

卓越显微成像技术推进 3D 生物学发展

自动化共聚焦显微成像技术



目录

细胞球体的共聚焦成像和分析以确定药物处理的剂量响应	4
在单台仪器上进行多种类型检测的能力可简化检测的开发和优化	4
使用 Cytation C10 共聚焦微孔板成像检测系统进行小鼠视网膜血管成像	7
系统克服了使用宽场显微镜评估小鼠视网膜的相关挑战	7
使用 Cytation C10 共聚焦微孔板成像检测系统进行脊髓运动神经元和 肌肉系统的整体生物成像	10
当对厚样本成像时，亚细胞细节的清晰视图现在成为可能	10
斑马鱼眼结构的整体免疫荧光成像	13
使用 Cytation C10 共聚焦微孔板成像检测系统进行可靠的自动化共聚焦成像	13



Agilent

Trusted Answers



台式微孔板成像和分析的主力仪器

Agilent BioTek Cytation C10 共聚焦微孔板成像检测系统

从共聚焦、宽场和活细胞成像到多功能检测，Agilent BioTek Cytation C10 共聚焦微孔板成像检测系统为您带来高分辨率的清晰图像和 3D 样品的成像及分析能力。此外，您无需预订使用中心实验室，能够更全面地掌控您的工作流程。体积小，功能强大 – 所有实验室的理想选择。

www.agilent.com/lifesciences/CytationC10

仅供科研使用。不用于临床诊断用途。
RA.44158.3299537037

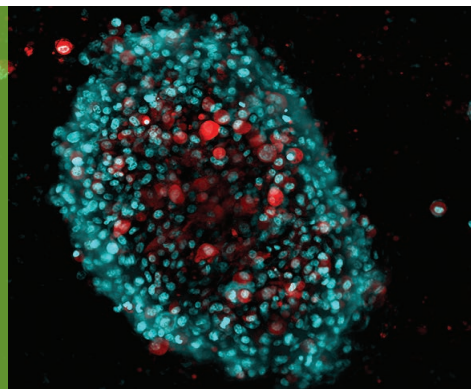
© 安捷伦科技（中国）有限公司，2021



全新 Agilent BioTek Cytation C10 共聚焦微孔板成像检测系统

细胞球体的共聚焦成像和分析以确定 药物处理的剂量响应

在单台仪器上进行多种类型检测的能力可简化检测
的开发和优化



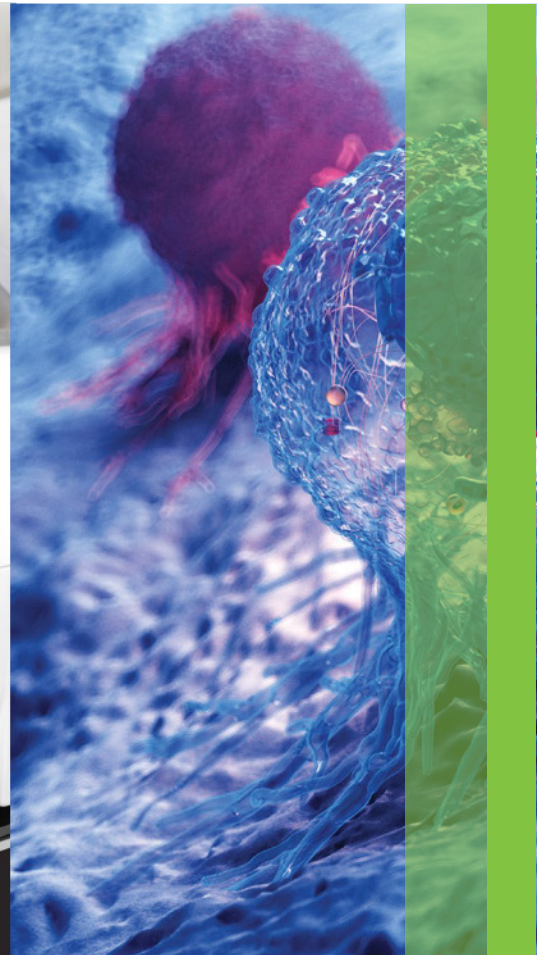
前言

上一个十年见证了三维 (3D) 细胞和组织使用的爆炸式增长，它们来源广泛，提供了更复杂的生物学模型。这些 3D 模型在医学研究、精准医疗、疾病建模和药物发现等领域的应用不断增加。这些模型更能代表生物体内的原生微环境，并被认为是某些情况下可提供更准确的检测模型。3D 模型经常被拿来与广泛使用的二维 (2D) 模型进行比较，后者由单层细胞构成，使用已达数十年之久。

使用 2D 检测可提供有意义的数据，但其局限也日益明显。近来许多研究的重点放在了开发由一种或多种细胞类型构成的复杂类器官、组织或肿瘤细胞团，它们往往基于干细胞或来自患者的样本。

考虑到许多实验室的试验台空间有限，能在体积小巧的单台仪器上进行多种类型检测是一项巨大优势。Cytation C10 共聚焦微孔板成像检测系统可在单台仪器上进行微孔板检测、宽场成像及共聚焦成像，为如今许多复杂研究提供了收集所需广泛数据的方法。本应用公告描述了使用自动化成像检测准确确定球体中的细胞数，以用于评价药物剂量响应。

本应用简报介绍了如何使用自动化成像方法准确计数球体样本中的细胞数量，以 3D 模型评价药物剂量响应。



自动化活细胞分析

Agilent BioTek BioSpa 活细胞分析系统

BioTek BioSpa 活细胞分析系统提供多种活细胞成像应用，一次实验可处理多达 8 块微孔板或其他样品容器。系统可使用五种成像模式捕获详细的细胞图像，为迁移和划痕愈合实验、3D 细胞球体形成以及许多其他动力学应用提供细胞水平的分析。

www.agilent.com/lifesciences/Biospa8



Agilent BioTek BioSpa 8
全自动培养箱

仅供科研使用。不用于临床诊断用途。
RA44627.4599768519

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2022

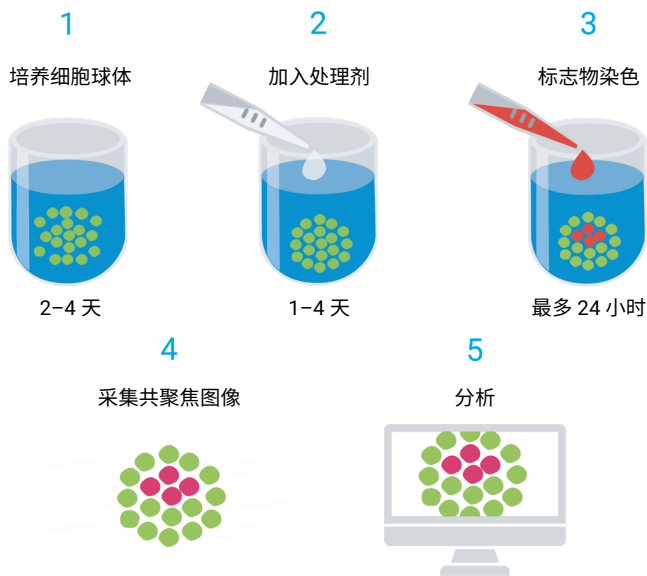


图 1. 细胞球体检测工作流程包括自动化图像采集与分析，由 Cytation C10 共聚焦微孔板成像检测系统和 Gen5 微孔板检测与成像分析软件完成

材料与方法

HCT116-H2B-GFP 细胞由 University of Vermont 的 Stumpff 实验室提供。H2B-GFP 结构提供了一个共表达的核标记，用于通过细胞计数进行定量，以便在活细胞分析中与核染色进行比较。将细胞以 500 个细胞/孔的相对较低密度接种于 96 孔圆底 ULA 成像板（货号 4520, Corning (Corning, NY)）根据条件培养 3 至 4 天，使细胞球的粒径可以达到 100 μm 左右。选择蛋白激酶的强效非选择性抑制剂十字孢碱，作为已知的凋亡诱导剂。

