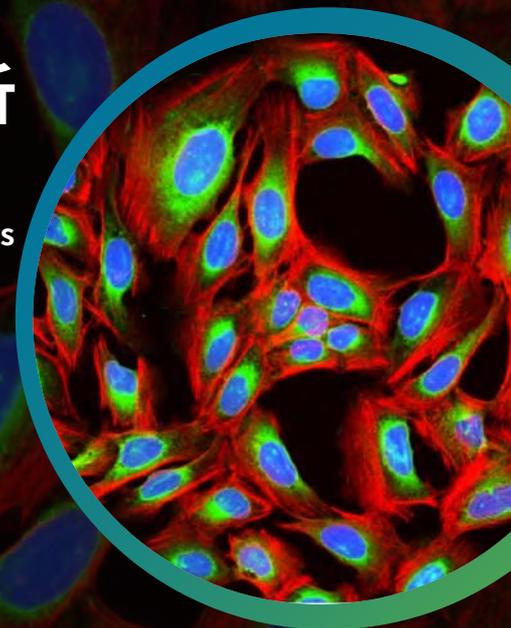


APPLICATION NOTE

基于细胞绘画法的高内涵表型分析

Angeline Lim, PhD | Applications Scientist | Molecular Devices
Christopher Nishioka | Field Applications Scientist | Molecular Devices
Misha Bashkurov | Product Owner | Molecular Devices



背景介绍

高内涵表型分析越来越广泛应用于许多的研究领域，包括基因功能研究、药物研发和毒理学。这种方法的优点是非常客观的从单细胞水平获取多维的信息，能够对单个细胞的状态进行分析和描述，并与总体分析数据进行比较。而许多传统的表型分析则是在要研究的通路中，只主观选取少数几个重要的指标来分析¹。因此，在传统的表型分析中，大多数因实验处理导致的生物相关的变化容易被忽略掉。

一个细胞的表型分析是由成千上万个表征细胞状态的可量化指标组成的。这些指标包含从生物标识物表达、结构和分布抽提出来的信息。通常，这些标记是细胞器特异性识别的，并提供有关其结构、空间上与其他亚细胞结构的关系的信息。这些细胞的分类信息能够在研究化合物、小分子物质或基因扰动时提供客户有效的分析依据。具有相似作用机制的化合物 (MOA) 常常导致相似的细胞形态变化。因此，表型谱之间的比较可以为新化合物的 MOA 提供依据³。同样地，同一途径中的遗传干扰常常导致相似的表型谱，这说明表型谱可用于高通量功能基因组学研究⁷。

优势

- 使用 ImageXpress Micro 共聚焦高内涵成像分析系统简化细胞绘画分析工作流程。
- 使用具有学习功能的强力软件进行客观的图像分析。
- 使用界面友好的 web 平台快速分析大型多维数据集

细胞绘画分析，通常用于表型分析，使用多达六种荧光染料来标记和显示单个细胞水平上的各种亚细胞结构。该分析的目的是尽可能多地观察分析细胞，以构建表明细胞状态的代表性图像。用于细胞绘画分析的标准染料组可以标记细胞核、内质网、肌动蛋白、高尔基体、RNA(和核仁)以及线粒体。高内涵细胞成像系统配备有合适的滤片组，用于快速获取荧光标记的细胞图像。然后进行自动图像分析，以识别、提取和测量特定的细胞特征。这些包含表型谱的大量的参数能够被进一步分析并用于针对性选择或聚类分析 (Figure 1)。

这里，我们展示一个基于 Gustafsdottir et al³ 细胞绘画方法的高内涵表型分析工作流程。该工作流程使用 IN Carta™ 图像分析软件和 HC StratoMiner™ 数据分析，使整个分析易于且具有不牺牲质量的图像分割和测量工具。在 IN Carta 软件中，图像分析程序可根据不同的成

像情况进行参数调整，以实现细胞和细胞器的准确检测。其中深度学习分割模块 (SINAP) 可以用来提高对具有挑战性特征的检测的分析准确性。该模块可用于检测细胞核或其他细胞参数。另外，用户可以使用自己某类实验的数据集来训练深度学习分割模块 (SINAP)，使其成为分析此类实验的专业分析模块。HC StratoMineR 是一个基于网络的平台工具，用于处理大型多维数据集。该平台具有引导式的工作流程用于分析高内涵的数据分析。正因为 HC StratoMiner 是通过浏览器访问的网络工具，因此用户不需要占用额外的计算机资源就可以处理大型数据集。使用这个工作流程，同样的化合物处理的细胞分析出的表型特征是相似的。例如，层次聚类分析将紫杉醇和鱼藤酮等剧毒化合物分组。同一分类中，氯喹和汉防己甲素都影响自噬^{2,4}。这些结果证明，这个工作流程是一个用户友好和准确强大的用于高内容表型分析的方法。

