

使用高内涵技术定量 分析人类胚胎干细胞

Uli Schmidt*, Sandra Lubitz, Biljana Dumevska, Tomas Stojanov Sydney IVF, Level 3 Kent St, Sydney, NSW 2000, Australia, [*uli.schmidt@sydneyivf.com](mailto:uli.schmidt@sydneyivf.com)

介绍

使用人类胚胎干细胞 (hESC) 进行科学研究和临床应用需要严格的监测细胞的属性。这对于确定该细胞是否保留其多能性, 还是处于分化阶段, 从而确认干细胞的性质非常重要。此外, 也需要有适当的分析方法用于测试和优化 hESCs 的培养和分化条件。这些方法通常包括使用流式细胞仪分析生物标志物的表达, 以及用 RT - PCR 进行基因表达的研究。然而当前, 高内涵分析 (HCA) 技术能够较上述技术提供更多的研究优势, 帮助研究者更好地定量研究 hESCs 的多能性与分化作用。

细胞成像和数据分析

高内涵分析通常包括自动对荧光标记的细胞进行成像, 并在所获得的图像基础上对细胞进行计算和定量分析。对于人类胚胎干细胞研究面临的一项特别的挑战是其细胞形态较小, 且不断呈高密度, 多层次的增长趋势。这往往导致在个别单个细胞的特性, 如细胞核不能被软件准确识别和分割 (图 1A)。我们使用的 HCA 系统 IN Cell Analyser 1000 利用独有的网格投影技术 ('optigrd'), 可用类似于激光共聚焦显微镜的方式消除不在聚焦平面上的荧光信号。我们发现, 使用细胞渗透远红外荧光核染料 DRAQ5 (Biostatus) 和上述的光学共聚焦技术能够大大提高图像

