아니요
몽타주	아니요
비연속 키네틱 과정	예
예상 총 시간	3일
예상 간격	2시간

이미지 분석

이미지 처리는 Gen5 소프트웨어를 사용하여 수행되었습니다. 사용된 파라미터는 표 3에 나와 있습니다. 감소된 백그라운드 및 강화된 대비를 전처리하여 모든 채널에서 쉽게 세포를 식별할 수 있었습니다. 고대비 명시야 이미지의 경우, 처리를 통해 검정색 백그라운드와 세포에 해당하는 밝은 흰색 점이 있는 이미지가 생성됩니다.

표 3. Agilent BioTek Gen5 마이크로플레이트 리더 및 이미지 소프트웨어 이미지 처리 파라미터.

이미지 처리			
파라미터	명시야	GFP 469,525	Propidium Iodide 531,647
백그라운드	어두움	어두움	어두움
롤링 볼 직경	20	100	30
우선 순위	우수한 결과	우수한 결과	우수한 결과
이미지 스무딩 강도	5 사이클	1 사이클	1 사이클

전처리된 이미지에 대해 세포 분석을 수행했으며 사용된 모든 채널에 대한 파라미터는 표 4에 나와 있습니다. 각 채널에 대한 임계값은 Gen5의 이미지 통계 분석을 통해 결정되었습니다. 대조 웰의 이미지 통계가 수행되었으며, 평균 이미지 신호 위 3개의 표준 편차가 세포 분석을 위한 임계값으로 사용되었습니다. 고대비 명시아 이미지의 1차 마스크 분석을 통해 총 세포 수를 확립했습니다. 세포 사멸 리포터 pSIVA에 대해 양성인 세포의 수는 GFP 채널의 1차 마스크 분석을 통해 확립되었습니다. 괴사 마커인 PI에 대해 양성인 세포의 수는 PI 채널의 1차 마스크 분석을 통해 확립되었습니다. 액체 메니스커스로 인해 정사각형 웰의 모서리가 나머지 배양 영역보다 명시아에서 약간 덜 밝혀지는 이미징 아티팩트가 생겨났으며(그림 17), 잠재적으로 형광 계수와 비교하여 무표지 세포 계수에 편향을 일으켰습니다. Gen5 플러그 기능은 전체 웰 배양 영역의 약 92%에 해당하는 명시아(직경 3,400 μm 원)에서 가장 잘 비춰지는 웰 영역으로 세포 분석을 제한하는 데 사용되었습니다. 따라서 플러그 기능을 사용하면 무표지 세포 계수 분석법을 사용하여 형광 세포 수의 편향 없는 정규화가 가능했습니다.

표 4. Agilent BioTek Gen5 마이크로플레이트 리더 및 이미지 소프트웨어 세포 분석 파라미터.

세포 분석			
1차 마스크			
파라미터	명시아 세포 계수	pSIVA 계수	PI 계수
검출 채널	Tsf[명시아]	Tsf[GFP 469,525]	Tsf[Propidium iodide 531,647]
임계값	8000	4000	3000
백그라운드	어두움	어두움	어두움
접촉 개체 분할	예	예	예
마스크의 홀 채우기	예	예	예
최소 개체 크기	10 μm	15 μm	5 μm
최대 개체 크기	100 μm	100 μm	100 μm
1차 엣지 개체 포함	아니요	아니요	아니요
전체 이미지 분석	아니요	아니요	아니요
고성능 검출 옵션			
롤링 볼 직경	자동	50	30
이미지 스무딩 강도	3 사이클	3 사이클	3 사이클
백그라운드 평가 커짐	5%	5%	5%
1차 마스크	임계값 마스크 사용	임계값 마스크 사용	임계값 마스크 사용

곡선 피팅 및 통계

모든 데이터는 Gen5 소프트웨어를 사용하여 수집 및 분석했습니다. 데이터 프리젠테이션에는 Gen5와 GraphPad Prism V8 소프트웨어가 모두 사용되었습니다. 모든 커브 피팅 및 EC_{50} 분석은 Gen5에서 수행되었습니다. Gen5의 V_{max} 분석 시간은 선형 회귀를 위해 5-포인트 창에서 수행되었습니다. 통계 분석은 Microsoft Excel에서 Student's t-test 함수(양측, 짝이 없음)를 사용하여 수행되었습니다.

결과 및 토의

자동화된 증식 키네틱 분석

인간 섬유육종 세포주 HT-1080의 무표지 이미지 기반 세포 계수를 384웰 플레이트에서 3일에 걸쳐 2시간 간격으로 수행했습니다. 각 웰에 대해 4x 대물렌즈와 고대비 명시야 키트를 사용하여 단일 이미지를 캡처했습니다. Gen5에서 세포 분석을 사용하여 세포 수를 확립했습니다(그림 17).

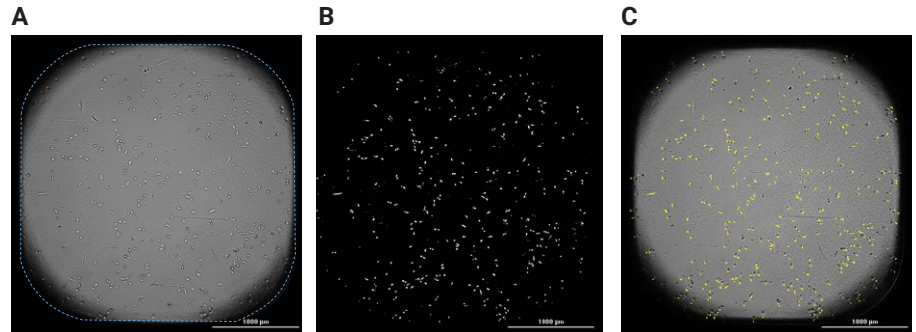


그림 17. 무표지 고대비 세포 계수 분석법. (A) 고대비 명시야 키트로 캡처한 원본 고대비 초점이 맞춰지지 않은 이미지. 384웰 플레이트에서 단일 웰의 전체 배양 영역은 파란색 점선으로 표시됩니다. (B) 표 3에 표시된 전처리 단계 후의 고대비 명시야 이미지. (C) Agilent BioTek Gen5 마이크로플레이트 리더 및 이미지 소프트웨어 세포 분석은 HT-1080 세포(노란색)를 식별 및 계수하고, 원래의 고대비 명시야 이미지에 이를 중첩시켜 표시합니다.

네 가지 항증양제인 staurosporine, nocodazole, camptothecin 및 nigericin의 세포 증식에 대한 효과를 조사했습니다. $t=0$ 시간에 첫 번째 이미지를 획득하기 직전에 약물을 추가했습니다. Gen5 소프트웨어는 전체 384웰 플레이트의 증식률에 대한 시각적 개요를 제공하는 세포 수의 곡선을 생성했습니다(그림 18). 증식에 미치는 각 약물의 차등적 억제 효과는 Gen5 플레이트 개요에서 쉽게 평가되었습니다.

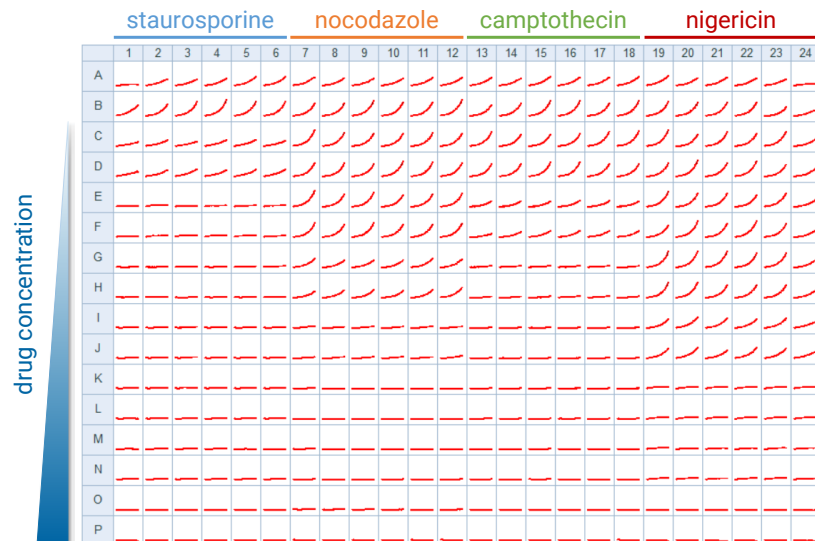


그림 18. 384웰 플레이트의 세포 증식 개요. 빨간색 곡선은 3일 실험 기간 동안 플롯한 세포 계수를 나타냅니다. 약물 농도가 C행에서 P행으로 증가함에 따라 전체 384웰 플레이트에서 모든 약물에 대한 증식 감소가 관측됩니다.

두 가지 예시 약물인 nocodazole과 camptothecin의 경우 세포 수는 다양한 용량에 걸쳐 함께 표시됩니다(그림 19A, 19B). 모든 추가 분석을 위해 각 조건에 대한 12개 웰의 반복 실험을 평균화하고 함께 표시했습니다. 증식에 미치는 각 약물의 억제 효과를 정량화하기 위해 Gen5에서 용량-반응 곡선을 생성했습니다(그림 19C, 19D). 24시간의 단일 시점 분석을 통해 다양한 약물에 대한 용량-반응 곡선이 처음 생성되었습니다.

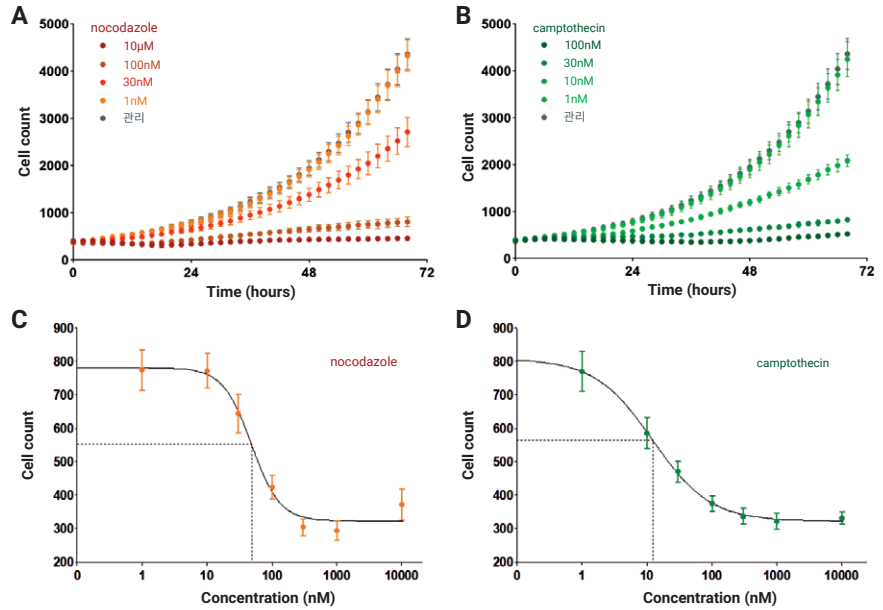
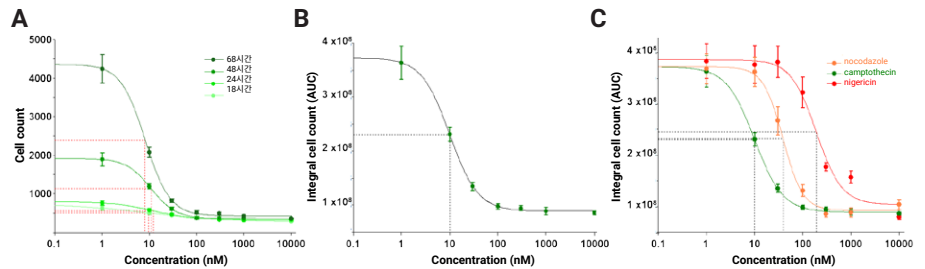


그림 19. HT-1080 섬유육종 세포 증식의 용량 의존적 억제. 3일 동안 (A) nocodazole(주황색 원, n=12 복제 웰) 및 (B) camptothecin(녹색 원, n=12 복제 웰)의 여러 농도에 대해 평균 세포 계수 플롯을 중첩시켰습니다. 오차 막대는 반복 실험의 표준 편차를 나타냅니다. Agilent BioTek Gen5 마이크로플레이트 리더 및 이미지 소프트웨어는 (C) nocodazole(주황색 원) 및 (D) camptothecin(녹색 원)에 대해 24시간의 단일 시점에서 무표지 세포 수에 대한 용량-반응 곡선을 생성했습니다. 4-파라미터 피팅은 검정색 실선으로 표시되고 보간된 IC₅₀ 값은 점선으로 시각화됩니다. Nocodazole의 경우 IC₅₀은 48nM에 해당하고, camptothecin의 경우 12nM에 해당합니다.