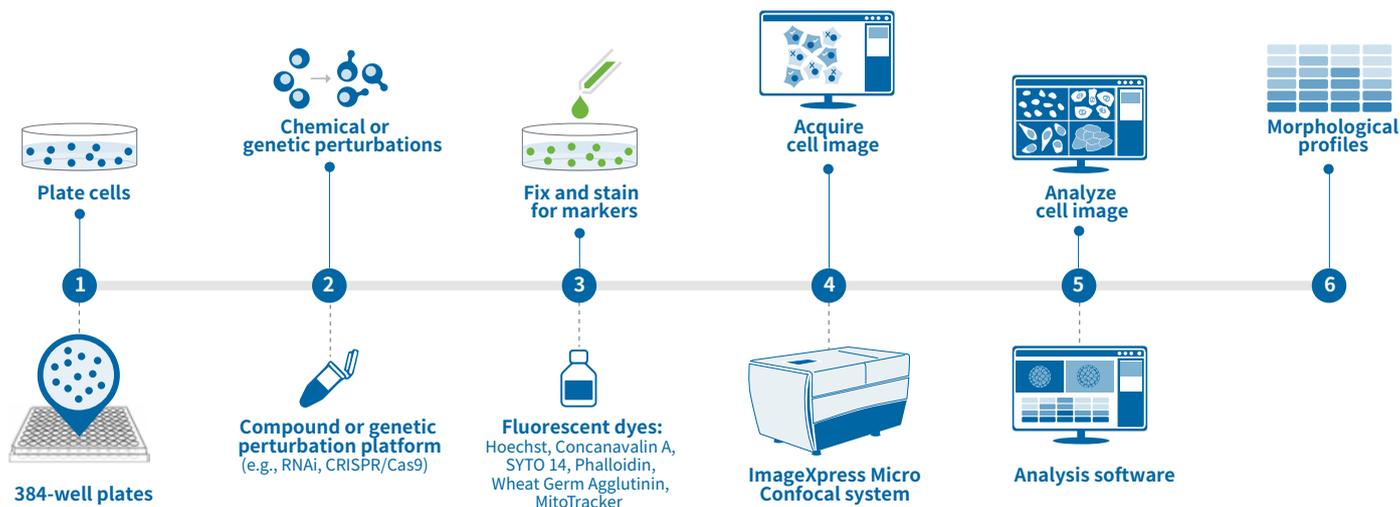


Figure 1 典型细胞绘画分析工作流程。细胞绘画分析是一种形态分析工具，它从单细胞水平生成多参数分析。它是高度通用的，可以适应不同的细胞系。一个标准的工作流程是以适当的密度播种细胞，然后进行所需的处理或生物扰动。接下来用适当的染料染色各种细胞结构并使用高含量成像系统成像。图像分析提供了成百上千的测量数据，形成了细胞的表型 / 形态轮廓的描述。

实验方法

细胞培养

根据制造商提供的方法，对 U2OS 细胞系 (ATCC) 进行传代和培养。根据 Bray et al¹ 提供的方案来实施细胞绘画分析方法。简单地说，将 U2OS 细胞接种在 Greiner 384 孔 (384-well μ Clear[®] plates) 透明板中，每孔 2000 个细胞，共 40 μ L McCoy 培养基 (补充 10% FBS)。药物处理前，细胞在 37°C 培养 24 小时。

在细胞铺板后 24 小时并在添加化合物之前，使用 2% FBS (体积 / 体积) 含量的 McCoy 培养液替换之前的细胞培养基。以下列举 11 种需要用到的化合物: Ca-074-Me, CCCP, chloroquine (Enzo), cytochalasin D, etoposide (Calbiochem), latrunculin B, rapamycin (Sigma), rotenone (Enzo), staurosporine, paclitaxel, and tetrandrine (除非另有说明，所有化合物均购自 SelleckChem)。化合物分别按照 1:3 的梯度稀释设置 7 个不同的浓度处理细胞，每个化合物浓度处理的样本设置 4 个检测复孔。在同一块检测板中同时设置 DMSO 对照组，阴性对照组和阳性对照组。化合物处理的细胞孵育时间为 24 小时。