同时加入碘化丙啶 (PI) 进行动态监测，以确定最佳分析时机。实验证明，加入后 12 小时足以表现出显著的凋亡活性用于分析。

成像步骤和分析

选择合适直径的 3D 细胞球体，以便使用 20x 物镜时可以在单个视野中捕获整个样本，减少数据量。此外，使用 beacon 功能标定球体的 x 轴和 y 轴位置，确保每一次成像都能精准定位。尝试发现使用 60 μm pinhole 转盘可为共聚焦成像采集时间与信号强度之间提供最佳平衡。在 GFP 和 TRITC 通道采集宽场图像，以便与共聚焦图像进行比较。

聚焦方式先使用“Scan”对球体进行扫描，然后使用“Autofocus”进行自动聚焦。这种聚焦方法可沿着 Z 轴方向识别球体的近似中心，不管球体在微孔板中何种位置，都可以以 10 μm 为步进，对球体进行 11 层层切成像。图像经过包括 Z 轴叠加等多步骤处理之后，可以对接近球体中心的单层细胞图像与 Z 轴叠加后的图像进行比较。

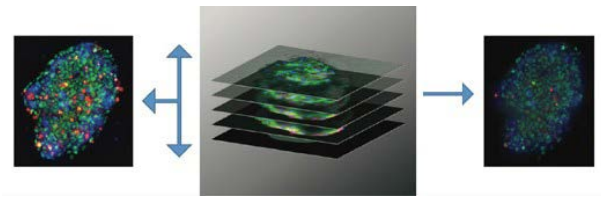


图 2. 以 10 μm 为步进，对球体沿 z 轴方向进行 11 层聚焦成像，对所有图像的 z 轴叠加或对代表穿过球体近似中心位置的平面的单层图像进行分析

自动细胞计数使用共聚焦和宽场成像模式进行，对单平面的图像和 z 轴层切的叠加图像进行分析。

结论

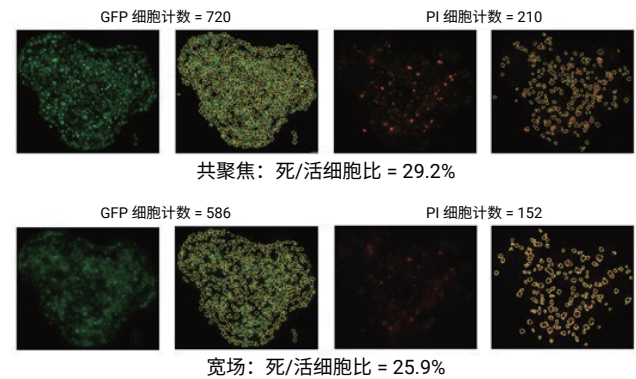
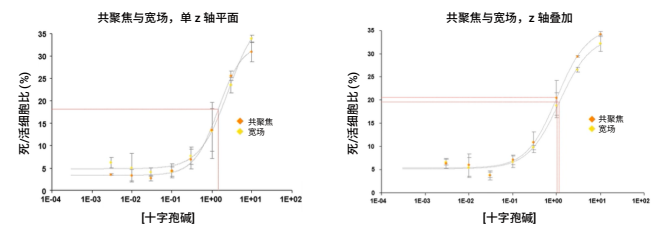


图 3. 通过共聚焦和宽场荧光显微成像使用 z 轴叠加图像进行自动化图像采集和细胞计数分析的代表性示例。黄色轮廓代表细胞被自动识别，GFP 细胞计数表示活细胞，PI 表示死细胞



十字孢碱 (EC ₅₀)(μM)		
共聚焦	单 z 轴平面	1.5
	Z 轴叠加	1.0

图 4. 各成像模式（单张图像与 z 轴叠加图像）下确定 EC₅₀

细胞球体越来越多地用于代表更复杂的生物系统微环境。使用多种成像模式进行自动图像采集及进行自动化图像分析的能力可大幅提高通量并允许进行比较分析。实验结果表明，与宽场光学元件相比，共聚焦光路能对细胞球体样品中标记细胞实现更准确的分割与识别。发现使用单 z 平面图像的细胞计数测定可提供与依赖 z 轴层切图像采集和处理的方法相近的结果。该研究提供的案例证实了 Cytation C10 共聚焦微孔板成像检测系统与 Gen5 微孔板检测和成像分析软件在捕获与分析多组平行数据集方面的灵活性，使用单台紧凑型仪器可帮助您简化方法开发和优化流程。

使用 Cytation C10 共聚焦微孔板成像检测系统进行小鼠视网膜血管成像

系统克服了使用宽场显微镜评估小鼠视网膜的相关挑战



前言

小鼠视网膜是研究血管生成及其相关病理使用最为广泛的体内系统之一。实际上，小鼠出生时并没有视网膜血管系统，但在其出生后第一周内，视网膜血管迅速从视神经开口向视网膜表面的周围呈放射性扩张（图 1A）。位于扩张前端的是特化的尖端内皮细胞，利用基于肌动蛋白的细胞延伸（称为丝状伪足）感知生长因子梯度（图 1B）。这些丝状伪足的宽度在数百纳米范围内变化。一旦初始的血管系统到达视网膜外围，新生的血管便开始分枝进入视网膜内部，最终成熟为三层血管丛（图 2A）。

视网膜血管系统非常适合高分辨率成像，因为其位于视网膜前 50–60 μm 表面处（图 2B）。尽管这种血管系统的可达性相对理想，但丝状伪足的宽窄度和想要获得足够分辨率图像以识别多层血管丛所需要的深度对宽场显微镜构成了重大挑战（图 1）。本应用简报介绍了使用 Cytation C10 共聚焦微孔板成像检测系统联合 Gen5 微孔板检测与成像分析软件克服这些挑战的方法，生成更清晰的小鼠视网膜血管系统图像。

小鼠视网膜成像的样品前处理

成年和出生 4 天 (P4) 小鼠眼睛购自 Brainbits, LLC (Springfield, IL)，置于 Hibernate A 完全培养基中保持活性连夜运送。样本送达后，移除角膜，立即使用 4% 多聚甲醛 (PBS) 固定眼睛 2 小时。

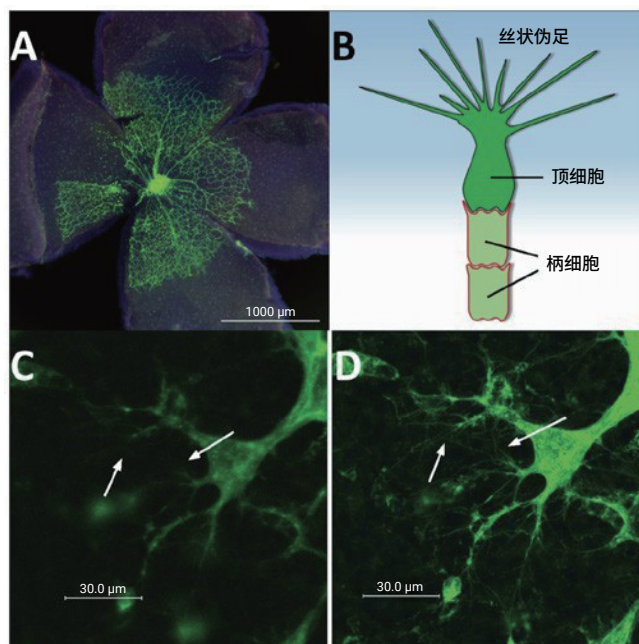


图 1. 发育中的小鼠视网膜血管系统中的丝状伪足。(A) 固定于载玻片上的完整新生小鼠视网膜 (P4)，4 倍放大倍率下成像。绿色：凝集素 B4-Alexa Fluor 488，蓝色：Hoechst 33342，红色：Alexa Fluor 546-鬼笔环肽。(B) 尖端内皮细胞伸展出的丝状伪足的示意图。(C) 和 (D) 血管扩展前沿处带丝状伪足（白色箭头）的尖端内皮细胞，以 (C) 宽场模式，(D) 共聚焦模式 (60 μm 盘) 40x 物镜 (0.6 NA) 成像。5 μm z 轴层切生成最大强度投影。绿色：凝集素 B4-Alexa Fluor 488