Gen5는 곡선 하 면적의 적분 분석을 통해 IC₅₀ 값을 추가로 비교합니다(그림 20). IC₅₀ 값을 계산하는 이 분석법은 약물 노출 시간과 무관하며 실험 기간 동안의 변화를 고려합니다. Camptothecin의 경우 분석법 간에 IC₅₀ 값이 매우 일치했습니다. 비교를 위해 nigericin 및 nocodazole에 대해서도 AUC 분석을 수행하여 IC₅₀의 큰 변화에 대한 어세이 감도를 입증했습니다(그림 20C).

그림 20. IC₅₀를 사용한 무표지 증식 용량-반응 곡선 분석. (A) Camptothecin에 대해 여러 시점에 대한 용량-반응 곡선을 중첩시켜 IC₅₀ 값을 시간에 따라 비교할 수 있게 했습니다(18시간 = 9.5nM, 24시간 = 12.3nM, 48시간 = 10.9nM, 68시간 = 8.2nM). 각 곡선에 대해 4-파라미터 피팅이 색상으로 표시되고 IC₅₀ 보간은 점선으로 시각화됩니다. (B) Agilent BioTek Gen5 마이크로플레이트 리더 및 이미지 소프트웨어는 전체 키네틱 계열(IC₅₀ = 10nM)에 대한 곡선 하 면적(적분) 분석을 통해 IC₅₀ 값에 대한 추가 추정치를 제공합니다. (C) 표시된 세 가지 약물에 대한 적분 기반 용량-반응 곡선. 실선은 4-파라미터 피팅에 해당하고 점선은 IC₅₀ 보간을 나타냅니다. IC₅₀ 값은 camptothecin의 경우 10nM, nocodazole의 경우 39nM, nigericin의 경우 193nM에 해당합니다.



형광 기반 키네틱 세포 사멸 표현형

증식에 미치는 전반적인 효과 외에도, 세포 사멸 및 괴사의 형광 리포터를 사용하여 세포 사멸의 메커니즘을 조사했습니다. 명시야 이미지를 포착한 각 시점에서 세포 사멸 마커 pSIVA 및 괴사 마커 PI에 대해 해당 형광 이미지를 얻었습니다(그림 21A). 세포는 pSIVA 및 PI 신호에 대해 양성으로 확인되었으며(그림 21B, 식별 파라미터는 "재료 및 분석법" 참조) 1차 마스크는 각 웰 및 시점에 대해 개별 세포를 식별했습니다(그림 21B, 삽입 부분 참조).

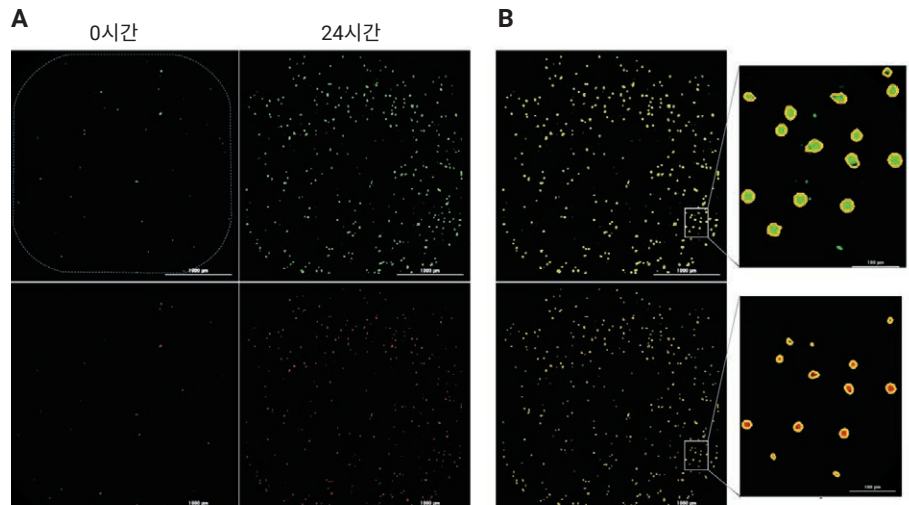


그림 21. 세포 사멸 및 괴사에 양성인 세포의 포획 및 식별. (A) 두 시점(표시됨)에서 pSIVA 세포 사멸 마커 (녹색, 상부 패널) 및 PI 괴사 마커(빨간색, 하부 패널)에 대해 양성인 세포의 예시 이미지. 384웰 바닥 영역은 A의 왼쪽 상단 패널에 파란색 점선 윤곽선으로 표시되었습니다. (B) 양성 세포 사멸 및 괴사 세포는 크기 및 신호 임계값 파라미터("재료 및 분석법" 참조)로 식별되고 1차 마스크는 양성 세포로 식별되었습니다(명확성을 위해 확대하여 삽입).

세포 사멸의 정량 분석

pSIVA의 녹색 형광은 phosphatidylserine이 세포외 공간에 노출됨에 따라 증가합니다. 예상한 대로, 세포 사멸 마커 pSIVA에 대해 양성인 세포의 수는 항증양제에 대한 반응으로 시간이 지남에 따라 증가하지만 대조 웰에서는 상대적으로 낮은 수준에서 안정적으로 유지됩니다(그림 22A). 이러한 거동은 nocodazole의 최고 농도와 최저 농도에서 예상되지만 중간 농도에서는 pSIVA에 양성인 세포의 수가 시간이 지남에 따라 계속 증가합니다. 이러한 축적은 많은 세포가 활발하게 세포 사멸을 겪고 있음에도 불구하고 전반적으로 세포 집단이 계속 증식되어 발생합니다. 이 효과는 결과의 해석을 모호하게 할 뿐만 아니라 시간 경과에 따른 결과적 용량-반응 곡선의 EC_{50} 값을 왼쪽으로 이동시킵니다(그림 22A, 하단 패널).

세포의 지속적인 증식뿐만 아니라 조건과 반복 사이의 초기 세포 수 변동성을 제어하기 위해 pSIVA 양성 세포 수는 무표지 세포 수를 통해 확립된 총 세포 수의 비율로 표시될 수 있습니다(그림 22B). 중요한 것은, 세포 사멸 수를 총 세포 수로 정규화하면 무표지 세포 수와 pSIVA 양성 수 모두의 절대적인 증가에도 불구하고 사멸 세포의 비율이 주어진 약물 농도에서 안정적으로 유지된다는 것이 입증됩니다(그림 22B, 상단 패널).

또한, 다양한 시점의 EC₅₀ 값은 시간이 지남에 따라 안정적이며 정규화된 계수와 거의 동일합니다(그림 22B, 하단 패널). 따라서 절대 계수에만 기초하여 세포 사멸 형광 신호를 정량화하면 중간 약물 농도의 세포가 계속 증식할 때 시간이 지남에 따라 EC₅₀ 값이 계통적으로 크게 과소 평가됩니다.

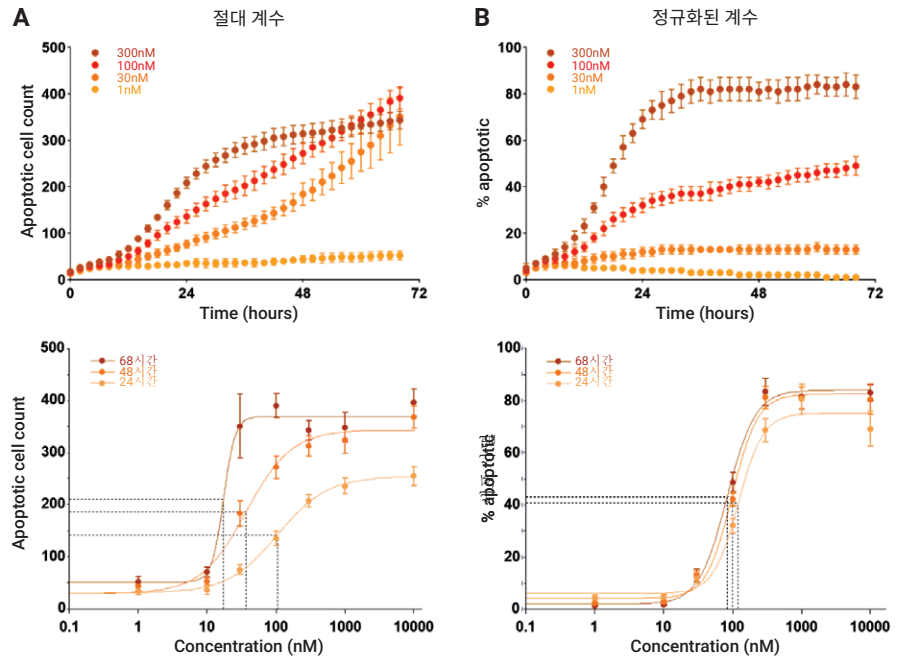


그림 22. 항종양제에 대한 세포 사멸 신호 반응. (A) 표시된 4가지 농도로 적용된 약물 nocodazole에 대한 세포 사멸 세포 수. 총 세포 수가 증가하기 때문에 중간 농도에서 세포 사멸 세포 수가 계속 증가한다는 점에 유의하십시오. 절대 세포 수를 얻기 위해 용량-반응 곡선이 생성되었으며 표시된 세 가지 시점에 피팅되었습니다. EC₅₀ 값은 세포 증식으로 인해 시간이 지남에 따라 실질적으로 왼쪽으로 이동했습니다 (EC₅₀ 24시간 = 106nM, EC₅₀ 48시간 = 30nM, EC₅₀ 68시간 = 17nM). (B) 패널 A의 세포 사멸 세포 수에 대한 동일한 데이터이지만 총 세포 수로 정규화되었습니다(비율로 표시). 정규화된 세포 사멸 세포의 경우, 모든 용량-반응 곡선은 일관되게 약 100nM의 EC₅₀ 값을 나타냈습니다. A 및 B 하단 패널 모두에 대해 Agilent BioTek Gen5 마이크로플레이트 리더 및 이미지 소프트웨어의 4-파라미터 피팅 선이 단색으로 표시되고 EC₅₀ 보간선은 점선으로 표시됩니다.

세포 괴사의 정량 분석

또한 Kinetic Apoptosis Kit에는 괴사 및 후기 세포 사멸의 리포터로서 요오드화 프로피듐(PI)이 포함되어 있습니다. PI는 세포막과 핵막이 모두 손상되면 세포에 들어가 DNA를 삽입합니다. 후기 세포 사멸과 괴사 과정에서 모두 막의 온전성이 상실됩니다. 여기서 PI 결합은 형광 이미지를 통해 모니터링되고 정량화됩니다. pSIVA 신호와 마찬가지로, PI 신호는 일반적으로 nocodazole에 대해 나타난 바와 같이 시간이 지남에 따라 그리고 약물 용량이 증가함에 따라 증가합니다(그림 23A). pSIVA 세포 사멸 신호에서도 볼 수 있듯이 PI 양성 세포는 증식으로 인해 중간 약물 농도에서도 증가합니다. 따라서 PI 양성 세포도 무표지 세포 수를 사용하여 전체 세포의 비율로 정규화되었습니다(그림 23B).

