

使用自动成像技术进行荧光标记 或无标记的细胞计数

Jayne Hesley | Imaging Applications Scientist | Molecular Devices

介绍

在多孔微板中精确地定量细胞数量的能力使得能够研究细胞的健康或增殖。这些应用可以利用终点测定法来成像荧光染色的细胞核，或者可以要求未染色的活细胞或固定细胞的可靠透射光成像。在这两种情况下，通过软件分割的细胞计数都应该是快速和可靠的。ImageXpress® Pico 个人型高内涵成像分析系统与 CellReporterXpress™ 图像采集和分析软件是理想的量化检测工具，无论细胞是 label-free 或荧光染色。在这个应用说明中，我们演示了用户选择的透射光分割 (分析) 算法如何提高计数不同细胞类型的准确性，并将结果与使用核染色时发现的结果进行比较。

方法

在接下来的实验中，一些细胞类型被铺在 96 孔板中，按照 1:2 进行系列稀释并过夜培养，然后 5 μ M Hoechst 或 DRAQ 5 核染色在 37°C，5% 的二氧化碳孵育 30-60 分钟。在 ImageXpress Pico 系统上用 4x 或 10x 物镜整板成像，每孔一个视野。荧光和透射光的图像被连续地采集 (透射光优先)，并且使用即时分析 (on-the-fly) 计数细胞。即时分析允许在获取过程中同时分析图像。

优势

- 适用于荧光染色或无标记细胞
- 可计数不同类型、不同大小的细胞
- 可在运行实验分析前，确定移液伪影或非均一性的细胞生长状况

细胞类型	CRX 模块
CHO	Small
PC-12	Large
U2OS	Large
HEK-293	Large
HeLa	Large
NIH-3T3	Large
HepG2	Large
THP-1*	Small

图 1. 通过对 156-20000 个细胞/孔不同细胞类型的比较，显示出 CellReporterXpress 软件模块对透射光图像的分割最为准确。透射光图像获得的 z 轴聚焦补偿值为 -40 μ m，使用 10 倍的物镜。

* THP-1为悬浮细胞。

为您的细胞选择更合适的透射光分析模块

CellReporterXpress 软件中包含三个模块，用于计算透射光中的细胞数。“Transmitted Light Cell Count, General” 适用于大多数单层细胞培养 (CHO, HeLa, PC-12)，即不太融合也不太稀疏。然而，在图 1 中所报告的实验中，细胞被铺到 96 个孔里，从完全融合到仅仅几个细胞。相应的 TL 模块产生的细胞计数与核染色在最广泛的细胞密度范围内实现的定量最接近。对于聚集生长的 HepG2 这样的细胞，在高密度的情况下，精确的分割是有挑战性的，因此，为了获得更准确的结果，最好使用测量“Area covered”而不是“Cell count”。

贴壁或悬浮细胞计数

根据细胞大小或细胞计数模块检测荧光染色细胞核的三种透射光 (TL) 细胞计数分析模块中的一种，可以定量贴壁单层细胞或悬浮细胞 (图 2 和图 3)。在未过度融合的孔中，使用染色细胞核检测细胞与未标记细胞的比较是一致的 (图 4)。

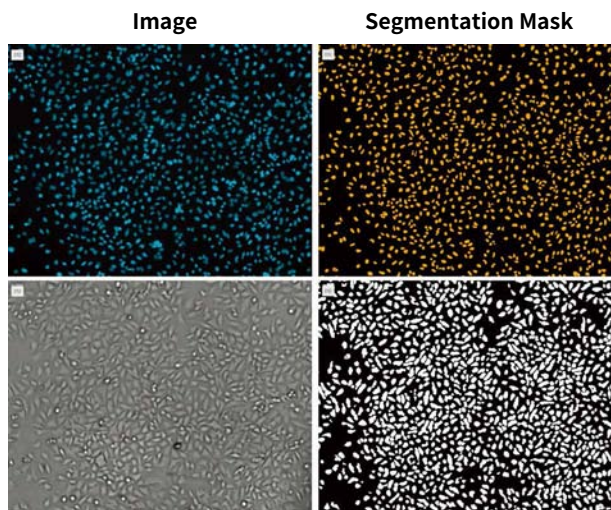


图 2. 利用荧光和透射光比较 HeLa 细胞的细胞计数。最上面的图像显示，在左边有一个 10x 物镜的贴壁 HeLa 细胞 (蓝色的核染色) 以及最终的分析 mask (橙色) 在右边。较低的面板显示了同一区域与透射光成像 (左) 和结果分析分割 (白色) 在右边。使用核计数的细胞总数为 1710 个，而使用透射光图像的细胞总数为 1790 个。

