

活细胞评价细胞周期抑制剂

前言

监测对细胞周期变化的影响对于肿瘤的发展及药物研发有着重要的作用。例如，已知抑制有丝分裂的化合物大都用来减缓肿瘤细胞的生长。活细胞高内涵的筛选已被验证可以区分细胞的每个周期。此技术结合BacMam转染系统，可使细胞表达两种细胞周期相关荧光融合蛋白。

延时监测实验持续2-3天，细胞置于ImageXpress® Micro高内涵成像与分析系统的环境控制舱室中，整个实验都可维持活细胞的正常生长环境。按预先设置的时间间隔，同时获取明场和荧光的活细胞图像。这个完整的实验方案包括了预置模块对延时拍摄的图片进行分析，基于明场的图像识别所有细胞，基于荧光蛋白的表达区分不同的细胞周期。

可视化荧光蛋白表明细胞所处周期

使用实时监测细胞周期Premo™ FUCCI细胞周期指示剂(Thermo Fisher)。在种板之前，细胞转染荧光标记的细胞周期相关蛋白，geminin和Cdt1。Geminin为绿色的GFP，Cdt1为红色RFP，拍摄通道分别为FITC和TRITC。由于geminin和Cdt1都只在特定的周期表达，因此，他们在细胞核中的表达可以指示细胞所处的细胞周期(图1)。

优势

- 活细胞在仪器内持续生长观察长达72小时以上
- 减少实验操作时间
- 明场无标记下识别细胞
- 应用细胞周期转染试剂检测周期变化

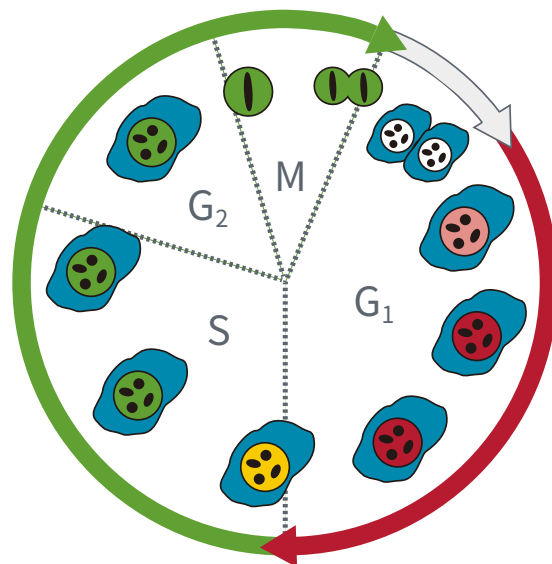


图1. FUCCI细胞周期标记物标记后与细胞周期变化关系。表达Cdt1-RFP红色为G₁期，表达Geminin-GFP绿色为G₂/M期，同时表达Cdt1-RFP红色和Geminin-GFP绿色的为S期。

方法

1. 准备细胞悬液，40,000细胞/mL的Hela细胞悬液与30颗粒/细胞浓度的FUCCI试剂混合，以4,000细胞/孔的浓度种在96孔板中，孔板置于37°C，5% CO₂的环境下贴壁8小时。
2. 不同浓度的有丝分裂抑制剂处理细胞，然后孔板放入ImageXpress Micro系统。
3. 每隔2-3小时系统自动拍摄一次图片，使用20倍Plan Apo物镜，同时获取明场及两个荧光通道FITC和TRITC的图像。实验持续48-72小时，细胞可完成1-2次分裂。
4. 分析延迟实验图像使用MetaXpress®高内涵成像与分析软件的用户自定义模块。

明场识别细胞，荧光蛋白区分细胞周期

活细胞使用FUCCI细胞周期指示剂，化合物处理后细胞周期的变化可以被实时监测到，比终点法检测固定细胞能得到更多的信息。转染了FUCCI细胞周期指示剂的Hela细胞在高内涵细胞中实时拍摄了图像，并通过MetaXpress®高内涵成像与分析软件的模块进行分析，明场下识别出所有细胞，基于荧光蛋白表达区分出不同周期。表达红色为G₁期，表达绿色为G₂/M期，同时表达红色和绿色的为S期(图2)。处于G₀期的细胞没有荧光信号，但是会在明场下被识别到并计入细胞总数中。另外，分裂的细胞也可被记录。

