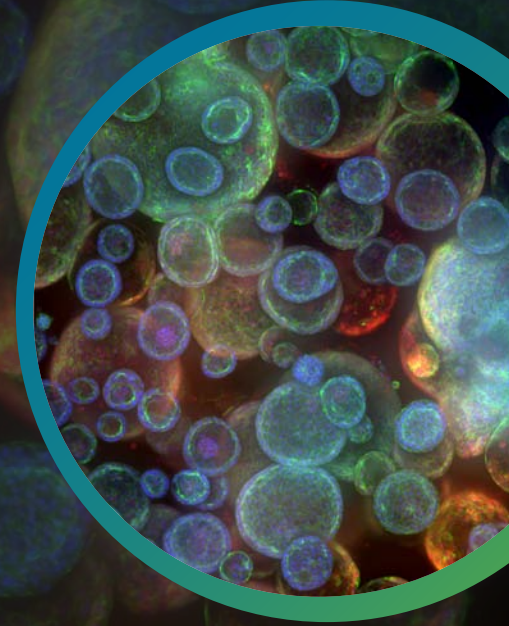


APPLICATION NOTE

使用高内涵激光成像系统提高复杂生物检测的灵敏度、速度和分析质量

Oksana Sirenko, PhD | Sr. Research Scientist | Molecular Devices
Jayne Hesley | Sr. Applications Scientist | Molecular Devices
Matt Chan | Optical Engineer | Molecular Devices



简介

随着高度复杂的基于细胞的二维和三维分析技术在生物研究中的应用日益广泛，人们迫切需要提高自动化高内涵成像能力。在此，我们展示了使用 ImageXpress® Confocal HT.ai 高内涵成像系统在检测灵敏度、分析质量和采集速度方面的提升。使用高功率激光光源，该系统可显著增加样品的光通量，从而产生更明亮的图像、更高的灵敏度和更高的检测通量。这种影响对于灵敏度和成像是限制因素的检测尤其重要。为了证明激光光源的实际影响，我们展示了几个复杂生物学的检测系统结果：GPCR 活化检测、肿瘤细胞球和肺类器官。

方法

仪器

ImageXpress Confocal HT.ai 系统配备了多线激光光源与相匹配的滤片，跨越 405nm 到 730nm 激发。与上一代 LED 光源相比，该光源为样品提供了显著增强的照明功率。

优势

- 使用激光光源提高图像强度和检测灵敏度
- 曝光时间减少 3-4 倍，相应的成像时间减少 1.5-3 倍
- 保证您的检测获得高质量图像

在下面的示例中，比较了 ImageXpress Confocal HT.ai 系统和上一代 ImageXpress Micro Confocal 系统。

细胞检测

如前所述，使用表达 GFP 标记的 beta- arrestin 的细胞系进行 Transfluor® 检测，该细胞系在激活时与感兴趣的受体相关¹。用异丙肾上腺素刺激细胞，引起聚集的内化受体 (pits) 的剂量依赖性表现，这些受体在 FITC 通道中用 20X Plan Apo 物镜 (60' 转盘) 呈现出来。

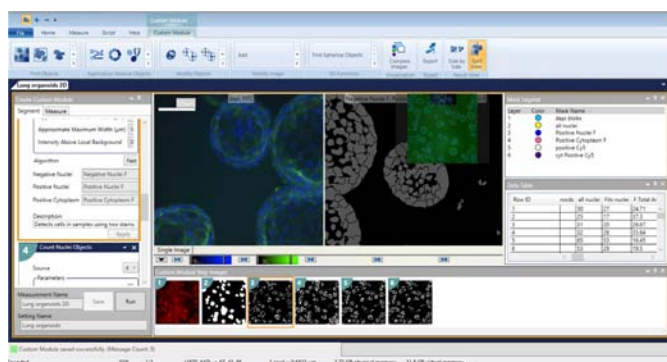
如前所述，使用 U 型底低附着 (Corning) 微孔板从 HTC116 结肠癌细胞系 (ATCC) 形成 3D 细胞球² (Sirenko, 2015)。细胞球用抗癌药物处理 48 小时，用 DRAQ5、HCS CellMask Orange 或 AF555 Phalloidin 和 Whole Cell Green 或 AF488 Phalloidin (Thermo Fisher Scientific) 固定和染色。

细胞球用 20X Plan Apo 物镜进行 3D (5 μm 步进 Z 轴系列) 成像。在 MetaXpress® 高内涵图像采集和分析软件中对最大投影图像进行细胞分析。

