

安捷伦 BioTek 活细胞增殖与活力

应用文集



目录

前言	3
仪器	4
细胞增殖与活力应用	5
使用无标记细胞计数进行动力学增殖分析	5
在长时间增殖分析中监测 pH 值	10
增殖分析中的荧光标记物	14
使用自动化的多参数方法对细胞死亡进行动力学定量分析	24
使用明场显微镜实时监测酿酒酵母生长	32
参考文献	38

前言

从归一化到测量药物对细胞增殖的影响，样品中活细胞的计数是许多生物学实验中的关键步骤^[1,2]。细胞培养的常规过程还包括监测细胞生长和计数，以确保下游实验的细胞接种密度一致。对于以增殖作为有效性关键指标的活细胞分析，最好采用无损或无标记的细胞计数方法。此外，可以使用有损测量，其中最直接的是收集细胞，并使用计数板进行定量分析。其他有损或终点法检测还包括通过检测总蛋白（如 BCA）和细胞代谢（如 MTT，CellTiter-Glo）来表征细胞数量^[3,4]。然而，这种策略需要在每个时间点进行多次重复分析，不利于高通量研究。

针对活细胞的高通量计数问题，多年来已找到许多解决方案。随着高通量显微镜仪器的普及，直接计数细胞是一种更准确的确定细胞数量和密度（多核细胞除外）的方法。使用荧光染料或荧光蛋白（核定位序列或组蛋白标记）标记活细胞和死细胞对于短时间或终点分析非常常见^[5]。此外，标记细胞凋亡或坏死的染料提供了关于细胞失活的更多详细信息。

然而，常见的 DNA 活细胞染料（例如 Hoechst 33342 和 DRAQ5）可能会干扰细胞分裂，破坏增殖动力学。此外，使用 Hoechst 33342 时，紫外激发对细胞具有直接毒性^[6]。另外，使用明场或相差成像直接测量细胞融合度可能会影响总细胞数的计算，因为细胞会根据可用培养空间进行体积调整。高对比度明场是一种通过针孔明场照明增加对比度的技术，可增加细胞体的对比度，尤其是细胞核周围的区域^[7]。使用高对比度明场进行无标记细胞计数时，可直接定量计算出对比度增加的细胞。在无标记细胞计数法中，大多数贴壁细胞和许多非贴壁细胞表现出高对比度明场信号（图 1）。通过对细胞核进行计数，无需使用荧光染料即可更准确地反映细胞的增殖情况。

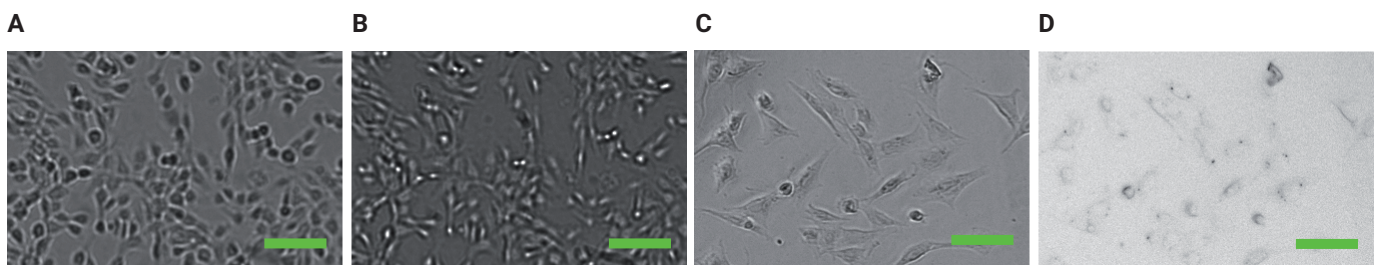


图 1. 在 Agilent BioTek Lionheart FX 全自动智能成像分析系统上使用高对比度明场 (A、B)、相差 (C) 和标准明场 (D) 对 ANIH3T3 细胞进行 4 倍成像。(B) 中的轻微失焦图像显示用于无标记细胞计数的对比度增加。比例尺，100 μm

本应用文集介绍了使用 Agilent BioTek Lionheart FX 全自动智能成像分析系统和 Agilent BioTek Cytation 细胞成像微孔板检测系统进行的有关细胞增殖和活力的几项实验。增殖抑制药物研究背景下无标记细胞计数的示例包括：对作为药物处理响应的细胞增殖进行动力学监测。其他实验将无标记计数与细胞死亡标志物（包括细胞凋亡和坏死）相结合，以更广泛地了解药物处理对细胞活力的影响。为了确保细胞实验接种的准确性，我们采用 Agilent BioTek Cell Count and Viability Starter Kit 进行自动细胞计数和活力检测。最后，通过明场显微成像对酵母增殖进行计数和分析，展示了在非动物细胞成像上的应用。

仪器



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

Agilent BioTek 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，适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 5 细胞成像多功能微孔板检测系统

Agilent BioTek 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

Agilent BioTek BioSpa 活细胞分析系统配备 Agilent BioTek BioSpa 8 全自动培养箱和 Agilent BioTek Cytation 细胞成像微孔板检测系统，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。

细胞增殖与活力应用

使用无标记细胞计数进行动力学增殖分析

检测原理

表征细胞增殖在生物学研究和药物开发中具有至关重要的意义。目前大多数细胞增殖测定方法依赖于间接的生化指标，而这些指标易受到人为因素或基于成像的终点测量的限制。本文介绍了一种使用 BioSpa 8 和 Cytation 5 结合高对比度明场检测工具包通过连续活细胞检测的方法进行细胞增殖曲线绘制。这种全自动方法能够使用无标记直接细胞计数对细胞生长进行准确的定量和长时间表型分析^[7]。

高对比度明场检测工具包使每个细胞的光折射产生一个亮点，从而无需进行细胞核染色即可实现准确的细胞计数（图 2）。

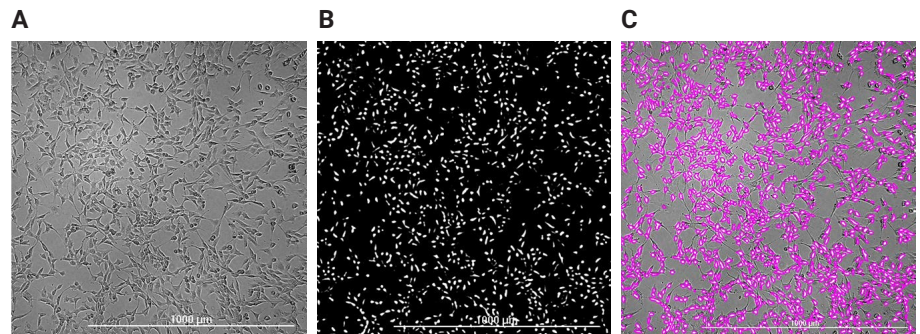
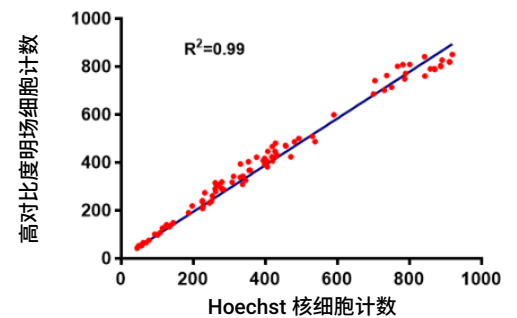


图 2. 高对比度明场直接细胞计数。(A) NIH3T3 细胞的对焦图像。(B) 失焦图像产生与每个细胞对应的单个亮点。(C) Agilent BioTek Gen5 微孔板检测与成像分析软件可轻松识别每个亮点，从而生成细胞计数。

高对比度明场细胞计数可与使用核染料（如 Hoechst 和 DAPI）进行的计数相媲美（图 3），同时可进行长时间增殖研究^[8]。

图 3. 高对比度明场无标记细胞计数与使用 Hoechst 标记的细胞核进行的细胞计数的比较。在广泛的接种密度范围内，两种技术对 Hoechst 染色 NIH3T3 细胞的细胞计数高度吻合。各点拟合非线性回归方程，R² 值为 0.99，斜率为 0.97



对 NIH3T3、HCT116 和 HeLa 细胞生长进行了为期五天的监测。三种细胞类型均表现出稳定的对数生长，直至完全汇合。为了证明该系统筛选药物的能力，我们使用两种不同浓度的抗癌药物与细胞共培养，在 8 种浓度下观察细胞生长情况，绘制细胞增殖曲线，并通过浓度响应曲线和 IC₅₀ 值定量分析各个细胞类型的增殖抑制作用。

材料与方法

细胞培养

在含 10% FBS (Gibco) 和 1x PenStrep-Glutamine (Cellgro, Manassas, VA) 的 Advanced Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco, Grand Island, NY) 培养基中培养 NIH3T3 和 HeLa 细胞。在含 10% FBS 和 1x PenStrep-Glutamine 的 McCoy's 5A 培养基 (Gibco) 中培养 HCT116 细胞。将细胞接种于 96 孔黑边透明底微孔板 (Corning, Corning, NY) 中，接种密度为 2000 个细胞/孔。在为期 5 天的孵育过程中，由 BioSpa 8 维持稳定的环境条件，包括温度 (37 °C)、气体 (5% CO₂) 和湿度 (90%)。

细胞成像

在每个时间点采集两幅高对比度明场图像：用于参考的对焦图像和用于细胞计数的失焦图像^[9]。简而言之，使用高对比度明场检测工具包将细胞聚焦，并记录“对焦”焦距。然后使用线轮廓工具绘制一条线，穿过细胞和无细胞成像区域的背景部分。然后降低焦距，同时观察线轮廓，确定细胞和背景亮度之间达到最大对比度的焦距。

图像分析

通过图像预处理尽可能增强对比度，将每个细胞缩小为单个亮点。然后设置对象识别阈值以识别计数的每个细胞（表 1）。

Image Preprocessing	
Image Set	Brightfield_2
Background	Dark
Rolling Ball Diameter	20 µm
Image Set	3 cycles of 3x3 average filter
Cellular Analysis Parameters	
Channel	Tsf[Brightfield_2]
Threshold	5000
Background	Dark
Split Touching Objects	Checked
Fill Holes in Mask	Checked
Minimum Object Size	5 µm
Maximum Object Size	100 µm
Include Primary Edge Objects	Unchecked
Analyze Entire Image	Checked
Advanced Analysis Parameters	
Rolling Ball Diameter	50 µm
Image Smoothing Strength	1 cycle of 3x3 average filter
Evaluate Background On	5 %
Primary Mask	Use threshold mask

表 1. Agilent BioTek Gen5 微孔板检测与成像分析软件设置。图像预处理可提高对比度，降低背景。设置细胞分析参数和高级分析参数，优化每个细胞的识别，以实现准确的细胞计数

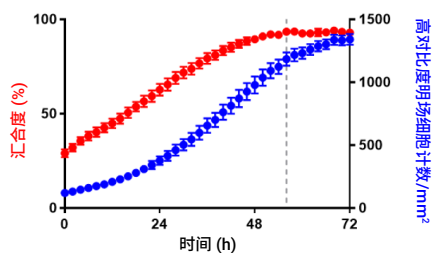


图 4. 随时间变化的高对比度明场细胞计数与汇合度的比较。NIH3T3 直接细胞计数和汇合度百分比随时间的变化比较，表明两种细胞生长指标具有不同的特征。无标记细胞计数显示稳定的对数细胞生长，直至完全汇合（虚线）

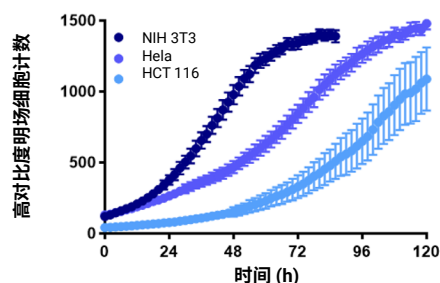


图 5. NIH3T3、HeLa 和 HCT116 的无标记直接细胞计数曲线。每两小时对细胞进行一次成像，并在五天内监测培养生长情况，直至细胞计数趋于平稳

结果与讨论

采用无标记直接细胞计数法对细胞增殖进行定量评估

相较于使用可能影响增殖率的染料，采用无标记的细胞生长动力学测量方法更具可取性。尽管在某些应用中可以使用汇合度分析，但在从更广泛的应用角度来说，细胞计数仍然是最直接、定量测量细胞增殖的方法（图4）。

三种细胞类型的细胞增殖曲线比较

NIH3T3、HeLa 和 HCT116 细胞以低密度接种，并在 BioSpa 8 中孵育 5 天。使用高对比度明场细胞计数确定每种细胞类型的增殖曲线（图 5）。在这些条件下，所有细胞均表现出稳定的对数生长，直至完全汇合。

测量抗增殖化合物对细胞生长速率的影响

动力学细胞增殖研究能够对癌症治疗药物进行定量评价。Doxorubicin（阿霉素）是一种蒽环类抗肿瘤抗生素，通过嵌入 DNA 和抑制大分子生物合成来中断细胞分裂^[10,11]。它常用于治疗各种癌症^[10]。Cercos-poramide 是一种 MAPK 相互作用激酶（Mnk），是翻译起始因子 4E（eIF4E）的强效和选择性抑制剂^[12]。最近的研究报道尾孢素酰胺可抑制恶性肿瘤生长，包括 HCT116 结肠癌异种移植瘤^[12,13]。为了探索阿霉素和尾孢素酰胺对 NIH3T3、HeLa 和 HCT116 增殖的影响，在 96 孔板中用 8 种药物浓度处理细胞，并监测 5 天（图 6）。

