

最新DNA损伤检测法

——应用ImageXpress Nano成像分析系统

前言

在研究中经常会涉及DNA或染色体的损伤，因为DNA损伤与很多疾病的发生有密切的关系，如遗传疾病、肿瘤等。放射性辐射、环境影响或化合物等都有可能引起DNA的损伤。之前的研究表明标记组蛋白H2AX在丝氨酸139上的磷酸化位点是敏感的可早期预测DNA双链断裂的方法。

本文详细介绍了自动细胞成像检测DNA损伤的实验方法，细胞样品由小分子化合物处理，经过磷酸化组蛋白H2AX免疫荧光染色后成像。另外，实验中选用了三种细胞系，CHO、Hela和PC-12，分别加入丝裂霉素和依托泊苷进行处理来检测化合物对其的影响。

磷酸化H2AX免疫荧光方法定量DNA损伤

细胞水平的DNA损伤可应用商业化的试剂和ImageXpress® Nano自动成像与分析系统可视且定量。免疫荧光法用的是抗磷酸化H2AX(EMD Millipore)的一抗和AlexaFluor标记的二抗(Life Technologies)。Hoechst 33342染核，由ImageXpress Nano获取图像，10X物镜，DAPI和FITC通道。

- 在平底透明384孔板中种入细胞，5,000-7,500细胞/孔
- 在37°C/5% CO₂环境下放置细胞过夜
- 按1:2系列梯度DNA毒性化合物加入孔中，处理细胞18-24小时
- 室温下用4%多聚甲醛固定细胞
- PBS洗去固定液，然后加入1% BSA+0.1% Triton X-100对细胞进行封闭并打孔，室温孵育30分钟
- 加入抗H2AX一抗4°C孵育过夜
- 1XPBS洗3次
- 加入荧光二抗和16 μM Hoechst室温孵育1-2小时
- 1XPBS洗3次
- 用ImageXpress Nano系统10X物镜下获取图像，并运行Cell Scoring模块实时定量

优势

- 细胞固定后用免疫法对细胞核进行荧光染色，并成像
- 精确计算DNA双链断裂位点
- On-the-fly分析可实时得出计算结果
- 通过热图显示阳性孔

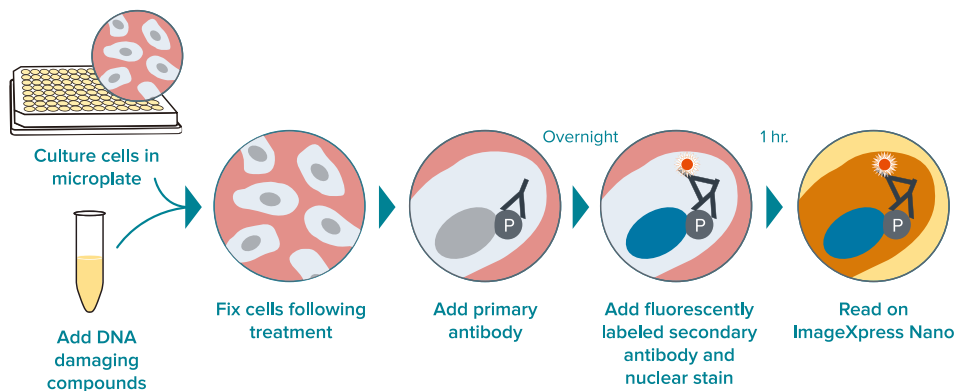


图1 DNA损伤免疫荧光法。

Cell Scoring模块实时高效定量DNA损伤DNA损伤

CellReporterXpress™自动图像获取与分析软件包括了预置的Cell Scoring模块，它可以轻松根据DNA损伤标记设定损伤阳性和阴性分类，并计算出产生DNA损伤的细胞百分比。图像获取和分析通常是一起运行的，孔板读取完就可以同时看到图像和分析得到的数据。另外，由于检测器的大靶面特性，10X物镜下一个视野的细胞足够定量得到具有统计学意义的浓度效应曲线数据了(图2)。其次，在此拍摄条件下，一个视野可拍摄>500个细胞(丝裂霉素C最高浓度)和>2800个细胞(低毒性浓度的丝裂霉素C)。

总结

磷酸化组蛋白H2AX是一个检测哺乳动物细胞DNA损伤的灵敏的指示剂。本文中我们介绍了应用ImageXpress Nano成像与分析系统和CellReporterXpress软件对CHO细胞自动获取图像和定量DNA损伤的方法，其中细胞培养及免疫荧光染色均在多孔板中操作。自动的成像流程，实时数据分析及可立即看到图像和分析数据的能力都给使用者带来不同的体验，多孔板的操作体系使科研者可以高通量的检测化合物对细胞DNA损伤的影响。

参考文献

1. Paull T.T., Rogakou E.P., Yamazaki V., Kirchgessner C.U., Gellert M., Bonner W.M..2000. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol.* 10, 886-95.