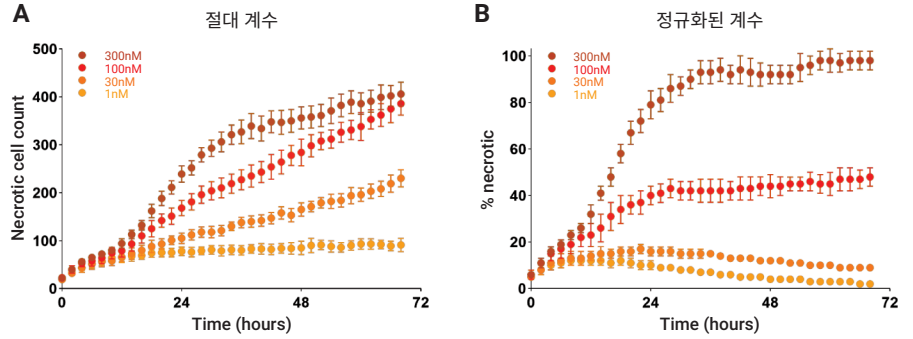


그림 23. 항종양제에 대한 과사 신호 반응. (A) 표시된 4가지 농도로 적용된 약물 nocodazole에 대한 과사 세포 수. 총 세포 수가 증가하기 때문에 중간 농도에서 과사 세포 수가 계속 증가한다는 점에 유의하십시오. (B) 패널 A의 세포 사멸 세포 수에 대한 동일한 데이터이지만 총 세포 수로 정규화되었습니다(비율로 표시).

약물 효능의 비교 및 정량화를 위해, 24시간에 모든 약물에 대해 정규화된 과사 및 세포 사멸 신호에 대해 키네틱 분석 및 곡선 피팅을 수행했습니다(그림 24). 흥미롭게도, 증식을 억제하는 nigericin의 효능에도 불구하고($IC_{50} = 100nM$, 그림 20C), 사용된 가장 높은 농도에서도 세포 사멸이나 과사가 거의 발생하지 않았으며 세포 사멸과 과사에 대한 EC_{50} 값은 결정되지 않았습니다.

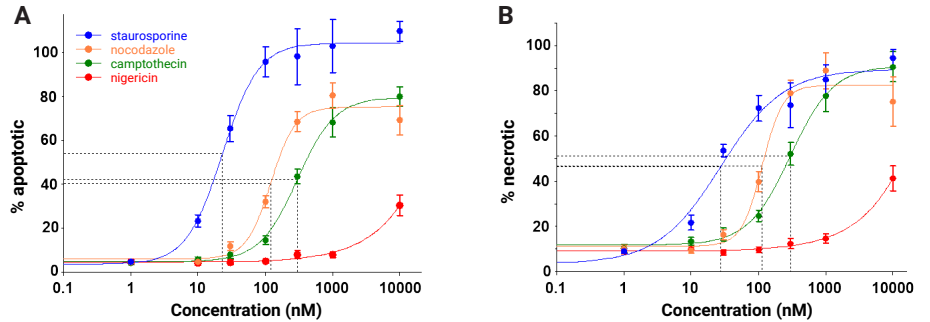


그림 24. 세포 사멸 및 과사에 대한 EC_{50} 결정. 표시된 각 약물에 대해 과사율(왼쪽 패널) 및 사멸 세포율에 대한 용량-반응 곡선이 표시됩니다. Agilent BioTek Gen5 마이크로플레이트 리더 및 이미지 소프트웨어의 4-파라미터 피팅이 각 피팅(실선) 및 보간된 EC_{50} 값(점선)에 대해 표시됩니다. 세포 사멸의 경우, EC_{50} 값은 staurosporine의 경우 24nM, nocodazole의 경우 121nM, camptothecin의 경우 301nM에 해당합니다. 과사의 경우, EC_{50} 값은 staurosporine의 경우 28nM, nocodazole의 경우 114nM, camptothecin의 경우 301nM에 해당합니다. Nigericin에 대한 EC_{50} 값(빨간색)은 세포 사멸 및 과사 모두에 대해 결정되지 않았습니다.

또한, staurosporine의 최대 정체기 값은 두 프로세스 모두에 대한 EC_{50} 값의 유사성에도 불구하고 과사율과 비교하여 세포 사멸율에 대해 더 높은 수준에 도달했습니다. 이 차이는 잠재적으로 staurosporine이 HT-1080 세포에서 세포 사멸을 우선적으로 개시한다는 것을 나타냅니다. 따라서 세포 사멸 및 과사 신호의 시작 시기도 Gen5를 사용하여 정량적으로 조사했습니다. 그림 25A에서, staurosporine(파란색)

및 camptothecin(녹색)에 대해 세포 사멸 및 괴사율 선이 모두 표시됩니다. 눈으로 보면 staurosporine으로 처리된 세포의 경우 세포 사멸 신호가 괴사 신호보다 먼저 나타납니다. 비교를 위해, 두 선이 상당히 겹치기 때문에 세포 사멸율과 괴사율 신호의 시작 시간은 camptothecin의 경우 거의 동일합니다. 이 차이를 정량화하기 위해 각 선에 대해 V_{max} 파라미터의 시간을 측정했습니다(자세한 내용은 "재료 및 분석법" 참조). 각 약물의 V_{max} 시간을 평가하기 위해 세포 사멸 및 괴사율의 최대 수준에 접근하는 첫 번째 농도를 선택했습니다. 각 약물의 V_{max} 시간이 그림 25B에 나와 있습니다. Staurosporine만이 두 신호 사이에 시작 시간의 차이를 보여, 세포 사멸이 약 3.5시간까지 괴사에 앞서 나타났습니다. 이 발견은 세포 사멸의 메커니즘이 주로 세포 사멸을 통해 이루어지고 괴사로 이어진다는 것을 나타냅니다.

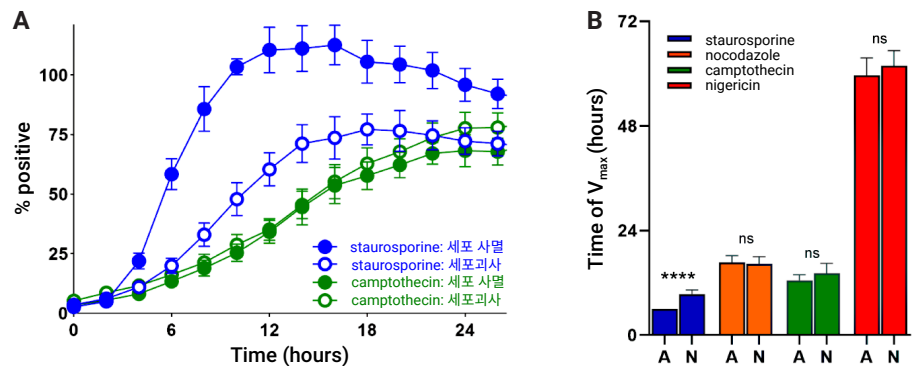


그림 25. 세포 사멸과 괴사 과정의 시작 시간 비교. (A) 동일한 세포 군집에 대해 함께 플롯된 세포 사멸 신호(채워진 원)와 괴사 신호(빈 원)에 대한 예시 선. Camptothecin(녹색 선)의 경우는 그렇지 않지만 Staurosporine(파란색 선)의 경우에는 세포 사멸이 괴사 신호보다 먼저 일어납니다. (B) 세포 사멸("A"로 약칭) 및 괴사("N"으로 약칭)에 대한 V_{max} 파라미터의 시간을 비교하는 플롯입니다. Staurosporine만이 V_{max} 시간 사이에 유의미한($p=0.000001$) 차이를 보였으며, 세포 사멸은 괴사보다 약 3.5시간 일찍 발생했습니다.

BioSpa 8 자동 인큐베이터와 결합된 광시야각 카메라를 갖춘 Cytation 5는 세포 증식 및 세포 사멸에 대한 이미지 기반 어세이를 정량화하는 완전 자동화되고 강력한 수단을 제공합니다. 광시야 카메라를 사용하면 전체 배양 영역에 대한 단일 이미지 캡처가 가능하므로 이미지 캡처 시간이 최소화되고 고처리량 응용 분야에서 소규모 배양 영역 용기에 대한 호환성이 향상됩니다. Gen5 소프트웨어 및 세포 분석 루틴을 사용하면 명시야 및 형광 기반 이미지 모두에서 세포 수를 빠르게 자동으로 식별할 수 있습니다. 조건 간 증식률의 차이로 인한 EC_{50} 판별 오차를 방지하려면 무표지 세포 계수를 사용하여 형광 신호를 정규화하는 것이 중요합니다.

자동화된 다중 파라미터 분석법을 활용한 키네틱 세포 사멸 분석 정량화

어세이 원리

세포 사멸 과정의 조절 및 조절 장애에 대한 깊은 통찰력은 암과 같은 질병 상태를 이해하고 효과적이고 내약성이 좋은 치료법을 개발하는 데 중요합니다. 실제로, 보다 효과적이고 독성이 적은 화학요법을 개발하기 위해 많은 프로그램화된 세포 사멸 경로와 프로그램되지 않은 세포 사멸 경로가 연구되고 있습니다.²² 그러나 세포 사멸 양식의 다양성은 공유된 신호 요소, 중복 메커니즘 및 다양한 세포 사멸 경로 간의 복잡한 혼선으로 인해 복잡해집니다.²³ 세포 사멸 경로의 형태학적 특징을 구별하는 것은 노동 집약적일 수 있으며, 엔드포인트 어세이를 통합할 때 중요하면서도 일시적인 반응을 놓칠 수 있는 경우가 많습니다.

여기에서는 라이브셀 이미징 시스템을 사용하여 실시간 세포 사멸을 평가하는 자동화된 다중화 분석법을 보여줍니다. Abcam의 형광 프로브를 사용하여 세 가지 일반적인 세포 사멸 바이오마커인 미토콘드리아 막 전위, 포스파티딜세린(PS) 외부화 및 세포막 무결성을 측정합니다. 형광성의 양전하를 띤 테트라메틸로다민 에틸 에스테르(TMRE) 염료는 세포막을 쉽게 통과하여 건강하고 활성 미토콘드리아에 축적되어 붉은 주황색 신호를 생성합니다. 세포 사멸 및 괴사 세포에서처럼 미토콘드리아 막이 탈분극되거나 비활성 상태가 되면 염료가 세포 전체로 확산됩니다. 녹색 형광 프로브인 pSIVA-1ANBD는 세포막 지질 이중층의 비극성 환경에 결합하여 세포 사멸과 괴사의 특징인 비가역적이고 일시적인 포스파티딜세린 노출을 감지합니다. 마지막으로, 근적외선 형광 염료인 DRAQ7은 건강한 세포에는 침투하지 않는 반면, 죽어서 투과된 괴사 및 괴사 세포의 핵은 염색시킵니다. 실시간 형태학적 분석을 통해 이러한 염료를 단일 다중화 분석법에 결합하면 세포 사멸 시스템을 특성 규명할 때 큰 이점을 얻을 수 있습니다. 섬유육종 표적 세포와 염료를 알려진 억제제 화합물과 함께 마이크로플레이트에 결합하고 자동화된 벤치탑 인큐베이터에서 배양했습니다. 이 플레이트는 총 48시간 동안 매 2시간마다 결합된 마이크로플레이트 리더와 자동화된 디지털 이미저로 인큐베이터에서 자동으로 옮겨졌습니다. 여기서 형광 이미징을 수행하여 세포 활동을 평가하고 고대비 명시야 이미징을 통해 전체 배양 기간 동안 세포를 정확하게 계수했습니다.

재료 및 분석법

세포 및 배지

HT-1080 섬유육종 세포(부품 번호 CCL-121)는 ATCC(Manassas, VA)로부터 입수했습니다. Advanced DMEM(부품 번호 12491-015), 소태아 혈청(부품 번호 10437-036) 및 페니실린-스트렙토마이신-글루타민(100X)(부품 번호 10378-016)은 Thermo Fisher Scientific(Waltham, MA)에서 구입했습니다.

어세이 및 실험 구성 요소

TMRE-Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit(부품 번호 ab113852)의 일부인 TMRE 형광 염료, Kinetic Apoptosis Kit(부품 번호 ab129817)의 일부인 pSIVA-IANDB 녹색 형광 프로브, DRAQ7 근적외선 형광 염료(부품 번호 ab109202) 및 알려진 토포이소머라제 I 억제제인 camptothecin(부품 번호 ab120115)은 Abcam(Cambridge, MA)에서 제공되었습니다.