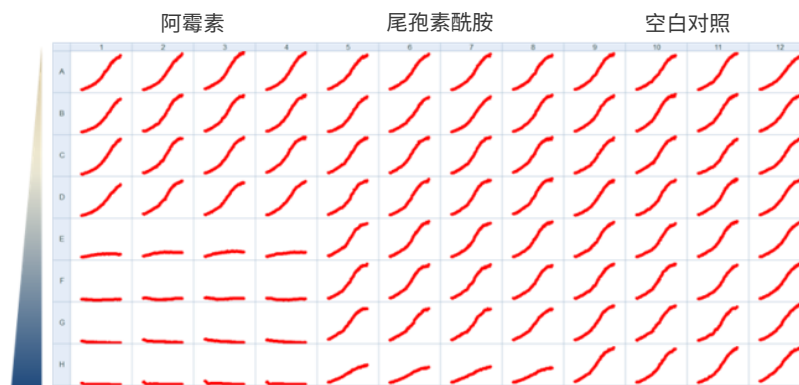


图 6. HeLa 细胞增殖 96 孔微孔板基质在五天内时间的变化。将 8 种浓度的阿霉素和尾孢素酰胺（每种浓度重复 4 次）与阴性对照一起检测

动力学细胞增殖曲线表明，三种细胞类型对和尾孢素酰胺的阿霉素响应存在差异（图7）。

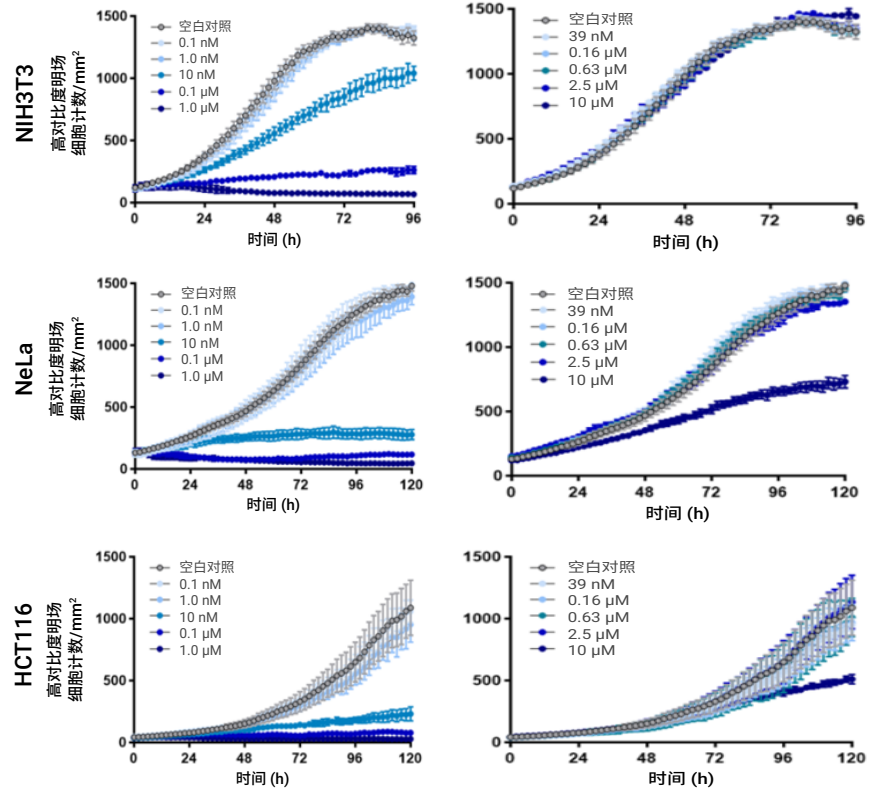


图 7. NIH3T3、HeLa 和 HCT116 细胞增殖曲线可实现药物响应的定量分析。每两小时计算一次细胞计数/mm²，持续 5 天或直至细胞完全汇合。五种药物浓度的曲线表明存在细胞类型依赖性剂量响应差异

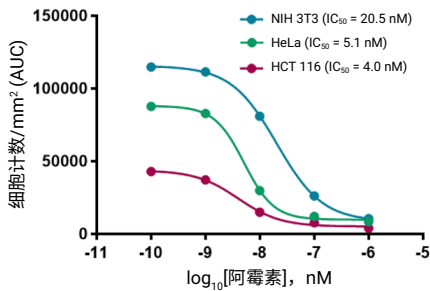


图 8. 测量阿霉素对细胞增殖的剂量依赖性抑制。使用细胞计数/mm² 增殖曲线的 AUC 计算 IC₅₀ 值

在任何测试浓度下，NIH3T3 细胞均不受尾孢素酰胺影响。然而，10 μM 尾孢素酰胺抑制了 HeLa 和 HCT116 两种癌细胞类型的增殖。阿霉素处理导致 NIH3T3、HeLa 和 HCT116 细胞增殖的剂量依赖性抑制。通过使用各增殖曲线的曲线下面积 (AUC) 测定 IC₅₀ 值，对阿霉素处理的影响随时间的变化进行了定量分析（图 8）。HCT116 对阿霉素的敏感度最高，其次是 HeLa 和 NIH3T3，IC₅₀ 值分别为 4 nM、5.1 nM 和 20.5 nM。

细胞对增殖抑制剂响应的动力学表型分析

为了进一步研究阿霉素的处理效果，我们使用实验视频对药物抑制浓度下的每种细胞类型进行了定性评估。在 10 nM 阿霉素下，36 小时内观察到 NIH3T3 细胞数量显著减少，但未出现明显的细胞凋亡迹象。这些结果表明，在该浓度下，阿霉素抑制细胞分裂，而不会导致明显的细胞毒性。相比之下，用 1 μ M 阿霉素处理的 NIH3T3 细胞在 24 小时内表现出明显的细胞毒性和凋亡迹象（图 9）。

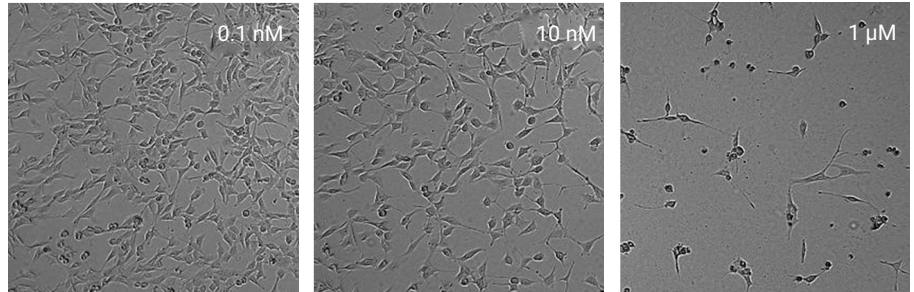


图 9. 动力学细胞增殖的定性分析有助于深入了解药物处理的表型响应。指定浓度阿霉素处理后 36 小时的 NIH3T3 增殖图像。在 10 nM 阿霉素下，细胞分裂受到抑制，但没有导致明显的细胞毒性。在 100 nM 及更高浓度下，细胞毒性迹象明显

结论

将 BioSpa 8 的细胞培养与转移功能与 Cytation 5 的成像功能相结合，形成一套全自动细胞培养监测系统，用于准确、可重现的长时间细胞增殖研究。高对比度明场细胞计数能够定量分析细胞生长，而无需使用破坏性标记。除定量测量外，该系统还可用于对细胞表型随时间的变化进行定性分析，以进一步表征药物处理响应或进行靶向基因干扰研究。增殖分析可在 96 孔或 384 孔板中运行，用于中等通量至高通量筛选。

将 BioSpa 8 和 Cytation 5 与强大的 Gen5 成像分析工具相结合，为广泛的动力学细胞增殖应用提供了一种简单易用且稳定的解决方案。

使用 Agilent BioTek 全自动智能活细胞成像分析系统进行无标记细胞增殖测量的最新出版物

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.

在长时间增殖分析中监测 pH 值

检测原理

表征细胞增殖在生物学研究和药物开发中具有至关重要的意义。目前大多数细胞增殖测定方法依赖于间接的生化指标，而这些指标易受到人为因素或基于成像的终点测量的限制。例如，可以通过引入类似 BrdU、EdU 和 IdU 等胸腺嘧啶核苷酸类似物来评估 DNA 合成，并使用特定抗体或化学试剂检测这些类似物。细胞代谢可以用四唑盐进行评估，四唑盐通过细胞酶的作用转化为有色化合物。多种不同的增殖标记蛋白，如 PCNA、Ki67 和 MCM-2，可以通过免疫荧光法检测。虽然这些技术可提供细胞生长的快照，但不一定能提供关于长时间增殖的信息。

研究表明，长时间细胞体外增殖分析在检测增殖抑制剂方面可提供大量信息^[14]。这些实验在组织培养基中进行，旨在模拟体内正常供应的营养物质，并持续数天。

大多数哺乳动物组织的 pH 值接近中性。人体动脉血通过正常呼吸调节的碳酸氢盐缓冲系统维持在 7.4 (7.35–7.45) 的 pH 值范围内。偏离正常范围会导致机体增加或减少肺部活动，以改变 CO₂ 排出量^[15]。毫无疑问，在体外培养细胞和组织时也需要相同的 pH 水平。培养基也主要通过碳酸氢盐-碳酸缓冲系统维持生理 pH 值。该系统采用匹配浓度的溶解性碳酸氢盐和人工水平的二氧化碳气体。二氧化碳溶解到培养基中与水反应形成了碳酸，而碳酸和重碳酸也相互作用形成一个能够保持生理性 pH 水平的平衡状态。

无论使用何种缓冲剂，组织培养基通常都会添加酚红染料。虽然酚红在某些条件下被描述为弱雌激素^[16]，但在大多数情况下，它是一种惰性化合物，被添加到体外培养基中，作为直观的 pH 指示剂。酚红的浓度随培养基配方的不同而变化，但通常在 5–15 mg/mL 的范围内。

细胞死亡或污染物过度生长所产生的废物会导致溶液 pH 值下降，引起指示剂颜色改变。例如，分裂相对缓慢的哺乳动物细胞受污染后，可能导致培养基酸化，并使指示剂变黄。哺乳动物细胞自身产生的废物也会逐渐降低溶液 pH 值，使其逐渐呈现橙色然后转变为黄色。这种颜色变化表明，即使在没有污染的情况下，也需要更换培养基。



图 10. 含酚红培养基的典型组织培养瓶

活细胞成像实验完全专注于手头的生物学研究。无论图像是明场、相差还是荧光，培养基的背景环境都不会观察到，通常会被忽略。本文介绍了使用 Cytation 5 细胞成像微孔板检测系统监测细胞培养 pH 状态，同时捕获数字显微图像的方法。这利用了微孔板检测系统测量孔吸光度结合细胞成像的独特功能。

材料与方法

DMEM、胎牛血清 (FBS) 和青霉素-链霉素-谷氨酰胺购自 Life Technologies。黑边透明底 96 孔板 (3904) 购自 Corning。

活细胞实验

表达核 H2B-GFP 嵌合体荧光蛋白的 HCT116-GFP 结肠癌细胞培养于补充 10% 胎牛血清和青霉素-链霉素的 Advanced DMEM 培养基中，在 37 °C、5% CO₂ 条件下。当细胞密度达到 80% 时，常规使用 0.05% Trypsin-EDTA 进行消化。实验中，将细胞接种于 Corning 3904 黑边透明底 96 孔板中。使用与 Cytation 5 连接的 BioSpa 8 进行长时间生长测量。BioSpa 系统控制微孔板检测系统的计划安排，并在成像和微孔板吸光度测量之间将细胞保存在湿润的受控环境 (37 °C, 5% CO₂) 中。根据需要，BioSpa 将微孔板运送到 Cytation 5 进行成像和吸光度测量，然后将其运送回培养箱。将 HCT116-GFP 细胞以每孔 500 或 2000 个细胞进行接种。在开始生长测量前，使细胞贴壁过夜。使用配备 GFP 光立方体的 Cytation 5 细胞成像微孔板检测系统对 HCT116-GFP 细胞进行成像。该成像仪的读取室保持 37 °C 和 5% CO₂，并结合使用 LED 光源、带通滤光片和二向色镜来提供适当波长的光。GFP 光立方体由 469/35 激发滤光片和 525/39 发射滤光片组成，用于成像表达 GFP 的细胞。使用 4 倍物镜拍摄蒙太奇 (2 × 2) 数字图像，并使用 Gen5 微孔板检测与成像分析软件拼接成单个文件。对捕获的数字图像进行一级 Mask 分析，以确定细胞数量。核被识别为大小介于 5–100 μm 之间且荧光超过 1500 阈值的荧光物体。成像后，立即使用 Cytation 5 的 UV-Vis 单色器模块测量 560 nm 处的孔吸光度。

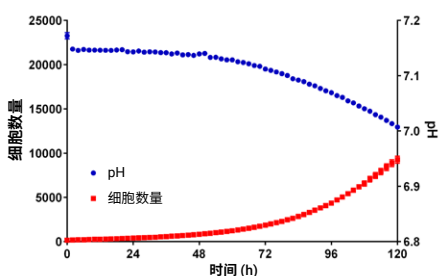


图 11. 非汇合培养物中 HCT116 细胞计数和 pH 值随时间的变化。将 HCT116 细胞以每孔 500 个细胞的密度进行接种。24 小时后进行贴壁, 对 96 孔板培养物进行基于图像和吸光度的分析, 每两小时一次, 持续 5 天, 并绘制结果图。通过内推之前生成的校准曲线的数据测定 pH 值。数据表示每个数据点 96 次测定的平均值和 SEM

结果与讨论

通过图像分析, 可以轻松计算出在其细胞核中表达 GFP 的 HCT116 活细胞的数量。绿色荧光标记使得每个细胞都能被识别, 无需使用可能影响细胞生长的核酸结合染料。将 HCT116-GFP 细胞低密度接种并监测 5 天后, 利用 560 吸光度, 通过内推之前确定的 pH 校准曲线, 计算每个孔中的 pH 值。在 5 天内, 尽管计数的细胞数量增加了 50 倍, 这些培养物的 pH 值仅降低约 0.15 (图 11)。

在这些实验中, 以 5 天结束时细胞未达到汇合的密度接种细胞 (图 12)。在这种状态下, 细胞不受接触抑制, 可以自由分裂。分裂的唯一限制因素是培养基的营养成分和 pH 值。

