

使用微孔读板机的细胞成像系统 检测标签蛋白的表达

某些细胞蛋白存在或不存在，可代表着细胞对某些刺激的反应、某种分化的状态或特定细胞类型的独特特征或者基因的成功转染。如血管内皮细胞粘附分子-1(VCAM-1)一般不存在于正常的血管内皮细胞，但在细胞因子TNF- α 的体外刺激引起的炎症反应，会出现VCAM-1的表达。这种细胞中某种特殊标志蛋白的表达，可以很容易地使用微孔板成像系统进行检测和定量。

定量测量细胞标志物的表达

人脐静脉内皮细胞(HUVEC)在96孔板中培养48小时，接着使用抗炎化合物SB202和SB203的不同剂量刺激2小时；然后使用TNF- α 刺激24小时，细胞表达VCAM-1；然后用4%的多聚甲醛固定细胞，接着使用抗VCAM荧光素标记的抗体染色。使用SpectraMax MiniMax细胞成像系统(SpectraMax i3多功能读板机的用户可升级模块)进行细胞成像，影像分析使用SoftMax Pro软件内的蛋白表达Protocol实时进行。使用SoftMax Pro的浓度效应曲线拟合，进行化合物的药效的评价，结果显示化合物成功地抑制了细胞因子的刺激，从而抑制了后续的VCAM-1的表达。

VCAM-1的表达水平的定量，通过设置荧光强度阈值过滤掉背景荧光和大小阈值过滤掉微小的杂质，如划痕，颗粒或气泡。图1表示在SoftMax Pro中如何进行蛋白标志物的分析设置程序。

荧光素标记的VCAM抗体染色的固定细胞，使用标签蛋白表达程序进行鉴定，由于细胞几乎连成一片，所以此程序设置为检测整个视野内蛋白总体表达，而非是进行单个细胞计数。

优势

- 带细胞成像系统的功能模块扩展了微孔读板机的检测应用
- 方便检测每个细胞或每孔的标签蛋白的表达水平
- 按照一般微孔读板机的简单流程
- 细胞可视化数据输出，增加了数据可信性

图1 阳性和阴性样品读板前的测试分析参数设置

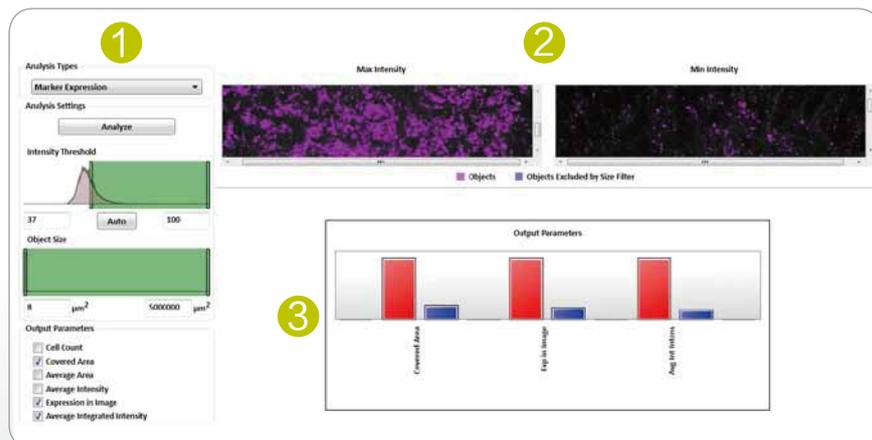
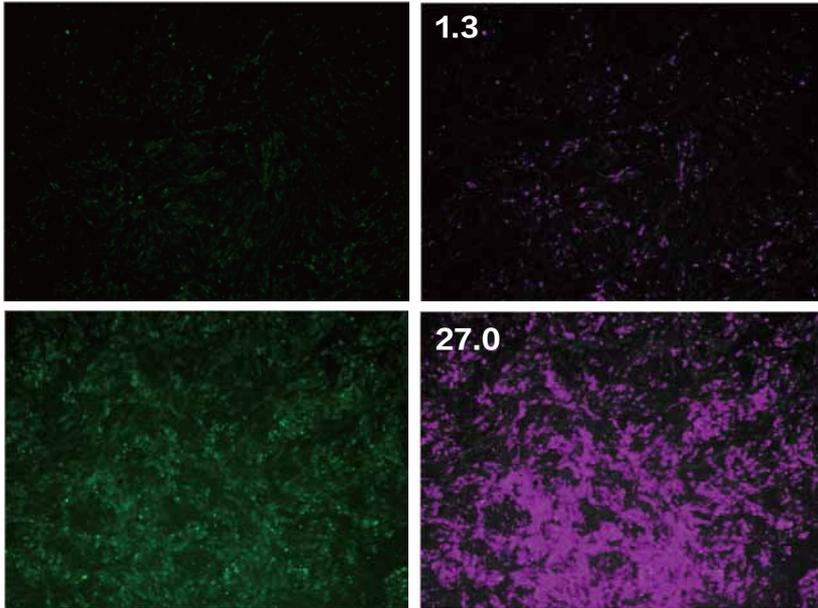