세포 준비

준비된 배지에 있는 총 2000개의 HT-1080 섬유육종 세포를 96웰 조직 배양 처리된 마이크로플레이트의 웰에 첨가했습니다. 마이크로플레이트를 37°C/5% CO₂에서 밤새 배양하여 세포가 웰에 부착되도록 했습니다.

시약 및 억제제 희석

어세이 시약을 배지에서 다음 1x 작업 농도로 희석시켰습니다: 200nM TMRE; 10µL/mL pSIVA-IANDB; 3µM DRAQ7. Camptothecin은 연속 1:4 희석을 사용하여 10µM에서 0µM까지 8-포인트 적정을 생성하기 위해 시약이 포함된 배지에 희석시켰습니다.

어세이 절차

밤새 세포를 부착한 후, 배지를 마이크로플레이트에서 제거하고 화합물 희석액 외에 TMRE, pSIVA 및 DRAQ7 시약을 포함하는 배지로 교체했습니다. 그런 다음 플레이트를 이전에 37°C/5% CO₂로 설정된 대기압 조건에서 BioSpa 8에 넣었습니다. 가습 환경을 만들기 위해 팬에 물을 추가했습니다. 48시간 배양 기간 동안 총 25회의 이미징 반복과 2시간마다 테스트 웰의 고대비 명시야 및 형광 이미징을 얻기 위해 플레이트가 자동으로 Cytation 5로 이송되도록 BioSpa 8 소프트웨어를 프로그래밍했습니다. 웰당 대표적인 세포 군집을 캡처하기 위해 각 채널(표 5)에서 단일 4x 이미지를 포착했습니다. 표적 세포층에 적절하게 초점을 맞추고 가장 효율적인 감도를 보장하기 위해 레이저 자동 초점이 통합되었습니다.

이미지 처리

캡처 후, 표 6의 설정을 사용하여 각 채널에서 백그라운드 신호(high background signal)를 제거하기 위해 분석 전에 이미지를 처리했습니다.

표 6. 이미지 전처리 파라미터.

2D 이미지 전처리 파라미터			
채널	이미지 전처리 적용	백그라운드	롤링 볼 직경
HCBF	예	어두움	25
GFP	예	어두움	자동
RFP	예	어두움	150µm
CY5	예	어두움	자동

표 5. 채널당 세포 이미징

이미징 채널 대상	
HCBF	모든 세포
GFP	사멸 세포
RFP	활성 미토콘드리아 막 전위
CY5	괴사 세포

처리된 이미지의 세포 분석

표 7 및 8의 기준을 사용하여 활성 미토콘드리아, 세포 사멸 및 괴사 활성화에 대한 기준을 충족하는 세포 수 외에 이미지당 총 세포 수를 결정하기 위해 처리된 이미지에 대해 세포 분석을 수행했습니다.

표 7. 1차 및 2차 분석 기준.

총 세포 1차 분석	
채널	Tsf[명시아]
임계값	10,000
백그라운드	어두움
접촉 개체 분할	체크됨
마스크의 홀 채우기	체크됨
최소 개체 크기	5 μ m
최대 개체 크기	100 μ m
1차 엣지 개체 포함	체크 해제됨
전체 이미지 분석	체크됨
고성능 검출 옵션	
롤링 볼 직경	25 μ m
이미지 스무딩 강도	0
백그라운드 평가 커짐	최저 픽셀의 5%
활성 미토콘드리아 세포 2차 분석	
채널	Tsf[RFP]
2차 마스크 내에서 측정	체크됨
유형	1차 마스크 제외
1차 마스크로부터의 거리	1 μ m
링 폭	25 μ m
임계값	5,000
스무딩	0
분석법	마스크 전파
관심 지표	영역_2[Tsf[RFP]]
세포 사멸 세포 2차 분석	
채널	Tsf[GFP]
2차 마스크 내에서 측정	체크됨
유형	1차 마스크 제외
1차 마스크로부터의 거리	1 μ m
링 폭	25 μ m
임계값	10,000
스무딩	0
분석법	마스크 전파
관심 지표	평균_2[Tsf[GFP]]
괴사 세포 2차 분석	
채널	Tsf[CY5]
1차 마스크 내에서 측정	체크됨
1차 마스크 확장	15 μ m
관심 지표	평균[Tsf[CY5]]

표 8. 이미지 전처리 파라미터.

하위 모집단 기준			
세포 하위 모집단	채널	관심 지표	양성 세포 차단 기준
활성 미토콘드리아	RFP	영역_2[Tsf[RFP]]	>100 μm^2
세포 사멸	GFP	평균_2[Tsf[GFP]]	>10000 RFU
세포 과사	CY5	평균[Tsf[CY5]]	>2000 RFU

결과 및 토의

무표지 총 세포 계수

48시간 camptothecin 배양 기간 동안 총 세포 수를 정량화하기 위해 고대비 명시야, 무표지 라이브셀 이미징을 수행했습니다. 세포의 초점 평면은 레이저 자동 초점을 통해 자동으로 결정되었으며(그림 26A), 추가 이미지는 원래 초점 평면보다 약 300 μm 아래에서 캡처되었으며(그림 26B) 자동으로 전처리되어(표 6) 세포 대비를 증가시켰습니다(그림 26C). 그런 다음 표 7의 총 세포 1차 분석 파라미터를 사용하여 정량 분석을 수행하고, 세포 주위에 개체 마스크를 배치하여(그림 26D), 이미지당 총 세포 수를 결정했습니다.

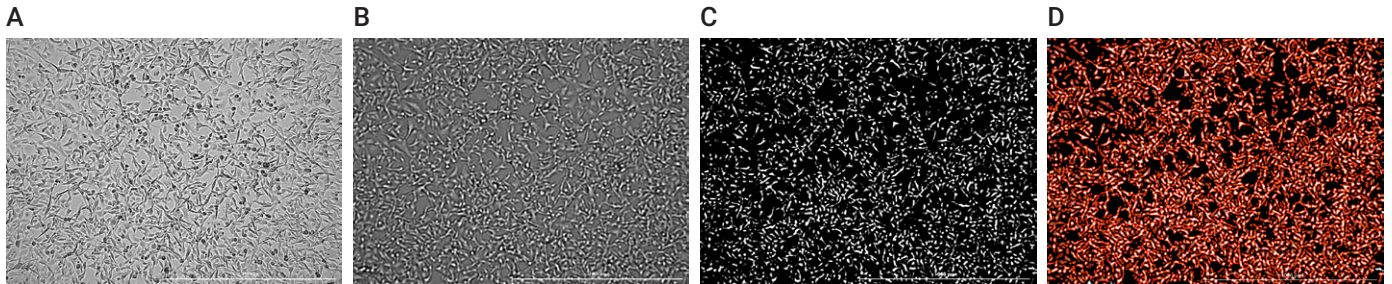


그림 26. 고대비 명시야 이미지 캡처, 전처리 및 분석. (A) 총 HT-1080 세포의 4x 초점 이미지. (B) 총 HT-1080 세포의 4x 초점이 맞지 않는 이미지. (C) 초점이 맞지 않는 이미지의 전처리. (D) 전처리된 이미지의 세포 분석. 이미지 내의 전체 세포 주위에 개체 마스크(빨간색)가 배치됩니다.

총 키네틱 세포 계수

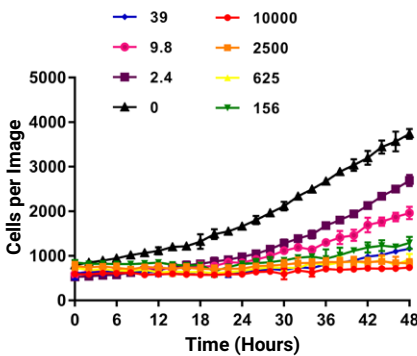


그림 27. 키네틱적 HT-1080 총 세포 용량 반응 곡선. 이미지당 평균 세포 수는 각 시점에서 각 화합물 처리의 3회 반복 웰로부터 계산되었습니다. Camptothecin 농도는 다음과 같습니다: 10,000nM, 2,500nM, 625nM, 156nM, 39nM, 9.8nM, 2.4nM, 0nM.

키네틱 전체 세포 분석 결과(그림 27)는 camptothecin 농도의 증가가 HT-1080 세포 증식에 미치는 효과를 확인시켜 주었습니다. 정확한 세포 수는 또한 고대비 명시야를 사용한 1차 세포 분석이 긍정적으로 영향을 받은 세포 수를 정규화하여 사용 방법을 보여줍니다.

미토콘드리아 막 전위

TMRE 세포 투과 염료를 0의 시간에 첨가하여 미토콘드리아 막 전위를 모니터링했습니다. 염료가 양전하를 띠기 때문에 음전하를 띤 미토콘드리아에 쉽게 축적되는 반면, 탈분극된 미토콘드리아는 막 전위를 감소시키고 염료를 격리하지 않습니다. Cytation 5 RFP 이미징 채널은 TMRE 프로브의 신호를 캡처하는 데 사용되었습니다. 시간 0의 세포(그림 28A)는 활성 미토콘드리아를 함유하여 넓은 영역의 세포질 프로브 신호를 유도했습니다. 미토콘드리아 막 온전성의 상실은 프로브 발현의 감소 및 세포질 신호의 영역 축소로 이어집니다(그림 28B). 활성 미토콘드리아 세포 2차 세포 분석(표 7)은 TMRE 프로브 RFP 신호 주위에 개체 마스크를 배치했습니다(그림 28C 및 28D). 최소 개체 영역 기준(표 8)을 설정함으로써 시간 경과에 따른 이미지당 활성 미토콘드리아 세포의 수가 결정되었습니다(그림 28E). 이어서, 이 숫자를 이전에 결정된 총 세포 수로 나누어 키네틱적 활성 미토콘드리아 세포 비율을 계산함으로써 정규화했습니다(그림 28F).

그림 28E 및 28F에 플롯된 곡선은 camptothecin이 미토콘드리아 막 온전성에 부정적인 영향을 미쳐 세포 사멸을 유도한다는 알려진 현상을 입증했습니다.²⁴ 또한, 이러한 결과는 BioSpa와 Gen5가 TMRE 라이브셀 미토콘드리아 막 전위 프로브를 사용하여 정확한 결과를 제공할 수 있음을 확인시켜줍니다.

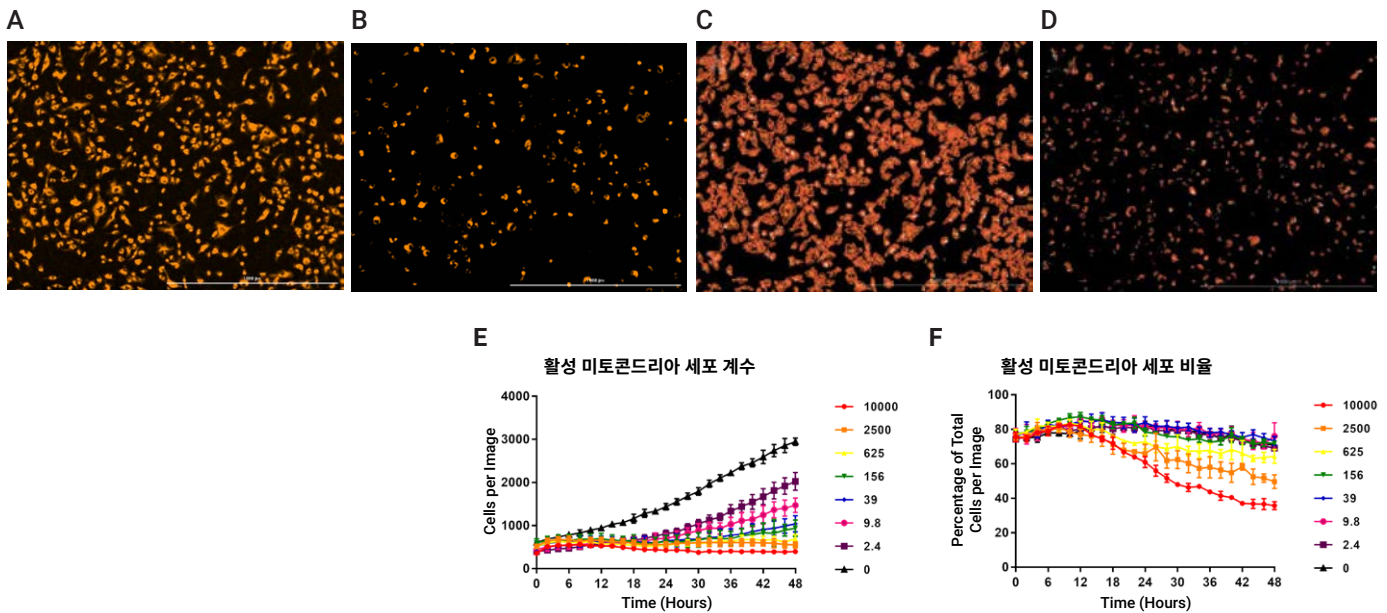


그림 28. 활성 미토콘드리아 이미징 및 분석. 2,500nM camptothecin을 사용하여 (A) 0시간; (B) 48시간의 배양 후 4x 대물렌즈 및 RFP 이미징 채널로 캡처한 이미지. (C) 0시간 및 (D) 48시간 동안 2,500nM camptothecin으로 처리된 세포의 활성 미토콘드리아 신호 주위에 2차 마스크를 배치하기 위해 세포 분석을 수행했습니다. 흰색: 전처리된 고대비 명시아 세포 영역. 주황색: TMRE 세포질 신호. 빨간색: 개체 마스크. 그런 다음 (E) 총 활성 미토콘드리아 세포 및 (F) 이미지당 미토콘드리아 세포 비율에 대해 키네틱 곡선을 플롯했습니다.

