

# 应用SpectraMax MiniMax细胞成像系统和MetaMorph软件测量神经突触

## 前言

神经细胞通过延展他们的身体彼此间产生连接，叫做树突(dendrites or processes)。这种生理现象与神经生长有关，并且和复杂的细胞内信号传导有关。理解突触生长的信号通路机理有助于神经毒性化合物的筛选，阐明影响神经再生的因素。

突触生长的测量是要将神经突触进行分割及量化，在样品量少的时候，突触的计算需要用荧光试剂标记后用显微镜拍照，再手动的画出及计数。然而，当样品量大的时候，就需要自动的成像和分析系统来提高效率。

本篇应用说明将介绍应用SpectraMax® i3x多功能微孔板检测平台配置SpectraMax® MiniMax™ 300细胞成像系统在神经突触成像和分析上的优势。特别指出，我们引用的小鼠胚胎背部根神经节细胞突触数据是由康奈尔大学医学院附属伯克医疗研究所的Thong C. Ma博士。

## 材料

- SpectraMax® i3x多功能微孔板检测平台 (Molecular Devices cat. #i3x)
- SpectraMax® MiniMax™ 300细胞成像系统 (Molecular Devices cat. #5024062)
- MetaMorph图像分析软件 (Molecular Devices cat. #5042477)
- 神经突触分析模块 (Molecular Devices cat. #40154)
- CHO-K1 细胞 (ATCC cat. #CCL-61)
- 重组神经生长因子 (EMD Millipore cat. #GF307)
- Anti-βIII-tubulin抗体 (Abcam cat. #52623)
- 5-fluorodeoxyuridine (Sigma cat. #F3503-5MG)
- Neurobasal® 培养基 (ThermoFisher cat. #21103049)
- B27® 补充剂 (ThermoFisher cat. #17504044)

## 优势

- 使用SpectraMax MiniMax细胞成像系统拍摄高质量神经细胞图片
- MetaMorph自动图像处理和分折工具可加速图片分析
- 自动得到神经突触分析所需参数，如突触个数、突触长度和突触总数等

Parameter	Settings
Optical configuration	SpectraMax MiniMax 300 Imaging Cytometer
Plate type	96-well
Read mode	Imaging
Read type	Endpoint
Well area settings	12 sites
Wavelength settings	541 nm (green fluorescence)
Image Acquisition settings	541 exposure: 150 ms 541 focus adjustment: 50 μm

表1 MiniMax细胞成像系统成像设置参数

## 方法

小鼠胚胎背部根神经节细胞从E12.5胚胎分离出来，并培养在加入B27补充剂、50 ng/mL神经生长因子(NGF)10  $\mu$ M 5-fluorodeoxyuridine的Neurobasal培养基中。5-fluorodeoxyuridine是为了杀死许旺细胞。培养几天后，将背部根神经节细胞消化，移至孔板中，并培养在单层贴壁的CHO细胞上。

24小时共培养后用4%多聚甲醛固定，并将细胞进行免疫荧光染色，一抗为Anti- $\beta$ III-tubulin抗体(1:500稀释，兔单抗)，二抗为绿色荧光二抗。此后，用MiniMax细胞成像系统对细胞进行成像，设置参数如表1所示。

拍摄的图片导入MetaMorph软件，每孔中的不同视野的多张图像被生成一个stack文件，并用拼接功能生成一张大图，这张大图将用来分析神经突触。

MetaMorph的神经突触分析模块可用于突触测量，模块设置参数如图1所示。软件可自动识别、计算并导出参数，如突触个数、突触成度等。这些参数导出到Excel中，可用于后期的分析及作图。

## 结果

GFP表达的神经元及其突触用MiniMax细胞成像系统可拍出高质量图像(图2)。SoftMax Pro软件得到的原始数据经过MetaMorph内置的拼接功能可得到整孔的拼接大图(图3)。在应用MetaMorph的神经突触分析模块自动的识别、计算神经细胞胞体和突触，并将得到的参数导出(图4)。每个神经元的参数都可选出并单独列出(图5)。

数据被导出到Excel中进行进一步分析。在此实例中，我们研究了分支数和突触总面积直接的关系(图6)。这只是能够分析的实验例子之一，其他的还包括比较突触个数或比较不同神经元之间的差异。