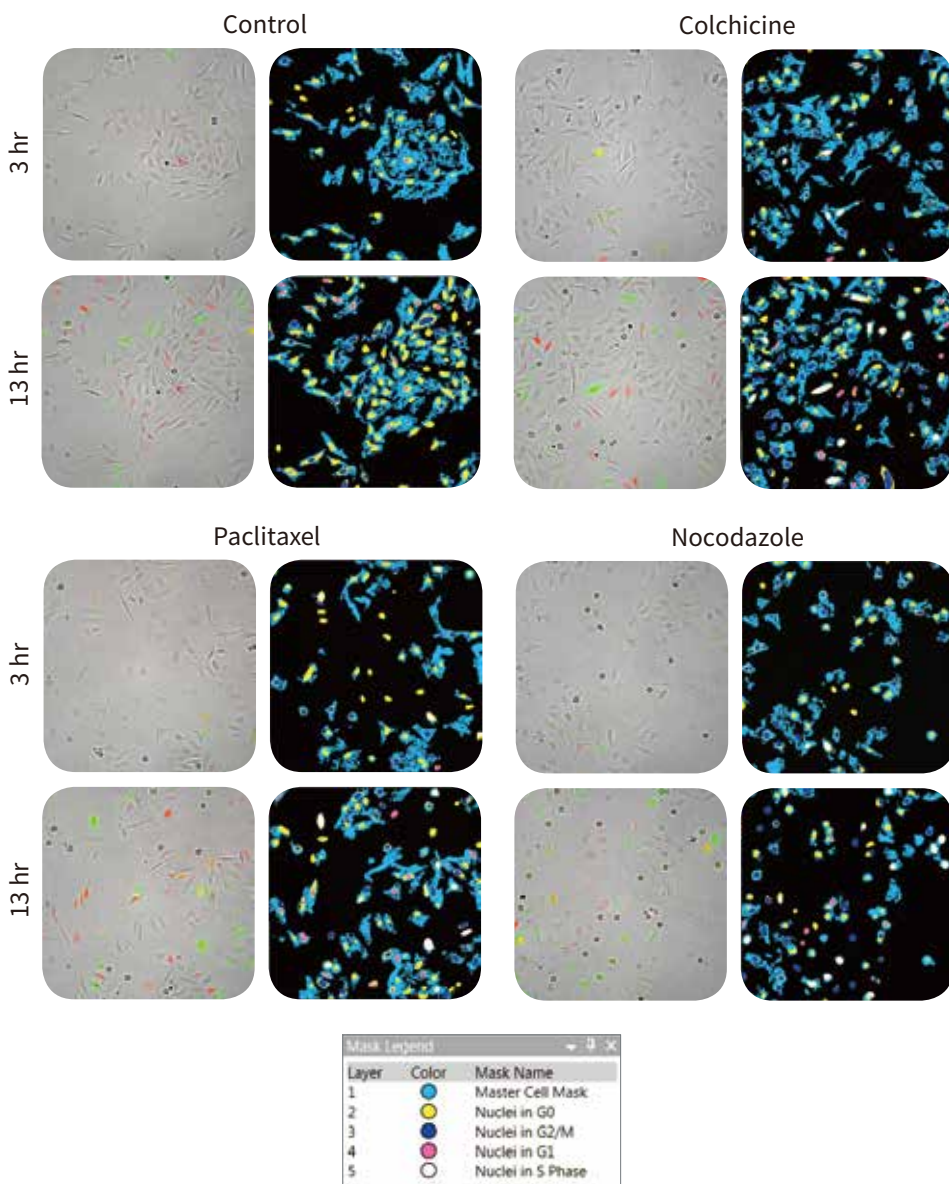


图2. Hela细胞转染FUCCI细胞周期指示剂后的延时成像。这些图片并通过MetaXpress®高内涵成像与分析软件的模块进行分析，明场下识别出所有细胞，基于荧光蛋白表达区分出不同周期。表达红色为G₁期，表达绿色为G₂/M期，同时表达红色和绿色的为S期，G₀期为无荧光。图中所示为第二和第六个时间点的图片，细胞被2 nM Paclitaxel, 10 nM Nocodazole, and 100 nM Colchicine处理。分割的蒙版图显示了被识别到的不同时期的细胞。