细胞染色

活细胞使用 MitoTracker DeepRed (终浓度 500nM) 在暗室中 37°C 孵育 30 min，然后使用 PFA (3.2% vol/vol) 细胞固定反应 20 min。在室温下使用 triton-100 (0.1%) 孵育细胞 20min。染色液配置成以下的浓度: 5 μ L/mL phalloidin, 100 μ g/mL concanavalin A, 5 μ g/mL Hoechst, 1.5 μ g/mL WGA and 3 μ M SYTO 14 dye，溶于封闭液体系 (1X HBSS and 1% wt/vol BSA)。在室温下，洗涤细胞并加入染色液孵育 30min。染色完毕后，移除染色液并洗涤细胞 3 次，然后用锡箔纸包裹避光保存。所有的细胞洗涤步骤均使用 1X HBSS 溶液。

细胞成像

使用 ImageXpress[®] Micro Confocal 高内涵成像系统 (Molecular Devices) 进行细胞成像。成像使用 20X Plan Apo 物镜，共聚焦针孔尺寸 60 μ m；所有荧光通道的激发和发射波段信息为 (ex/em): DAPI 377/447, FITC 475/536, TRITC 543/593, TexasRed 560/624, Cy5 631/692。每孔设置 4 个成像视野。利用最佳聚焦投影方式获得了一个由三幅图像组成的小 Z 轴叠层图像，以解决可能影响图像聚焦的板形问题。

特征提取

利用 IN Carta 软件进行图像分析。图像分割方法如下：以 Hoechst 染色细胞核为主要目标，采用自定义分割算法对图像中染色目标进行分割 (预染为细胞核的模型)，接触图像边缘的目标被排除在计算中。TRITC 通道使用 Robust 选项对细胞进行分割。三个额外的细胞器分类方法使用指定选项: Mitochondria (networks), actin (fibers) and endoplasmic reticulum (networks)。每个细胞总共可以选择 280 个测量值作为数据输出。

数据分析

在特征提取完毕后，单个细胞水平的数据被导出成 CSV 格式的文件并和包含有化合物信息的高内涵数据的 text 文件一起上传到 HC StratomineR (CoreLife Analytics)。孔板预览导航图是使用 StratoMineR 界面来定义的。使用质量控制工具，将状态异常的孔从分析中去除 (被移除的异常孔少于 50 个)。软件通过特征缩放的建议进行数据转换。主要成分分析 (PCA) 用于数据整理。由于产生的 15 个成分用以评估模型的距离评价，是用来衡量不同处理下细胞的表型效应程度⁶。模型的距离评价可用于针对性选择或聚类分析。

结果

实验共使用 11 种化合物处理细胞，其中一些已经在先前的细胞绘画研究中用作参考化合物⁵。化合物孵育处理后，对细胞中相应细胞器进行染色，包括线粒体、肌动蛋白、高尔基体、核仁 (RNA 颗粒)、内质网 (ER) 和细胞核 (Figure 2)。

使用 IN Carta 软件从每个检测到的细胞中提取所有不同类别细胞的细胞特征。这个软件拥有：A. 直观的用户界面；B. 提供对表型分析很重要的测量数据，包括强度、纹理、形状、空间协调（如细胞器之间的空间关系）和共定位；C. 使用深度学习语义分割模块 (SINAP) 进行全面的特征识别，该模块可以进行非常客观的特征分割。这些模型能够通过图像进一步训练软件来自主识别用户感兴趣的目标。

深度学习分割模块 (SINAP) 加入分析流程用于改善细胞核的识别 (Figure 3)。内置的细胞核分析方法是在超过 1000 多张细胞核图像的识别中建立起来的自主识别

方法。训练集包括使用不同放大倍数的成像模式（荧光和明场）获得的细胞核，并用不同的染料（DAPI, Hoechst, 苏木精 / 曙红）染色，因此使其适用于各种各样的图像。在这种方法的自学习建立过程中，图像集包含了明场和荧光成像模式下不同放大倍率和各种染色 (DAPI, Hoechst, Hematoxylin/Eosin) 的情况，因此该方法能够适用于各种各样的图像分析。在图像分析设置期间，我们能够给观察到该核模型分析方法提供了改进的细胞核检测并且能够准确地分割相接触的细胞核。SYTO14 染色标识细胞质的样本使用 Robust 选项的细胞分割方法来进行分析。实验同时还对内质网，线粒体和肌动蛋白进行了识别和分析。另外，实验还从整个细胞，细胞核和细胞质的所有通道进行总体强度的测量。

对特征的分析能够容易的在 IN Carta 软件中进行预览。热图显示和直方图等选项可用于一般数据探索。单个细胞的各项分析数据或整个样本孔的整体数据均可以以 CSV 格式的文件导出，并可用于进一步的数据挖掘和分析 (Figure 4)。