质量和细胞识别准确性 (图 1B)。然后, 我们对基于 HCA 分析 hESC 的方法进行了优化。图 1 C 显示的即为一个典型的 HCA 的检测方法。



图 1A: 普通荧光显微镜成像



图 1B: 使用 IN Cell Analyser 1000 的光学共聚焦技术成像



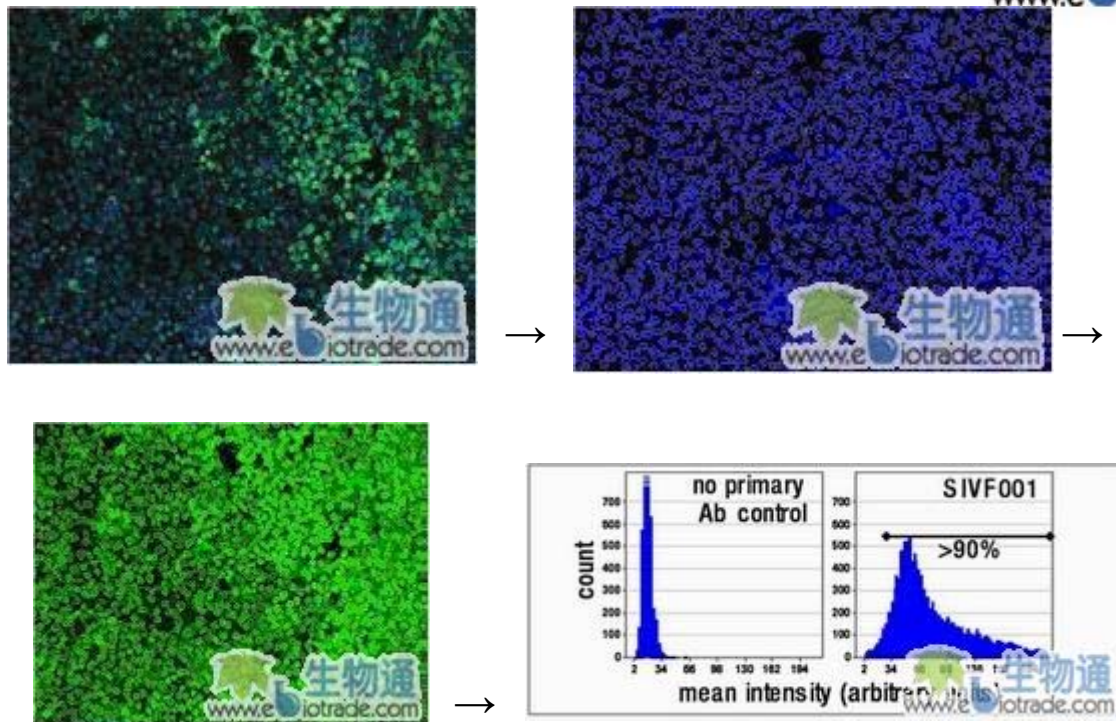


图 1C

- SIVF001 细胞使用微孔板培养，并使用 DRAQ5 (细胞核)和转录因子 Nanog 的抗体标记。

- 细胞微孔板使用 IN Cell Analyser 1000 (10x 物镜，光学共聚焦模块) 成像。

- 使用 IN Cell Developer 分析工作站分析 DRAQ5 标记的细胞核相关参数，如 DNA 含量，细胞核大小、形状等

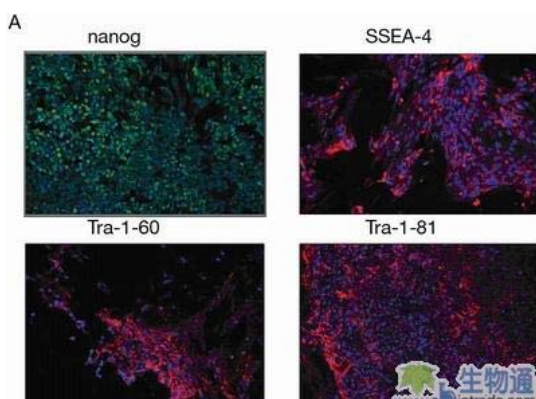
- 在 Nanog 成像的荧光波长通道使用之前识别的细胞核区域，并且计算每个细胞核的

平均荧光强度。

- 细胞数据使用 Spotfire DecisionSite 进行图表可视化展示。

干细胞的多能性和分化研究

我们经常使用基于 HCA 的检测方法干细胞系。我们通常使用免疫细胞化学分析的标志物包括 nanog, SSEA-4, Tra-1-60 和 Tra-1-81。其中对于干细胞系 SIVF001 的分析结果在图 2A 中概括显示。



标志物	4 次实验中的阳性比率%
nanog	85-98%
SSEA-4	59-75%
Tra-1-60	81-85%
Tra-1-81	75-85%

图 2A

接下来，我们使用 HCA 监察早期细胞分化。以已知的诱导分化因子 2% DMSO 作用于 SIVF001 细胞系五天，对于 DNA (DRAQ5) 和 Nanog 染色，发现正如预期，有 Nanog 表达细胞的比例显著下降。有趣的是，如图 2B 所示，干细胞的分化同时也伴随着核的增大和细胞增殖的减少（测定 DNA 含量所得）。

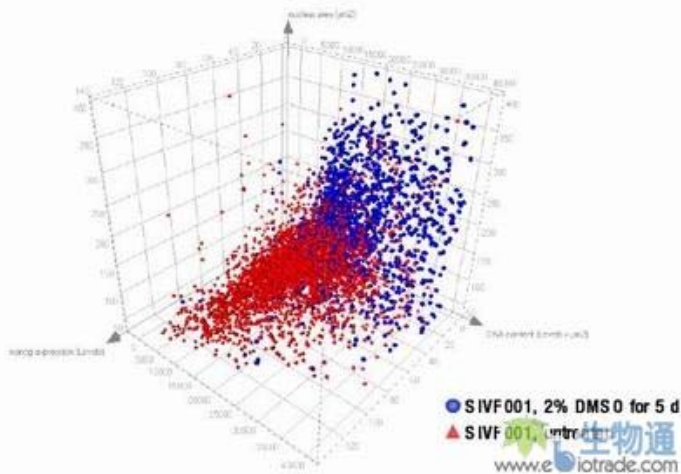


图 2B
报告基因的表达

报告基因的表达检测对于分析那些不能通过抗体活细胞染色的细胞标记物非常有效。这种方便的技术只需一个单一的步骤，并可用于活细胞分析。

最初我们测试了不同转染试剂和条件，使用了简单的荧光素酶重组表达质粒并测量总的发射光信号。结果显示，Fugene HD (Roche) 在较低的细胞密度下优于其他试剂（图 3A）。接下来，我们验证了一种能够同时表达两种不同的荧光蛋白双重表达系统；一种由构建的启动子控制，另一种由人类 nanog 蛋白启动子控制，标记为具备多能性的细胞（图 3B）。

我们转染的 SIVF001 细胞在优化的培养条件下无需饲养层即可生长。使用 HCA 技术 (i) 确定转染效率；(ii) 测定 Nanog+ 细胞在转染细胞总体中的比例（图 3C）。在 8 次独立实验中，转染效率为 30-47 %，并观察到最多达 65 % 的转染细胞显示为 Nanog 阳性。

