

IN Cell Analyzer 细胞功能图像分析系列: 在高内涵筛选中采用 IN Cell Developer ——多才多艺的图像软件分析工具

摘要

药物筛选过程的改进取决于在细胞组织和活的有机体中药物作用效能的图像分析。图像结果显示在显微水平上密度或形态上与对照的差异。除了一少部分特意筛选方法有现成的图像分析软件外，特别在研发阶段，客户自定义图像分析软件还远未成熟。Developer 软件正适应这一需求而研发出的通用图像分析软件工具包。使用者无需软件编辑能力就可以具有广泛分析多种检测方法图像结果的能力。

介绍

在各种确切研究中需要一个比较的“金标”。象 INCell 固化的分析单元一样。“金标”为手工图像定量分析，同时还要提供生物学意义结果，如反应曲线，S:Ntt, EC50 值等。Developer 还需提供其它定量信息，去满足用户定义需求。

实验方法

选择特异性的核转位检测方法，检测 NFκB P65 在 TNF 刺激下由胞质到核。Norak Trans fluor™ GPCR 颗粒检测方法，检测由异丙基肾上腺素刺激后颗粒数目的变化，实验由多个实验者完成。由 Developer 软件计算出诸如反应曲线，S:Ntt, EC50 等结果，结果再与 IN Cell 1000 固化软件单元及手工图像分析进行比较。

方法

NFκB 细胞培养在 96 孔 Pakcard View Plates 中并用 TNF 刺激。然后细胞由 4% 多聚甲醛固定，并由抗体（兔多抗 IgG）染色 NFκB P65 检染色 Hoechst 33258, 图像分析由 IN Cell Analyzer 1000 完成。

Norak Transflour™ 方法

Osteosarcoma 细胞 (U2os-p2AR-Eβarr2-GFP) 由 Norak Biosciences 公司提供，在 96 孔 Greniner 板中固定和染色，细胞用各种浓度异丙基肾上腺素处理，图像分析由 IN Cell Analyzer 1000 完成。

Z 和 S:N 计算

下列公式用于计算 Z' 和 S:N

$$Z' = 1 - \frac{[3\sigma_p + 3\sigma_n]}{[\mu_p - \mu_n]} \quad S : N = \frac{[\mu_p - \mu_n]}{\sqrt{\sigma_p^2 + \sigma_n^2}}$$

μ = 平均信号 σ = 标准偏差

p = 阳性对照 n = 阴性对照

结果

NFκB 核转位检测

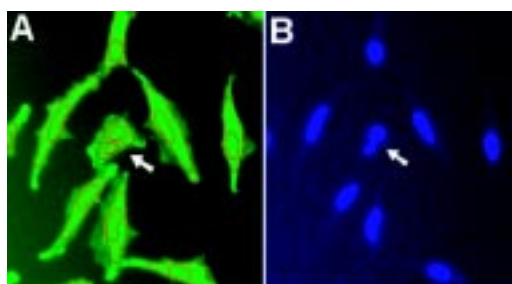


图 1 Developer 处理由 TNF 处理的胞质、核图像 A: 用于计算核/胞质比的核、胞质部分 B: Hoechst 染色分辨核, 箭头提示相邻的核及如何分裂进入两个细胞

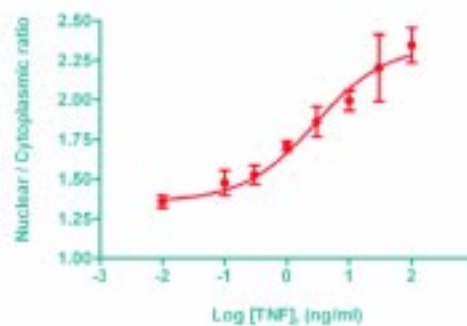


图 2. HeLa 细胞用于 TNF 处理 20 分钟后的反应曲线显示核/胞质比 (N = 5, 每个条件 5 个重复) EC₅₀ = 2.86 ng/ml

Operator	Nuclear / Cytoplasm Intensity ratio					
	Max	Mean	S.D.	Z' Value	S:N	EC50 [ng/ml]
Human Scored Data	2.34	0.11	0.55	0.45	8.45	2.86
IN Cell Analyzer 1000	1.47	0.06	0.45	7.33	1.78	
Developer (User 1)	1.57	0.06	0.56	9.20	2.25	
Developer (User 2)	1.79	0.08	0.42	7.24	2.69	
Developer (User 3)	2.12	0.05	0.56	9.53	0.48	
Developer (User 4)	1.49	0.06	0.50	7.86	3.06	

表 1. 核/胞质比和关联 Z' 值以及人工统计 S:N 比，IN Cell Analyzer 1000 分析数据 Z' 值和 S:N 比采用图 2 中最大浓度反应曲线或 100ng/ml TNF 刺激。