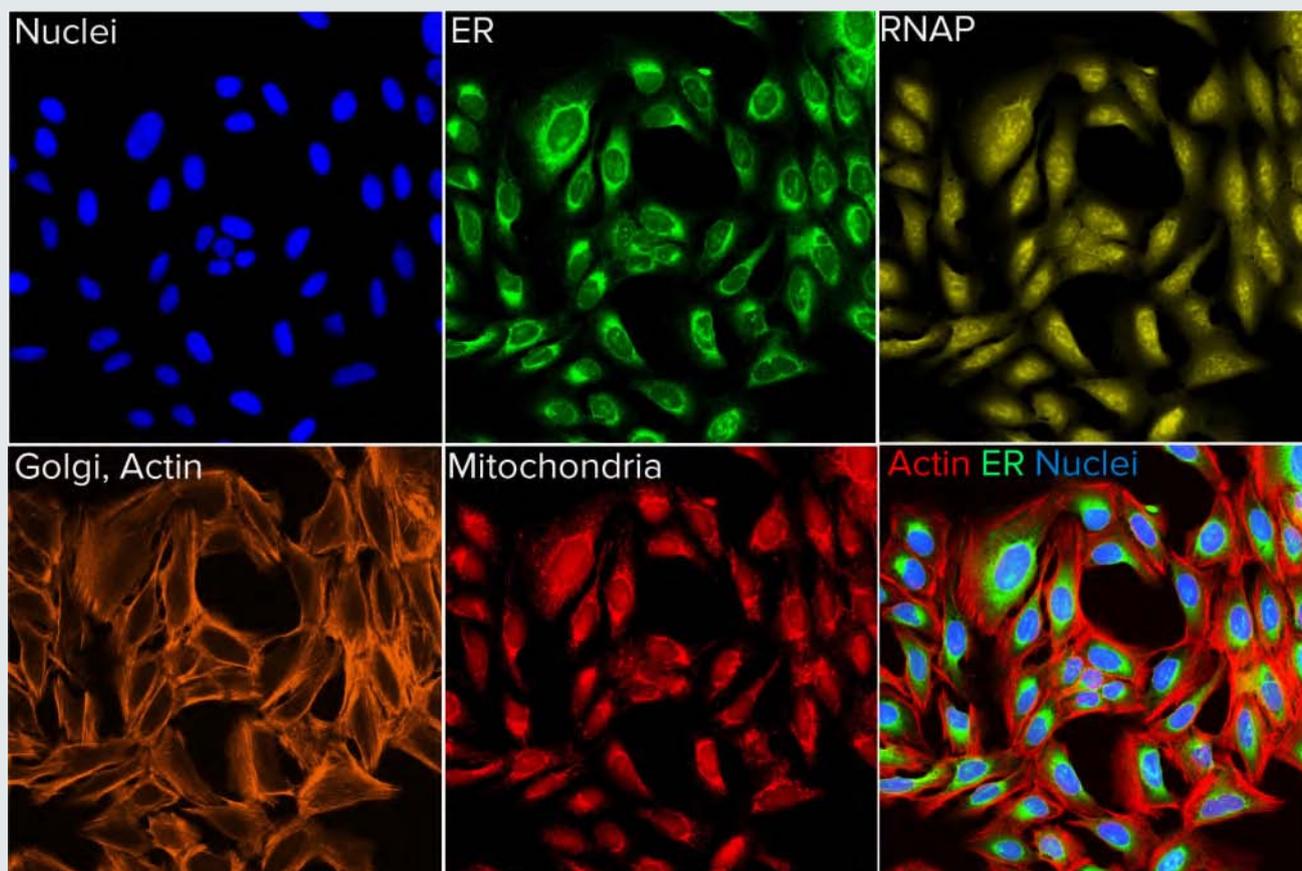


Figure 2 细胞绘画分析。细胞经过化合物处理、染色后，用 ImageXpress 共聚焦系统进行成像。示例图中展示了对照样本孔中每一个通道的图像。最后一幅图显示了由肌动蛋白，ER（内质网）和细胞核染色组成的复合图像。

数据分析

从 IN Carta 软件获取的测量参数能够被导出并上传到 HC StratoMiner 软件中进行进一步的数据分析。这里，我们使用 HC StratoMiner 软件可以引导平台允许非数据专家很容易的浏览整个数据分析工作流程。另外，HC StratoMiner 是通过浏览器访问的网络工具，因此终端用户不需要占用额外的计算机资源就可以处理大型的复杂的数据集。