3D 类器官是由原代人肺上皮细胞 (ScienCells) 在 Matrigel (Corning) 圆顶中形成的，使用 Stem Cell Technologies 试剂盒和方案制备³。成熟的肺类器官 (发育 6 周后) 被固定并用 Hoechst、MitoTracker Orange 和 AF488 Phalloidin 染色。10X 放大倍率以 3D (Z-stack 范围 150-250 μm) 方式对类器官成像并使用 MetaXpress 3D 图像分析工具分析图像。



配备水镜的 ImageXpress Confocal HT.ai 高内涵成像系统



MetaXpress 高内涵成像采集和分析软件

通道	LED/ 激光 (nm)	LED 光源功率 (mW)	激光光源功率 (mW)
Violet	377/405	200	400
Blue	NA/445		1000
Cyan	475/470	200	1000
Teal	NA/520		500
Green	543/555	300	1000
Yellow (optional)	560/555	200	1000
Red	631/640	155	900
NIR	NA/730		700

结果

GPCR 活化检测, Transfluor

G 蛋白偶联受体是最大的一类药物靶点，在生物筛选分析中起着重要作用。Transfluor 检测定量 GFP 标记的 beta-arrestin 蛋白的内化，beta-arrestin 蛋白与感性趣的激活的受体有关。这种内化导致出现小的荧光斑点，这些荧光斑点通过高内涵成像进行计数和特征描述。

这些斑点相对较暗，用 LED 光源需要 1 秒左右的曝光。ImageXpress Confocal HT.ai 系统的激光光源可将曝光时间减少 3-4 倍，与此同时成像时间可减少 33%% (获得 1.5 倍 检测速度)。另外，检测 Z' 值也提高了约 20%。

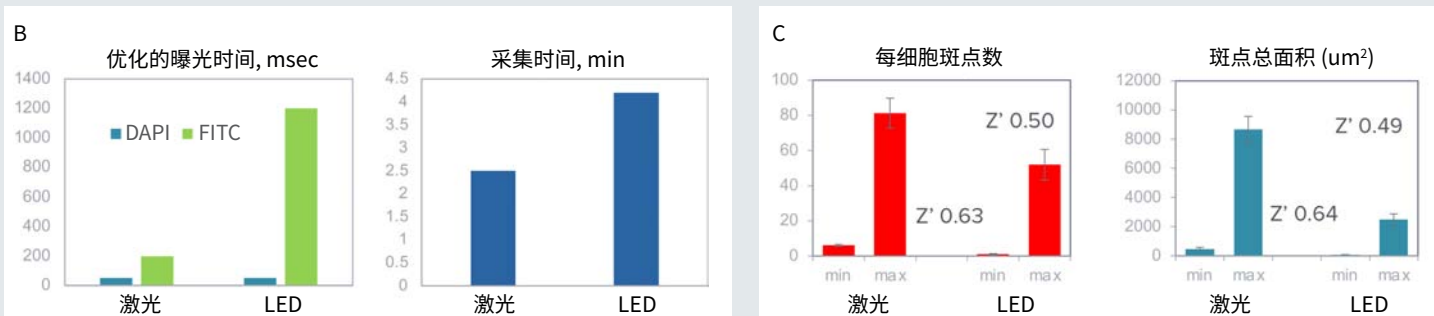
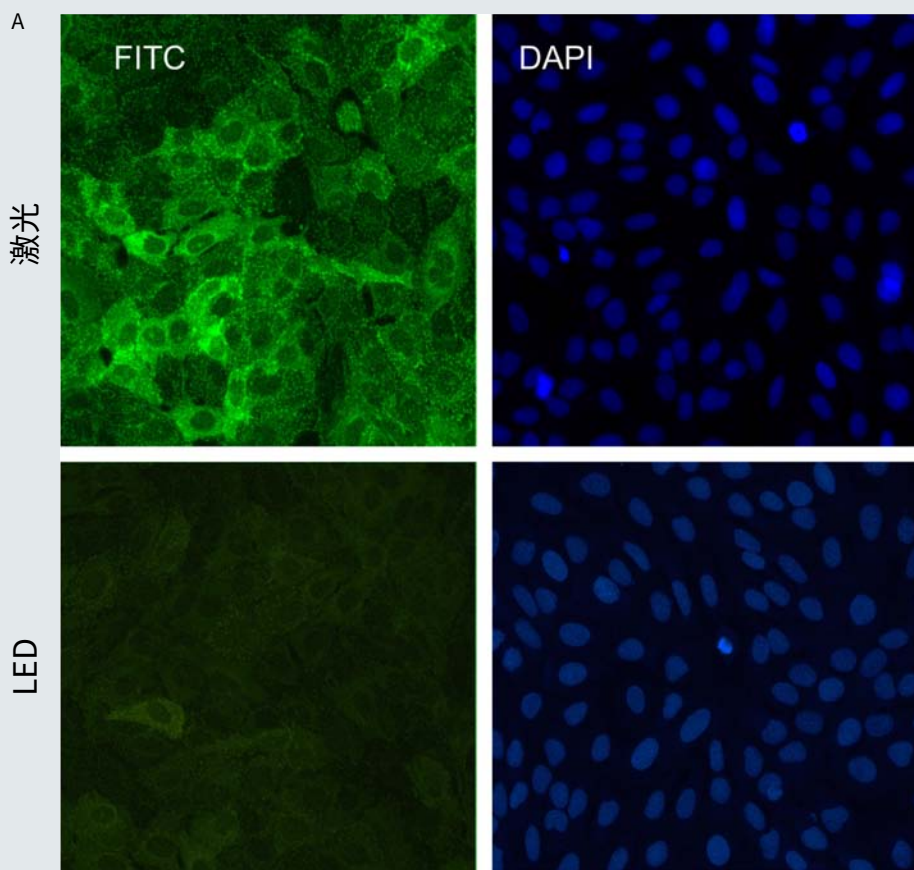