固定后，眼杯上从前到后切开四条切口，随后使用镊子将视网膜从巩膜上轻轻剥离。因眼球为球形，故需切口以使其平整地置于盖玻片与载玻片之间。随后，视网膜在 0.5% Triton X-100 中透化约 1 小时，再用 5% BSA 封闭。封闭的视网膜随后使用兔抗-GFAP 抗体（货号 RPCA-GFAP，EnCor Biotechnology, Inc. (Gainesville, FL)）及凝集素 B4-Alexa Fluor（货号 121411，Thermo Fisher Scientific (Waltham, Ma)）进行免疫染色，4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。使用含 0.1% 吐温 20 的 PBS 清洗视网膜三次后，使用与 Alexa Fluor 555 偶联的羊抗兔二抗（货号 A21428，Thermo Fisher Scientific (Waltham, Ma)）孵育。

最后，使用 Fluoromount-G (货号 0100-35, Southern Biotech (Birmingham, AL) 将视网膜固定于载玻片与 #1.5 玻璃盖玻片之间。

成像步骤及处理

使用 Cytation C10 共聚焦微孔板成像检测系统和 Gen5 软件以手动模式 (IMM) 40 倍放大倍率捕获 P4 (图 1) 以及成年小鼠视网膜 (图 2 和图 3) 的共聚焦和宽场 z 轴层切图像。一旦确定了感兴趣的区域，通过选择“显示饱和像素”按钮将每个通道的动态范围最大化。调整各通道的曝光设置，避免过曝。通过上下调节样品，直到目标结构 (本例中为血管) 强度减弱，确定 z 轴范围。z 轴步进使用 Nyquist 采样推荐设置；使用 40x 空气物镜 (NA = 0.6) 对 Alexa Fluor 488 成像时，宽场模式和共聚焦模式的步进分别设为 1 μm 和 0.6 μm 。原始图像使用基于物镜的点扩散函数进行五次反卷积迭代。然后对反卷积图像进行预处理以减少背景信号。用于 IB4-AF488 (GFP 通道) 和 $\alpha\text{GFAP-AF555}$ (TRITC 通道) 背景扣除的滚球大小均设为 50 μm 。对于 P4 视网膜，对整个 z 轴层切图应用最大强度投影以显示丝状伪足 (图 1C 和图 1D)。对于成年视网膜，生成分区的 z 轴叠加图，分离出三个成熟的视网膜血管丛 (浅表丛、内丛和深丛) (图 2C)。最后，为更好地显示发育成熟的血管系统的三层血管丛，使用 Gen5 中的 3D 查看器生成 3D 渲染图。通过旋转的 3D 渲染 z 轴层切图显示正交 x-y 方向，展现了增强的 z 轴分辨率。

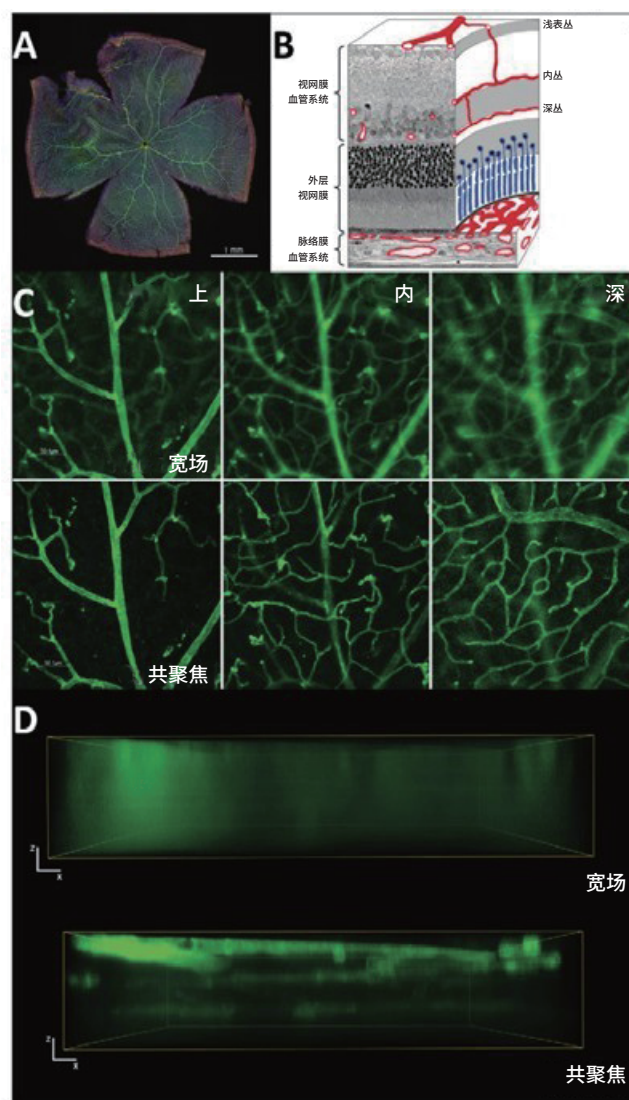


图 2. 发育成熟的小鼠视网膜的血管丛。(A) 固定于载玻片上的完整成年小鼠视网膜 (3 月龄)，4 倍放大倍率下成像。拼接图像由 5x5 蒙太奇生成。绿色：凝集素 B4-Alexa Fluor 488，蓝色：Hoechst 33342，红色：Alexa Fluor 546-鬼笔环肽。(B) 完全成熟的视网膜横切面示意图，显示三层血管丛，包含三层：上、内和深丛^[1]。(C) “分区的”最大强度投影，分离出成熟视网膜血管系统的三层血管丛，在 40 倍放大倍率 (0.6 NA) 下以宽场 (上图) 或共聚焦 (下图；60 μm 盘) 成像。从包含整个三层血管丛的 z 轴层切图提取。(D) 发育成熟血管丛的正交视图 (xz)，在 40 倍放大倍率 (0.6 NA) 下以宽场或共聚焦模式成像。使用 Gen5 微孔板检测与成像分析软件内的 3D 查看器渲染 z 轴层切图

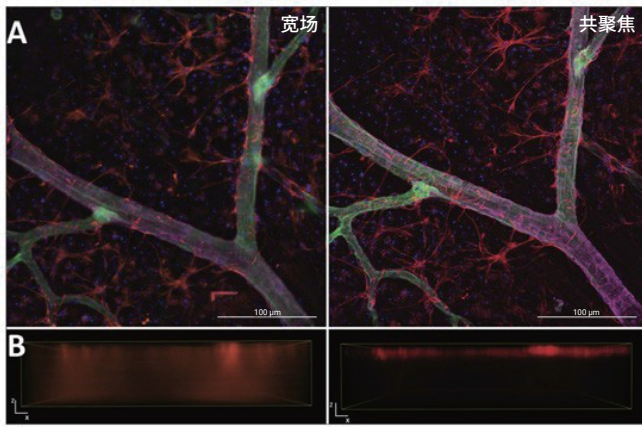


图 3. 星形胶质细胞与上血管丛相互交织。(A) 整体的成年小鼠视网膜 (3 月龄) 使用 α GFAP (lexa Fluor 555 二抗) 及凝集素 B4-Alexa Fluor 448、Hoechst 33342 和 Alexa Fluor 647-鬼笔环肽进行免疫染色。在 40 倍放大倍率 (0.6 NA) 以宽场或共聚焦模式 (40 μ m 盘) 捕获 z 轴层切图, 并生成最大强度投影。(B) 整个血管丛的正交视图 (xz), 在 40 倍放大倍率 (0.6 NA) 下以宽场或共聚焦模式成像。星形胶质细胞仅位于上丛内。使用 Gen5 微孔板检测与成像分析软件内的 3D 查看器渲染 z 轴层切图