主要成分分析方法 (广义加权最小二乘法) 用来将 280 个测量值减少到 15 个相关分量。然后进行层次聚类法，并在树状图中表示每个孔之间的关系 (Figure 5)。用相同化合物处理的细胞倾向于聚类在一起。例如，簇 9 仅由星形孢菌素处理的细胞组成。已知具有相似细胞效应的化合物也聚集在一起，如细胞松弛素 D 和 latrunculin B，两种肌动蛋白聚合抑制剂均在簇 6 中发现。已知影响自噬途径的粉防己碱和氯喹也聚集在一起 (簇 5)。这些结果表明，所提出的工作流程是执行高内涵表型分析的一种可行且易于实现的方法。

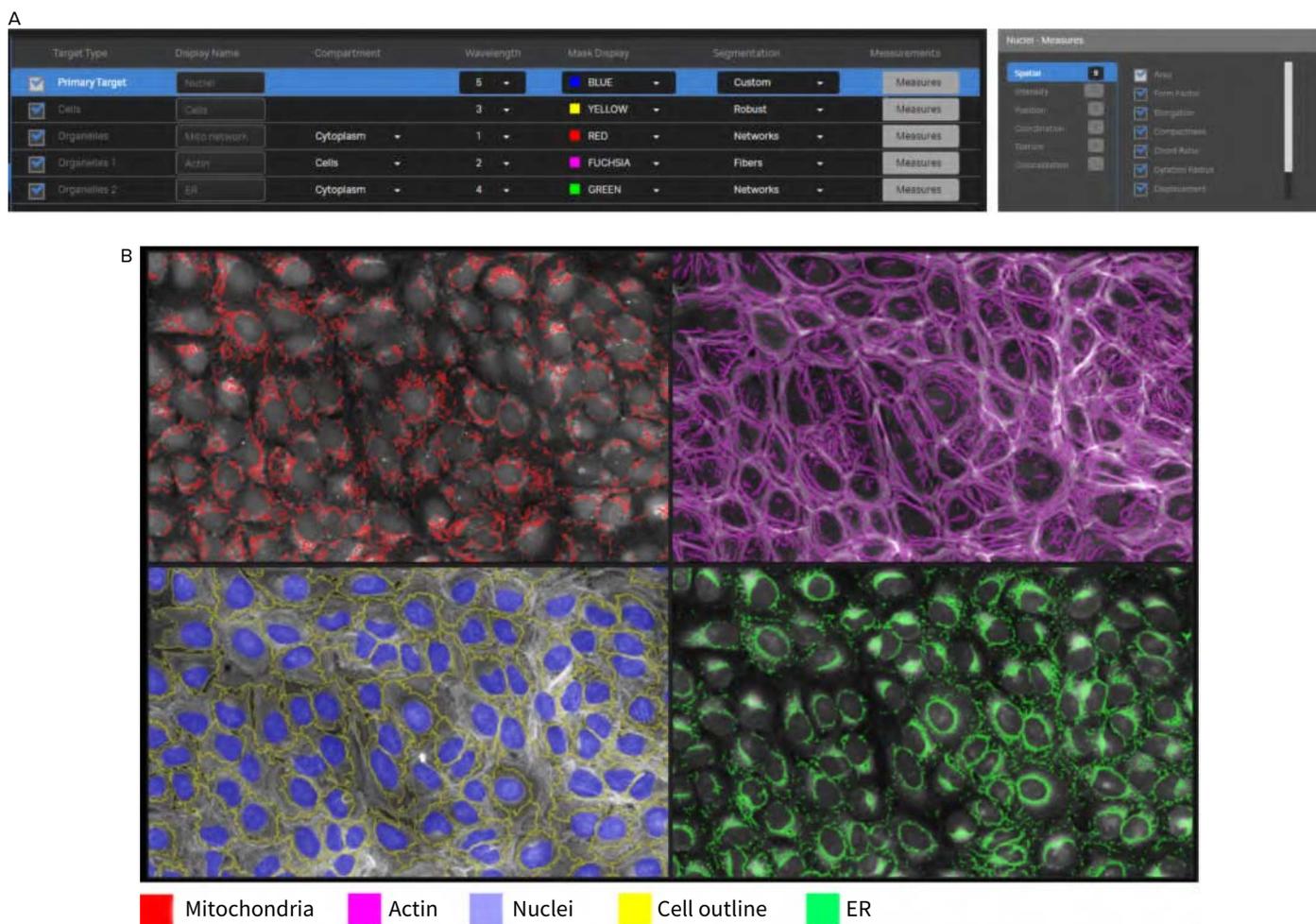
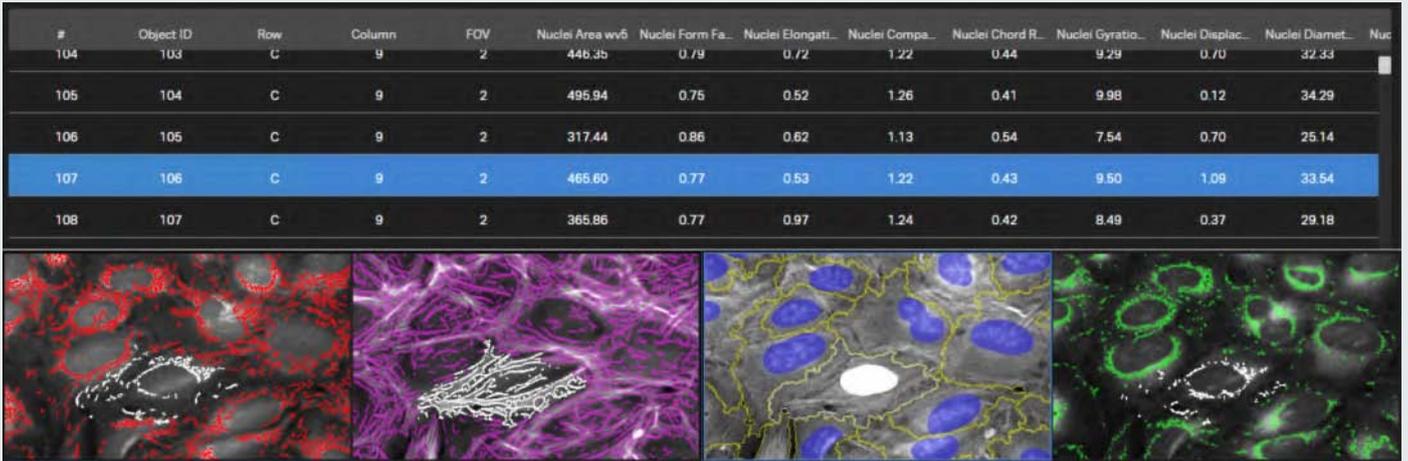


