

APPLICATION NOTE

使用自动细胞成像系统进行细胞毒性评价和细胞活/死测定

Matthew Hammer and Oksana Sirenko, PhD | Application Scientist | Molecular Devices

简介

细胞活 / 死测定被广泛应用于各种研究领域，包括各种化合物的细胞毒性作用、实验处理或基因表达变化的研究。自动细胞成像和分析系统提供了一种评价细胞活性和细胞死亡的最佳方法。在本篇应用文献中，我们介绍了使用 ImageXpress®Pico 自动细胞成像系统以及 CellReporterXpress 自动图像采集和分析软件对 EarlyTox™ Live/Dead 检测试剂处理的细胞进行成像。

EarlyTox Live/Dead 检测试剂盒包含了针对哺乳动物活细胞和死细胞的标记物。活细胞可被在细胞质中能够发出强烈绿色荧光的 Calcein AM 染色。不发荧光的 Calcein AM 可穿透完整细胞膜且其乙酰羟甲基酯 (AM) 基团可被细胞内的脂酶裂解，得到可发出荧光的钙黄绿素分子。死细胞标记物乙锭二聚体-III (EthD-III) 对完整细胞质膜而言既无荧光也无穿透能力。当与死亡细胞相关的细胞膜完整性受到损伤时，EthD-III 进入细胞并与细胞核结合，在细胞中产生明亮的红色荧光。影响细胞膜完整性的细胞毒性事件可以使用这种方法准确的评估。

该检测试剂盒可对测试化合物的全浓度响应特性进行表征。这种免洗、均相实验可减少因为洗涤步骤导致的死细胞被冲洗掉的情况。使用 ImageXpress Pico 系统和 CellReporterXpress 软件能准确检测到来自钙黄绿素和 EthD-III 的荧光信号并获得高质量的图像及分析结果。

材料

- EarlyTox Live/Dead Assay Kit
 - Explorer Kit (2-Plate Size, Molecular Devices P/N R8340)
 - Bulk kit (10-Plate Size, Molecular Devices P/N R8341)
- HeLa 细胞 (ATCC P/N CCL-2)

- HeLa 培养基
 - 补充谷氨酰胺和血清的最低必需培养基
- Staurosporine (Sigma P/N S5921)
- Mitomycin C (Sigma P/N M4287)
- 384- 孔黑色, 底透微孔板 (Corning Falcon P/N 62406-490)
- ImageXpress Pico 自动细胞成像系统和 CellReporterXpress 软件

方法

HeLa 细胞以 5,000 细胞 / 孔接种于黑色 384 孔底透微孔板中，37°C, 5% CO₂ 孵育箱内生长过夜。用十字孢碱 (staurosporine) (通用蛋白激酶抑制剂和潜在的抗癌治疗药物) 或丝裂霉素 C (强效 DNA 交联剂与化疗药物) 处理细胞 24 小时，做 4 个平行，按 1:3 梯度稀释，起始最高浓度为 10 μM 十字孢碱和 300 μM 丝裂霉素 C。

化合物处理完成后，用 Live/Dead 检测试剂结合 Hoechst33342 核染料 (Thermo Fisher) 对细胞进行染色。每孔移去一半体积液体并替换成 2x Calcein AM 和 EthD-III 染色液。染色液终浓度为 2 μM Calcein AM 和 3 μM EthD-III。在添加 Hoechst (6 μM 终浓度) 前，孔板在 37°C, 5% CO₂ 下孵育 30 分钟。细胞再次以 37°C, 5% CO₂ 孵育 15 分钟。最后一次孵育结束后立即将孔板在 ImageXpress Pico 系统上用 10x Plan Fluor 物镜进行成像，荧光通道分别为针对 Calcein AM 的 FITC 通道、针对 EthD-III 的 Texas Red 通道和针对 Hoechst 染料的 DAPI 通道。在此放大倍数下，一张单独的图像一个视野下可以采集多达

优势

- 利用一种高效免洗实验方法来测定细胞活性
- 准确定量活细胞或死细胞
- 通过预设分析模块快速获得相关统计学结果

4000-4500 个细胞，足以获得统计学相关结果。

使用细胞分类模块进行图像分析

利用 CellReporterXpress 软件中的细胞分类分析模块对图像进行分析。此模块可识别和区分活细胞或死细胞。Hoechst 染色用于识别总细胞，而 Calcein AM 或 EthD-III 作为特异性染色用于将细胞分类为阳性或阴性。图1展示了用十字孢碱处理和未处理的阳性细胞和阴性对照以及相关分析所识别的阳性和阴性细胞。分别进行分析，以确定活细胞或死亡细胞的数量和百分比。

从剂量-应答曲线计算EC₅₀毒性

对活细胞和死细胞成像，并基于 Calcein AM (绿色荧光) 或 EthD-III (红色荧光) 的细胞阳性染色进行细胞分类定量分析 (图1)。用十字孢碱和丝裂霉素 C 处理 HeLa 细胞均展示出浓度依赖性的死细胞百分比的增加和活细胞百分比的下降。图2所呈现的剂量应答曲线，活细胞百分比对化合物浓度，其十字孢碱的 EC₅₀ 值为 0.569 μM，而丝裂霉素 C 是 223 μM。死细胞百分比曲线得到的十字孢碱 EC₅₀ 值为 0.492 μM 而丝裂霉素 C 为 6.305 μM。