세포 사멸 외부 phosphatidylserine 노출

Phosphatidylserine(PS)은 건강한 세포막의 세포질 표면에 존재하는 인지질이며, 세포 사멸의 초기 단계에서 외막으로 이동합니다. pSIVA(Polarity sensitive indicator of viability and apoptosis)인 가역 결합 프로브는 외부에 노출된 PS에 결합하여 강렬한 녹색 신호를 생성하고 PS가 내부화될 때 방출됩니다. GFP 이미징 채널은 pSIVA 형광 신호가 세포와 함께 camptothecin 배양 시 증가함에 따라 이를 검출하는데 사용되었습니다(그림 28A 및 28B). 세포 사멸 세포 이차 세포 분석(표 7)은 세포질 pSIVA 프로브 GFP 신호 주위에 개체 마스크를 배치했습니다(그림 28C 및 28D).

세포 사멸 유도 시 pSIVA 프로브로부터의 신호는 면적과 무관하므로, 최소 개체 평균 기준(표 8)은 시간 경과에 따른 사멸 세포를 식별했으며(그림 29E) 이는 총 세포 수에 대해 다시 정규화되었습니다(그림 29F). 이들 그래프는 이미징 및 분석을 통해 다중화된 환경에서 camptothecin 유도된 pSIVA 사멸 신호를 검출하고 정량화할 수 있음을 확인시켜 주었습니다.

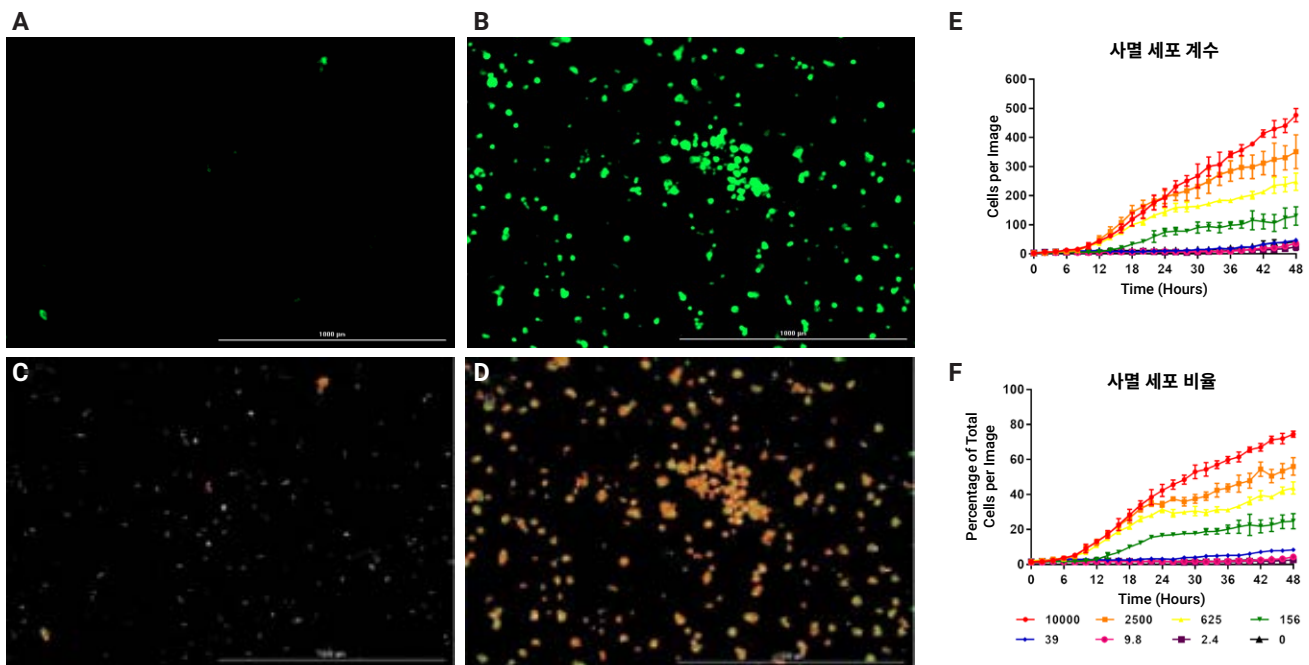


그림 29. 세포 사멸 이미징 및 분석. 2,500nM camptothecin을 사용하여 (A) 0시간; (B) 48시간의 배양 후 4x 대물렌즈 및 GFP 이미징 채널로 캡처한 이미지. (C) 0시간 및 (D) 48시간 동안 2,500nM camptothecin으로 처리된 세포의 pSIVA 신호 주위에 2차 마스크를 배치하기 위해 세포 분석을 수행했습니다. 흰색: 전처리된 고대비 명시아 세포 영역; 녹색: pSIVA 세포질 신호; 빨간색: 개체 마스크. 그런 다음 (E) 총 사멸 세포 및 (F) 이미지당 사멸 세포 비율에 대해 키네틱 곡선을 플롯했습니다.

괴사 세포의 막 온전성 손실

근적외선 세포 비침투성 염료인 Deep Red Anthraquinone 7(DRAQ7)은 괴사의 징후인 세포 막 온전성 손실 시 세포핵에 결합하여 CY5 이미징 채널을 사용하여 캡처된 빨간색 형광 신호를 생성합니다. pSIVA와 유사하게, DRAQ7 형광 신호는 세포와 camptothecin 배양 시 증가했습니다(그림 29A 및 29B). 괴사 세포 2차 세포 분석(표 7)은 핵 프로브

CY5 신호 주위에 개체 마스크를 배치했습니다. 최소 개체 평균 기준(표 8)은 시간이 지남에 따라 괴사 세포를 다시 식별하고 총 세포 수로 정규화되었습니다(그림 30C). 이 그래프는 이미징 및 분석으로 다중화 설정에서 단일 웰로부터 TMRE, pSIVA 및 DRAQ7 신호의 camptothecin 유발 변화를 감지하고 정량화할 수 있음을 입증했습니다.

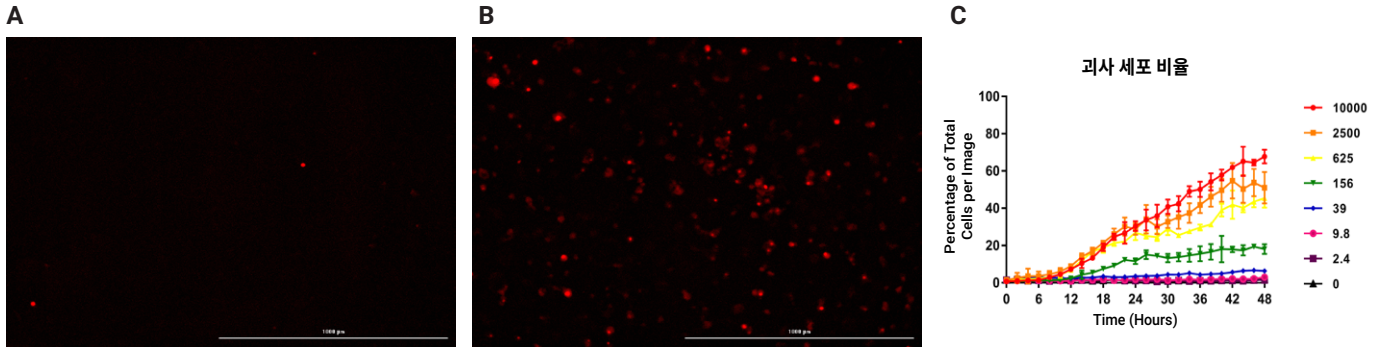


그림 30. 세포 괴사 이미징 및 분석. 2,500nM camptothecin을 사용하여 (A) 0시간; (B) 48시간의 배양 후 4x 대물렌즈 및 CY5 이미징 채널로 캡처한 이미지. (C) 1차 및 2차 세포 분석 후 이미지당 괴사 세포 비율.

가변 배양 분석 비교

BioSpa의 장점은 특정 시점뿐만 아니라 연장된 배양 기간 동안 키네틱적으로 일정한 간격으로 camptothecin 처리 효과를 모니터링할 수 있다는 것입니다. 그림 31에 따르면, 0시간, 12시간, 24시간 및 48시간 camptothecin 처리 후 결정된 괴사 세포 비율로부터 플롯된 용량 반응 곡선에서 생성된 계산된 EC_{50} 값은 단기 배양이 테스트 분자의 실제 효능에 대한 잘못된 가정으로 이어질 수 있음을 보여줍니다. 키네틱 분석을 도입하면 정확한 결론을 내릴 수 있습니다.

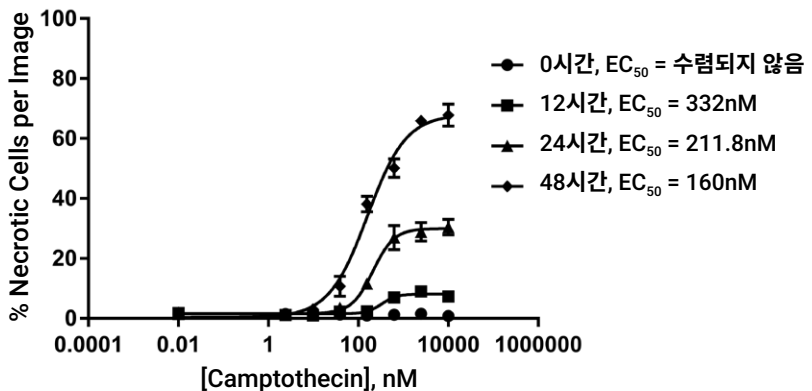


그림 31. 이미지 용량 반응 곡선당 camptothecin 괴사 세포 비율. 0, 12, 24, 48시간 동안 camptothecin 배양 후 이미지 곡선당 유도된 괴사 세포 비율.

Cytation 5의 다중 형광 이미징 검출 채널을 사용하면 라이브셀 TMRE, pSIVA 및 DRAQ7 프로브를 동일한 웰 내에서 다중화할 수 있어 다중 세포 사멸 경로를 측정하는 간단하고 강력한 분석법을 제공합니다. BioSpa가 제공하는 적절한 환경 조건을

사용하면 연장된 배양 기간 동안 자동으로 이미지를 캡처할 수 있으므로 각 테스트 분자의 효과에 대한 보다 완전한 그림을 얻을 수 있습니다. 마지막으로, 세포 분석 기술을 Gen5 소프트웨어와 통합하면 정규화된 키네틱 유도 곡선과 시간 경과에 따른 여러 테스트 농도의 반응을 확인하여 정확한 결론을 추론할 수 있습니다.