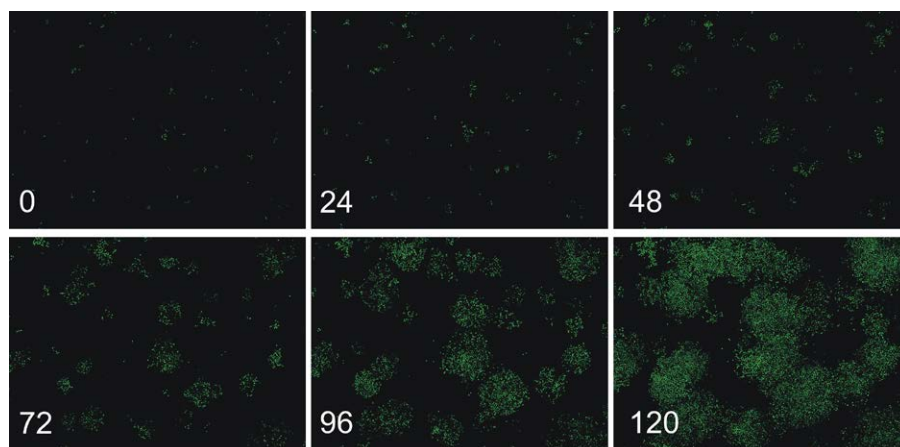


图 12. 培养 HCT116-GFP 细胞 5 天的蒙太奇图像。将 HCT116-GFP 细胞以每孔 500 个细胞接种到 96 孔板中, 贴壁 24 小时。使用 GFP LED 模块, 每 24 小时用 4 倍物镜拍摄蒙太奇图像 (2 × 2)

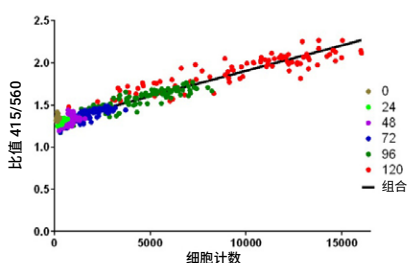


图 13. 低密度接种时培养基颜色与细胞数量之间的关系。在为期 5 天的培养过程中, 将 96 孔板每个孔的细胞计数对 415/560 吸光度比值作图。每个数据点代表单个孔

通过比较细胞数量与 415/560 吸光度比证实了这一点。该比值与培养基颜色相关, 我们之前已经证明培养基颜色与培养基的 pH 值负相关^[17]。如图 13 所示, 这些细胞培养物中的细胞数量随时间增加。在这些条件下, 细胞能够不受阻碍地生长和分裂, 随着时间的推移, 测定的细胞数量增加。由于细胞物理位置的不同以及初始细胞数量的差异, 单个孔的细胞数量可能会有所不同。由于用于细胞计数的拼接图像仅包括孔的中心部分, 因此附着在孔边缘的细胞不一定会被计数。同样, 在初始接种时获得细胞略多或略少的孔, 预期在之后的时间间隔内细胞计数也会不同。尽管细胞计数存在差异, 但细胞数量随时间呈线性增加。随着时间的推移和细胞数量的增加, 孔的 pH 值降低。

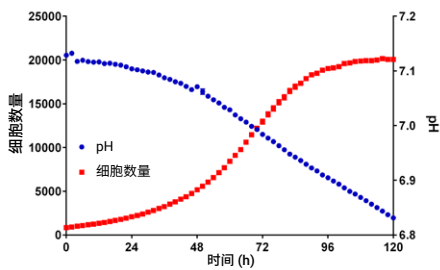


图 14. 汇合培养物中 HCT116 细胞计数和 pH 值随时间的变化。将 HCT116 细胞以每孔 2000 个细胞的密度进行接种。24 小时后进行贴壁，对 96 孔板培养物进行基于图像的吸光度分析，每两小时一次，持续 5 天。通过用之前生成的校准曲线内推 415/560 比值来测定 pH 值。数据表示每个数据点 96 次测定的平均值和 SEM

当 HCT116-GFP 细胞以更高的密度接种时，pH 值变化成为一个更大的问题，并且细胞数量最终停止上升（图 14）。当以每孔 2000 个细胞进行接种时，细胞数量的增加导致 pH 下降约两倍于较低的接种密度。尽管细胞数量的增加在约 80 小时后停止，但 pH 值的下降在整个实验期间持续存在。在较高的细胞密度下，尽管细胞数量停止增加，但细胞在整个实验过程中继续呼吸，导致 pH 值下降。

从图 15 中可以看出细胞的汇合情况，在 96 小时和 120 小时之间观察到的荧光几乎没有增加。

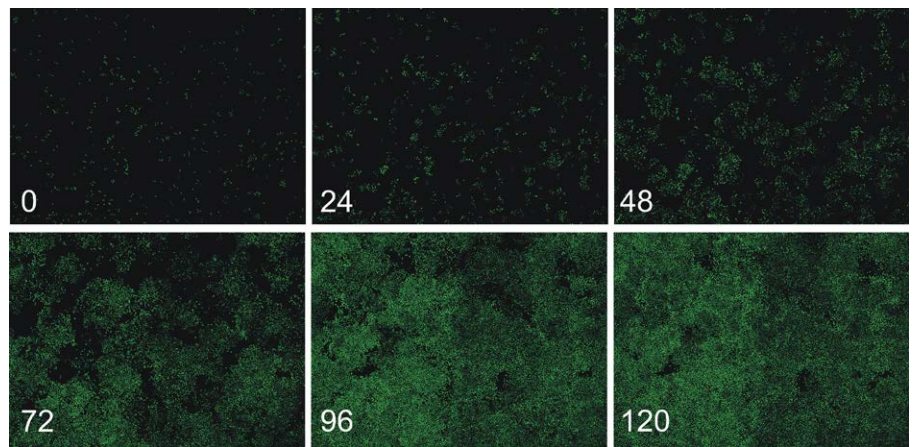


图 15. 培养 HCT116-GFP 细胞 5 天的蒙太奇图像。将 HCT116-GFP 细胞以每孔 2000 个细胞接种到 96 孔板中，贴壁 24 小时。使用 GFP LED 模块，每 24 小时用 4 倍物镜拍摄蒙太奇图像 (2 × 2)

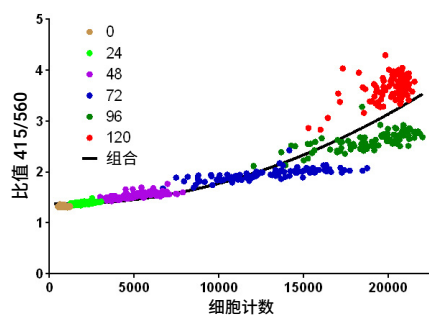


图 16. 高密度接种时培养基颜色与细胞数量之间的关系。在为期 5 天的培养过程中，将 96 孔板每个孔的细胞计数对 415/560 吸光度比值作图。每个数据点代表单个孔

在长时间培养过程中，通过细胞计数可以识别细胞汇合导致的生长抑制。如图 16 所示，通过基于图像的细胞核计数确定的细胞数量不再随着细胞汇合的时间而增加。4 天或 5 天后细胞数量无明显增加。然而，当观察到 415/560 吸光度比值增加时，培养基的 pH 值降低。尽管细胞数量增加很少或没有增加，但代谢废物仍然产生，并且营养物质被现有的细胞消耗。

这些数据表明，Cytation 5 能够在活细胞实验中监测细胞培养物 pH 值，同时进行成像。由于细胞数量和细胞呼吸的增加，细胞培养物通常会酸化，导致含酚红的培养基颜色变黄。虽然短时间实验的 pH 值变化通常可以忽略不计，但在长时间活细胞实验中，细胞数量的增加和持续时间的延长会使培养基的缓冲能力不堪重负。实时监测培养物 pH 值变化的能力可以让研究人员对观察到的实验结果充满信心，或者可以中止 pH 条件不利的实验。

监测细胞数量或细胞汇合度随时间的变化通常用于测试抗肿瘤药物在防止细胞生长方面的效果。使用酚红吸光度监测培养基 pH 值，可确保报告的抑制是测试化合物的结果，而不是组织培养基状况不佳的结果。

Cytation 5 是用活细胞成像实验监测酚红吸光度变化的理想平台。该微孔板检测仪的独特之处在于，它既能使用专用紫外-可见单色器测量吸光度，又能使用 6 位物镜转盘和 LED 光立方体进行显微成像。吸光度读数速度快，仅为完整 96 孔成像步骤增加了几秒钟，但却能提供关于细胞培养状态的有效信息。除控制微孔板检测仪的功能外，Gen5 还可用于根据之前建立的 pH 校准曲线计算 pH 值。这种独特的组合可对长时间活细胞培养实验进行持续的实时监测。

增殖分析中的荧光标记物

通过使用荧光标记物，可以测量细胞凋亡和坏死等细胞死亡状态的其他详细信息。此外，在不需要无标记计数的情况下，标记细胞计数还能为各种细胞类型提供出色的结果。

基于 384 孔板的细胞增殖的自动动力学成像测定

检测原理

即使从生命之初开始，所有多细胞生物体的正常功能都依赖于细胞死亡。从发育异常到癌症，细胞死亡管理不当是各种现象的根源。癌细胞能够逃避受调控的细胞死亡或凋亡，这对于癌症治疗而言尤其棘手^[18]。无论是通过放疗、免疫治疗还是化疗，癌症治疗的目标都是选择性地杀死癌细胞。多方面了解细胞死亡，特别是癌细胞能够克服的方面，是临床医生、主要研究人员和药物发现工作都高度关注的领域^[18]。基于成像的工具可监测经历不同死亡机制的细胞，提供了一种连续、实时、高通量的方式来探索细胞死亡过程。

受调控的细胞死亡（如凋亡）和意外细胞死亡（如坏死）都是对细胞刺激（即养分缺失或 DNA 损伤）的响应过程，但各自会产生不同的标志性细胞变化^[19]。当磷脂酰丝氨酸（一种通常仅存在于细胞膜内叶的膜成分）转位至外叶时，就会出现细胞凋亡早期阶段的特征之一。磷脂酰丝氨酸的这种暴露可能会促使吞噬细胞吞噬细胞或剩余的细胞碎片^[20]。本文通过荧光 pSIVA-1ANBD 探针的特异性结合和活化，对活细胞中磷脂酰丝氨酸的暴露进行光学监测。这种荧光探针为细胞凋亡提供了一种动态指示剂，并在细胞死亡过程中持续存在^[21]。

在晚期凋亡和坏死过程中，细胞膜完整性的改变是一个特征性的变化^[19]。这种完整性的丧失允许通常被排除在外的分子进入细胞核，如 DNA 染色染料碘化丙啶 (PI)。因此，也可以实时监测细胞核的荧光 PI 染色，作为衡量细胞发生坏死和晚期凋亡过程的指标。

在本研究中，我们将长时间动力学无标记细胞计数和荧光成像相结合，在基于高通量 384 孔成像的分析中监测癌细胞在数天内的响应。带宽场相机的 Cytation 5 可以在一张图像中采集 384 孔板的整个孔的图像。将 Cytation 5 与 BioSpa 结合用于全自动环境控制，可实现基于图像的高通量无人值守细胞分析工作流程。

材料与amp;方法

试剂

HT-1080 纤维肉瘤细胞来自 ATCC (Manassas,VA)。Advanced DMEM、Fluorobright DMEM、胎牛血清 (FBS) 和谷氨酰胺/青霉素/链霉素购自 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA)。十字孢碱、诺考达唑、尼日利亚菌素和喜树碱购自 Tocris Bioscience (Minneapolis, MN)。用于显微成像的 Kinetic Apoptosis Kit (ab129817) 购自 (Cambridge, MA)。Greiner 384 孔微孔板 (目录号 781091) 来自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)。

细胞培养和分析准备

HT-1080 细胞在含有 10% FBS、2 mM 谷氨酰胺和青霉素/链霉素抗生素的 Advanced DMEM 培养基中，在 37 °C、5% CO₂ 湿度控制培养箱中进行培养。当细胞达到 80% 密度时，定期传代。收集 HT-1080 细胞并悬浮后，以每个孔 500 个细胞的密度接种于 384 孔板中。细胞贴壁后 (约 4 小时)，将培养基更换为 Fluorobrite DMEM 培养基。将 Kinetic Apoptosis Kit 试剂添加到每个孔中，使最终浓度为 1 μL/mL pSIVA-1ANBD 和 2 μL/mL PI。在微孔板上加入抗肿瘤药物稀释系列，并在加药后立即开始成像分析。

自动化长时间活细胞成像

为实现全自动长时间成像，将细胞培养在与 Cytation 联用的 BioSpa 8 中，在整个 72 小时的实验期间，BioSpa 8 在 37 °C、5% CO₂ 和湿度 80%–90% 的环境下培养细胞，并通过 BioSpa 软件对环境参数进行监测和实时报告。每隔 2 小时，微孔板自动从 BioSpa 培养箱转移到 Cytation 5。在整个成像过程中，Cytation 5 内置的环境控制功能将细胞维持在 37 °C 和 5% CO₂ 条件下。

单视野全孔图像采集

为了实现 384 孔微孔板的全孔成像，将带宽场相机的 Cytation 5 与 4 倍放大物镜搭配使用。Cytation 5 宽场相机可以在单个视野中采集孔中整个培养区域的图像（图 17）。Cytation 5 的成像配置如表 2 所示。成像模块 GFP (469/525 nm) 和 PI (531/647 nm) 分别用于检测动力学细胞凋亡试剂盒试剂 pSIVA 和 PI 信号。对于无标记细胞计数，如前所述使用 Cytation 5 与高对比度明场检测工具包^[14]。

表 2. Agilent BioTek Gen5 微孔板检测与成像分析软件的图像采集设置

Image Acquisition	
Parameter	Value
Channel	Brightfield (high-contrast)
	GFP 469,525
	Propidium iodide 531,647
Focus	Laser autofocus
Objective	4x PL FL
Z-stack	No
Montage	No
Discontinuous Kinetic Procedure	Yes
Estimated Total Time	3 days
Estimated Interval	2 hours

图像分析

使用 Gen5 软件进行图像处理。表 3 中列出了实验所用的参数。预处理降低了背景并增强了对比度，有助于所有通道中的细胞识别。对于高对比度的明场图像，经过处理后得到一个黑色背景的图像，并且亮白色斑点所呈现出来的是细胞。

表 3. Agilent BioTek Gen5 微孔板检测与成像分析软件的图像处理参数

Image Processing			
Parameter	Brightfield	GFP 469,525	Propidium Iodide 531,647
Background	Dark	Dark	Dark
Rolling Ball Diameter	20	100	30
Priority	Fine results	Fine results	Fine results
Image Smoothing Strength	5 cycles	1 cycle	1 cycle