Figure 3 IN Carta 软件中的特征提取。在 IN Carta 软件中创建分析方法用于分割各种细胞结构。在这里，我们使用内置的细胞核模型来实现所有处理中细胞核的准确分割。其他细胞特征，如细胞质室，肌动蛋白丝网络，内质网和线粒体也被指定模式分割。在分析设置期间选择与强度，纹理，共定位和形状相关的测量数据。我们总共选择了 280 个细胞和亚细胞结构的测量指标。A) 分析方法设置的屏幕截图。在“measurements”下选择要输出的数据类别，图中展示的是在“Spatial”选项下可用分析项。B) 在 IN Carta 软件中样品图象的识别标识。

A



B

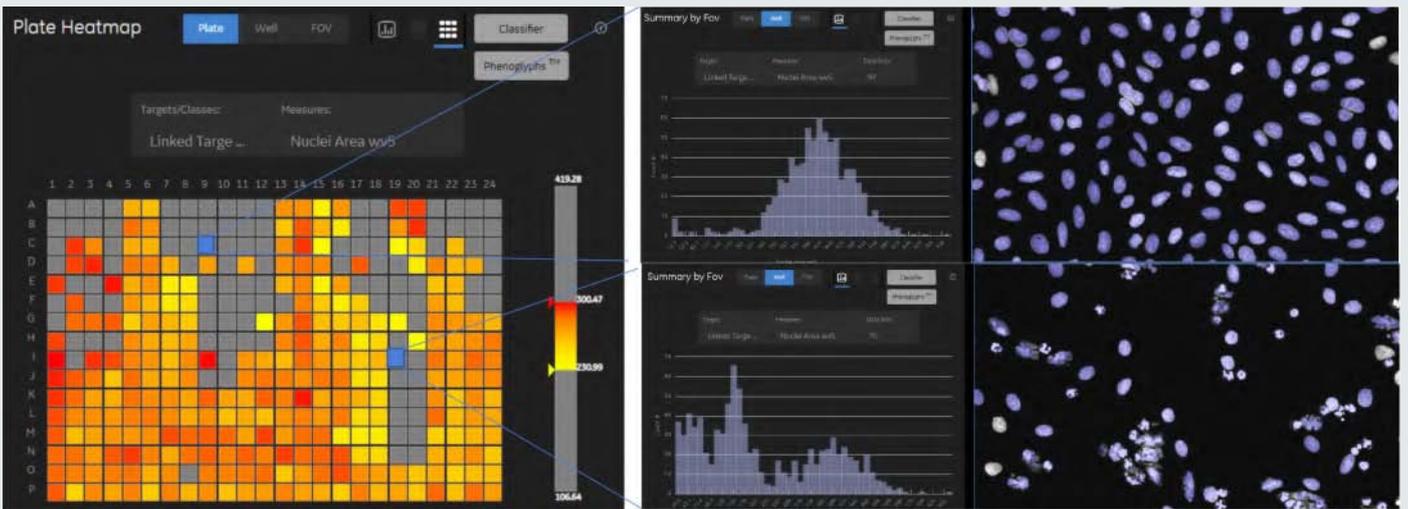