细胞周期抑制剂可引起细胞停滞在特定周期

分析过程可使用MetaXpress PowerCore 并行处理软件加速分析速度。经过24小时化合物处理，大部分细胞停留在G₀期，只有少数细胞表达了细胞周期标记蛋白。被紫杉醇和诺考达唑的细胞有一定的细胞停滞在G₂/M期(图3)。

总结

Premo™ FUCCI细胞周期指示剂结合配置环境控制的ImageXpress Micro成像系统和MetaXpress软件，可实现高效的活细胞周期精确测量。高通量筛选技术可为科学家提供一个快速的、自动的基于图像定量分析细胞周期的方法，并能够完整的记录长时间的细胞周期变化。另外，MetaXpress软件能够在明场图像识别细胞，避免了染料对活细胞的毒性。同一标准具有统计学意义的定量分析方法可评价多化合物在不同浓度对细胞周期影响的相关参数。

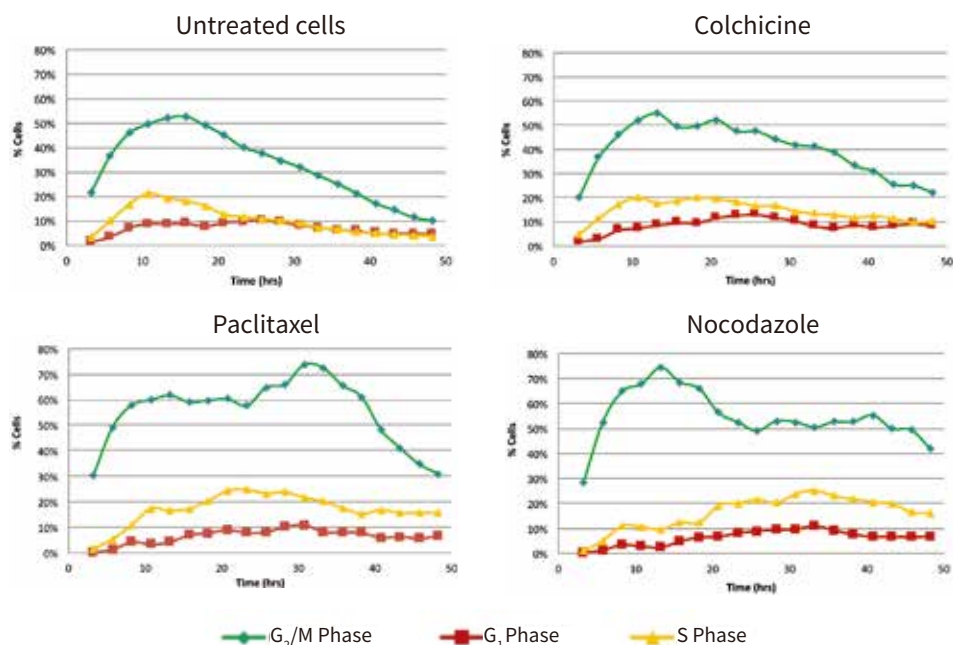


图3. 经过48小时化合物处理对细胞周期的影响。Paclitaxel处理组 (2nM) 处于S、G₂和S期的细胞明显高于对照组，10 nM Colchicine处理组处于G₂和M期的细胞明显高于对照组，100 nM Nocodazole有抑制分裂的作用(并且在实验过程中细胞数量没有增长)，且半数细胞停滞在G₂/M期。



扫一扫关注我们
的官方微信