세포 증식, 생존력, 세포 사멸 및 괴사 측정을 위한 표지 분석에 Agilent BioTek 현미경을 사용한 최근 발행물

1. K. Baergen, L. M. Jeusset, Z. Lichtensztein, and K. J. McManus, "Diminished Condensin Gene Expression Drives Chromosome Instability That May Contribute to Colorectal Cancer Pathogenesis," *Cancers*, vol. 11, no. 8, p. 1066, Jul. **2019**, doi: 10.3390/cancers11081066.
2. C. Lepage, L. L. Thompson, B. Larson, and K. J. McManus, "An Automated, Single Cell Quantitative Imaging Microscopy Approach to Assess Micronucleus Formation, Genotoxicity and Chromosome Instability," *Cells*, vol. 9, no. 2, p. 344, Feb. **2020**, doi: 10.3390/cells9020344.
3. E. N. McAndrew, C. C. Lepage, and K. J. McManus, "The synthetic lethal killing of RAD54B-deficient colorectal cancer cells by PARP1 inhibition is enhanced with SOD1 inhibition," *Oncotarget*, vol. 7, no. 52, Dec. **2016**, doi: 10.18632/oncotarget.13654.
4. H. I. Muendlein et al., "cFLIP L protects macrophages from LPS-induced pyroptosis via inhibition of complex II formation," *Science*, vol. 367, no. 6484, pp. 1379–1384, Mar. **2020**, doi: 10.1126/science.aay3878.
5. H. I. Muendlein et al., "Constitutive Interferon Attenuates RIPK1/3-Mediated Cytokine Translation," *Cell Rep.*, vol. 30, no. 3, pp. 699-713.e4, Jan. **2020**, doi: 10.1016/j.celrep.2019.12.073.
6. V. Sajesh and K. J. McManus, "Targeting SOD1 induces synthetic lethal killing in BLM- and CHEK2-deficient colorectal cancer cells," *Oncotarget*, vol. 6, no. 29, Sep. **2015**, doi: 10.18632/oncotarget.4875.
7. J. Sarhan et al., "Caspase-8 induces cleavage of gasdermin D to elicit pyroptosis during Yersinia infection," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 115, no. 46, pp. E10888–E10897, Nov. **2018**, doi: 10.1073/pnas.1809548115.
8. Singh et al., "The BH3 only Bcl-2 family member BNIP3 regulates cellular proliferation," *PLOS ONE*, vol. 13, no. 10, p. e0204792, Oct. **2018**, doi: 10.1371/journal.pone.0204792.

명시야 현미경으로 *Saccharomyces cerevisiae* 성장 실시간 모니터링

어세이 원리

효모는 출아 또는 분열을 통해 무성생식하는 단세포 진핵생물입니다(그림 32). 효모의 크기는 다양할 수 있지만 일반적으로 직경은 3-8 μ m입니다. *Saccharomyces cerevisiae*는 과학 연구, 베이킹 및 발효에 가장 일반적으로 사용되는 균주이며 효모라는 용어와 동의어가 되었습니다.

고정된 환경에서 배양할 때 효모 세포는 (1) 유도; (2) 대수성장; (3) 감속; (4) 정지의 4단계로 쉽게 나눌 수 있는 매우 예측 가능한 성장 패턴을 따릅니다. 유도기에서는 새로 도입된 효모가 성숙하고 환경에 적응하기 때문에 성장이 일어나지 않습니다. 그 다음에는 세포가 빠르게 성장하고 분열하는 대수성장기가 이어집니다. 세포 수에 비해 영양분은 과잉이고, 노폐물은 미미할 정도로 충분히 희석됩니다. 이 단계의 성장률은 1차 키네틱을 따릅니다. 세포 수가 증가함에 따라 각각 포화 효과가 있는 여러 파라미터(예: 기질 및 폐기물)가 중요해짐에 따라 세포 성장이 느려지기 시작합니다. 결국 효모 세포는 높은 폐기물 농도 또는 완전한 기질 소비로 인해 성장이 일어나지 않는 정지기에 도달합니다(그림 33).

하지만 이러한 다양한 단계는 성장 데이터의 해석을 어렵게 만듭니다. 정적 환경에서의 성장률은 효모 세포의 성장 능력뿐만 아니라 영양분 고갈이나 폐기물 부산물의 축적과 같은 환경 조건의 함수이기도 합니다. 관류 시스템을 사용하면 적절한 성장 영양분을 유지할 수 있을 뿐만 아니라 생성되는 폐기물을 제거할 수 있으며 성장은 물리적 공간에 의해서만 제한됩니다.

효모 성장 실험은 광산란 수직 측광법을 사용하여 마이크로플레이트에서 수행되는 경우가 많으며, 이를 통해 다양한 실험 조건을 빠르게 테스트할 수 있습니다. 세포 수를 간접적으로 측정하는 이 형식은 효모 세포 부유물이 응집되어 더 이상 부유 상태를 유지할 수 없어 웰 바닥에 불투명한 덩어리가 형성될 때 어려움을 겪을 수 있습니다. 이 현상으로 인해 흡광도 수준이 비정상적으로 높아져 분석이 불가능하지는 않더라도 어려워집니다. 이 기술은 실제 흡광도가 아닌 광산란을 사용하기 때문에 다양한 광학 장치(예: 다양한 형태의 리더)를 사용하여 측정하면 값이 달라집니다. 마찬가지로, 크기가 다른 다양한 효모 균주를 비교하는 분석법은 세포 크기가 광산란에 상당한 영향을 미치기 때문에 종종 문제가 될 수 있습니다.

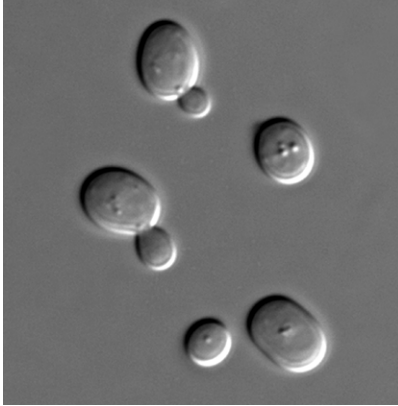


그림 32. *Saccharomyces cerevisiae*.

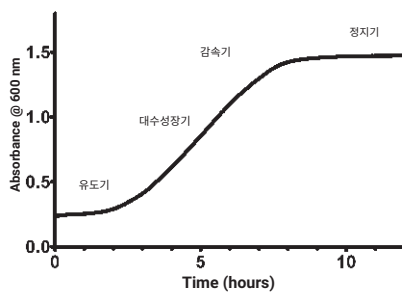


그림 33. 전형적인 효모 성장 곡선. *Saccharomyces cerevisiae* 부유물을 30°C에서 12시간 동안 YPD 배지에서 성장시키고 Agilent BioTek Synergy H1 멀티모드 리더를 사용하여 2분마다 데이터를 측정했습니다.

기존의 ONYX 플레이트

ONIX Y04C-02 미세유체 플레이트는 반수체 효모 세포를 이용한 관류 연구를 위해 ONIX2 미세유체 시스템과 함께 사용하도록 설계된 4챔버 세포 배양 플레이트입니다. Y04C 플레이트에는 4개의 독립 단위(A-D)가 있으며, 각각에는 6개의 주입구 웰(1-6), 세포 주입구(8) 및 큰 배출구 웰(7)이 있습니다. 웰의 각 행(A-D)은 해당 배양 챔버를 지정합니다(그림 34).

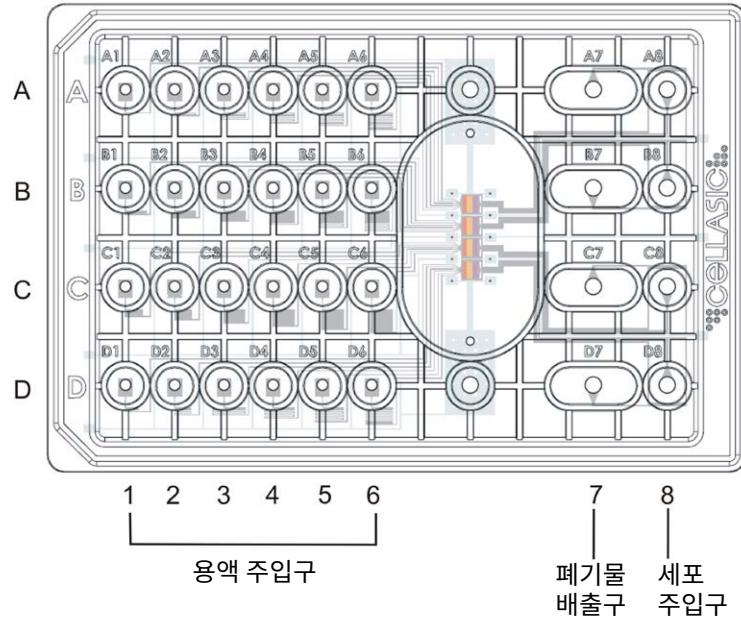


그림 34. ONIX CellASIC 플레이트 구성.

4개의 배양 챔버는 모두 단일 관측 창에 위치하여 이미징 대물렌즈 X-Y 이동을 최소화합니다. 각각에는 시약과 성장 배지를 제공하기 위한 6개의 별도 미세유체 주입구가 있습니다(그림 35).

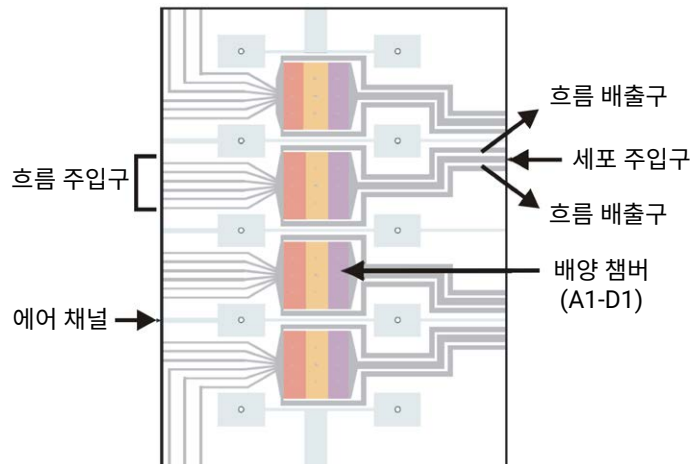


그림 35. CellASIC 챔버 관측 창. CellASIC에는 완전히 분리된 4개의 관측 셀이 있으며, 각 셀에는 관류액을 위한 6개의 서로 다른 주입구 소스가 있습니다. 관측 챔버 C1을 나타내었습니다.

각 챔버는 3.0mm x 3.0mm 면적이며 유리 상부 천장 사이의 높이가 서로 다릅니다 (3.5, 4.0, 4.5 μ m). 트랩 높이는 세포 주입구 소스에서 챔버를 가로질러 이동함에 따라 거리가 감소합니다(그림 36).

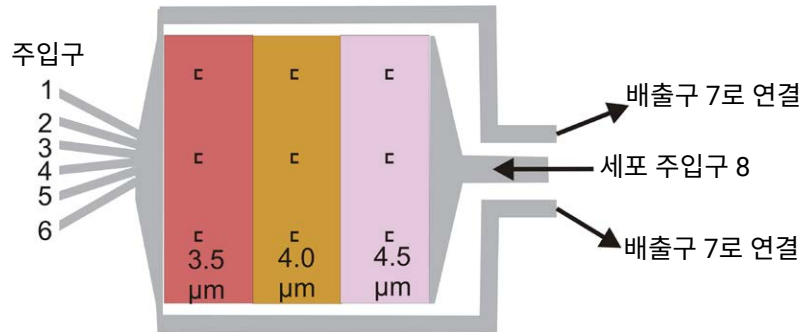


그림 36. 배양 챔버. 배양 챔버에는 세 가지 다른 트랩 높이와 함께 9개의 위치 마커 "c"가 있습니다.