结论

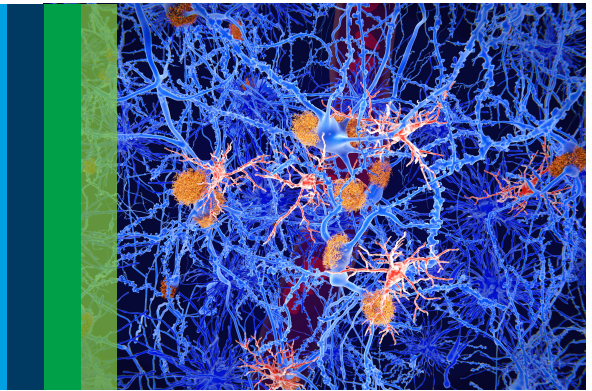
小鼠视网膜是一个成熟的体内实验系统, 用以研究血管生成及血管病理。为评估对视网膜血管系统的药理作用或基因扰动, 获得尽可能清晰的图像至关重要。与宽场显微镜相比, 本应用简报显示: 与宽场显微镜相比, Cytation C10 共聚焦微孔板成像检测系统能够提高这种组织成像的分辨率。

参考文献

1. Sim & Fruttiger. Ophthalmology: Keeping Blood Vessels Out of Sight. eLife 2013;2:e00948 DOI: [10.7554/eLife.00948](https://doi.org/10.7554/eLife.00948)

使用 Cytation C10 共聚焦微孔板成像检测系统进行脊髓运动神经元和肌肉系统的整体生物成像

当对厚样本成像时，亚细胞细节的清晰视图现在成为可能



前言

长期以来，斑马鱼因其生物学和实用性优势，在发育生物学研究中一直扮演着重要的角色。最近，斑马鱼对基因组编辑技术（如 CRISPR）、高通量筛选和药物发现毒理学研究中的预测价值的适应性^[1]，再加上它们非常容易通过光遗传学操作和活体成像技术进行研究，进一步突显了其作为一种健康研究工具的重要地位。事实上，斑马鱼正在降低体内研究破坏性神经退行性疾病的障碍，如肌萎缩性侧索硬化症（ALS，也称为 Lou Gehrig's 病）^[2]，因为斑马鱼的完整脊髓神经元和肌肉单位组织完全可以通过光学显微镜观察到。

本应用简报介绍了新推出的 BioTek Cytation C10 共聚焦微孔板成像检测系统的整体生物成像能力，重点关注斑马鱼模式生物的脊髓运动神经元、神经突触和肌肉组织。转盘共聚焦系统的光学层切成像对于解决深层组织结构（如精细神经元过程）至关重要，并且在成像厚样本时提供更清晰的亚细胞细节视图。

材料与方法

除非另有说明，所有化学品均购自 Sigma Aldrich (St. Louis, MO)。斑马鱼的一般养护遵循既定的方法^[3]。野生型雄性和雌性斑马鱼 (*Danio rerio*) 饲养温度为 28 °C，光/暗周期为 14/10 小时。成鱼交配产卵后，鱼卵迅速收集于 EM3 培养基中^[4]，胚胎在受精后 24 小时于 EM3 中使用 0.003% 苯基硫脲进行处理以减少色素沉积。按以下步骤处理胚胎进行免疫组织化学法染色：受精后 3 天 (pec-fin 阶段)，人工对胚胎去绒膜、麻醉，并用 4% 多聚甲醛 (PFA) 于磷酸盐缓冲液 (PBS) 中固定，4 °C 过夜。孵育过后，将固定的胚胎从 PFA 中取出，用含 1% 吐温 20 的 PBS (PBST) 冲洗。胚胎按以下连续步骤进行透化：固定的胚胎使用 ddH₂O 冲洗，随后浸入预冷至 -20 °C 的丙酮中 8 分钟，再用透化缓冲液 ddH₂O 冲洗，最后用 PBST 冲洗。胚胎随后在室温下于透化缓冲液（含 3% TritonX-100 和 1% DMSO 的 PBST）中孵育 1 小时，随后在室温下于封闭缓冲液

（含 3% BSA、1% Triton-X-100 和 1% DMSO）中孵育 1 小时。透化并封闭后的胚胎于一抗和染色剂混合物中孵育，4 °C 过夜，一抗与染料比例为 1:200 DAPI（货号 D1306，Invitrogen (Carlsbad, CA)）、1:100 鬼笔环肽-Alexa Fluor 488（货号 A12379，Invitrogen (Carlsbad, CA)）、1:200 α-环蛇毒素-Alexa Fluor 555（货号 B35451，Invitrogen (Carlsbad, CA)）和 1:100 抗乙酰化微管蛋白（货号 SAB5600134，Sigma Aldrich (St. Louis, MO)）。孵育后，反复冲洗胚胎，再在室温下于 PBST 中孵育 3 小时。胚胎随后于二抗（抗兔 Alexa Fluor 647，Cell Signaling 4414S）中孵育，4 °C 过夜，再以 PBST 反复冲洗。随后用含 1.5% 琼脂糖的 PBS 将胚胎固定于玻璃底 35 mm 培养皿（货号 P35G-1.5-20-C，MatTek (Ashland, MA)）以进行成像。

成像步骤及处理

使用 Cytation C10 共聚焦微孔板成像检测系统和 Gen5 微孔板检测与成像分析软件采集所有图像，包括明场、宽场和共聚焦图像。Cytation C10 仪器配有 40 μm 针孔转盘、Hamamatsu Orca sCMOS 相机和用于共聚焦和宽场模式的发射/激发滤光片模块，其配置如下（宽场：DAPI 1225100、GFP 1225101、TRITC 1225125、CY5 1225105；共聚焦：DAPI 1945103、GFP 1945104、TRITC 1945106、CY5 1945102）。低放大倍率（4 倍）图像以“raw”图像展示，不进行进一步图像处理，包含单个 z 轴高度。宽场和共聚焦模式的更高放大倍率（40 倍）图像以 1 μm 间隔采用 z 轴层切采集。使用 Gen5 “Maximum” 方法对 z 轴叠加图进行叠加，随后在 Gen5 中进行处理，使用 50 μm 直径滚球对除绿色外（未处理）的所有荧光通道去背景。对于 3D 渲染，z 轴层切的所有图像首先进行去背景（20 μm 滚球，所有通道），随后在 Gen5 3D 查看器应用程序中打开。要仅渲染单个体节（如图 3 所示），使用 3D 查看器功能对层切图像进行裁剪。图 3 中使用的静态图像由 3D 查看器“Snapshot”功能获得，视频由“Record Video”功能获得。

结果与讨论

低放大倍率宽场荧光图像（4 倍）提供了优异的染色概览（图 1A）。DAPI 标记细胞核在头部和脊髓可观察到最高密度，并在整个皮肤呈弥漫性标记。鬼笔环肽标记肌动蛋白在整个肌肉骨骼系统中尤其丰富。