图1， SoftMax Pro软件界面拥有几个可视化的组件，以帮助建立图像分割最佳参数设置。

- 1: 调整背景强度和对象大小阈值来识别荧光细胞。
- 2: 在阳性和阴性孔内，可视化生成的分割遮罩，以帮助判断是否需要进一步的参数调整。
- 3: 选择能展示阳性孔和阴性孔直接较大差异的输出参数，如直方图的显示方式。

标记的表达程序是用来识别荧光素标记的抗VCAM抗体标记的区域。VCAM-1的存在表示炎症应答的阳性反应。

图2 细胞对抗炎化合物的反应应答



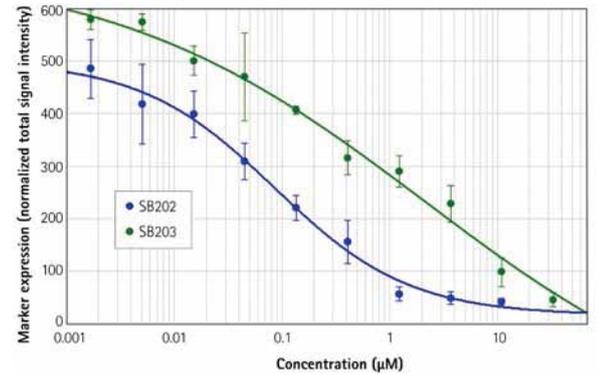
左侧的图像显示荧光VCAM-1表达的细胞，右图加上紫色遮罩，显示软件对表达炎症标签蛋白的划分；高剂量的抗炎化合物SB202处理的细胞(上排)显示出很少的VCAM-1的表达，而低剂量的抗炎化合物SB202处理的细胞(下排)使用细胞因子后，则表达出大量的VCAM-1。所有的值为经过归一化处理后的总强度值。

标记表达分析实验的更多信息

SpectraMax MiniMax细胞成像系统可提供简单酶标荧光强度检测值所不能提供的可视化数据和信息。荧光检测区域可定位到表达感兴趣的标签的细胞，大的成像视野允许将数量庞大的细胞一次整合。友好的SoftMax Pro软件分析界面，允许进行浓度效应曲线拟合和计算IC₅₀值等。总之，MiniMax细胞成像系统简化了细胞成像过程，提供了和补充了在细胞标签蛋白表达检测方面标准酶标仪检测所不能提供的重要信息。

图3 标志物的表达结果分析

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PBlank	0.001893	0.005080	0.015241	0.046724	0.137174	0.411522	1.234567	3.703703	11.111111	33.333333	100
B		0.001893	0.005080	0.015241	0.046724	0.137174	0.411522	1.234567	3.703703	11.111111	33.333333	100
C		0.001893	0.005080	0.015241	0.046724	0.137174	0.411522	1.234567	3.703703	11.111111	33.333333	100
D		0.001893	0.005080	0.015241	0.046724	0.137174	0.411522	1.234567	3.703703	11.111111	33.333333	100
E		0.001893	0.005080	0.015241	0.046724	0.137174	0.411522	1.234567	3.703703	11.111111	33.333333	100
F		0.001893	0.005080	0.015241	0.046724	0.137174	0.411522	1.234567	3.703703	11.111111	33.333333	100
G							Unknowns					
H												



顶：微孔板模板中孔的注释定义。

底：浓度vs标记物表达量的曲线拟合图。随着抗炎化合物的浓度的增加，细胞因子刺激的VCAM-1的表达量则降低。归一化的总信号强度可以使用众多曲线拟合选项和给出IC₅₀浓度。SB202 IC₅₀=0.1 µM时，SB203 IC₅₀=1.8 µM。