对预处理图像进行细胞分析，表 4 列出了所有通道的参数。通过 Gen5 中的图像统计分析确定每个通道的阈值。对对照孔进行图像统计，以高于平均图像信号三倍标准差作为细胞分析的阈值。通过对高对比度明场图像进行一级 Mask 分析，确定总细胞计数。通过 GFP 通道的一级 Mask 分析确定凋亡报告基因 pSIVA 阳性的细胞数量。通过 PI 通道的一级 Mask 分析确定坏死标志物 PI 阳性的细胞数量。弯液面引入成像伪影，在方形孔口角落处稍微较其他培养区域暗淡（图 17），可能导致无标记细胞计数与荧光计数相比存在偏差。Gen5 plug 功能用于将细胞分析限制在明场中照明最佳的孔区域（直径为 3400 μm 的圆），相当于整个孔培养区域的 92%。因此，plug 功能支持使用无标记细胞计数方法对荧光细胞计数进行无偏差归一化。

表 4. Agilent BioTek Gen5 微孔板检测与成像分析软件的细胞分析参数

Cellular Analysis			
Primary Mask			
Parameter	Brightfield Cell Count	pSIVA Count	PI Count
Detection Channel	Tsf[Brightfield]	Tsf[GFP 469,525]	Tsf[Propidium iodide 531,647]
Threshold	8,000	4,000	3,000
Background	Dark	Dark	Dark
Split Touching Objects	Yes	Yes	Yes
Fill Holes in Masks	Yes	Yes	Yes
Minimum Object Size	10 μm	15 μm	5 μm
Maximum Object Size	100 μm	100 μm	100 μm
Include Primary Edge Objects	No	No	No
Analyze Entire Image	No	No	No
Advanced Detection Options			
Rolling Ball Diameter	Auto	50	30
Image Smoothing Strength	3 cycles	3 cycles	3 cycles
Evaluate Background On	5 %	5 %	5 %
Primary Mask	Use threshold mask	Use threshold mask	Use threshold mask

曲线拟合与统计

使用 Gen5 软件采集和分析所有数据。使用 Gen5 和 GraphPad Prism V8 软件呈现数据。所有曲线拟合和 EC_{50} 分析均在 Gen5 中进行。在线性回归的 5 点窗口内进行 Gen5 中的 V_{max} 时间分析。使用 Microsoft Excel 中的 Student's t-test 函数（双尾，非配对）进行统计分析。

结果与讨论

自动化增殖动力学分析

在 384 孔板中对人纤维肉瘤细胞系 HT-1080 进行了基于无标记图像的细胞计数，每隔两小时计数一次，共计数三天。使用 4 倍物镜和高对比度明场检测工具包为每个孔采集单视野图像。使用 Gen5 中的细胞分析进行细胞计数（图 17）。

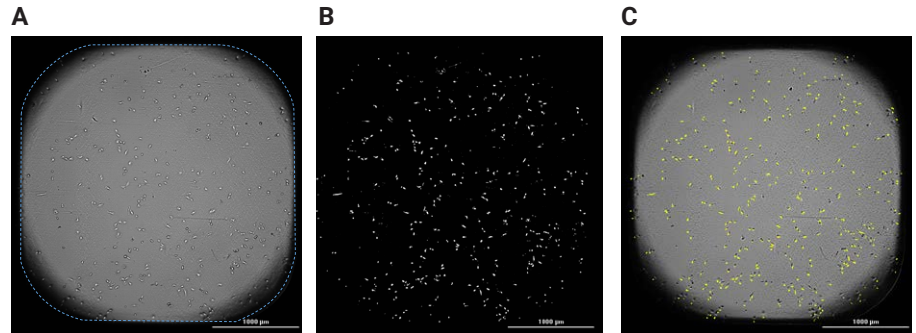


图 17. 无标记高对比度细胞计数方法。(A) 使用高对比度明场检测工具包采集的原始高对比度失焦图像。蓝色虚线轮廓内为 384 孔板单个孔的总培养区域。(B) 经过表 3 所示预处理步骤后的高对比度明场图像。(C) Agilent BioTek Gen5 微孔板检测与成像分析软件识别并计数 HT-1080 细胞（黄色），结果叠加显示于原始高对比度明场图像上

本文研究了四种抗肿瘤药物（十字孢碱、诺考达唑、喜树碱和尼日利亚菌素）对细胞增殖的影响。在 $t = 0$ 小时采集第一张图像前加入药物。Gen5 软件生成细胞计数曲线，提供了整个 384 孔培养板增殖速率的直观概览（图 18）。从 Gen5 孔板概览中很容易看出每种药物对增殖的不同抑制作用。

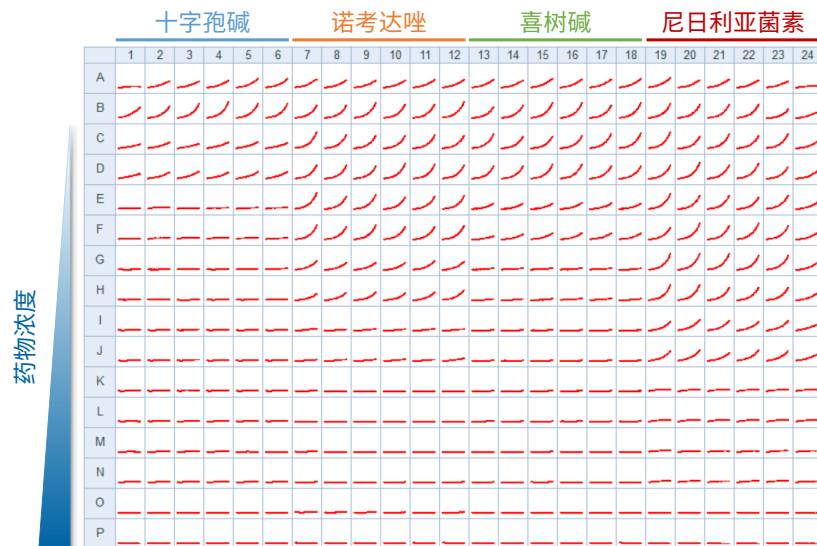


图 18. 384 孔板细胞增殖概览。红色曲线表示三天实验期间的细胞计数。从 C 行到 P 行，随着药物浓度的增加，在整个 384 孔板中观察到所有药物条件下的增殖均减少

对于诺考达唑和喜树碱这两种示例药物，绘制了不同剂量下的细胞计数曲线（图 19A、19B）。为了进一步分析，对每种条件下 12 个孔的重复分析取平均值并将结果绘制于一张图中。为了定量分析每种药物对增殖的抑制作用，在 Gen5 中生成剂量响应曲线（图 19C、19D）。首先通过 24 小时的单一时间点分析生成不同药物的剂量-响应曲线。

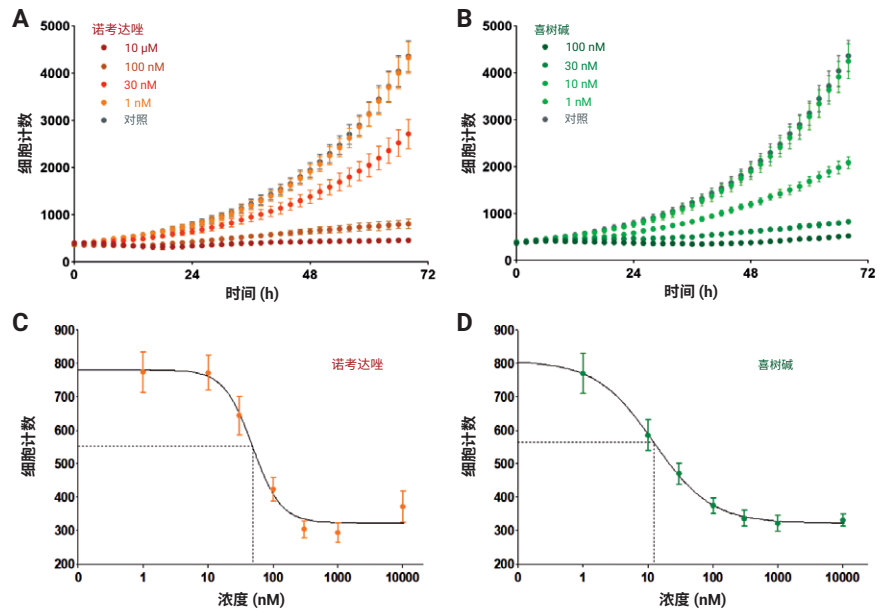
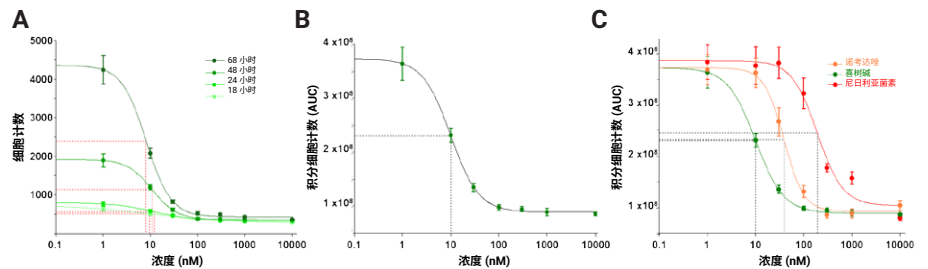


图 19. HT-1080 纤维肉瘤细胞增殖的剂量依赖性抑制。将几种浓度的 (A) 诺考达唑（橙色圆，n = 12 个重复测定孔）和 (B) 喜树碱（绿色圆，n = 12 个重复测定孔）在三天内的平均细胞计数图叠加。误差线表示重复测定的标准偏差。Agilent BioTek Gen5 微孔板检测与成像分析软件生成 (C) 诺考达唑（橙色圆）和 (D) 喜树碱（绿色圆）在 24 小时的单一时间点无标记细胞计数的剂量-响应曲线。4 参数拟合用黑色实线表示，插入的 IC_{50} 值用虚线表示。诺考达唑的 IC_{50} 对应于 48 nM，喜树碱对应于 12 nM

Gen5 提供了通过曲线下面积的积分分析来比较 IC_{50} 值的方法（图 20）。这种计算 IC_{50} 值的方法与药物暴露时间无关，并解释了实验期间的变化。对于喜树碱，不同分析方法的 IC_{50} 值高度一致。为了进行比较，还对尼日利亚菌素和诺考达唑进行了 AUC 分析，结果表明，在 IC_{50} 值变化很大的情况下，检测灵敏度也很高（图 20C）。

图 20. 无标记增殖剂量-响应曲线和 IC_{50} 分析。(A) 喜树碱的多个时间点剂量-响应曲线叠加图，允许对 IC_{50} 值进行时间依赖性比较（18 小时 = 9.5 nM、24 小时 = 12.3 nM、48 小时 = 10.9 nM 和 68 小时 = 8.2 nM）。每条曲线的 4 参数拟合用彩色表示， IC_{50} 内插值用虚线表示。(B) Agilent BioTek Gen5 微孔板检测与成像分析软件通过整个动力学系列的曲线下面积（积分）分析提供 IC_{50} 值的额外估计值 ($IC_{50} = 10$ nM)。(C) 所示三种药物基于积分的剂量-响应曲线。实线对应 4 参数拟合，虚线表示 IC_{50} 内插值。 IC_{50} 值对应于喜树碱 10 nM、诺考达唑 39 nM 和尼日利亚菌素 193 nM



基于荧光的动力学细胞死亡表型

除了对增殖总体效应进行研究外，还使用细胞凋亡和坏死的荧光报告基因研究了细胞死亡机制。在拍摄明场图像的同时，拍摄细胞凋亡标志物 pSIVA 和坏死标志物 PI 的相应荧光图像（图 21A）。识别 pSIVA 和 PI 信号阳性的细胞（图 21B，识别参数见“材料与方法”部分），并用一级 Mask 识别每个孔和时间点的单个细胞（图 21B，见插图）。

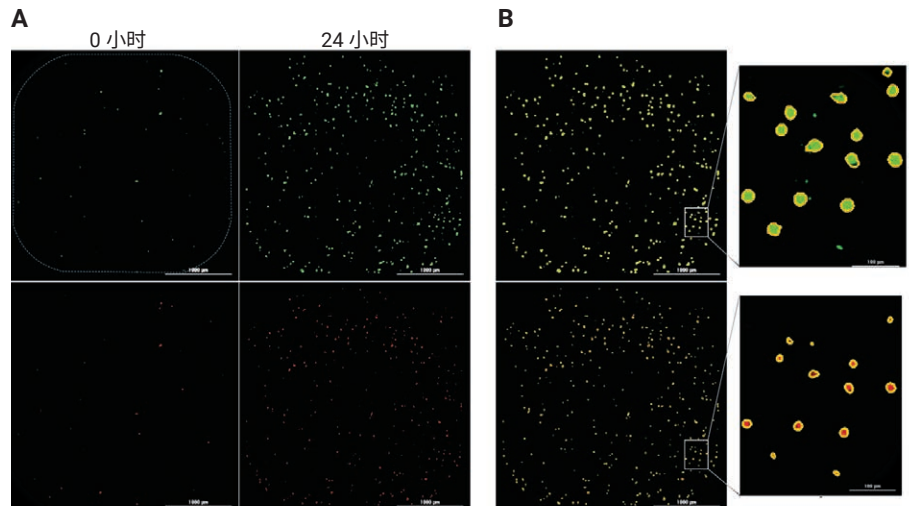


图 21. 细胞凋亡和坏死阳性细胞的捕获和识别。(A) 两个时间点 pSIVA 凋亡标志物（绿色，上图）和 PI 坏死标志物（红色，下图）阳性细胞的示例图像（图示）。384 孔底部的区域由 A 中左上角的蓝色虚线轮廓表示。(B) 通过大小和信号阈值参数（见“材料与方法”部分）识别阳性凋亡和坏死细胞，并通过一级 Mask 识别阳性细胞（为清晰起见，插图显示了放大区域）