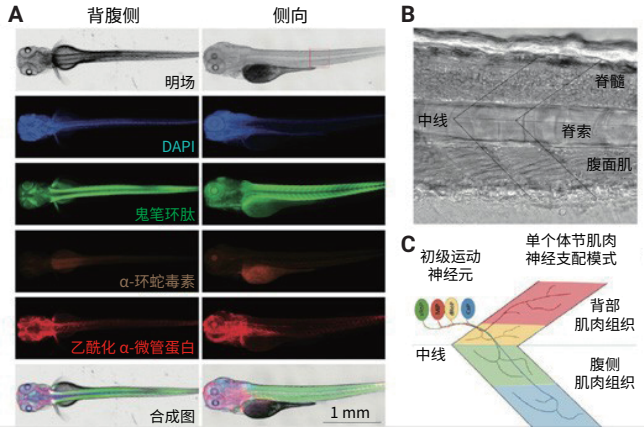


图 1. 在 Cytation C10 共聚焦微孔板成像检测系统上使用自动宽场模式的斑马鱼结构和染色概览。(A) 受精 3 天后的斑马鱼胚胎，放大 4 倍的背腹侧和侧向固定视图。左侧图显示各颜色通道信号下的染色。侧向明场图像中的红色方框指示 (B) 中更高放大倍率图像的位置。(B) 放大 40 倍的皮下 50 μm 深处中部至尾部区域的明场图像，大约在左右轴（矢状面中线）中心和脊髓处。在整个脊髓中可见神经元细胞体紧密堆积成圆形或气球形细胞。指示了脊索（一种类似软骨的椎骨前体）和腹侧肌细胞。覆盖在图上的 V 形虚线指示了单个体节的轮廓，这是一种包含初级运动神经元和肌肉组织的功能单元的重复身体结构。(C) 体节运动单元的示意图，包括初级运动神经元和受其支配的肌肉组织区域

乙酰胆碱受体的 α -环蛇毒素染色指示了在放大 4 倍的情况下肌肉组织主要的弥漫性染色，但更高的放大倍率揭示了神经肌肉突触染色典型的点状模式，如图 2 所示。乙酰化 α -微管蛋白染色表示神经元轴突，在整个颅神经、脊髓和侧线可见。预期的卵黄自发荧光也可以在绿色和橙色通道观察到。

在更高放大倍数下，如图 1B 所示，使用明场照明可辨认许多脊髓和肌肉组织的一般组织形式，包括 V 形重复单元，称为体节。每个体节都包含初级运动神经元及受其神经支配的肌肉组织区域（图 1C），运动神经元表观数量取决于发育阶段^[5,6]。胚胎斑马鱼的运动单元结构，结合其小尺寸和透明特性，非常适合使用共聚焦显微成像研究初级运动神经元的生长、支配和退化，使斑马鱼模型尤其适用于神经病变疾病的研究。

在更高放大倍数（图 2，40 倍）下，从皮肤表面到略高于矢状中线平面处（约 80 μm 深）每隔 1 μm 采集 z 轴层切图，以采集胚胎整个左侧图像。

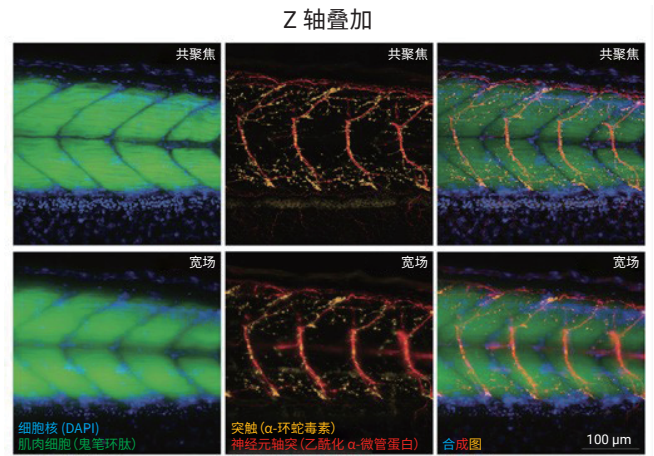


图 2. 斑马鱼轴向神经肌肉单元的 Cytation C10 共聚焦微孔板成像检测系统共聚焦模式和宽场模式图像比较。放大 40 倍转盘式（40 μm 针孔）共聚焦 z 轴叠加图（上排）和宽场 z 轴叠加图（下排）。下侧图显示各颜色通道信号下的染色

图 2 中展示的图像来自于从 25 μm 至 50 μm 深的层切部分，由 Gen5 软件最大 z 轴叠加生成。该 z 轴层切的单独切片图像通过避免在接近皮肤表面处观察到的额外神经元轴突染色，捕获了最佳的运动神经元结构图像。为进行比较，共聚焦和宽场 z 轴叠加图像均使用 50 μm 滚球背景消除步骤进行同样处理。尽管同时采集所有四个颜色通道，为清晰起见成对展示通道。共聚焦图像在所有通道和所有结构上都显示明显提高的对比度和表观分辨率，从识别深处的单个细胞核和肌肉细胞，到精细的神经元突起和修饰神经轴突的亚细胞突触连接。观察到的轴突束染色与图 1 中指示的初级运动神经元的叠加与分枝一致，在各体节中可能包含 CaP、MiP 和 RoP 运动神经元。

Gen5 的 3D 查看器模块提供 z 轴层切图的交互式显示功能，允许围绕样品的所有轴进行自由旋转和观察。3D 渲染提供了对不同深度 z 轴层切结构间的空间关系进行更好的检查与可视化的独特机会。为清晰起见，图 3 显示的渲染快照仅包括肌肉（绿色）和神经元（红色）通道。3D 查看器软件包内的裁剪工具被用来选取完整图像（如图 2 所示）中的单个体节，以观察单体节结构的横截面图像。在侧视图中，仅渲染 20 至 50 μm 深的切片，方便进行运动神经元的观察并减少靠近皮肤表面的表面轴突的干扰。横截面视图包括图像的全部深度（50 μm ）。

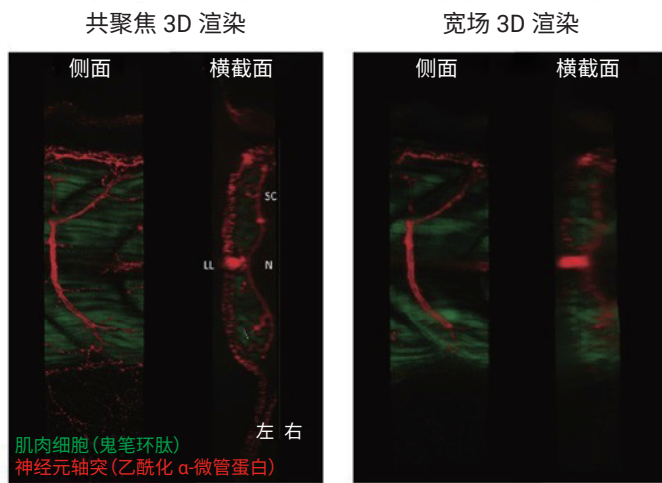


图 3. Cytation C10 共聚焦微孔板成像检测系统的 Gen5 3D 查看器软件包渲染单个斑马鱼体节的 z 轴层切图。斑马鱼胚胎从侧面和横截面角度的 z 轴层切快照，由 Gen5 软件 3D 渲染模块生成。染色标识显示在共聚焦（左）图片上。横截面图片上添加的注释指示了脊髓 (SC)、脊索 (N)、侧线 (LL) 和左右身体轴中线（虚线）的位置。箭头指示神经元突起深入支配肌肉组织的一个示例

从共聚焦渲染的横截面图像，可以更充分地识别运动单元的结构，神经元轴突沿脊髓 (SC) 和脊索 (N) 的肌肉组织边界弯曲，然后侧向分支并支配深部肌肉组织（箭头示例）。侧线 (LL) 的浅表神经元轴突染色和整个皮肤的轴突也可被观察到。共聚焦功能对观察这些结构至关重要，因为宽视场模式下失焦光会使该厚样品的横截面图像变模糊（右侧图）。