扫一扫关注我们
的官方微信

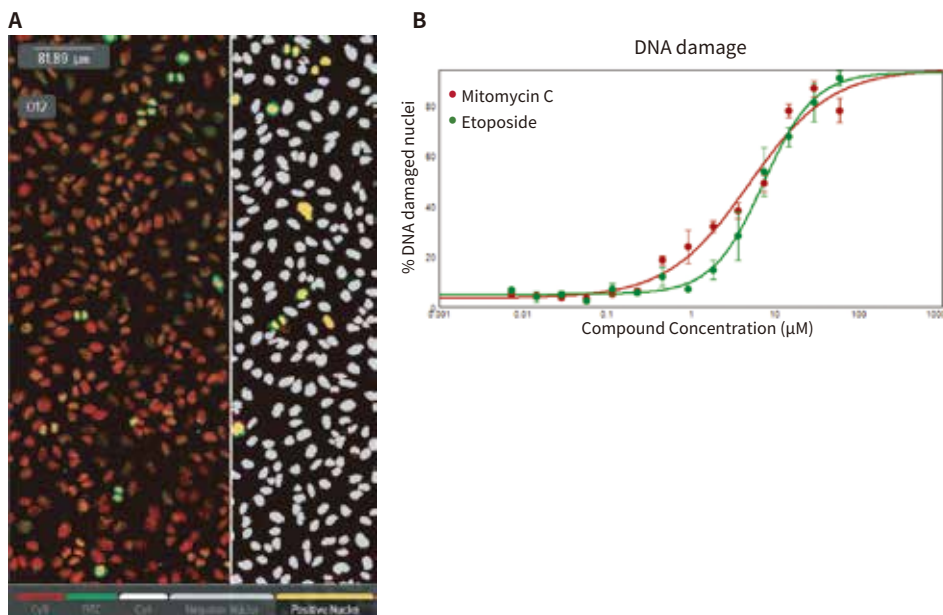


图2 (A)10X物镜下获取细胞核图像，并通过双链断裂标记物磷酸化H2AX区分阳性和阴性。左图的分屏视图显示了荧光核染色(红色)和DNA损伤阳性核(黄/绿色)，右图Cell Scoring蒙板图中显示所有核(灰色)和阳性核(黄色)。(B)CHO细胞被化疗化合物处理24小时后DNA损伤效应曲线。丝裂霉素和依托泊苷处理细胞后，通过磷酸化H2AX阳性细胞数做浓度效应曲线。

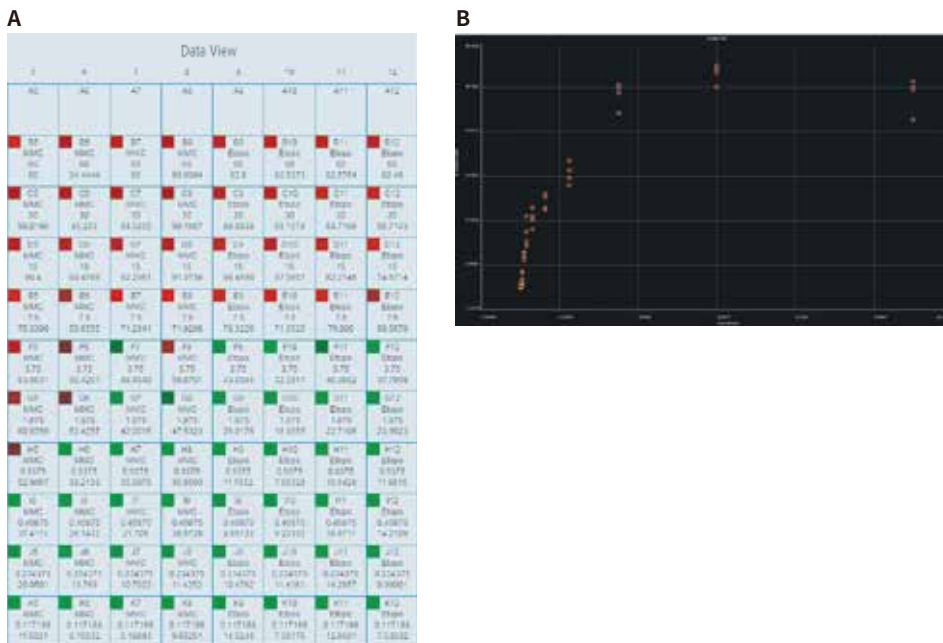


图3 (A)丝裂霉素和依托泊苷处理造成的DNA损伤可通过浏览H2AX阳性率整体的热图来快速的评估。图中，上面为高浓度，均有两个复孔。阳性率最高的显示为红色，低的显示为绿色。(B)数据也可生成散点图，横坐标为依托泊苷的浓度，纵坐标为DNA损伤细胞阳性率。