각 관측 챔버는 단일 초점면을 유지하기 위해 이미징 유리 표면에 세포를 고정하는 탄성 천장을 사용합니다. 세포가 관측 챔버에 걸리는 압력에 의해 이동하면서 결국 탄성 천장과 유리 이미징 표면 사이에 갇혀 안정됩니다(그림 37).

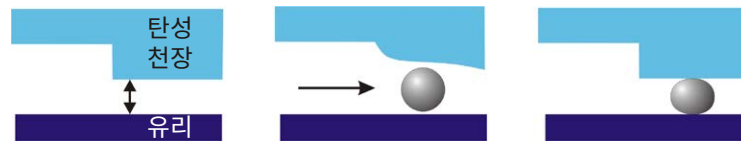


그림 37. 세포 트래핑 메커니즘.

재료 및 분석법

BactoYeast 추출물, 포도당, BactoPeptone, 염화나트륨, 일염기성 및 이염기성 인산염 분말, 에탄올은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO)에서 구입했습니다. 효모 균주 By4742는 ATCC(부품 번호 4012458)에서 구입했습니다. YPD(Yeast Extract-Peptone-Dextrose) 배지는 BactoYeast 추출물 10g, BactoPeptone 20g 및 Dextrose 20g을 물 1리터에 용해하고 고압멸균하여 준비했습니다. 필요한 경우 Milli Q 물 또는 표시된 시약을 사용하여 YPD를 희석했습니다.

모든 실험은 동일한 일반적인 형식을 따랐습니다. YPD 배지(50mL)를 사용한 효모 배양 스톱 배양물을 30°C의 250mL 삼각 플라스크에서 125RPM의 궤도 진탕으로 성장시켰습니다. 성장 실험에 앞서, 각 배양 스톱 배양액 100 μ L를 신선한 1x YPD 배지 9.9mL로 희석했습니다. 그런 다음 희석된 세포(50 μ L)를 세포 주입구 웰(위치 8)을 사용하여 CellASIC Y04C-02 플레이트에 로드했습니다. 실험에 필요한 대로 시약을 용액 주입구(위치 1-6)에 로드했습니다. 관류 타이밍과 속도는 ONIX2 Microfluidic 시스템(Millipore-Sigma)을 사용하여 제어했습니다. 관류 압력은 10kPa로 설정되었으며, 명시되지 않는 한 로드 직후 관류가 시작되었습니다.

이미징

몽타주 명시아 이미지(2x2)는 20x 대물렌즈가 장착된 Agilent BioTek Lionheart FX 자동화 현미경을 사용하여 12시간 동안 5분마다 키네틱적으로 생성했습니다. 카메라 노출 설정은 각 실험 시작 시 수동으로 최적화되었으며 레이저 자동 초점을 사용하여 이미지 초점이 유지되었습니다. 온도 조절이 활성화되었으며 달리 명시되지 않는 한 30°C였습니다.

분석

몽타주 명시아 이미지는 선형 혼합 융합 분석법을 사용하여 스티칭했습니다. 효모 세포를 식별하기 위해 스티칭한 명시아 이미지의 개체 마스크 계수로 세포 성장을 평가했습니다. 백그라운드 선택은 "Light"로 설정되었으며 백그라운드 평탄화를 위한 롤링 볼 직경은 3 μ m였습니다. 마스크 임계값은 4,500으로 설정되었으며, 1 μ m보다 작거나 10 μ m보다 큰 개체는 제외됩니다.

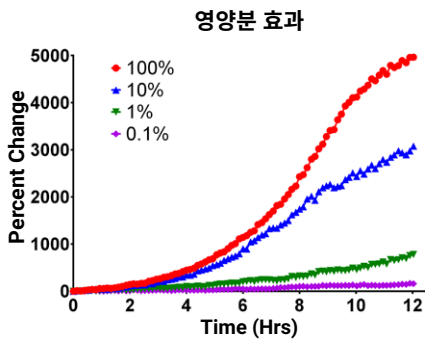


그림 38. 효모 세포 성장에 미치는 영양분 농도의 영향.

결과 및 토의

배지 농도

세포 성장에 미치는 영양분 농도의 영향을 YPD 배지의 희석을 통해 조사했습니다. 희석되지 않은 YPD(100%)를 물로 일련의 1:10 비율로 희석하고 관측 챔버에 관류했습니다. 그림 38에서 볼 수 있듯이 성장 영양분의 희석은 세포 성장 속도에 현저한 영향을 미칩니다. 배지의 영양분이 물로 희석됨에 따라 세포 증식이 급격히 감소합니다. 1,000배 희석된 YPD를 사용한 관류는 12시간 동안 사실상 성장이 없는 반면, 완전 배지는 같은 기간 동안 세포 수가 5,000% 증가했습니다.

염분 민감성

성장 배지의 이온 강도는 효모 세포가 탈이온수 또는 증류수로 희석된 제제화된 영양분으로 구성되지 않은 혼합물에서 증식될 때 문제가 됩니다. 예를 들어, 오염된 물의 정화 또는 셀룰로오스 분해물의 발효는 다양할 수 있으며 다량의 이온을 포함할 수 있습니다.

효모 세포는 높은 염화나트륨 농도에서 성장 시 상당한 내성을 나타냅니다(그림 39). 로드된 세포에 YPD 함유 외인성 NaCl을 관류시켜 효모 세포 성장에 미치는 이온 강도의 효과를 평가했습니다. 최종 염화나트륨 농도가 0-1M 범위가 되도록 4가지 NaCl 희석액을 추가했습니다. YPD의 농도는 모든 챔버에서 동일했습니다(90%). 고염 농도(1M)는 세포 증식을 효과적으로 막는 반면, 0.5M 염화나트륨을 관류한 효모는 처리되지 않은 효모 배양액 농도의 거의 80%까지 성장할 수 있었습니다. 낮은 염분 조건에서 처리되지 않은 세포와 동일하거나 약간 더 나은 세포 성장이 가능했습니다.

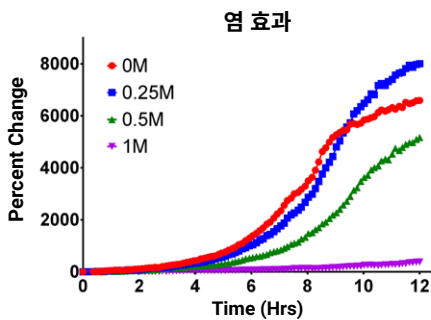


그림 39. 이온 강도가 효모 세포 성장에 미치는 영향. 효모 세포는 다양한 농도의 염화나트륨을 함유한 YPD 배지로 관류되었고 세포는 명시아로 이미지화되었습니다. 이미지 분석 세포 수는 시간의 함수로 표시되었습니다. 각 데이터 포인트는 단일 관측 챔버의 시점을 나타냅니다.

pH 감도

효모 세포 성장에 미치는 pH의 영향을 시험하기 위해, *Saccharomyces cerevisiae* 배양물을 pH 4.5-9.5 범위에서 20mM 인산염이 보충된 YPD로 관류시켰습니다. 모든 배양에서 YPD는 혼합물의 80%를 차지하고 인산염 완충액은 나머지 20%를 차지합니다.

효모는 알칼리에 비해 산성 조건에서 훨씬 더 잘 성장하는 경향이 있습니다. 이는 pH 4.5 YPD 혼합물로 관류된 세포가 pH 7.5 배지 농도의 거의 두 배까지 성장하는 그림 40에서 입증됩니다. 알칼리 혼합물(pH 9.5)은 산성 배양보다 상당히 느린 성장을 보였지만 여전히 복제가 가능했습니다.

에탄올 내성

효모는 설탕 발효의 부산물로 에탄올과 이산화탄소를 생성합니다. 폐기 부산물의 농도가 중요해짐에 따라 그 존재는 세포 성장에 해를 끼칠 수 있습니다. 에탄올의 영향을 조사한 결과, 높은 수준의 에탄올이 By4742 균주의 효모 성장을 억제한다는 것이 분명해졌습니다. 이 세포들은 1% 이하의 에탄올 수준에 상당히 내성이 있습니다. 이러한 수준 이상에서는 효모 균주의 성장이 현저하게 감소하는 것이 관측됩니다(그림 41).

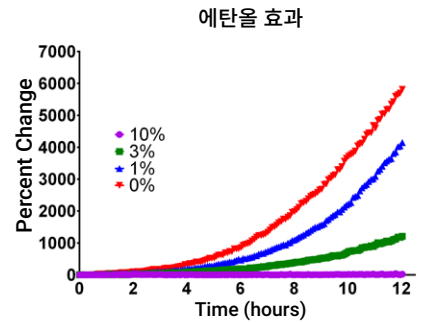
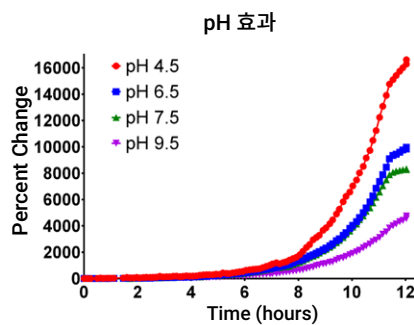


그림 40. 효모 세포 성장에 미치는 pH의 영향. 효모 세포를 CellASIC 플레이트에 로드하고 다양한 pH 수준의 인산염 완충액을 함유한 YPD(80%)를 관류했습니다. 데이터는 초기 판독값에서 세포 수의 변화율을 나타냅니다. 각 데이터 포인트는 단일 관측 챔버의 고유한 시점을 나타냅니다.

그림 41. 효모 세포 성장에 미치는 에탄올의 영향. 효모 세포를 CellASIC 플레이트에 로드하고 다양한 pH 수준의 인산염 완충액을 함유한 YPD(90%)를 다양한 농도의 에탄올. 데이터는 초기 판독값에서 세포 수의 변화율을 나타냅니다. 각 데이터 포인트는 단일 관측 챔버의 시점을 나타냅니다.

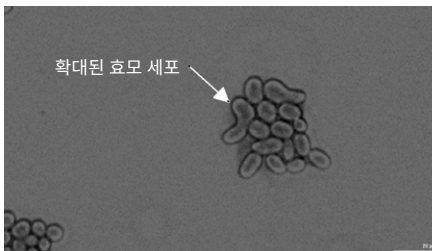


그림 42. 세포 주기의 명시야 이미지에 *Saccharomyces cerevisiae* 세포가 포착되었습니다. 30μM nocodazole로 3시간 동안 처리된 효모 세포를 60x 에어 대물렌즈를 사용하여 명시야에서 이미징했습니다.

Nocodazole 노출

Nocodazole은 미세소관의 중합을 방해하여 효과를 발휘하는 강력한 항종양제입니다.²⁵ 출아 효모에서는 세포 주기의 G2/M 단계에서 세포를 정지시켜 모세포에서 분리되지 않는 큰 아체를 생성합니다(그림 42).

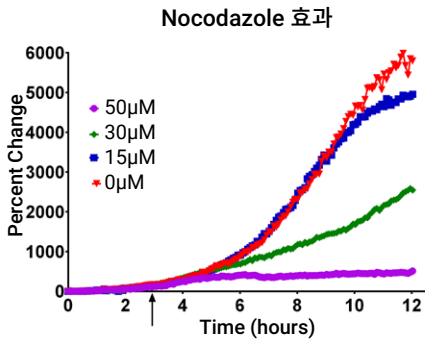


그림 43. Nocodazole을 관류한 효모 세포의 키네틱적 성장 곡선. 효모를 CellASIC 플레이트에 로드하고 즉시 YPD 배지를 관류시켰습니다. 3시간 후, 관류 혼합물을 YPD에 다양한 농도의 nocodazole을 포함하도록 변경했습니다. Nocodazole 관류의 시작은 화살표로 표시됩니다. 데이터 포인트는 단일 관측 챔버의 초기 세포 계수에 대한 변화율을 반영합니다.