Figure 4 IN Carta 软件中的数据显示。这个软件拥有多种可视化的工具用于对数据的探索。A) 显示的测量值链接到图像中的对象，可以通过单击测量表中的一条线或图像视图面板中的对象 / 单元格来进行选择。被选中的目标在途中使用白色的覆盖标识显示出来。B) 热图和直方图等选项可用。被选择的参数可在孔板示意图中使用热度显示出来。可以调整热图比例，以便仅显示选定的值范围。直方图显示也可用于轻松查看所选测量的分布情况。测量可以导出为 csv 格式以进行进一步的数据分析。

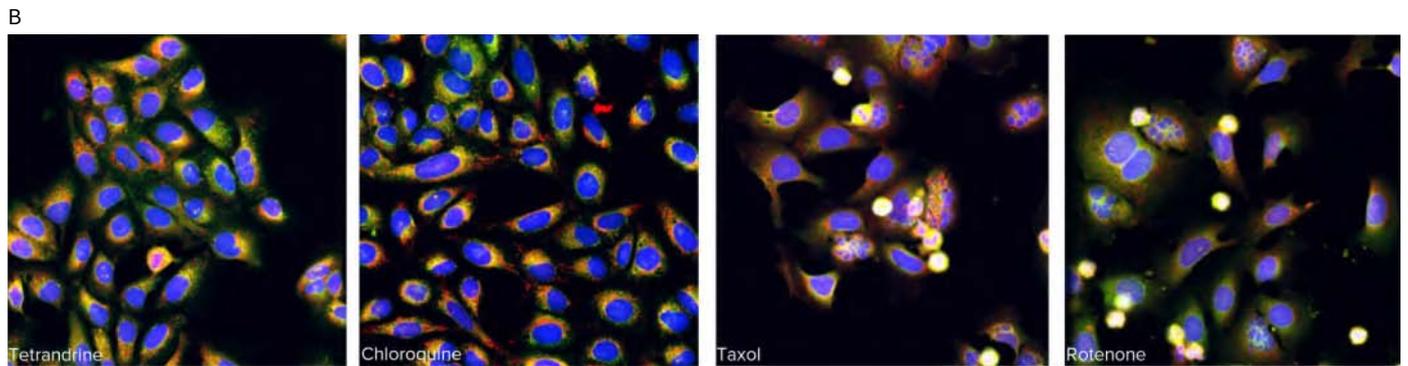
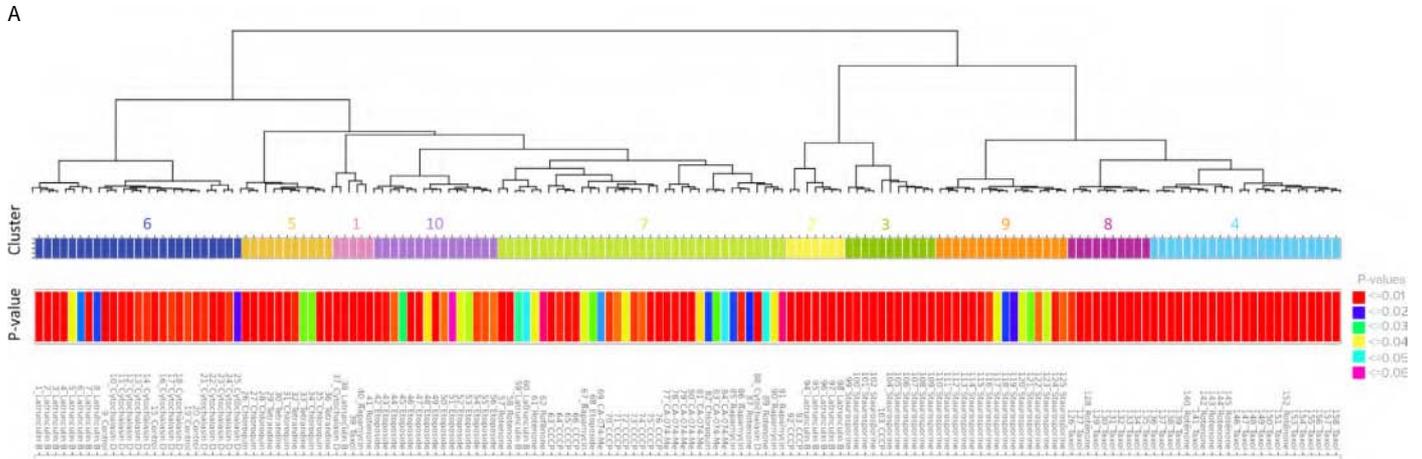