图 1 A. 用异丙肾上腺素激活受体后形成的绿色小点。Hoechst (蓝色) 染细胞核。对 LED 和激光光源 (针对激光进行了优化) 使用相同的曝光时间获取图像。B. 使用激光光源使优化的曝光时间和成像时间大大减少了。C. 比较激光和 LED 系统拍摄的图像的检测质量 (Z' 值)。

3D 癌细胞球

在第二个实验中，我们比较了 LED 激发与激光激发的标准成像系统 ImageXpress Confocal。HCT-116 细胞球在圆形底孔板中生长 4 天，一些孔在最后两天接受 5 μ M 细胞松弛素 D 或诺科达唑的抗癌化合物处理。固定细胞球并用 DRAQ5 (核)、Whole Cell Green 和 Alexa Fluor 555 Phalloidin (肌动蛋白); 或 DRAQ5、HCS CellMask Orange (全细胞) 和 Alexa Fluor 488 Phalloidin (肌动蛋白) 染色。用 20X Plan Apo 物镜采集 Z 轴系列图像，采集的球体深度为 150 μ m (31 层, 5 μ m 步进)。

对最大投影图像进行图像分析，计算细胞核数，确定球体面积。这些图像不管使用 LED 还是激光激发采集，都是以产生 14 位图像的曝光获取的。通过独立优化每个光源的曝光时间，根据收集的通道和使用的荧光团数量，使用激光采集 3D 细胞球的时间大约是 LED 采集时间的一半。