细胞凋亡的定量分析

磷脂酰丝氨酸暴露于细胞外空间时，pSIVA 的绿色荧光会增强。正如预期的那样，在抗肿瘤药物作用下，细胞凋亡标志物 pSIVA 阳性的细胞数量随时间增加，但在对照孔中则保持相对稳定的低水平（图 22A）。尽管这种行为在最高和最低浓度的诺考达唑中是符合预期的，但在中间浓度下，pSIVA 阳性的细胞数量随时间持续增加。这种积累是由于尽管许多细胞都在主动发生细胞死亡，但整个细胞群仍在继续增殖。这种效应模糊了对结果的解析，并使随时间变化的剂量-响应曲线的 EC_{50} 值左移（图 22A，下图）。

为了控制细胞的持续增殖，以及不同条件和重复之间细胞数量的任何初始变化，pSIVA 阳性细胞计数可表示为通过无标记细胞计数确定的总细胞计数百分比（图 22B）。重要的是，将凋亡计数归一化至总细胞计数表明，在给定的药物浓度

下，尽管无标记细胞计数和 pSIVA 阳性计数均绝对增加，但凋亡细胞百分比保持稳定（图 22B，上图）。此外，不同时间点的 EC_{50} 值随时间保持稳定，归一化计数几乎相同（图 22B，下图）。因此，当细胞在中等药物浓度下继续增殖时，如果仅根据绝对计数对凋亡荧光信号进行定量，随着时间的推移，会系统性且实质性地低估 EC_{50} 值。

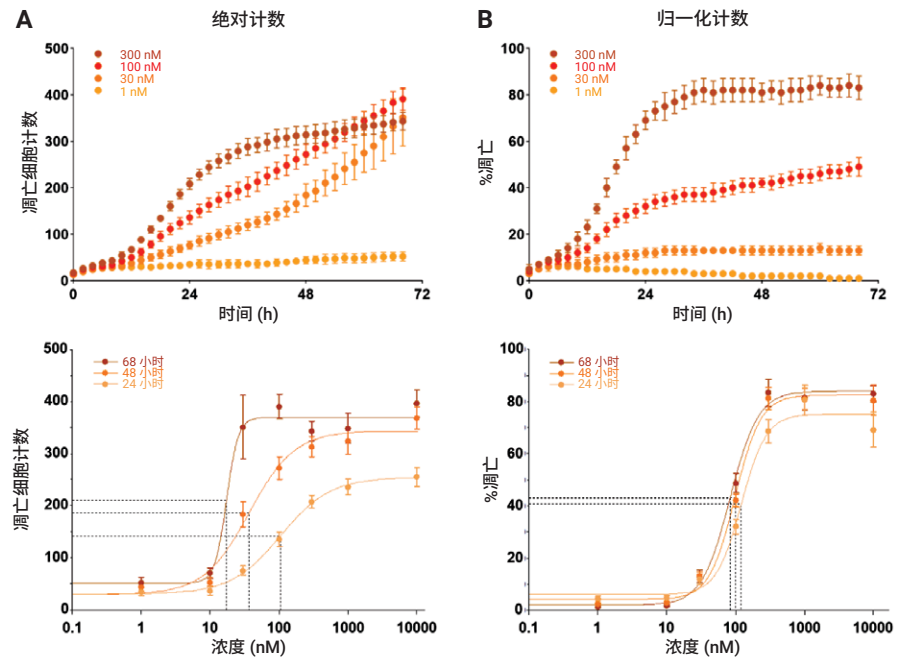


图 22. 凋亡信号对抗肿瘤药物的响应。(A) 在指定的 4 种浓度下应用药物诺考达唑的凋亡细胞计数。请注意，由于总细胞计数增加，中间浓度下凋亡细胞计数继续升高。对于绝对细胞计数，生成剂量-响应曲线，并拟合至指定的三个时间点。由于细胞增殖， EC_{50} 值随时间显著左移 (EC_{50} 24 小时 = 106 nM, EC_{50} 48 小时 = 30 nM, EC_{50} 68 小时 = 17 nM)。(B) 与图 A 中凋亡细胞计数的数据相同，但归一化至总细胞计数（以百分比表示）。对于归一化的凋亡细胞，所有剂量-响应曲线的 EC_{50} 值均为约 100 nM。在 A 和 B 下图中，Agilent BioTek Gen5 微孔板检测与成像分析软件的 4 参数拟合线以实线显示， EC_{50} 内插线以虚线显示

细胞坏死的定量分析

此外，动力学细胞凋亡试剂盒包含碘化丙啶 (PI)，作为细胞坏死和晚期凋亡的指示剂。当细胞和核膜均受损时，PI 进入细胞并嵌入 DNA；在晚期凋亡和坏死过程中，膜完整性丧失。本研究通过荧光成像监测并定量 PI 结合情况。与 pSIVA 信号一样，PI 信号通常会随时间和药物剂量的增加而增加，如诺考达唑所示（图 23A）。同样，如 pSIVA 凋亡信号所示，PI 阳性细胞在中等药物浓度下也会因增殖而增加。因此，还使用无标记细胞计数将 PI 阳性细胞数归一化为总细胞数的百分比（图 23B）。

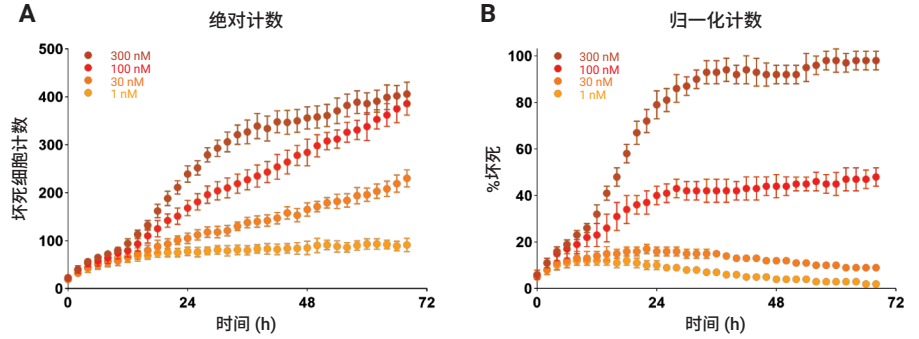


图 23. 坏死信号对抗肿瘤药物的响应。(A) 在指定的 4 种浓度下应用药物诺考达唑的坏死细胞计数。请注意，由于总细胞计数增加，中间浓度下坏死细胞计数继续升高。(B) 与图 A 中凋亡细胞计数的数据相同，但归一化至总细胞计数（以百分比表示）

为了比较和定量药效，对所有药物在 24 小时的归一化坏死和凋亡信号进行了动力学分析和曲线拟合（图 24）。有趣的是，尽管尼日利亚菌素具有抑制增殖的效力 ($IC_{50} = 100 \text{ nM}$, 图 20C)，但即使在使用的最高浓度下，它也很少导致细胞凋亡或坏死，并且细胞凋亡和坏死的 EC_{50} 值尚未确定。

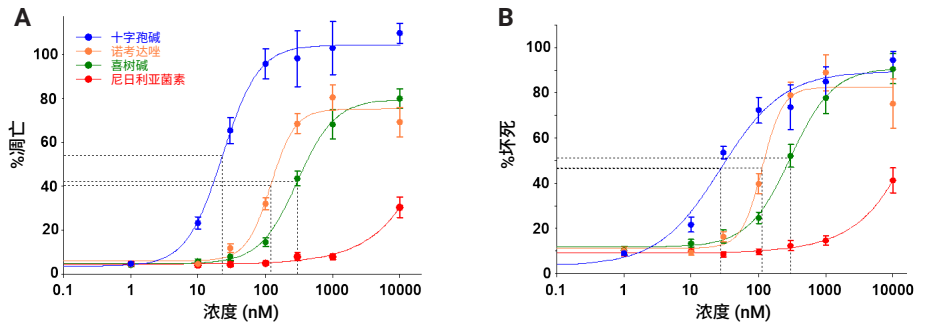


图 24. 细胞凋亡和坏死的 EC_{50} 测定。绘制每种药物的坏死细胞百分比（左图）和凋亡细胞百分比的剂量-响应曲线。Agilent BioTek Gen5 微孔板检测与成像分析软件的每次 4 参数拟合（实心彩色线）以及内插 EC_{50} 值（虚线）。对于细胞凋亡， EC_{50} 值分别为十字孢碱 24 nM、诺考达唑 121 nM 和喜树碱 301 nM。对于细胞坏死， EC_{50} 值分别为十字孢碱 28 nM、诺考达唑 114 nM 和喜树碱 301 nM。尼日利亚菌素（红色）的细胞凋亡和坏死 EC_{50} 值均未确定

此外，尽管两个过程的 EC_{50} 值相似，但与坏死百分比相比，十字孢碱的最大平台值的凋亡百分比达到了更高水平。这种差异可能表明，十字孢碱优先启动 HT-1080 细胞凋亡。因此，我们还使用 Gen5 对细胞凋亡和坏死信号的开始时间进行了定量研究。在图 25A 中，显示了十字孢碱（蓝色）和喜树碱（绿色）的细

胞凋亡百分比和坏死百分比曲线。肉眼可见，用十字孢碱处理的细胞，凋亡信号先于坏死信号出现。相比之下，喜树碱的细胞凋亡百分比和坏死信号开始时间几乎相同，两条曲线明显重叠。为了定量这种差异，测量了每条曲线的 V_{max} 参数的时间（详见“材料与方法”部分）。为了评估每种药物的 V_{max} 时间，选择了接近细胞凋亡和坏死百分比最大水平的第一个浓度。每种药物的 V_{max} 时间见图 25B。只有十字孢碱的两种信号开始时间存在差异，凋亡比坏死早约 3.5 小时。这一发现表明细胞死亡的机制主要是通过凋亡，导致坏死。

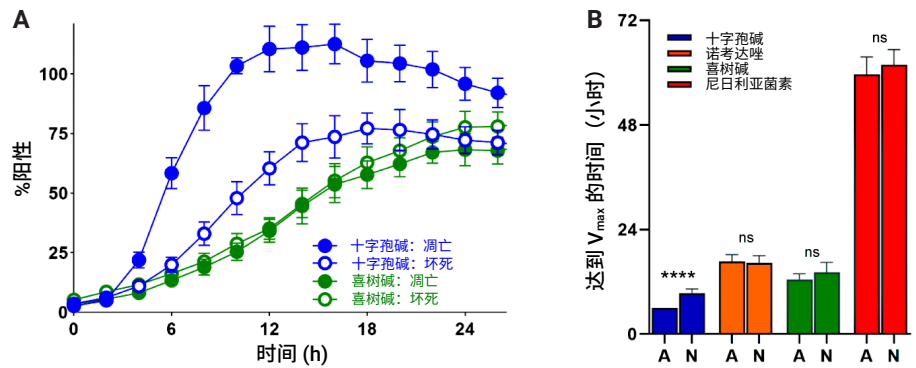


图 25. 细胞凋亡和坏死过程的开始时间比较。(A) 相同细胞群的细胞凋亡信号（实心圆）和坏死信号（空心圆）的曲线叠加图示例。对于十字孢碱（蓝色曲线），而不是喜树碱（绿色曲线），细胞凋亡先于坏死信号出现。(B) 细胞凋亡（缩写为“A”）和坏死（缩写为“N”）的 V_{max} 参数时间比较图。只有十字孢碱显示 V_{max} 时间之间存在明显 ($p = 0.000001$) 差异，细胞凋亡比坏死早约 3.5 小时

将带宽场相机的 Cytation 5 与 BioSpa 8 全自动培养箱搭配使用，提供了一种全自动且稳定的方法，可定量分析基于图像的细胞增殖和细胞死亡。宽场相机可对全孔培养区域进行单图像捕获，大幅缩短图像捕获时间，提高小培养区域容器在高通量应用中的兼容性。Gen5 软件和细胞分析程序可快速自动识别明场和荧光图像的细胞计数。使用无标记细胞计数对荧光信号进行归一化，对于避免因不同条件之间的增殖率差异导致的 EC_{50} 测定偏差至关重要。

使用自动化的多参数方法对细胞死亡进行动力学定量分析

检测原理

深入了解细胞死亡过程的调控和失调对于理解癌症等疾病状态，以及开发有效、耐受性良好的治疗疗法至关重要。事实上，许多程序性和非程序性细胞死亡通路正在被研究，以开发更有效、毒性更低的化疗方案^[22]。然而，细胞死亡方式的多样性因信号转导元件共享、机制重叠以及各种细胞死亡通路之间的复杂串扰而变得复杂^[23]。区分细胞死亡通路的形态特征需要大量工作，而当结合终点分析时，往往会错过关键的瞬态事件。

本文展示了一种使用活细胞成像系统评估实时细胞死亡的自动化多重方法。使用 Abcam 荧光探针测量三种常见的细胞死亡生物标志物：线粒体膜电位、磷脂酰丝氨酸 (PS) 外翻和细胞膜完整性。带正电荷的荧光四甲基罗丹明乙酯 (TMRE) 染料很容易穿过细胞膜，并在健康、活跃的线粒体中聚集，产生橙红色信号。如果线粒体膜去极化或失去活性，如凋亡和坏死细胞，染料会扩散到整个细胞。绿色荧光探针 pSIVA-1ANBD 与细胞膜脂质双分子层的非极性环境结合，可检测到不可逆和瞬时的磷脂酰丝氨酸暴露，而这是细胞凋亡和坏死的特征。最后，远红荧光染料 DRAQ7 在健康细胞中不具有渗透性，但在死亡和透化的坏死和坏死性凋亡细胞中会染色细胞核。在表征细胞死亡系统时，将这些染料与实时形态学分析相结合的单一、多重方法具有很大的优势。将纤维肉瘤靶细胞和染料与已知的抑制剂化合物一起放入微孔板中，并在台式自动培养箱中孵育。每隔两小时将微孔板从培养箱自动转移到微孔板检测仪与自动化数字成像仪的联用系统中，共计运行 48 小时，在此过程中进行荧光成像以评估细胞活性，同时进行高对比度明场成像，以便在整个培养期间进行准确的细胞计数。

材料与方法

细胞和培养基

HT-1080 纤维肉瘤细胞（货号 CCL-121）来自 ATCC, Manassas, VA。Advanced DMEM（货号 12491-015）、胎牛血清（货号 10437-036）和青霉素-链霉素-谷氨酰胺 (100X)（货号 10378-016）购自 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA)。