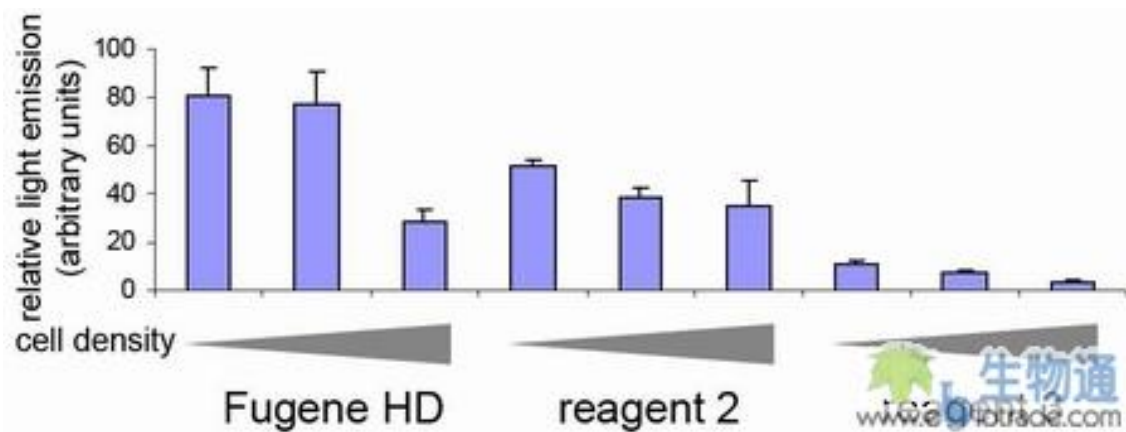


图 3A



图 3B

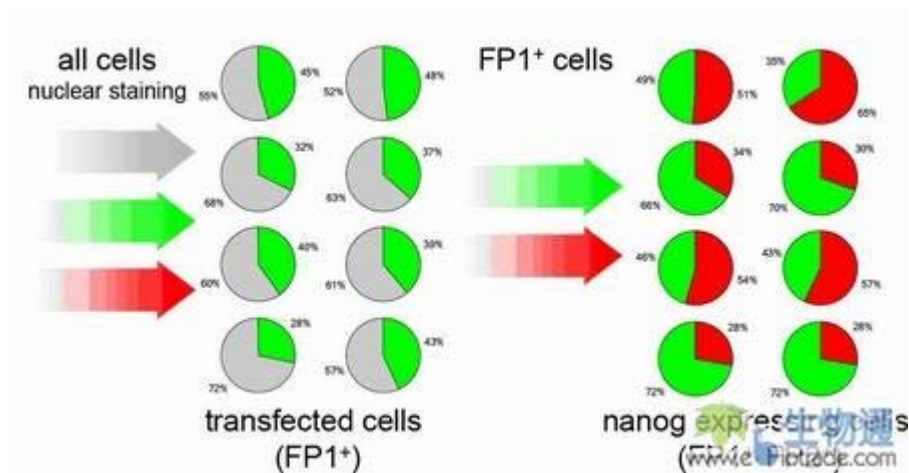


图 3C

结论

综上所述，HCA 结合合适的分析方法，是对于 hESC 进行研究的一个非常有价值的工具，同时也是开发和实践基于 hESC 分析方法的一个理想技术平台。对比其他技术 HCA 能够提供多项优势，包括：

- 比流式细胞仪需要更少的细胞量，实验流程也更加简化。且能够直接分析贴壁细胞，而非单细胞悬液
- 分析过程全自动完成
- 可连续重复地监测分析活细胞
- 除了在生物标志物的表达水平，还可定量分析亚细胞定位和细胞形态分布
- 相比传统的显微镜成像与图像分析，消除了使用者之间的操作偏差。

如果你想了解高内涵技术的更多信息，请[点击索取资料](#)。

关于GE Healthcare的IN Cell Analyzer
IN Cell Analyzer 是运用了当今最先进的模块化快速自动成像技术的高内涵活细胞分析系统，其高度灵敏的成像技术使得科学家们能够轻松地研究细胞变化过程中的真实生物学进程，目前，该技术已经被广泛应用于基础研究和药物发现领域。该系统将高通量的自动显微镜技术、在线自动加样技术和在线细胞培养技术完美整合，是当前功能最强大、应用最广泛、设计最灵活、操作最简便的高内涵细胞分析系统。其主打机型IN Cell Analyzer 1000 获得全球权威咨询机构Frost & Sullivan颁发的 2007 年细胞分析领域 - 技术革新奖。希望获取更多信息，请访问 <http://www.gehealthcare.com/incell>。