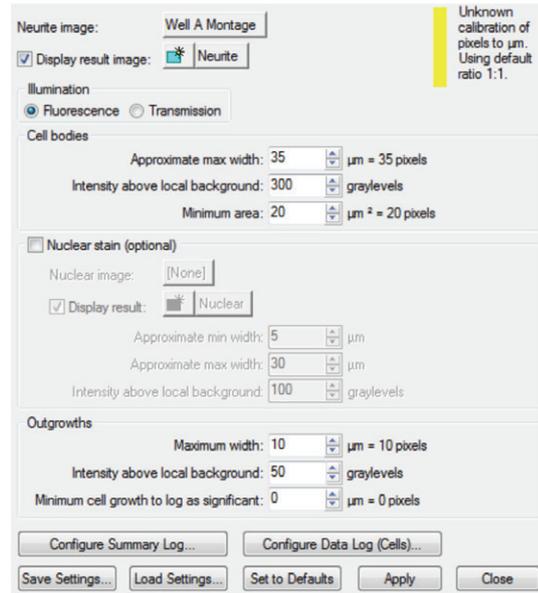


图1 神经突触分析模块参数设置。设置参数为神经元和突触的大小和荧光强度。

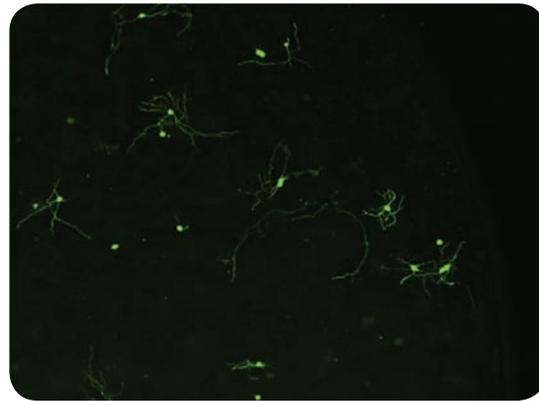


图2 神经细胞图像。应用MiniMax细胞成像系统的绿色荧光通道拍摄神经细胞图像，图中所示为一个孔的12个视野之一。

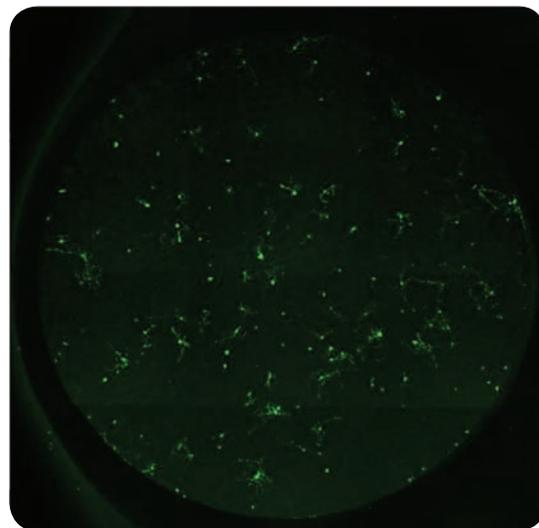


图3 神经细胞的拼接图。MiniMax细胞成像系统拍摄的原始图被MetaMorph软件拼接成整孔的大图。这种大图将被用于神经突触的分析。

## 结论

将MiniMax细胞成像系统和MetaMorph软件联合使用，可以拍摄神经元图片，并得到具体的神经突触参数。MiniMax细胞成像系统可拍摄出清晰的荧光染色神经细胞，MetaMorph软件的图像处理功能及分析模块可以准确的分析得到神经突触生长相关的所以参数。两种产品联合使用给科学工作者提供了一个研究神经生长和分化，及神经毒性筛选的完全解决方案。