分析和实验组件

TMRE 荧光染料（包含在 TMRE-线粒体膜电位分析试剂盒（货号 ab113852）中）、pSIVA-IANDB 绿色荧光探针（包含在动力学细胞凋亡试剂盒（货号 ab129817）中）、DRAQ7 远红荧光染料（货号 ab109202）和已知的拓扑异构酶 I 抑制剂喜树碱（货号 ab120115）均由 Abcam (Cambridge, MA) 提供。

准备细胞

将 2000 个 HT-1080 纤维肉瘤细胞加入到预先准备好的培养基中，并分装到一个 96 孔组织培养处理微孔板中。在 37 °C/5% CO₂ 下将微孔板孵育过夜，使细胞附着在孔上。

试剂和抑制剂稀释

用培养基将分析试剂稀释至以下 1x 工作浓度：200 nM TMRE；10 µL/mL pSIVA-IANDB；3 µM DRAQ7。用含试剂的培养基稀释喜树碱，通过连续 1:4 稀释在 10 µM 至 0 µM 范围内建立 8 点滴定。

分析程序

细胞贴壁过夜后，从微孔板中移除培养基，替换为含 TMRE、pSIVA 和 DRAQ7 试剂以及化合物稀释液的培养基。然后将微孔板置于 BioSpa 8 中，环境条件之前设定为 37 °C/5% CO₂。向盘中加水，创建湿润环境。对 BioSpa 8 软件进行编程，使微孔板自动转移到 Cytation 5，每两小时对测试孔进行一次高对比度明场和荧光成像，在 48 小时培养期内共进行 25 次成像迭代。每个通道拍摄一张 4x 图像（表 5），以捕获每孔中的代表性细胞群。结合激光自动对焦，确保对目标细胞层进行正确对焦以及最有效的对焦程序。

图像处理

捕获图像后，在分析前对图像进行处理，使用表 6 中的设置去除每个通道的背景信号。

表 5. 每个通道成像的细胞

Imaging Channel Target	
HCBF	All cells
GFP	Apoptotic cells
RFP	Active mitochondrial membrane potential
CY5	Necrotic cells

表 6. 图像预处理参数

2D Image Preprocessing Parameters			
Channel	Apply Image Preprocessing	Background	Rolling Ball Diameter
HCBF	Yes	Dark	25
GFP	Yes	Dark	Auto
RFP	Yes	Dark	150 µm
CY5	Yes	Dark	Auto

对处理后的图像进行细胞分析

使用表 7 和表 8 中的标准，对处理后的图像进行细胞分析，确定每张图像的细胞总数，以及符合活性线粒体、凋亡和坏死标准的细胞数。

表 7. 一级和二级分析标准

Total Cell Primary Analysis	
Channel	Tsf[Brightfield]
Threshold	10,000
Background	Dark
Split Touching Objects	Checked
Fill Holes in Masks	Checked
Minimum Object Size	5 μm
Maximum Object Size	100 μm
Include Primary Edge Objects	Unchecked
Analyze Entire Image	Checked
Advanced Detection Options	
Rolling Ball Diameter	25 μm
Image Smoothing Strength	0
Evaluate Background On	5 % of lowest pixels
Active Mitochondria Cell Secondary Analysis	
Channel	Tsf[RFP]
Measure Within a Secondary Mask	Checked
Type	Exclude primary mask
Distance from Primary Mask	1 μm
Ring Width	25 μm
Threshold	5,000
Smoothing	0
Method	Propagate mask
Metric of Interest	Area_2[Tsf[RFP]]
Apoptotic Cell Secondary Analysis	
Channel	Tsf[GFP]
Measure Within a Secondary Mask	Checked
Type	Exclude primary mask
Distance from Primary Mask	1 μm
Ring Width	25 μm
Threshold	10,000
Smoothing	0
Method	Propagate mask
Metric of Interest	Mean_2[Tsf[GFP]]
Necrotic Cell Secondary Analysis	
Channel	Tsf[CY5]
Measure Within a Primary Mask	Checked
Expand Primary Mask	15 μm
Metric of Interest	Mean[Tsf[CY5]]

表 8. 图像预处理参数

Subpopulation Criteria			
Cell Subpopulation	Channel	Metric of Interest	Positive Cell Cutoff Criteria
Active mitochondria	RFP	Area_2[Tsf[RFP]]	>100 μm^2
Apoptosis	GFP	Mean_2[Tsf[GFP]]	>10000 RFU
Necrosis	CY5	Mean[Tsf[CY5]]	>2000 RFU

结果与讨论

无标记总计细胞计数

执行高对比度明场、无标记活细胞成像，从而定量分析喜树碱整个 48 小时孵育期间的细胞总数。通过激光自动对焦自动确定细胞焦平面（图 26A），同时在原始焦平面下方约 300 μm 处捕获额外图像（图 26B），并自动进行预处理（表 6）以提高细胞对比度（图 26C）。然后使用表 7 中的总细胞一级分析参数进行定量分析，标记 Mask（图 26D），以确定每张图像的细胞总数。

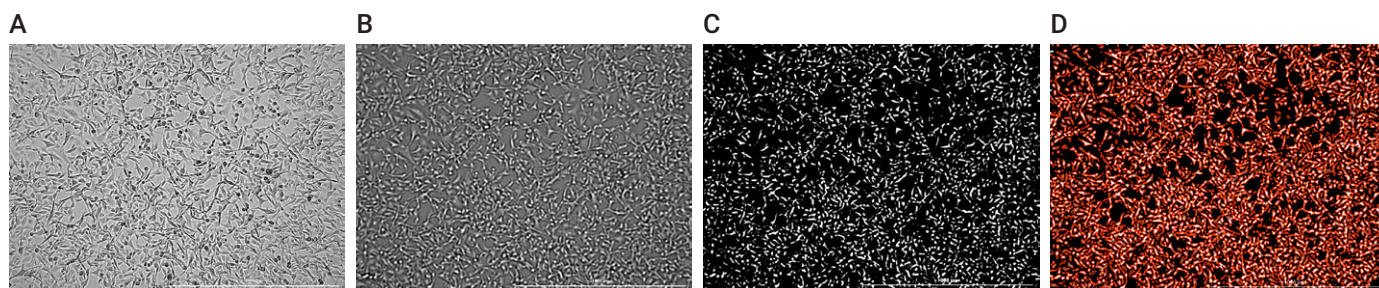


图 26. 高对比度明场图像采集、预处理和分析。(A) HT-1080 总细胞的 4x 对焦图像。(B) HT-1080 总细胞的 4x 离焦图像。(C) 离焦图像的预处理。(D) 对预处理图像进行细胞分析。将对象 Mask（红色）放置在图像中的总细胞周围

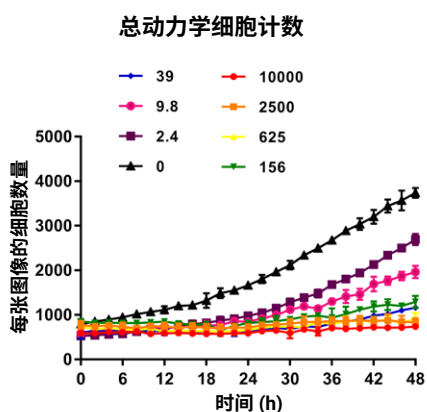


图 27. 动力学 HT-1080 总细胞剂量响应曲线。根据各时间点各化合物处理的 3 个重复孔计算每张图像的平均细胞数。喜树碱浓度如下：10000 nM、2500 nM、625 nM、156 nM、39 nM、9.8 nM、2.4 nM 和 0 nM

总细胞动力学分析结果（图 27）证实了喜树碱浓度的增加对 HT-1080 细胞增殖的影响。准确的细胞计数还证明了使用高对比度明场进行一级细胞分析可作为积极影响细胞计数的归一化方法。

线粒体膜电位

在 0 时加入 TMRE 细胞渗透染料，监测线粒体膜电位。由于染料带正电荷，因此很容易在带负电荷的线粒体中积聚，而去极化线粒体的膜电位降低，无法固定该染料。Cytation 5 RFP 成像通道用于捕获 TMRE 探针的信号。0 时的细胞 (图 28A) 含有活性线粒体，导致大面积的细胞质探针信号。线粒体膜完整性丧失导致探针表达减少，细胞质信号区域变小 (图 28B)。使用二级 Mask 标记表达 TMRE 探针 RFP 信号的细胞 (图 28C 和 28D)。通过设定最小对象区域标准 (表 8)，测定每张图像上随时间变化的活性线粒体细胞数量 (图 28E)。然后将这一数字除以之前确定的细胞总数进行归一化，计算动力学活性线粒体细胞百分比 (图 28F)。

图 28E 和 28F 中绘制的曲线验证了喜树碱通过对线粒体膜完整性产生不利影响而诱导细胞死亡这一已知现象^[24]。此外，这些结果证实了 BioSpa 和 Gen5 为使用 TMRE 活细胞线粒体膜电位探针提供准确结果的能力。

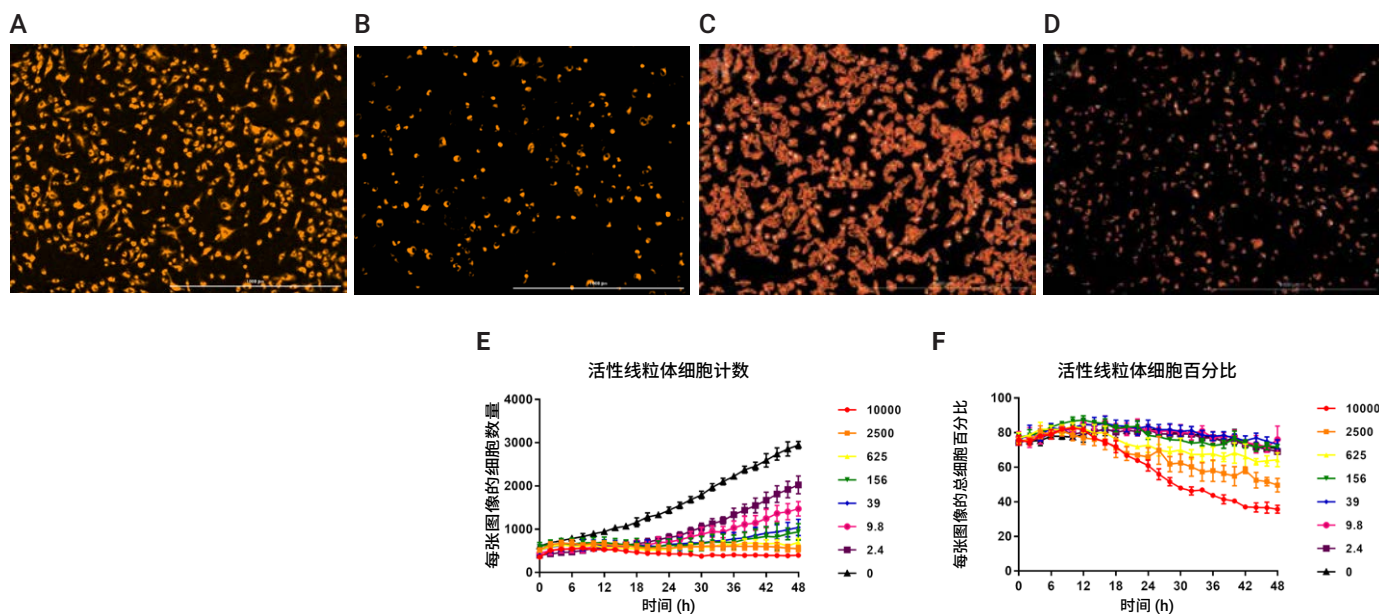


图 28. 活性线粒体成像和分析。用 4 倍物镜和 RFP 成像通道在 2500 nM 喜树碱孵育 (A) 0 小时和 (B) 48 小时后采集的图像。进行细胞分析，在 2500 nM 喜树碱处理 (C) 0 小时和 (D) 48 小时后的活性线粒体信号周围放置二级 Mask。白色：预处理的高对比度明场细胞区域。橙色：TMRE 细胞质信号。红色：对象 Mask。然后绘制每张图像 (E) 总活性线粒体细胞和 (F) 线粒体细胞百分比的动力学曲线

细胞凋亡外部磷脂酰丝氨酸暴露

磷脂酰丝氨酸 (PS) 是一种位于健康细胞膜细胞质表面的磷脂，在细胞凋亡早期转位至外膜。可逆性结合探针 — 活性和凋亡的极性敏感指标 (pSIVA) 与外部暴露的 PS 结合产生强烈的绿色信号，并在 PS 内化时释放。当喜树碱与细胞孵育后 pSIVA 荧光信号增加时，使用 GFP 成像通道检测 pSIVA 荧光信号 (图 28A 和 28B)。通过在细胞质中识别 pSIVA 探针 GFP 信号并标记 Mask 进行次级细胞分析 (图 28C 和 28D)。

由于 pSIVA 探针在诱导细胞凋亡时发出的信号与区域无关，最小对象平均值标准 (表 8) 识别出随时间变化的凋亡细胞 (图 29E)，并再次归一化为总细胞计数 (图 29F)。这些图证实了成像和分析在多重设置中检测和定量喜树碱诱导的 pSIVA 凋亡信号的能力。