除图 3 所示的静态快照外，交互式 3D 查看器软件模块还可生成视频供离线观看，其中样品可围绕选定的轴旋转。

在下面的视频链接中，经 3D 渲染的包含神经元（红色）和肌肉（绿色）染色的三个体节围绕着 y 轴旋转，对应于胚胎的矢状（左右）中线轴。

Cytation C10 共聚焦斑马鱼运动神经元轴突和肌肉细胞视频

结论

Cytation C10 共聚焦微孔板成像检测系统在斑马鱼样品的单细胞成像方面表现出色，与宽视场模式相比，在深度图像对比度和荧光信号分辨率方面有了实质性的提高。图像的改进来源于共聚焦光学层切，能够对组织深处的细胞进行详细的 3D 渲染，同时仍保留了 Cytation 自动成像系统的易用性。

参考文献

1. Ali S, van Mil HGJ, and Richardson MK (2011) Large-scale Assessment of the Zebrafish Embryo as a Possible Predictive Model in Toxicity Testing. PLoS ONE 6(6): e21076. doi:[10.1371/journal.pone.0021076](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021076)
2. Asakawa K, Handa H and Kawakami K (2021) Illuminating ALS Motor Neurons with Optogenetics in Zebrafish. Front. Cell Dev. Biol. 9:640414. doi:[10.3389/fcell.2021.640414](https://doi.org/10.3389/fcell.2021.640414)
3. Westerfield M (2000) The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (*Danio rerio*). 4th ed. Eugene: Univ. of Oregon Press. Accessed at https://zfin.org/zf_info/zfbook/zfbk.html
4. Avdesh A, Chen M, Martin-Iverson MT, Mondal A, Ong G, Rainey-Smith S, Taddei K, Lardelli M, Groth DM, Verdile G and Martins RN (2012) Regular Care and Maintenance of a Zebrafish (*Danio rerio*) Laboratory: An Introduction. J. Vis. Exp. 69:e4196. doi:[10.3791/4196](https://doi.org/10.3791/4196)
5. Bello-Rojas A, Istrate AE, Kishore S, and McLean DL (2019) Central and Peripheral Innervation Patterns of Definal Axial Motor Units in Larval Zebrafish. J. Comp. Neurol. 527:2557-2572. doi: [10.1002/cne.24689](https://doi.org/10.1002/cne.24689)
6. Issa FA, Mock AF, Sagasti A and Papazian DM (2012) Spinocerebellar Ataxia Type 13 Mutation that is Associated with Disease Onset in Infancy Disrupts Axonal Pathfinding During Neuronal Development. Dis. Model. Mech. 5:921-929. doi:[10.1242/dmm.010157](https://doi.org/10.1242/dmm.010157)

斑马鱼眼结构的整体免疫荧光成像

使用 Cytation C10 共聚焦微孔板成像检测系统进行可靠的自动化共聚焦成像



摘要

荧光免疫组织化学是斑马鱼模型系统中基于显微镜的表型分析的主要方法。本研究采用荧光免疫组化和染色相结合的方法对胚胎斑马鱼的眼部结构进行了观察。为了进行比较，使用 Agilent BioTek Cytation C10 共聚焦微孔板成像检测系统在宽视场和共聚焦成像两种模式下对样品进行研究。结果表明，在处理相对较厚的样品中更深的荧光信号时，使用 Cytation C10 的共聚焦光学系统具备的优势，为荧光免疫组织化学法标记的整体斑马鱼胚胎提供更清晰、细节更丰富的高质量共聚焦图像。

前言

由于斑马鱼与人类眼睛发育的相似性，它们在眼睛发育生物学研究中一直扮演着重要的角色^[1]。随着基因操作技术的不断扩展，斑马鱼已经被证明是研究人类眼科疾病（包括青光眼和白内障等晚发性疾病）的重要模型系统。光学显微镜技术对这些研究至关重要，荧光免疫组织化学是眼睛和视网膜表型分析的重要工具。

在胚胎阶段，斑马鱼由于其小体积和光学透明特性，适合于整体免疫组织化学法分析。然而，当成像深度深入厚样品内部超过几微米时，传统的宽场显微成像方法应用受限。共聚焦成像可以克服这些限制，提供一种检查斑马鱼胚胎更深层次荧光信号的方法。但是，考虑到绝大多数共聚焦显微镜高昂的成本和专业的操作要求，研究人员往往依赖于组织切片和重建的方法以生成高质量图像^[9]。Agilent BioTek Cytation C10 共聚焦成像仪消除了这些障碍，让更多的实验室可实现稳定且自动化的共聚焦成像。

本研究利用 Cytation C10 的共聚焦模式，通过荧光免疫组织化学对胚胎斑马鱼眼进行了检测。

为了突出将共聚焦功能添加到斑马鱼研究自动化成像系统的好处，在 Cytation C10 上使用传统的宽场模式对相同的结构进行了成像。

实验部分

除非另有说明，所有化学品均购自 Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)。

样品前处理

斑马鱼的一般养护遵循既定的方法^[4]。野生型雄性和雌性斑马鱼饲养温度为 28 °C，光/暗周期为 14-10 小时。成鱼交配产卵后，鱼卵迅速收集于 EM3 培养基中^[5]。胚胎在受精后 24 小时于 EM3 中使用 0.003% 苯基硫脲进行处理以减少色素沉积。

免疫组织化学

按以下步骤处理胚胎进行免疫组织化学法染色。受精后 3 天 (pec-fin 阶段)，人工对胚胎去绒毛膜、麻醉，并用 4% 多聚甲醛 (PFA) 于磷酸盐缓冲液 (PBS) 中固定，4 °C 过夜。孵育过后，将固定的胚胎从 PFA 中取出，用含 1% 聚山梨醇酯 20 的 PBS (PBST) 冲洗。胚胎按以下连续步骤进行透化：固定的胚胎使用超纯实验室用水 (水) 冲洗，随后浸入预冷至 -20 °C 的丙酮中 8 分钟，再用水冲洗，最后用 PBST 冲洗。

胚胎随后在室温 (RT) 下于渗透缓冲液 (含 3% TritonX-100 和 1% DMSO 的 PBST) 中孵育 1 小时，随后在 RT 下于封闭缓冲液 (含 3% 牛血清白蛋白 (BSA)、1% Triton-X-100 和 1% DMSO) 中孵育 1 小时。渗透并封闭后的胚胎于一抗和染色剂混合物中孵育，4 °C 过夜，混合物为封闭缓冲液中含 1:200 DAPI (Invitrogen D1306)、1:100 鬼笔环肽-Alexa488 (Invitrogen A12379) 和 1:100 抗乙酰化微管蛋白 (Sigma SAB5600134)。孵育后，反复冲洗胚胎，再在室温下于 PBST 中孵育 3 小时。胚胎随后于二抗 (抗兔 Alexa647, Cell Signaling 4414S) 中孵育，4 °C 过夜，再以 PBST 反复冲洗。胚胎随后转移至载玻片上，用封片剂 (80% 甘油、20 mmol/L TRIS pH 8.0 和 0.05% 没食子酸丙酯) 和 #1.5 玻璃盖玻片封片，用于成像。

仪器

使用 Cytation C10 共聚焦微孔板成像检测系统和 Agilent BioTek Gen5 微孔板检测与成像分析软件采集所有图像，包括明场、宽场和共聚焦图像。Cytation C10 仪器配有 40 μm 针孔转盘、Hamamatsu Orca sCMOS 相机和用于共聚焦和宽场模式的发射/激发滤光片模块。所用成像滤光片模块包括：宽场：DAPI 1225100、GFP 1225101、CY5 1225105；共聚焦：DAPI 1945103、GFP 1945104、CY5 1945102。