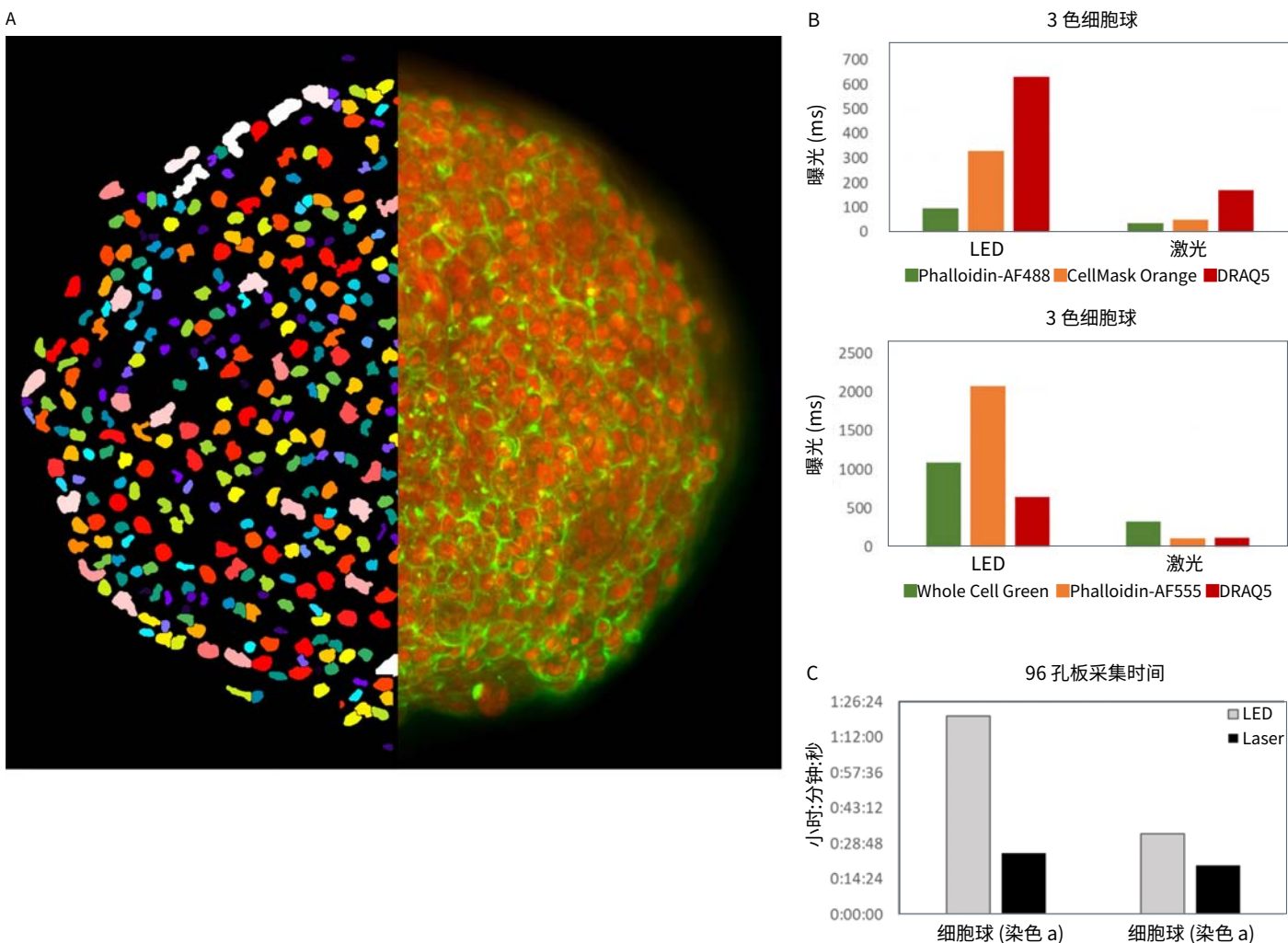


图 2 A. 未处理细胞球 (右半边) 经 DRAQ5 和 Phalloidin-AF488 染色叠加的 2D 投影图像和核分割掩模 (左半边)。B. 曝光时间优化以获得同等像素强度的图像。针对不同的染色方法需要不同的曝光。C. 在 ImageXpress Confocal HT.ai 系统中用 20X, 对比 LED 和激光光源采集 96 孔细胞球孔板的速度。

A

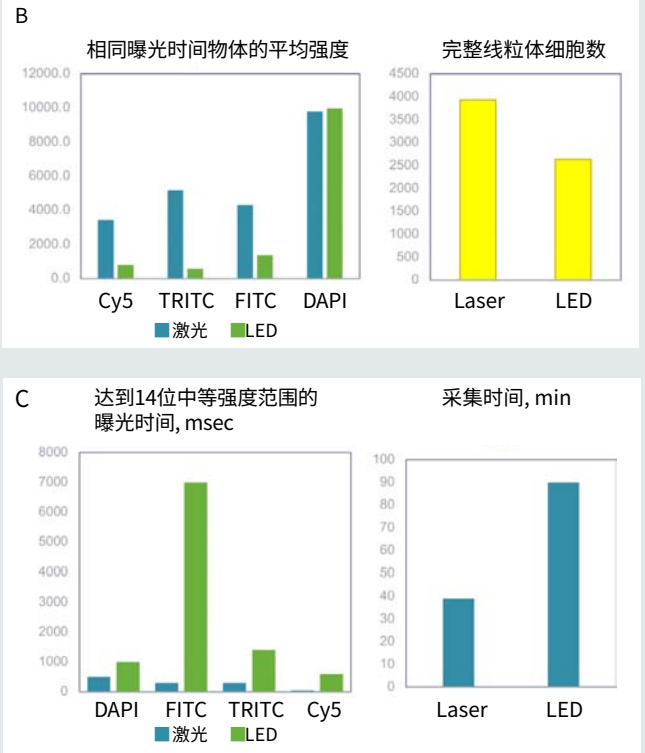
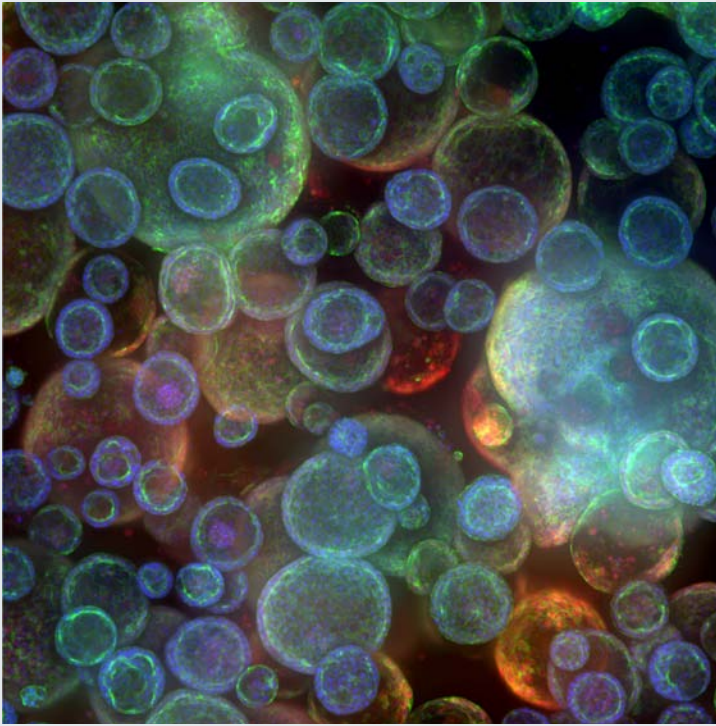