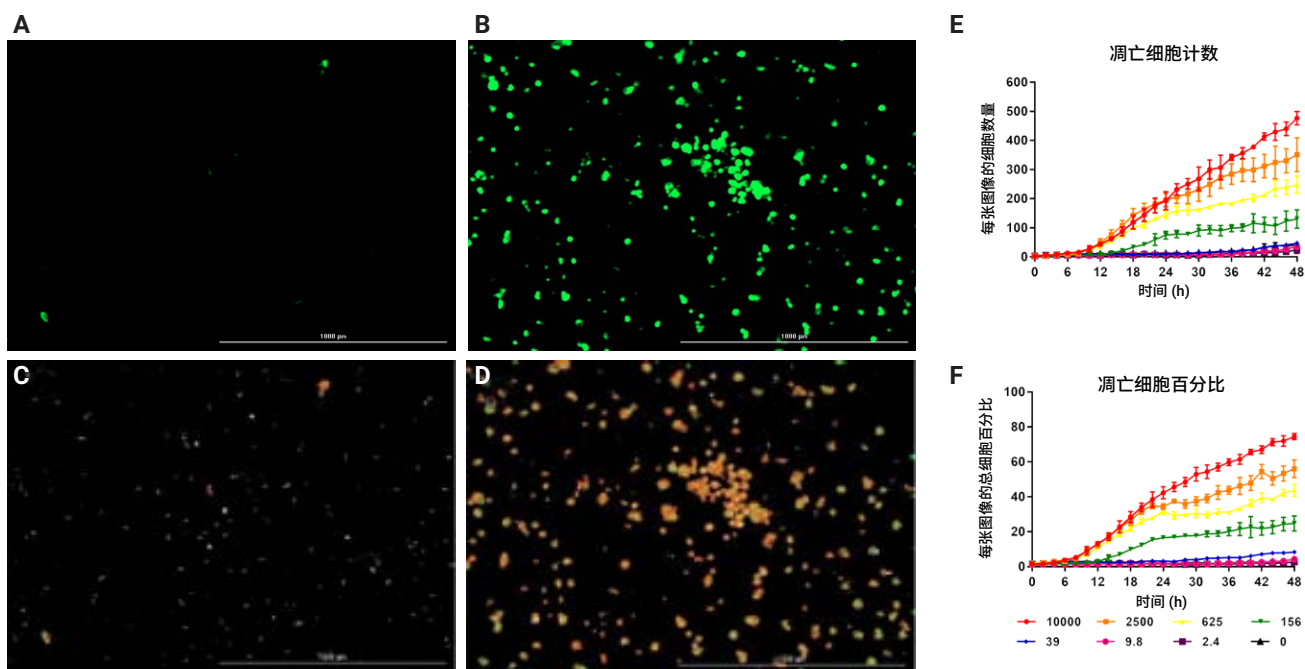


图 29. 细胞凋亡成像和分析。用 4 倍物镜和 GFP 成像通道在 2500 nM 喜树碱孵育 (A) 0 小时和 (B) 48 小时后采集的图像。进行细胞分析，在 2500 nM 喜树碱处理 (C) 0 小时和 (D) 48 小时后的细胞信号标记 Mask。白色：预处理的高对比度明场细胞区域；绿色：pSIVA 细胞质信号；红色：对象 Mask。然后绘制每张图像 (E) 凋亡细胞总数和 (F) 凋亡细胞百分比的动力学曲线

坏死细胞膜完整性丧失

在细胞膜完整性丧失 (坏死指征) 时，远红细胞不渗透染料 — 深红葱酞 7 (DRAQ7) 与细胞核结合，产生红色荧光信号，使用 CY5 成像通道进行捕获。与 pSIVA 类似，喜树碱与细胞孵育后，DRAQ7 荧光信号增加 (图 29A 和 29B)。

使用二级 Mask 标记表达核探针 CY5 信号的坏死细胞。最小对象平均值标准 (表 8) 再次识别出随时间变化的坏死细胞, 并归一化为总细胞计数 (图 30C)。该图进一步验证了成像和分析在多重设置中检测和定量喜树碱诱导的 TMRE、pSIVA 和 DRAQ7 信号变化的能力。

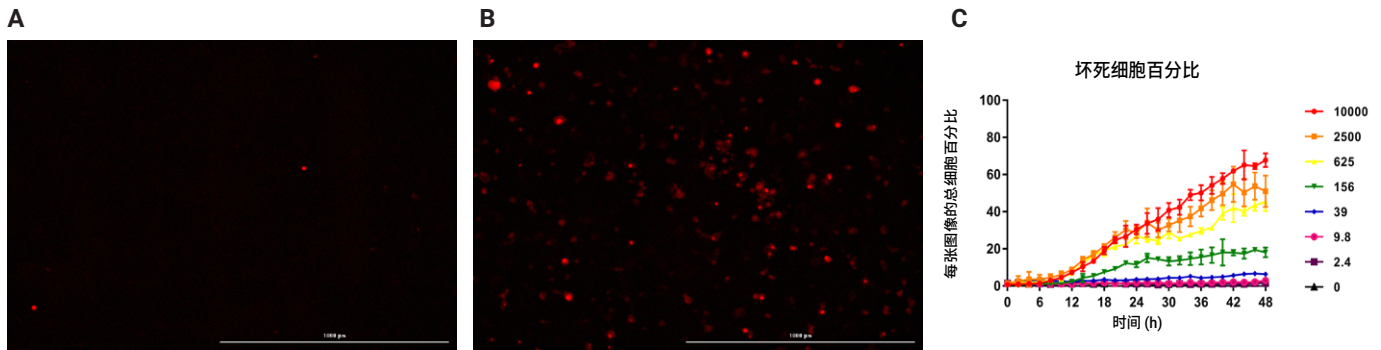


图 30. 细胞坏死成像和分析。用 4 倍物镜和 CY5 成像通道在 2500 nM 喜树碱孵育 (A) 0 小时和 (B) 48 小时后采集的图像。(C) 一级和二级细胞分析后每张图像的坏死细胞百分比

变量孵育分析比较

BioSpa 的一个优点是能够在长时间孵育期内以动力学方式监测喜树碱处理的效果, 而不仅仅是在特定时间点。如图 31 所示, 根据喜树碱处理 0、12、24 和 48 小时后确定的坏死细胞百分比绘制的剂量响应曲线计算得出的 EC_{50} 值表明, 短时间孵育可能会导致对测试分子的真实效力的错误假设。通过结合动力学分析, 可以得出准确的结论。

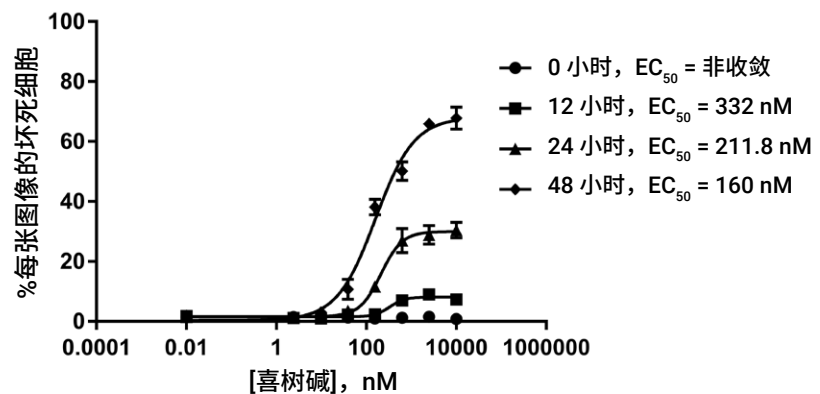


图 31. 每张图像的喜树碱坏死细胞百分比剂量响应曲线。喜树碱孵育 0、12、24 和 48 小时后诱导的每张图像坏死细胞百分比曲线

Cytation 5 上的多个荧光成像检测通道允许在同一孔内多重分析活细胞 TMRE、pSIVA 和 DRAQ7 探针, 为测量多种细胞死亡通路提供了一种简单、可靠的方法。然后, BioSpa 提供的适当环境条件可在较长的孵育时间内自动捕获图像, 提高了

更全面地了解每种测试分子效果的能力。最后，将细胞分析技术与 Gen5 软件相结合，通过查看归一化动力学诱导曲线以及多种测试浓度随时间变化的响应，可以得出准确的结论。

使用 Agilent BioTek 全自动智能活细胞成像分析系统对细胞增殖、活力、凋亡和坏死进行标记测量的最新出版物

1. K. Baergen, L. M. Jeusset, Z. Lichtensztejn, 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.

使用明场显微镜实时监测酿酒酵母生长

检测原理

酵母是单细胞真核真菌生物，通过出芽或分裂进行无性繁殖（图 32）。虽然酵母的大小各不相同，但它们的直径通常为 3–8 μm 。酿酒酵母是科学研究、烘焙和发酵中最常用的菌种，并且已经成为“酵母”这个词的代名词。

在固定环境中培养时，酵母细胞遵循极易预测的生长模式，该模式可简单分为四个阶段：(1) 缓慢期；(2) 指数期；(3) 减速期；和 (4) 稳定期。在缓慢期，由于新引入的酵母需要成熟和适应环境，因此没有生长。随后是指数期，细胞迅速生长和分裂。相对于细胞数量，营养物质过剩，废物被充分稀释，变得不明显。这一阶段的生长速率遵循一级动力学。随着细胞数量的增加，由于一些参数（如底物和废物）会产生明显的饱和效应，细胞的生长速率开始减慢。最终酵母细胞进入稳定期，在这一阶段，由于废物浓度高或底物完全消耗，细胞不会生长（图 33）。

遗憾的是，这些不同的阶段给解析生长数据带来了困难。静态环境中的生长速率不仅取决于酵母细胞的生长能力，还取决于环境条件，如营养物质的消耗或废物副产物的积聚。使用灌注系统可以维持适当的生长营养物质，并在产生废物时将其排出，生长仅受物理空间的限制。

酵母生长实验通常在微孔板中使用光散射垂直光度法进行，支持快速测试大量不同的实验条件。这种方法可以间接测量细胞数量，但当酵母细胞悬液发生絮凝，无法再保持悬浮状态，在孔底形成不透明的团块时，该方法就会受到影响。这种现象会导致异常高的吸光度，使分析变得困难甚至不可能。由于该技术使用光散射而不是真实的吸光度，因此使用不同的光学元件（即不同的微孔板检测仪类型）进行测量会得出不同的值。同样，比较不同大小的不同酵母菌株通常存在问题，因为细胞大小对光散射有实质性影响。

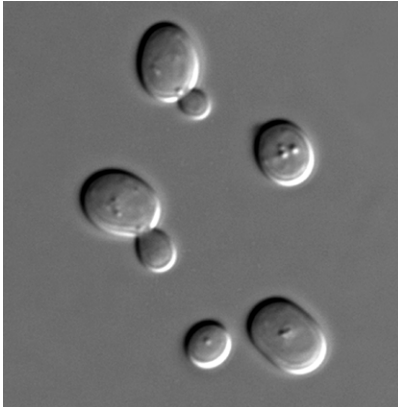


图 32. 酿酒酵母

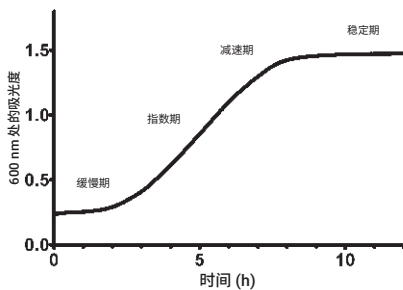


图 33. 典型的酵母生长曲线。酿酒酵母混悬液在 YPD 培养基中于 30 °C 下生长 12 小时，使用 Agilent BioTek Synergy H1 多功能微孔板检测仪每 2 分钟测量一次数据

经典 ONYX 孔板

ONIX Y04C-02 微流控板是一种 4 腔室细胞培养板，设计用于与 ONIX2 微流控系统配合使用，对单倍体酵母细胞进行灌注研究。Y04C 孔板有 4 个独立单元 (A-D)，每个单元有 6 个入口孔 (1-6)、1 个细胞入口 (8) 和 1 个大出口孔 (7)。每排孔 (A-D) 对应相应的培养室 (图 34)。

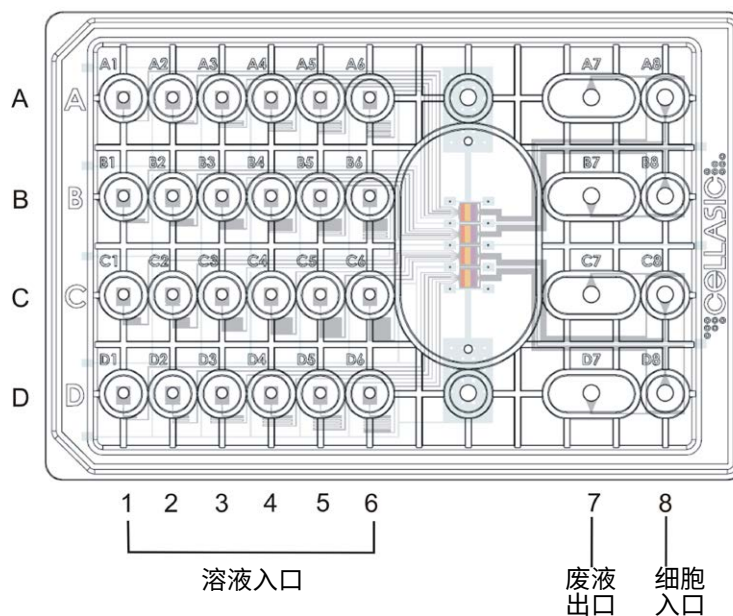


图 34. ONIX CellASIC 孔板配置

所有四个培养室均位于单个观察窗中，以尽量减少成像物镜的 X-Y 移动。每个培养室有 6 个单独的微流控入口，用于提供试剂和生长培养基 (图 35)。

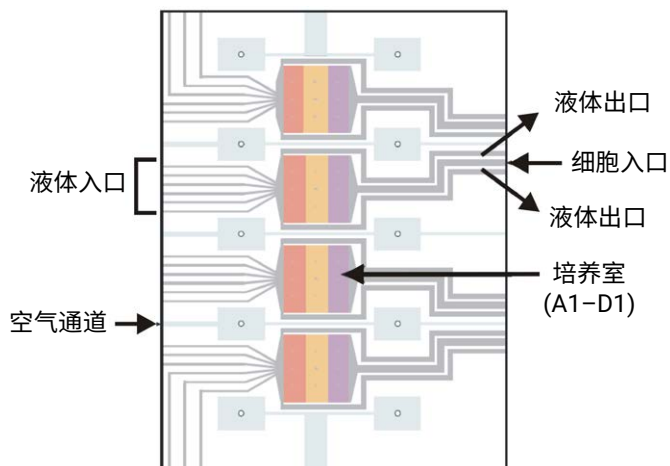


图 35. CellASIC 腔室观察窗。CellASIC 有四个完全独立的观察室，每个观察室有 6 个不同的灌注液入口来源。图中所示为 C1 观察室

每个腔室的面积为 $3.0 \text{ mm} \times 3.0 \text{ mm}$ ，玻璃与顶板之间的高度不同 (3.5、4.0、4.5 μm)。当从细胞入口源穿过腔室时，捕集阱高度随之降低 (图 36)。