成像步骤及处理

宽场和共聚焦模式的 20 倍放大倍率图像以 2 μm 间隔沿 z 轴依次采集。

宽场和共聚焦模式的 40 倍放大倍率图像以 1 μm 间隔沿 z 轴依次采集。使用 Gen5 软件处理图像以去除背景，在所有荧光通道运用滚球算法，滚球直径 30 μm 。使用 Gen5 “Maximum” 方法对 z 轴叠加图进行累加。最大 z 轴叠加图像随后使用缺省的 Gen5 计算点扩散函数参数进行反卷积。导致样品折射率不匹配的光学深度估计值使用轴向畸变校正因子确定^[6]。

结果与讨论

联合使用核染色 (DAPI)、细胞骨架染色 (鬼笔环肽) 和细胞骨架免疫组织化学法 (抗乙酰化微管蛋白)，进行总体头部结构的荧光成像检查。以背外侧位置固定受精三天的胚胎 (图 1A)，可在 Cytation C10 以 20 倍放大倍率下在单视场中生成整个头部的概览图 (图 1B)。

图 1B (左侧图) 显示的明场图是从头部背侧面光学深度约 240 μm 处的单焦平面摄取。在这个位置上，眼睛横切面可见，视网膜分层可见。使用 Cytation C10 的宽场和共聚焦模块沿 z 轴自动采集一系列荧光图像。采集的 z 轴层切叠加图 (图 1B, 中间和右侧图) 代表约 60 μm 厚切片。尽管 z 轴层切光学成像深度距背侧面头部表面约 240 μm ，由于头部的几何结构，大部分光产生的信号只穿过了很少的组织。

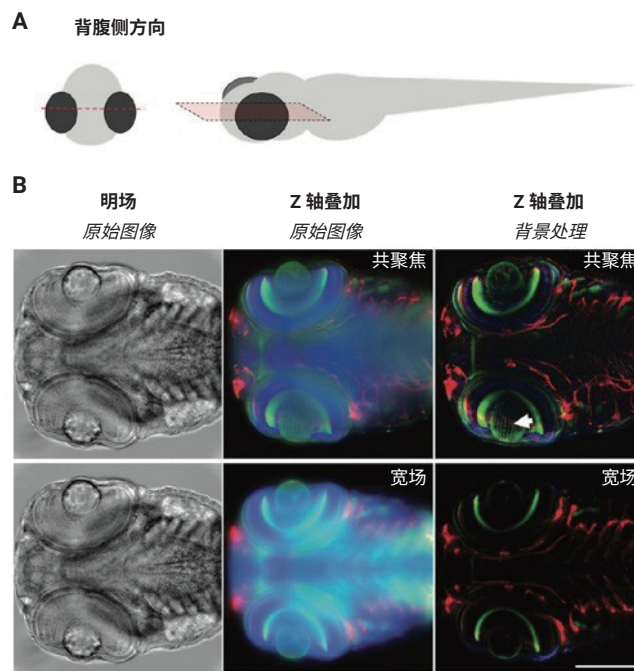


图 1. 三日龄斑马鱼胚胎头部的背腹侧整体图像，以 Agilent BioTek Cytation C10 共聚焦微孔板成像检测系统的共聚焦和宽场模式采集。(A) 成像平面 (虚线) 和胚胎方向示意图。(B) 在放大 20 倍的情况下，以宽场和共聚焦模式沿 z 轴采集斑马鱼头部图像。在单平面拍摄的明场图像与沿 z 轴叠加图像 (约 60 μm 厚切片) 一起显示，并显示在 Agilent BioTek Gen5 软件进行背景消除处理之前 (“原始”) 和之后的 z 轴叠加图像。蓝色通道对应 DAPI 核染色，绿色通道对应肌动蛋白的鬼笔环肽染色，红色通道对应神经元轴突的乙酰化 α -微管蛋白免疫染色。箭头指示共聚焦图像中可见的晶状体纤维。比例尺表示 200 μm

共聚焦图像 (图 1B, 上排) 与宽场模式 (图 1B, 下排) 展示了焦外背景光的显著消除。对比以共聚焦和宽场模式获取的经过处理的 z 轴层切图像时，这种背景的消除十分明显 (图 1B, 右侧)。结构如眼晶状体纤维 (图 1B, 箭头) 在共聚焦图像中清晰可见，但在宽场图像中无法与背景区分。

通过以侧面方向固定 (图 2A) 将胚胎旋转 90 度，可使用 Cytation C10 在 40 倍放大倍率下在单个视场内对斑马鱼眼部成像。与整个头部相同，在同一台仪器上使用共聚焦 (图 2B, 上排) 和宽场 (图 2B, 下排) 模式对沿 z 轴摄取眼部图像。图 2B 显示的 z 轴叠加图包含约 20 μm 光学深度切片，从眼部表面约 35 μm 深处开始。为在这些图像中纳入整个晶状体前极，绿色通道 z 轴叠加包括了额外的 z 轴切片。这些 z 轴切片从眼部表面开始，故绿色通道包括了更多的总光学深度切片 (约 55 μm)。