总结

EarlyTox Live/Dead 检测试剂盒结合 ImageXpress Pico 系统和 CellReporterXpress 软件，能够通过简单高效的工作流程实现对活细胞和死细胞的精确测定。自动成像和定量分析使得我们能够测试毒性化合物并非常适合于大量生物学检测中对细胞活性的评价。



扫一扫关注我们
的官方微信

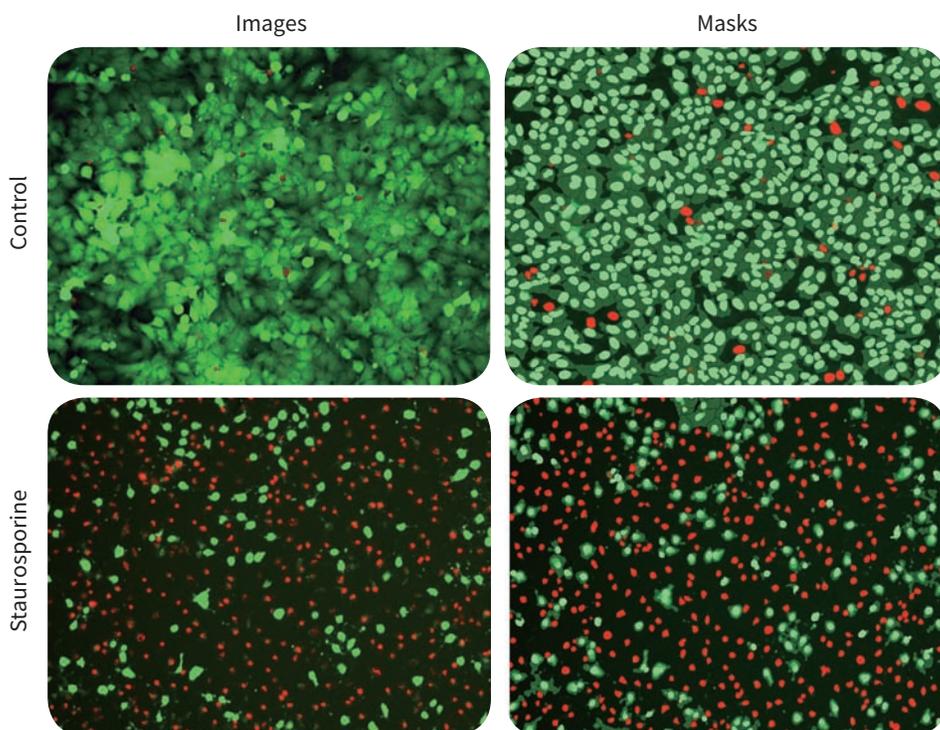


图 1: 阴性对照细胞和 0.1 μM 十字孢碱处理的细胞的代表性图像。左侧: Hoechst 核染色 (蓝色)、Calcein AM 染色 (绿色) 和 EthD-III 染色 (红色) 的 HeLa 细胞 10x 采集到的图像。右侧: 分析识别结果展示了绿色的活细胞核和红色的死细胞核

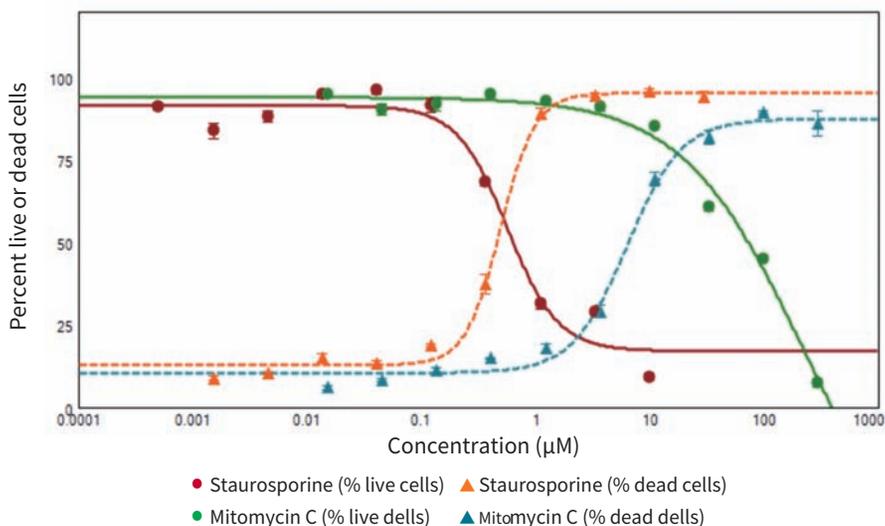


图2: 不同浓度十字孢碱或丝裂霉素 C 处理 HeLa 细胞得到的活细胞和死细胞百分比浓度依赖曲线。平均值和标准差来自 4 次重复。从曲线中所得 EC₅₀ 值如下: 0.569 μM 十字孢碱和 223 μM 丝裂霉素 C 的 % 活细胞以及 0.492 μM 十字孢碱和 6.305 μM 丝裂霉素 C 的 % 死细胞。