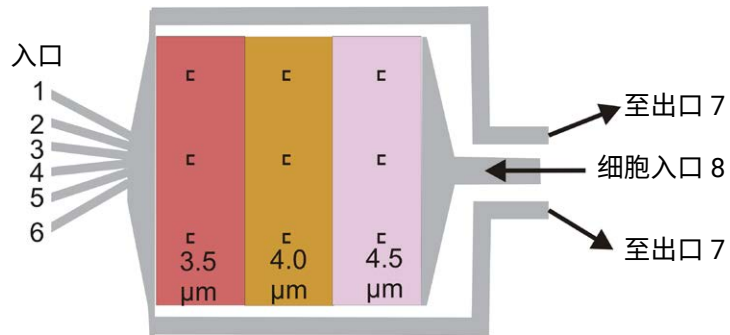


图 36. 培养室。培养室有 9 个位置标记“c”和 3 种不同的捕集阱高度

每个观察室都使用弹性顶板将细胞固定在成像玻璃表面，以保持单一焦平面。当细胞在压力作用下穿过观察室时，它们最终会被捕获并稳定在弹性顶板和成像玻璃表面之间 (图 37)。

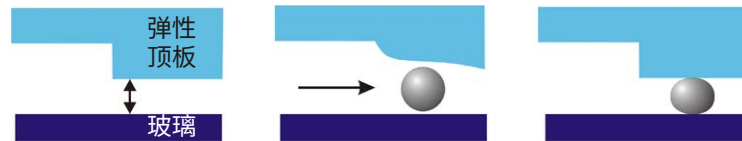


图 37. 细胞捕集机制

材料与方法

Bacto 酵母提取物、葡萄糖、Bacto 蛋白胨、氯化钠、磷酸二氢盐和磷酸氢二盐粉末以及乙醇来自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)。酵母菌株 By4742 来自 ATCC (货号 4012458)。通过将 10 g Bacto 酵母提取物、20 g Bacto 蛋白胨和 20 g 葡萄糖溶于 1 L 水中并进行高压灭菌，制备酵母提取物-蛋白胨-葡萄糖 (YPD) 培养基。必要时，用 Milli Q 水或指定试剂稀释 YPD。

所有实验均遵循相同的一般格式。使用 YPD 培养基 (50 mL) 的酵母过夜储备培养物在温度为 $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ，转速为 125 RPM 的轨道式振荡条件下，在 250 mL 锥形瓶中培养。在进行生长实验前，用新制 1x YPD 培养基将 $100 \text{ }\mu\text{L}$ 各过夜储备培养物稀释至 9.9 mL。然后使用细胞入口孔 (位置 8) 将稀释的细胞 ($50 \text{ }\mu\text{L}$) 加载到 CellASIC Y04C-02 孔板中。根据实验要求，将试剂加载至溶液入口 (位置 1-6)。使用 ONIX2 微流控系统 (Millipore-Sigma) 控制灌注时间和速率。灌注压力设定为 10 kPa，除非另有说明，否则在加载后立即开始灌注。

成像

使用配备 20 倍物镜的 Agilent BioTek Lionheart FX 全自动智能成像分析系统，每 5 分钟拍摄一次蒙太奇明场图像 (2 × 2)，持续 12 小时。在每次实验开始时手动优化相机曝光设置，并使用激光自动对焦保持图像对焦。启用温度控制，除非另有说明，将温度设定为 30 °C。

分析

使用线性混合融合方法对蒙太奇明场图像进行拼接。通过拼接明场图像的对象 Mask 计数评估细胞生长，以识别酵母细胞。将背景选择设定为“Light”，rolling ball 设定为 3 μm，用于淡化背景。Mask 阈值设定为 4500，排除小于 1 μm 或大于 10 μm 的物体。

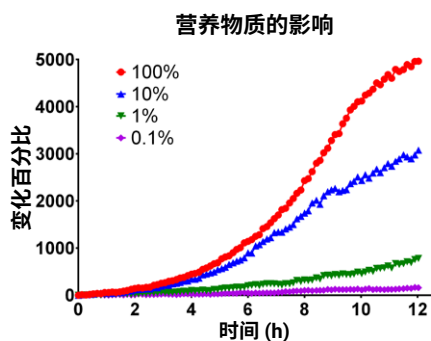


图 38. 营养物质浓度对酵母细胞生长的影响

结果与讨论

培养基浓度

通过稀释 YPD 培养基研究营养物质浓度对细胞生长的影响。用水对未稀释的 YPD (100%) 进行 1:10 系列稀释，然后灌注到观察室中。如图 38 所示，生长营养物质的稀释对细胞生长速率具有显著影响。当培养基中的营养物质被水稀释后，细胞的增殖速率会急剧下降。用 1000 倍稀释的 YPD 灌注 12 小时后，细胞几乎没有生长，而完全培养基在同一时期则使细胞数量增加了 5000%。

盐敏感性

当酵母细胞在不含有去离子水或蒸馏水稀释的配制营养物质的混合物中繁殖时，需要注意生长培养基的离子强度。例如，污染水的修复或纤维素消化物的发酵可能不同，并可能含有大量的离子。

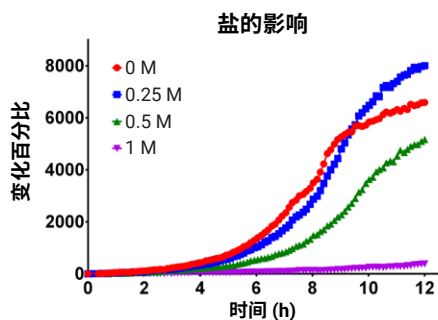


图 39. 离子强度对酵母细胞生长的影响。用含有不同浓度氯化钠的 YPD 培养基灌注酵母细胞，并对细胞进行明场成像。绘制图像分析细胞计数与时间的关系图。每个数据点代表单个观察室的一个时间点

在高氯化钠浓度条件下生长时，酵母细胞表现出很强的耐受性（图 39）。通过向加载细胞灌注含外源性 NaCl 的 YPD，评估了离子强度对酵母细胞生长的影响。加入 4 份 NaCl 稀释液，使最终氯化钠浓度范围为 0-1 M。所有腔室中 YPD 的浓度相当 (90%)。虽然高盐浓度 (1 M) 有效地阻止了细胞增殖，但灌注 0.5 M 氯化钠的酵母能够生长至接近未处理酵母培养物浓度的 80%。低盐条件下的细胞生长与未经处理的细胞相当或略优于后者。

pH 敏感性

为了测试 pH 值对酵母细胞生长的影响，在 pH 值为 4.5–9.5 的范围内，向酿酒酵母培养物灌注添加了 20 mM 磷酸盐的 YPD。在所有培养物中，按体积计算，YPD 占混合物的 80%，磷酸盐缓冲液占剩余的 20%。

与碱性条件相比，酵母在酸性条件下生长情况更好。这在图 40 中得到证实，其中用 pH 4.5 YPD 混合物灌注的细胞的生长浓度几乎是 pH 7.5 培养基条件下的两倍。碱性混合物 (pH 9.5) 的生长速率明显低于酸性培养物，但仍能进行复制。

乙醇耐受性

酵母在发酵糖类时会产生副产物乙醇和二氧化碳。当废物副产物的浓度变得很高时，它的存在会对细胞生长产生不利影响。在研究乙醇的影响时我们发现，高浓度的乙醇对 By4742 菌株的酵母生长具有明显的抑制作用。这些细胞对 1% 或更低的乙醇水平的耐受性非常强。高于这些水平时，观察到酵母菌株的生长显著减少 (图 41)。

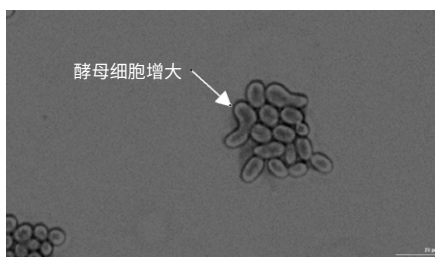


图 42. 细胞周期停止的酿酒酵母细胞的明场图像。使用 60 倍空气物镜对经 30 μ M 诺考达唑处理 3 小时的酵母细胞进行明场成像

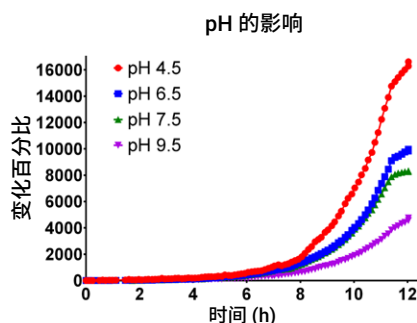


图 40. pH 对酵母细胞生长的影响。将酵母细胞装载至 CellASIC 孔板，用含有不同 pH 值磷酸盐缓冲液的 YPD (80%) 进行灌注。数据表示相对于初始读数的细胞数量变化百分比。每个数据点代表单个观察室的独特时间点

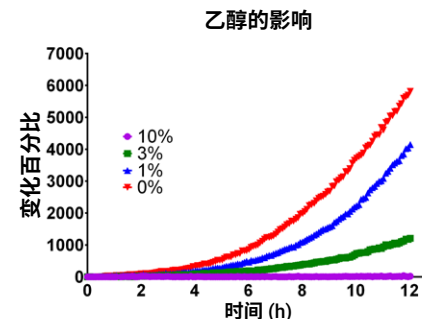


图 41. 乙醇对酵母细胞生长的影响。将酵母细胞装载至 CellASIC 孔板，用含有不同浓度乙醇的 YPD (90%) 进行灌注。数据表示相对于初始读数的细胞数量变化百分比。每个数据点代表单个观察室的一个时间点

诺考达唑暴露

诺考达唑是一种强效抗肿瘤药物，通过干扰微管的聚合发挥作用^[25]。在芽殖酵母中，它能使细胞停滞在细胞周期的 G2/M 期，导致大芽不与母细胞分离 (图 42)。

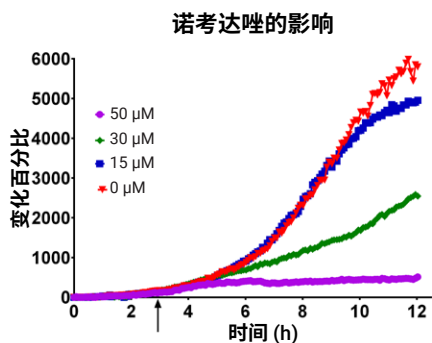


图 43. 诺考达唑灌注酵母细胞的动力学生长曲线。将酵母装载至 CellASIC 孔板，并立即灌注 YPD 培养基。3 小时后，更换灌注混合物，在 YPD 中加入不同浓度的诺考达唑。箭头表示开始灌注诺考达唑。数据点反映了单个观察室初始细胞计数的百分比变化

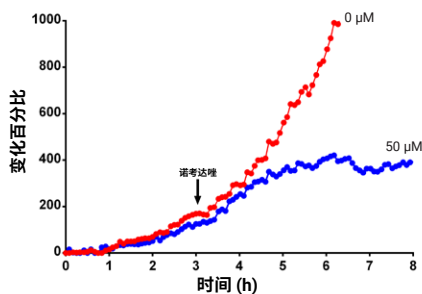


图 44. 用 0 μM 或 50 μM 诺考达唑灌注的酿酒酵母细胞计数比较。将酵母细胞加载到 CellASIC 孔板上，用 YPD 培养基灌注使其生长。3 小时后，将灌注混合物换为含有 0 μM 或 50 μM 诺考达唑的 YPD。数据反映了不同细胞的动力学细胞计数

停滞在 G2/M 期的芽殖子酵母细胞通常不会与母细胞分离，并且通常表现出扩大的表型。这种现象表现为细胞增殖减少。如图 43 所示，诺考达唑对细胞周期的阻断具有浓度依赖性。暴露于 50 μM 诺考达唑的细胞在暴露后不久便几乎停止增殖。在较低浓度下，观察到细胞增殖减少（图 43）。

图 44 显示了灌注的有效性。将酵母细胞接种至 CellASIC 孔板中并灌注 YPD 培养基后，细胞数量会通过细胞出芽而增加。开始灌注 50 μM 诺考达唑后不久，培养物停止分裂，细胞数量不再增加。在同一时间接种的培养物则继续出芽，细胞数量迅速增加。

这些数据表明，Lionheart FX 与 ONIX2 微流控平台结合使用，能够通过细胞计数对酵母的生长情况进行定量。CellASIC Y04C 孔板使用不同尺寸的捕集阱固定母细胞，进行重复成像。通过明场成像和数字图像分析，可以对细胞进行实时定量。

对培养物进行灌注不仅能补充新鲜营养，还能清除废物。以乙醇发酵为例。这种废弃产物可能会积累到一定水平，从而有效地阻碍细胞生长，并与营养物的可利用性无关。通过连续流系统去除该副产物，可以防止副产物积累导致细胞进入稳定期。在菌株开发的背景下这将避免对乙醇具有抗性需求的开发。

从一般意义上讲，使用灌注可以使细胞生长不减弱，几乎完全消除在静态实验中观察到的稳定期，因为静态实验中未添加营养物质，也未持续清除废物。当观察区域腔室完全填充后，细胞生长将细胞推出成像区域，细胞计数开始趋于平稳。使用大型蒙特奇成像可延长实验窗口期。

这些数据表明，使用 Lionheart FX 和 ONIX2 微流控平台可以监测环境和药物诱导的酵母细胞生长变化。请注意，该方法获得的数据为实际细胞数，而不是基于光散射的间接测量。这些实验使用长时间的动力学运行来分析酵母菌株的能力。值得注意的一点是，尽管生长速率明显不同，但一些不同的培养条件会产生相同的最终细胞密度。如果在长时间培养结束时进行终点测定，就会忽略这一发现。Gen5 能够实时自动计数酵母细胞，从而简化了数据分析。

使用 Agilent BioTek 全自动智能活细胞成像分析系统测量非哺乳动物细胞增殖的最新出版物

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

参考文献

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

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。
RA44173.6644675926

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
5994-2568ZH-CN
AG082120_02