为清晰起见，各成像通道分别显示，然后作为最终合成图像显示 (图 2B)。

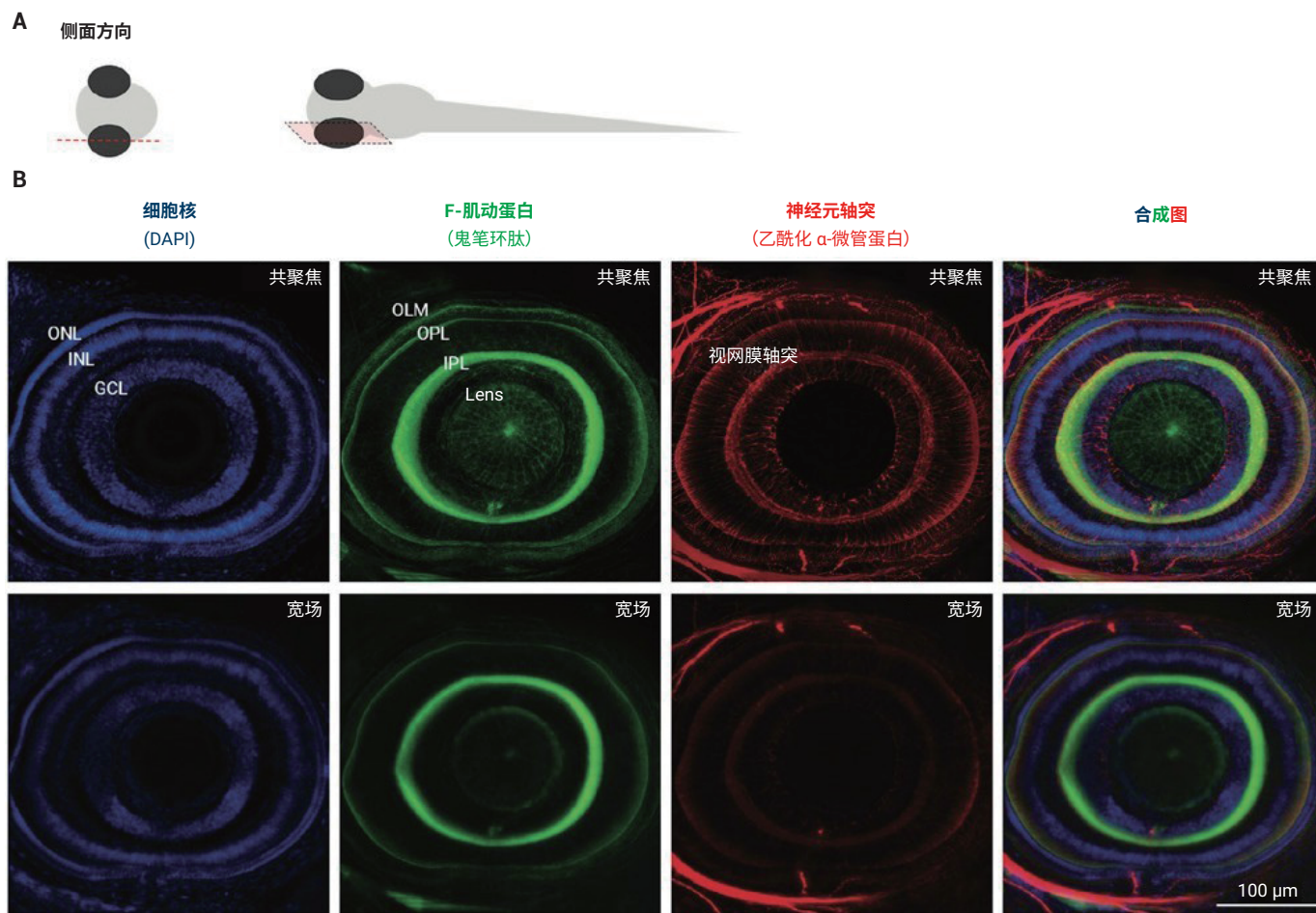


图 2. 三日龄斑马鱼胚胎的侧向整体图像，以 Agilent BioTek Cytation C10 共聚焦微孔板成像检测系统的共聚焦和宽场采集。(A) 成像平面（虚线）和胚胎方向示意图。(B) 在放大 40 倍的情况下，以共聚焦和宽场成像模式沿 z 轴采集斑马鱼胚胎图像（如指示）。缩写：ONL，外核层；INL，内核层；GCL，神经节细胞层；OLM，外界膜；OPL，外丛状层；IPL，内丛状层

核 DAPI 染色（蓝色）显示视网膜各核层，详见标记。鬼笔环肽染色（绿色）表示丛状层和晶状体纤维结构。乙酰化 α -微管蛋白染色（红色）显示整个视网膜的神经元轴突，突出显示视网膜各细胞层间的连接。

与宽场模式相比，共聚焦模式带来的图像质量改善清晰可见。共聚焦图像可分辨 DAPI 通道内的单个细胞核、鬼笔环肽通道内的晶状体纤维和整个视网膜内大量的精细神经元轴突走行。这种水平的细节在宽场模式中无法见到。

图 2B 显示的 40 倍放大图像的数字缩放图突出显示了仅能在共聚焦成像模式中观察到的晶状体结构（图 3）。鬼笔环肽可对晶状体纤维细胞的细胞骨架内的肌动蛋白微丝进行染色。随着晶状体细胞的分化和成熟，细胞骨架被排除

出细胞质，并与细胞外围的质膜紧密结合。在横截面上，晶状体细胞呈细长的六边形，两个宽边和若干窄边紧密并列，导致在狭窄的侧边可观察到强烈的鬼笔环肽染色^[7]。在图 3 中显示的靠近晶状体赤道的单张 z 轴切片中，鬼笔环肽染色显示了晶状体外皮质中晶状体细胞的窄边和宽边。

在整个晶状体前极的 z 轴叠加图中，窄边染色显示为条纹，突出显示了纤维细胞边界，因其在缝合处汇集。鬼笔环肽标记的晶状体上皮细胞同样可见，为覆盖在纤维细胞条纹上的外部单层六边形图案。

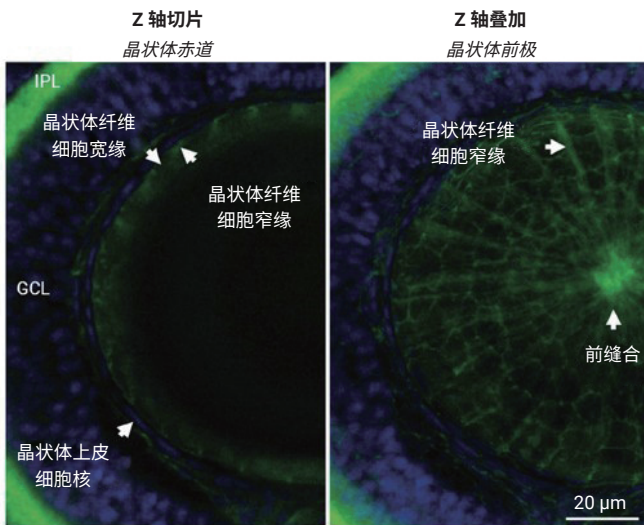


图 3. 三日龄斑马鱼胚胎晶状体的侧向整体图像，以 Agilent BioTek Cytation C10 共聚焦微孔板成像检测系统的共聚焦模式采集。在 40 倍放大倍率和数字缩放下，斑马鱼晶状体结构以单光学平面（左侧）和沿 z 轴的叠加图（右侧）显示。DAPI 核染色（蓝色）指示细胞核，包括晶状体上皮细胞单层（如图示）。肌动蛋白微丝的鬼笔环肽染色（绿色）突出显示了晶状体纤维细胞边缘（如图示）。缩写：IPL，内丛状层；GCL，神经节细胞层

结论

Agilent BioTek Cytation C10 共聚焦微孔板成像检测系统增加了共聚焦光学系统，但未损失自动化 Cytation 成像系统原有的多功能检测能力和易用性。共聚焦光学系统使荧光免疫组织化学法标记的整体斑马鱼胚胎高质量成像成为可能。通过与宽场成像比较，本应用简报展示了 Cytation C10 转盘式共聚焦成像的光学层切能力是精确捕获斑马鱼胚胎深处荧光标记细胞结构的关键，使详细评估对于斑马鱼眼科研究至关重要的视网膜和晶状体结构成为可能。

参考文献

- Richardson, R.; Tracey-White, D.; Webster, A.; Moosajee, M. The zebrafish eye – a paradigm for investigating human ocular genetics. *Eye* 2017, 31(1), 68-86. doi:10.1038/eye.2016.198
- Chhetri, J.; Jacobson, G.; Gueven, N. Zebrafish – on the move towards ophthalmological research. *Eye* 2014, 28(4), 367-380. doi:10.1038/eye.2014.19
- Oralová, V.; Rosa, J. T.; Soenens, M.; Bek, J. W.; Willaert, A.; Witten, P. E.; Huysseune, A. Beyond the whole-mount phenotype: high-resolution imaging in fluorescence-based applications on zebrafish. *Biology Open* 2019, 8(5), bio042374. doi:10.1242/bio.042374
- Westerfield M. *The zebrafish book: A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*. 4th ed. Eugene: Univ. of Oregon Press 2000. Accessed at https://zfin.org/zf_info/zfbook/zfbk.html
- Avdesh, A.; Chen, M.; Martin-Iverson, M.T.; Mondal, A.; Ong, G.; Rainey-Smith, S.; Taddei, K.; Lardelli, M.; Growth, D.M.; Verdile, G.; Martins, R.N. Regular care and maintenance of a zebrafish (*Danio rerio*) laboratory: an introduction. *J Vis Exp* 2012, 69:e4196. doi:10.3791/4196
- Diel, E.E.; Lichtman, J.W.; Richardson, D.S. Tutorial: avoiding and correcting sample-induced spherical aberration artifacts in 3D fluorescence microscopy. *Nat Protoc* 2020, 15, 2773-2784. doi: 10.1038/s41596-020-0360-2
- Vorontsova, I.; Hall, J.; Schilling, T. Assessment of zebrafish lens nucleus localization and sutural integrity. *J Vis Exp* 2019, 147:e59528. doi:10.3791/59528

查找当地的安捷伦客户中心:

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线:

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们:

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价:

www.agilent.com/chem/erfq-cn



微信搜一搜

安捷伦视界

www.agilent.com

DE04811702

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本文中的信息、说明和技术指标如有变更,恕不另行通知。

© 安捷伦科技(中国)有限公司, 2023
2023年2月27日, 中国出版
5994-5869ZH-CN