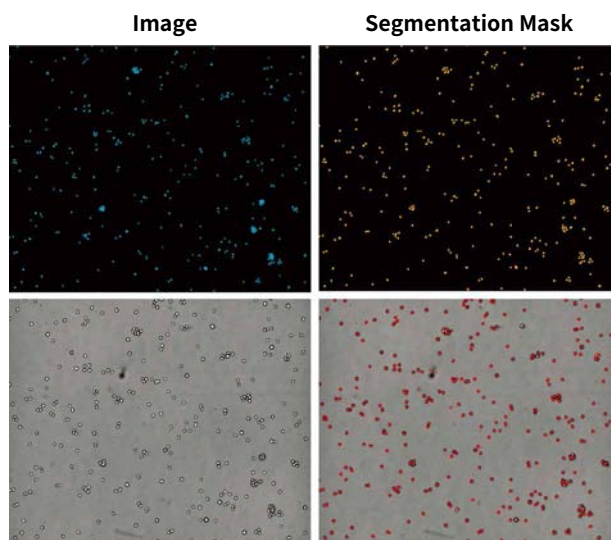


图 3. 荧光与透射光悬浮细胞的比较。顶部图像显示用 10x 物镜获得的 THP-1 白细胞 (蓝核染色) 和右侧得到的分析 mask (橙色)。下面板显示的是用透射光成像的相同区域 (左侧)，结果分析分割 (红色) 显示在右侧。使用核计数的细胞总数为 325 个，使用 TL 图像的细胞总数为 320 个。

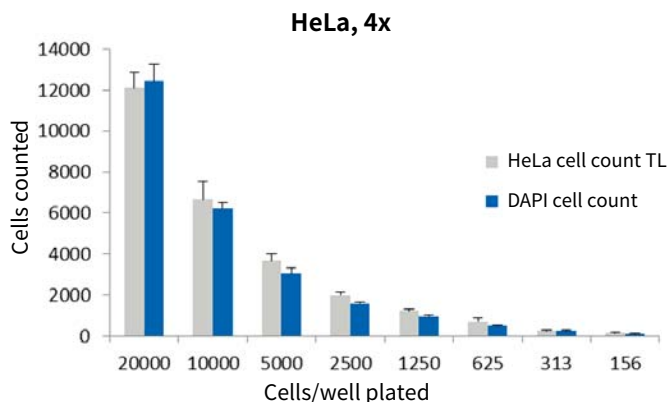


图 4. 透射光分割细胞定量与 Hoechst 染色细胞核定量的比较。使用 4x 物镜获取单个图像/孔 (n=6 孔)，使用 CellReporterXpress 软件预配置模块进行分析。

通过全板缩略图观察移液伪影

在透射光 (或荧光, 如果染色) 下, 可以以低放大倍率扫描整个平板。可以使用 CellReporterXpress 软件直观地识别或即时 (on-the-fly) 检测细胞层中显示不均匀的孔 (图 5)。

结论

ImageXpress Pico 系统允许研究人员使用配套的软件在支持即时分析 (on-the-fly) 的逻辑工作流程中定量各种活细胞或固定细胞。采用低放大倍率扫描方法, 可即时检查铺板均匀性。此外, 通过观察复合处理或加入试剂对细胞密度的影响, 可以对实验结果进行更程度的验证。