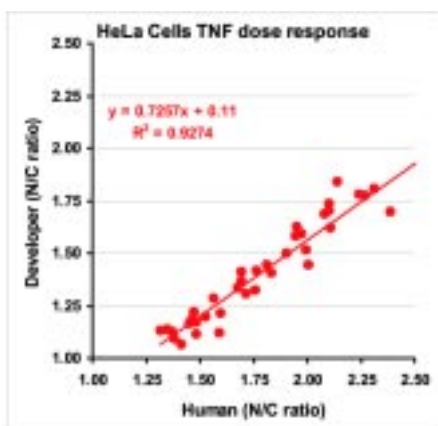


图3.核胞质比相关分析，核对胞质比由 Developer(用户1)与人工处理图像相比，显示高度相关，R²值为0.9275

从表1的生物学相关性分析数据中可看到所有三个过程都给出可比较的结果。尽管不同的 Developer 软件用户使用不同的方法且目标不同，但最终的结果却是可比较的。例如胞质密度定量，一个用户选用环状核分析方法，而另一个选用的是总胞质面积方法。

数据明确显示，用户所选择的不同方法不含明显影响到最后结果的输出，如 Z'，S:N 和 EC50 值。表 1 及图 3 显示人工处理数据的结果与 Developer 很类似，这增强了我们使用自动图像数据处理软件包的信心。

Nolak Transflour 方法

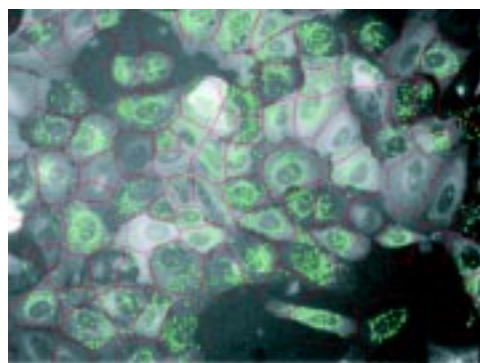


图4.U20s细胞用1μM异丙基肾上腺素处理 Developer 软件可以图像中分辨出每个细胞体(红色)及相应颗粒体(绿色)。Developer 可以给出每个细胞中颗粒体的数目。

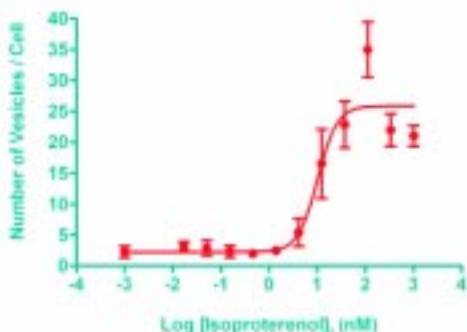


图5.U20s 细胞用异丙基肾上腺素处理的反应曲线，显示每个细胞中颗粒体的数目(标准偏差)(N=6每个条件的重复)，EC₅₀=10.18nM 数据由 IN Cell Analyzer 1000 颗粒分析软件单元处理。

Operator	[Isoproterenol]	Number of Vesicles / Cell				EC50 nM
		Mean	S.D.	Z' Value	S:B	
IN Cell Analyzer 1000	111 nM	34.99	4.47	0.56	7.16	10.18
Developer (User 1)	111 nM	24.16	2.67	0.55	7.50	17.85
Developer (User 2)	111 nM	31.72	3.97	0.62	9.50	22.32
Developer (User 3)	111 nM	14.00	1.03	0.43	6.66	11.65
Developer (User 4)	111 nM	69.67	6.96	0.47	7.66	11.59

表2.数据计算.每个细胞颗粒数及相关字数是在 Z'，S:N 值。数据处理用 IN Cell Analyzer 1000(颗粒分析单元)和 Developer 用户自定义方法。111nM 异丙基肾上腺素数据点被选为计算 Z' 值和 S:N 值的数据点，如图 5 所示最大反应曲线。

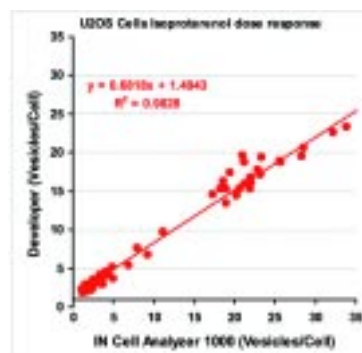


图5.颗粒数、细胞数相关分析

每个细胞中颗粒数由 Developer(用户1)与 IN Cell Analyzer 1000 颗粒分析单元分别计算出，结果显示的高度相关一致，R²=0.9828

表2显示用 Developer 和 IN Cell Analyzer 1000 分析 Norak Tranflour 检测数据高度可比较性。

参考文献

- (1)Soltys,B.,Alexandrov,Y,Cybuch,Y.,and Ramm,P. Scientific poster 129.Society of Biomolecular Screening Conference 2002.The Hague,Netherlands.
- (2)Zhang et al.,J.Biomol.Screening 4,67-73,1999.
- (3)Roquemore,E.P.,Murphy,S.,Capper,S.J.,Hancock,S.M., Adie,E.,Price-Jones,M.,Game,S.,and Swinburne,S. Scientific poster 140.Society of Biomolecular Screening Conference 2003.Portland,Oregon,USA

总结

- Developer 的结果与人工及 IN Cell Analyzer 1000 相关分析单元的结果是可比较的
- 用户自定义实验和分析方法，得出的生物学分析结果与人工计算高度一致
- 用户各自自定义选择不会对使用 Developer 软件包分析数据结果产生重要影响