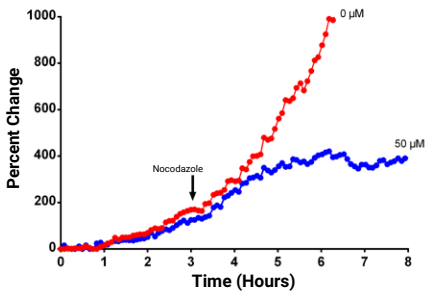


그림 44. 0µM 또는 50µM nocodazole을 관류한 *Saccharomyces cerevisiae*의 세포 수 비교. 효모 세포를 CellASIC 플레이트에 로드하고 YPD 배지 관류로 성장시켰습니다. 3시간 후 관류 혼합물을 0µM 또는 50µM nocodazole을 함유하는 YPD로 변경했습니다. 데이터는 개별 세포의 키네틱 세포 수를 반영합니다.

G2/M에 정지된 출아 딸 효모 세포는 종종 모세포에서 분리되지 않고 일반적으로 확대된 표현형을 나타냅니다. 이러한 현상은 세포 증식의 감소로 관측될 수 있습니다. 그림 12에서 볼 수 있듯이 nocodazole에 의한 세포 주기 차단은 농도에 따라 달라집니다. 50µM nocodazole에 노출된 세포는 노출 직후 사실상 증식을 멈춥니다. 더 낮은 농도에서는 세포 증식의 감소가 관측됩니다(그림 43).

관류의 효과는 그림 44에 나와 있습니다. CellASIC 플레이트에 분주되고 YPD 배지로 관류된 효모 세포는 세포 발아를 통해 수가 증가합니다. 50µM nocodazole로 관류를 시작한 직후, 배양은 분열을 멈추고 세포 수는 더 이상 증가하지 않습니다. 배양은 동시에 분주되지만 계속해서 아체가 생기고 세포 수가 급격히 증가합니다.

이러한 데이터는 ONIX2 미세유체 플랫폼과 함께 Lionheart FX로 세포를 계수하여 효모 성장을 정량화할 수 있음을 보여줍니다. 반복적인 이미징을 위해 CellASIC Y04C 플레이트가 다양한 크기의 트랩을 사용하여 모세포를 고정합니다. 명시야 이미징과 디지털 이미지 분석을 통해 실시간으로 세포 정량을 수행할 수 있습니다.

배양물의 관류는 신선한 영양분을 추가할 뿐만 아니라 폐기물을 제거하는 수단을 제공합니다. 한 가지 예로, 발효에 의한 에탄올 생산을 들 수 있습니다. 이 폐기물은 영양분의 유무에 관계없이 성장을 효과적으로 제거하는 수준까지 축적될 수 있습니다. 연속 흐름 시스템에 의한 이 부산물의 제거는 부산물 축적으로 인한 정지상을 방지할 수 있다고 생각됩니다. 균주 개발의 맥락에서 이는 에탄올 저항성을 개발할 필요성을 없애줍니다.

일반적으로, 관류를 사용하면 감소되지 않는 성장이 가능하여 영양분이 추가되지 않고 폐기물이 지속적으로 제거되지 않는 정적 실험에서 관찰되는 정지상이 거의 완전히 제거됩니다. 관측 영역 챔버가 완전히 채워지면 세포 성장으로 인해 세포가 이미징 영역 밖으로 밀려나면서 세포 수에 변화가 없어지기 시작합니다. 더 큰 몽타주를 사용하는 이미징을 통해 실험 창을 연장할 수 있습니다.

이러한 데이터는 ONIX2 미세유체 플랫폼과 함께 Lionheart FX를 사용하여 효모 세포 성장의 환경적 변화와 약물 유발 변화를 모두 모니터링할 수 있음을 보여줍니다. 데이터는 광산란을 기반으로 한 간접 측정이 아닌 실제 세포 수입니다. 이러한 실험에서는 효모 균주의 능력을 분석하기 위해 긴 키네틱 실험을 사용했습니다. 주의해야 할 중요한 점은 현저하게 다른 성장률에도 불구하고 일부 다른 배양 조건에서 최종 세포 밀도가 동일했다는 것입니다. 이는 장기간 배양이 끝난 후 엔드포인트 결정이 누락되었을 수 있다는 사실을 나타냅니다. 실시간으로 효모 세포를 자동 계산하는 Gen5의 기능으로 데이터 분석이 간소화되었습니다.

비포유동물 세포의 증식을 측정하기 위해 Agilent BioTek 현미경을 사용한 최근 발행물

1. C. Garcia, A. Burgain, J. Chaillot, É. Pic, I. Khemiri, and A. Sellam, "A phenotypic small-molecule screen identifies halogenated salicylanilides as inhibitors of fungal morphogenesis, biofilm formation and host cell invasion," *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, p. 11559, Dec. **2018**, doi: 10.1038/s41598-018-29973-8.
2. D. A. Hanna, R. Hu, H. Kim, O. Martinez-Guzman, M. P. Torres, and A. R. Reddi, "Heme bioavailability and signaling in response to stress in yeast cells," *J. Biol. Chem.*, vol. 293, no. 32, pp. 12378–12393, Aug. **2018**, doi: 10.1074/jbc.RA118.002125.

참고 문헌

1. L. A. Harris et al., "An unbiased metric of antiproliferative drug effect *in vitro*," *Nat. Methods*, vol. 13, no. 6, pp. 497–500, Jun. **2016**, doi: 10.1038/nmeth.3852.
2. M. Niepel, M. Hafner, M. Chung, and P. K. Sorger, "Measuring Cancer Drug Sensitivity and Resistance in Cultured Cells: Cancer Drug Sensitivity and Resistance in Cells," *Curr. Protoc. Chem. Biol.*, vol. 9, no. 2, pp. 55–74, Jan. **2017**, doi: 10.1002/cpch.21.
3. A. Adan, Y. Kiraz, and Y. Baran, "Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays," *Curr. Pharm. Biotechnol.*, vol. 17, no. 14, pp. 1213–1221, Nov. **2016**, doi: 10.2174/1389201017666160808160513.
4. K. Präbst, H. Engelhardt, S. Ringgeler, and H. Hübner, "Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin, in Cell Viability Assays: Methods and Protocols", *D. F. Gilbert and O. Friedrich, Eds. New York, NY: Springer New York, pp. 1–17, 2017.*
5. W. Strober, "Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability," *Curr. Protoc. Immunol.*, vol. 21, no. 1, p. A.3B.1-A.3B.2, **1997**, doi: 10.1002/0471142735.ima03bs21.
6. D. I. Pattison and M. J. Davies, "Actions of ultraviolet light on cellular structures," *in Cancer: Cell Structures, Carcinogens and Genomic Instability, Basel: Birkhäuser, pp. 131–157, 2006.*
7. L. L. Drey, M. C. Graber, and J. Bieschke, "Counting unstained, confluent cells by modified bright-field microscopy," *BioTechniques*, vol. 55, no. 1, pp. 28–33, Jul. **2013**, doi: 10.2144/000114056.
8. P. Held and P. Banks, "High Contrast Brightfield: Enabling microplate-based automated label-free cell counting," *BioTek Resources*, **2016**.
9. J. Clayton and P. Banks, "A Guide to Label-free Cell Counting using High Contrast Brightfield," *BioTek Resources*, **2016**.
10. O. Tacar, P. Sriamornsak, and C. R. Dass, "Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems: Doxorubicin cell and molecular biological activity," *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 65, no. 2, pp. 157–170, Feb. **2013**, doi: 10.1111/j.2042-7158.2012.01567.x.
11. F. A. Fornari, J. K. Randolph, J. C. Yalowich, M. K. Ritke, and D. A. Gewirtz, "Interference by doxorubicin with DNA unwinding in MCF-7 breast tumor cells," *Mol. Pharmacol.*, vol. 45, no. 4, pp. 649–656, Apr. **1994**.

12. B. W. Konicek et al., "Therapeutic Inhibition of MAP Kinase Interacting Kinase Blocks Eukaryotic Initiation Factor 4E Phosphorylation and Suppresses Outgrowth of Experimental Lung Metastases," *Cancer Res.*, vol. 71, no. 5, pp. 1849–1857, Mar. **2011**, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3298.
13. J. K. Altman et al., "Inhibition of Mnk kinase activity by cercosporamide and suppressive effects on acute myeloid leukemia precursors," *Blood*, vol. 121, no. 18, pp. 3675–3681, May **2013**, doi: 10.1182/blood-2013-01-477216.
14. J. Clayton, "Kinetic Proliferation Assay Using Label-Free Cell Counting," *BioTek Instrum. Appl. Note*, **2017**, [Online]. Available: <https://www.biotek.com/resources/application-notes/kinetic-proliferation-assay-using-label-free-cellcounting/>.
15. R. Rhoades and D. R. Bell, *Medical physiology: principles for clinical medicine*. **2013**.
16. Y. Berthois, J. A. Katzenellenbogen, and B. S. Katzenellenbogen, "Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture.," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 83, no. 8, pp. 2496–2500, Apr. **1986**, doi: 10.1073/pnas.83.8.2496.
17. P. Held, "Using Phenol Red to assess pH in Tissue Culture Media," *BioTek Instrum. Appl. Note*, [Online]. Available: <https://www.biotek.com/resources/application-notes/using-phenol-red-to-assess-ph-in-tissue-culture-media/>.
18. D. Hanahan and R. A. Weinberg, "Hallmarks of Cancer: The Next Generation," *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646–674, Mar. **2011**, doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
19. L. Galluzzi et al., "Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018," *Cell Death Differ.*, vol. 25, no. 3, pp. 486–541, Mar. **2018**, doi: 10.1038/s41418-017-0012-4.
20. K. Segawa and S. Nagata, "An Apoptotic 'Eat Me' Signal: Phosphatidylserine Exposure," *Trends Cell Biol.*, vol. 25, no. 11, pp. 639–650, Nov. **2015**, doi: 10.1016/j.tcb.2015.08.003.
21. Y. E. Kim, J. Chen, J. R. Chan, and R. Langen, "Engineering a polarity-sensitive biosensor for time-lapse imaging of apoptotic processes and degeneration," *Nat. Methods*, vol. 7, no. 1, pp. 67–73, Jan. **2010**, doi: 10.1038/nmeth.1405.
22. M. S. Ricci and W.-X. Zong, "Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways," *The Oncologist*, vol. 11, no. 4, pp. 342–357, Apr. **2006**, doi: 10.1634/theoncologist.11-4-342.
23. S. K. Halonen, "Modulation of Host Programmed Cell Death Pathways by the Intracellular Protozoan Parasite, *Toxoplasma gondii* — Implications for Maintenance of Chronic Infection and Potential Therapeutic Applications," in *Cell Death - Autophagy, Apoptosis and Necrosis*, T. M. Ntuli, Ed. *InTech*, **2015**.
24. C.-W. Zeng et al., "Camptothecin Induces Apoptosis in Cancer Cells via MicroRNA-125b-Mediated Mitochondrial Pathways," *Mol. Pharmacol.*, vol. 81, no. 4, pp. 578–586, Apr. **2012**, doi: 10.1124/mol.111.076794.
25. R. J. Vasquez, B. Howell, A. M. Yvon, P. Wadsworth, and L. Cassimeris, "Nanomolar concentrations of nocodazole alter microtubule dynamic instability *in vivo* and *in vitro*," *Mol. Biol. Cell*, vol. 8, no. 6, pp. 973–985, Jun. **1997**, doi: 10.1091/mbc.8.6.973.

자세한 내용:

www.agilent.com/lifesciences/biotek

Agilent Community에서 기술적 질문에 대한 해답을 얻고 리소스에 액세스하세요:

community.agilent.com

온라인 구매:

www.agilent.com/chem/store

미국 및 캐나다

1-800-227-9770

agilent_inquiries@agilent.com

유럽

info_agilent@agilent.com

아시아 태평양

inquiry_lsca@agilent.com

연구 용도로만 사용하십시오. 진단 용도로는 사용하지할 수 없습니다.
RA44173.6644675926

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2021
2021년 2월 1일, 한국에서 발행
5994-2568KO
AG082120_02

한국애질런트테크놀로지스(주)
대한민국 서울특별시 서초구 강남대로 369,
A+ 에셋타워 9층, 06621
전화: 82-80-004-5090 (고객지원센터)
팩스: 82-2-3452-2451
이메일: korea-inquiry_lsca@agilent.com