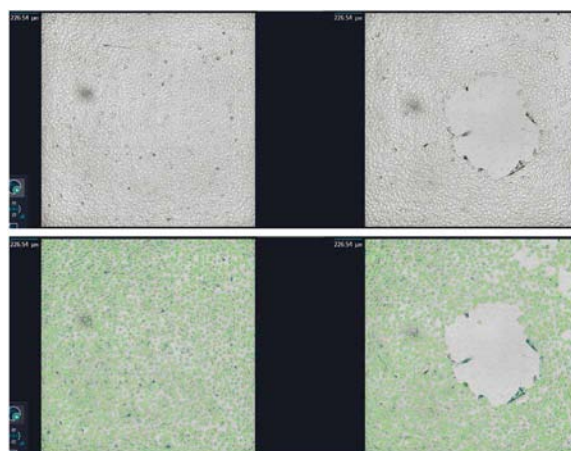
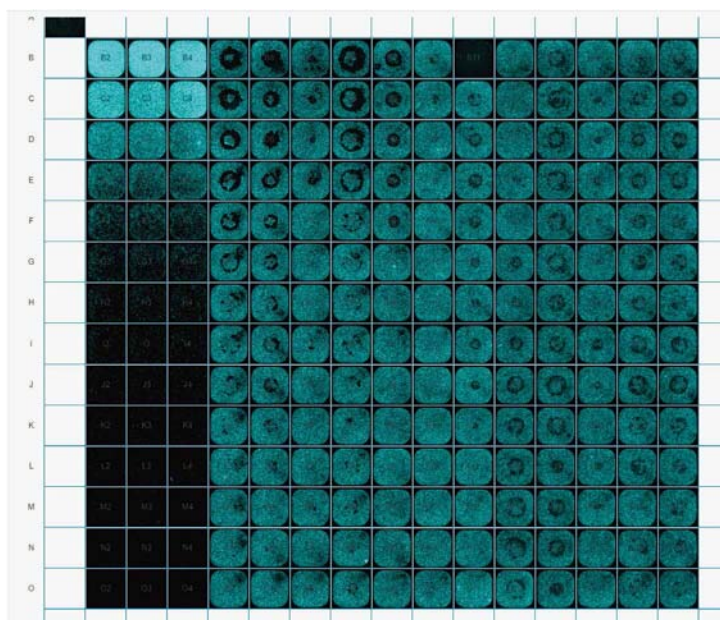


图 5. 利用低放大率扫描整个板来识别移液伪影。 (顶部) Hoechst染色核的板块蒙太奇视图。在这张 384 孔板 4 倍成像的蒙太奇图中, 移液伪影非常明显。(底部) 透射光图像 (上图) 可被进行分割分析, 分析结果 (绿色 mask 叠加于下图) 突出显示那些不含有均一细胞数量的孔。

公司简介

Molecular Devices 始创于上世纪 80 年代美国硅谷，作为全球高通量仪器设备的优秀品牌，一直致力于为生命科学研究及药物研发提供先进的全方位解决方案。其产品覆盖微孔板检测分析、高通量筛选、高内涵成像、高效克隆筛选等。公司以持续创新、快速高效、一流质量的产品及完善的售后服务著称业内。

Molecular Devices 为您提供高性能的分析检测系统，加快和改进药物研发及基础生命科学研究。除了科研单位和部门外，我们还帮助制药和生物技术企业从分子、细胞和系统水平去了解各项生物功能，研究开发新的治疗方法。

Molecular Devices 于近几年收购了 Universal Imaging Corporation (2002 年)、Axon Instruments (2004 年)、Blueshift Technologies (2008 年) 和 Genetix (2011 年)，从而进一步拓展了公司的产品领域。现在，Molecular Devices 与 Leica、Sciex、Beckman Coulter、Pall 等公司均隶属于 Danaher 集团公司，我们的产品线包括：微孔读板机系列、液体处理系统、电生理检测系统、神经细胞生物学仪器和软件、高内涵细胞成像系统、生物芯片扫描仪和软件、克隆挑选系统、分子互作分析系统、Threshold 系统以及筛选试剂等。其中，微孔读板机系列涵盖了光吸收、荧光强度、化学发光、荧光偏振、时间偏振荧光等测读模式以及终点检测、光谱扫描、快速和慢速动力学的检测方法。

Molecular Devices 总部位于美国硅谷中心桑尼韦尔市，并在全球设有多个代表处和子公司，包括美国、法国、英国、德国、中国、韩国、日本、巴西等。2005 年，Molecular Devices 在上海设立了中国代表处，2012 年 Molecular Devices 在国内正式成立商务公司：美谷分子仪器 (上海) 有限公司。



更多精彩内容
尽在官方微信

美谷分子仪器 (上海) 有限公司

全国咨询服务热线: 400-820-3586

上海 电话: 86-21-3372 1088

北京 电话: 86-10-6410 8669

成都 电话: 86-28-6558 8820

台北 电话: 886-2-2656 7585

香港

www.MolecularDevices.com.cn Email: info.china@moldev.com

传真: 86-21-3372 1066

传真: 86-10-6410 8601

传真: 86-28-6558 8831

传真: 886-2-2894 8267

传真: 852-2289 5385

地址: 上海市长宁区福泉北路 518 号 1 座 501 室 200335

地址: 北京市朝阳区广渠东路 3 号中水电国际大厦 612 & 613 室 100124

地址: 成都市锦江区东御街 18 号百扬大厦 2208 室 610016

地址: 台北市内湖区堤顶大道二段 89 号 3 楼

地址: 香港中环皇后大道中 15 号置地广场 公爵大厦 21 楼