图 3 A. Matrigel 中类器官培养的共焦图像 (最大投影), 10X。B. 使用相同的 LED 和激光光源曝光时间拍摄图像。代表性图像显示的物体 (线粒体完整的细胞) 的细胞计数和平均强度。C. 曝光时间匹配 (14 位强度范围) 的激光和 LED。通过使用激光, 优化的曝光时间和成像时间大大缩短。

3D 肺类器官

肺类器官培养从原代肺上皮细胞开始, 然后使用 Stem Cell Technologies 的试剂和方案在基质凝胶圆顶中生长。简单地说, 细胞首先在 2D 中扩增, 然后与生长因子还原的 Matrigel 混合, 并以 24 孔板或其他孔板形式接种到 Matrigel 圆顶中。类器官对于疾病建模和评估化合物作用是非常有用的工具。类器官的自动成像和分析是定量评估类器官表型变化和提高了类器官实验通量的重要方法。共聚焦成像和 3D 图像分析对于捕捉 3D 生物系统的复杂性特别有用。

我们已经评估了激光对 3D 类器官样品成像的影响。类器官包括具有复杂空腔和囊泡结构的球形物体, 这些物体通过 Matrigel 用 20-30 层 Z 轴平面以 10X-40X 放大倍率成像。用已知会损伤肺组织的化合物处理类器官, 并用可见的线粒体、细胞骨架和细胞连接的标记物染色。进行 3D 体积分析以计数和表征类器官和类器官内的细胞。我们能观察到像素强度、分辨率和物体锐利度的提高, 从而得到更高质量的分析。重要的是, 由于总曝光时间减少了 8 倍, 成像速度提高了 2.3 倍 (时间缩短了 51-57%)。

激光光源对检测速度和通量的影响

为了测试激光对高内涵筛选分析的检测速度和通量的影响，我们比较了 5 位科学家进行的 10 次独立检测的曝光时间和采集速度。下面的数据说明了观察到的这 10 次检测的曝光时间减少和速度增加（时间缩短）。

检测	每个视野的总曝光时间, msec		曝光时间减少 (倍数)	速度提升 (倍数)
	LED	激光		
1	1400	800	1.8	1.53
2	700	230	3.0	1.86
3	700	230	3.0	1.71
4	9500	1150	8.3	2.31
5	1250	250	5.0	1.54
6	5010	000	5.0	2.03
7	1020	350	2.9	1.38
8	1340	370	3.6	1.54
9	3830	560	6.8	3.21
10	1200	255	4.7	1.55

总结

激光光源的照明功率显著提高了图像强度和检测灵敏度，这对于较暗的样品尤为重要。激光成像系统大大减少了曝光时间，从而提高了成像速度和检测通量。3D 成像尤其得益于激光光源。我们描述了几种生物学检测，并证明了更高的图像强度和改善的图像质量，从而提高了检测灵敏度和成像速度。

References

1. TransfluoR, MolDev <https://www.moleculardevices.com/en/assets/app-note/dd/img/gpcr-activation-using-metaxpress-acuityxpress-software-and-transfluoR-assay-system#gref>
2. Sirenko et.al., 2015, Assay and drug development technologies <https://www.liebertpub.com/doi/pdfplus/10.1089/adt.2015.655>
3. Stem Cell Technologies, <https://www.stemcell.com/pneumacult-airway-organoid-kit.html>



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 公署大厦 21 楼