Figure 5 聚类分析。 A) 树状图显示了分层关系。属于同一簇（编号）的孔由彩色条表示。图中标识了每个孔的基于距离评价的 P 值。 B) 属于相同簇的化合物处理的细胞在图中展示出来。簇 5 由粉防己碱和氯喹处理的细胞组成。注意两个孔中 ER 斑点的数量增加。簇 4 由鱼藤酮和紫杉醇处理的细胞组成。注意这些孔的一些细胞中存在泡状结构，表明细胞毒性的作用。

结论

- ImageXpress Micro Confocal 系统适用于高内涵成像和细胞绘画分析。
- IN-Carta 软件将易用性与高级特征分割选项 (SINAP) 相结合，以实现细胞特征的准确和客观的识别。
- StratoMineR 平台允许非数据专家用户通过其直观的指导工作流程快速执行表型数据分析。
- 总体而言，我们的结果显示了使用 ImageXpress Micro Confocal 系统，IN-Carta 软件和 StratoMineR 进行基于图像的分析测定的可行性方案。

参考文献

1. Bray MA, Singh S, Han H, Davis CT, Borgeson B, Hartland C, Kost-Alimova M, Gustafsdottir SM, Gibson CC, Carpenter AE. Cell Painting, a high-content image-based assay for morphological profiling using multiplexed fluorescent dyes. *Nat Protoc.* 2016 Sep;11(9):1757-74. doi: 10.1038/nprot.2016.105. Epub 2016 Aug 25. PMID: 27560178; PMCID: PMC5223290.

2. Gong K, Chen C, Zhan Y, Chen Y, Huang Z, Li W. Autophagy-related gene 7 (ATG7) and reactive oxygen species/extracellular signal-regulated kinase regulate tetrandrine-induced autophagy in human hepatocellular carcinoma. *J Biol Chem.* 2012 Oct 12;287(42):35576-88. doi: 10.1074/jbc.M112.370585. Epub 2012 Aug 27. PMID: 22927446; PMCID: PMC3471698.

3. Gustafsdottir SM, Ljosa V, Sokolnicki KL, Anthony Wilson J, Walpita D, Kemp MM, Petri Seiler K, Carrel HA, Golub TR, Schreiber SL, Clemons PA, Carpenter AE, Shamji AF. Multiplex cytological profiling assay to measure diverse cellular states. *PLoS One.* 2013 Dec 2;8(12):e80999. doi: 10.1371/journal.pone.0080999. PMID: 24312513; PMCID: PMC3847047.

4. Mauthe M, Orhon I, Rocchi C, Zhou X, Luhr M, Hijlkema KJ, Coppes RP, Engedal N, Mari M, Reggiori F. Chloroquine inhibits autophagic

flux by decreasing autophagosomelysosome fusion. *Autophagy.* 2018;14(8):1435-1455. doi: 10.1080/15548627.2018.1474314. Epub 2018 Jul 20. PMID: 29940786; PMCID: PMC6103682.

5. Nyffeler J, Willis C, Lougee R, Richard A, Paul-Friedman K, Harrill JA. Bioactivity screening of environmental chemicals using imaging-based high-throughput phenotypic profiling. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2020 Jan 15;389:114876. doi: 10.1016/j.taap.2019.114876. Epub 2019 Dec 30. PMID: 31899216.

6. Omta WA, van Heesbeen RG, Pagliero RJ, van der Velden LM, Lelieveld D, Nellen M, Kramer M, Yeong M, Saeidi AM, Medema RH, Spruit M, Brinkkemper S, Klumperman J, Egan DA. HC StratoMineR: A Web-Based Tool for the Rapid Analysis of High-Content Datasets. *Assay Drug Dev Technol.* 2016 Oct;14(8):439-452. doi: 10.1089/adt.2016.726. Epub 2016 Sep 16. PMID: 27636821.

7. Rohban MH, Singh S, Wu X, Berthet JB, Bray MA, Shrestha Y, Varelas X, Boehm JS, Carpenter AE. Systematic morphological profiling of human gene and allele function via Cell Painting. *Elife.* 2017 Mar 18;6:e24060. doi: 10.7554/eLife.24060. PMID: 28315521; PMCID: PMC5386591



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