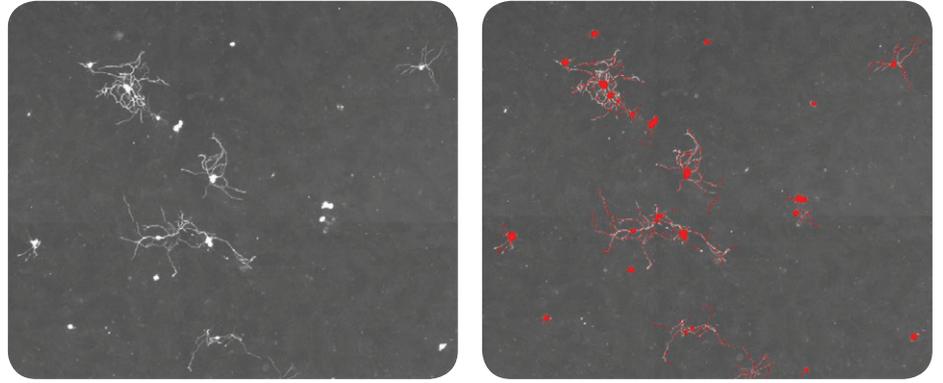


图4 MetaMorph软件识别图。MetaMorph软件的神经突触分析模块对拼接图的灰度图(左)进行识别神经元胞体和突触，识别到的位置用红色蒙版标出(右)。

## 参考文献

1. Kiryushko, Darya, Vladimir Berezin, and Elisabeth Bock. "Regulators of neurite outgrowth: role of cell adhesion molecules." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1014.1 (2004): 140-154.
2. Meijering, E., et al. "Design and validation of a tool for neurite tracing and analysis in fluorescence microscopy images." *Cytometry Part A* 58.2 (2004): 167-176.

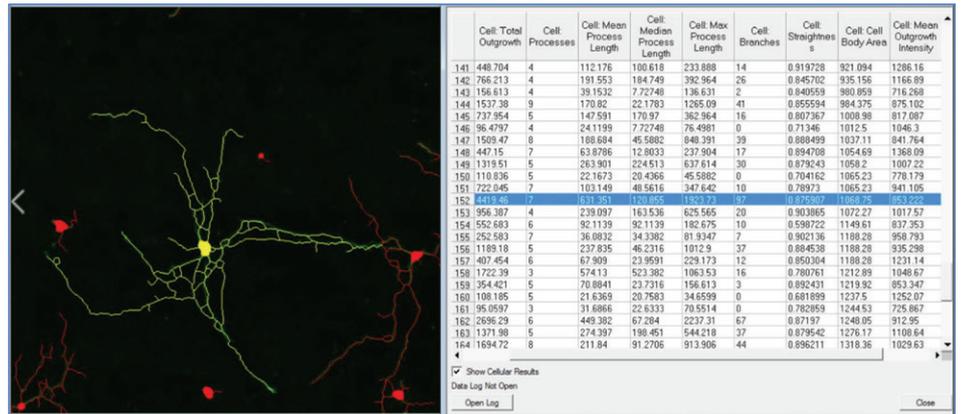


图5 神经突触参数。MetaMorph软件可自动计算出多种神经突触生长的参数，并可显示出每个被识别的神经元及其突触。图中黄色部分为一个神经元细胞，与其相关的突触被高亮显示(表中蓝色)。

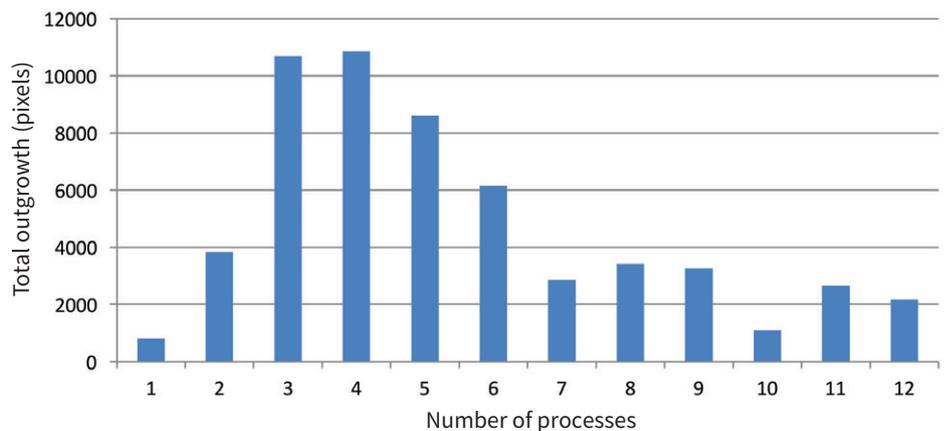


图6 突触总面积与分支数的关系。神经元细胞以分支数量分类，每一组中的突触总面积为平均值。突触总面积与分支数的关系用Excel的柱状图展示，由图标可得随着分支数的增加，突触总面积先增加后减少，最大值出现在分支数为3和4的时候。



扫一扫关注我们的官方微信