高内涵检测体系优化方法

The Optimization of High Content Imaging Detection System

赵宏伟, 陈铭*

¹ 化学生物学技术平台, 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心, 上海市

*通讯作者邮箱: chenm@sibcb.ac.cn

引用格式: 赵宏伟, 陈铭. (2021). 高内涵检测体系优化方法. // 高通量筛选实验手册. *Bio-101 e1010824*. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010824.

How to cite: Zhao, H. W. and Chen, M. (2021). The Optimization of High Content Imaging Detection System. // High-throughput Screening Protocol eBook. *Bio-101 e1010824*. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010824. (in Chinese)

摘要: 在药物筛选领域和细胞生物学基础研究中, 高内涵检测应用越来越广泛。基于近几年高内涵成像和图像分析的经验, 本文就高内涵检测体系中关于成像和图像分析的一些细节的优化方法进行总结。成像相关的优化主要包括物镜和多孔板的选择、细胞类型及细胞密度的优化、荧光基团的选择、成像模式的选择以及成像参数的优化。图像分析方法的优化主要包括图像分割方法的选择和优化、生物学参数的提取和选择、细胞亚群的分类以及高内涵数据的质量评价等几个方面。

关键词: 物镜, 微孔板, 荧光标记, 高内涵成像, 高内涵图像分析

实验步骤

一、高内涵成像样品的准备

高内涵成像样品的准备包含两个阶段, 高内涵筛选实验的设计阶段和筛选实验的操作阶段。在实验设计阶段, 需要考虑以下问题: 物镜的选择、微孔板类型, 样品在微孔板上的排布、细胞株的选择, 细胞接种密度, 荧光标记的选择 (免疫荧光、荧光染料/探针、荧光蛋白等)、高内涵成像系统的选择等。步骤多, 周期长, 涉及细节众多, 本小节主要围绕与高内涵成像系统使用密切相关的物镜、微孔板、细胞和荧光标记四个方面进行展开讨论。

1. 物镜的选择

高内涵成像仪的物镜，按照放大倍数分为 2, 4, 10, 20, 40 和 60 倍等多种规格；按照数值孔径分为高数值孔径物镜和长工作距离物镜；按照物镜和样品间的介质可分为空气镜和水镜。

进行细胞学成像，通常第一步就需要选择成像的放大倍率。放大倍率的选择通常取决于待观测目标的大小或者成像需要达到的分辨率。对细胞核染色后进行简单细胞计数的实验，通常 4 倍的放大倍率就足够了。对于普通的贴壁细胞，进行细胞整体的荧光强度分析，10 倍的放大倍率足以达到实验目的。而对比较小的亚细胞结构进行分析，例如细胞内的点状结构或者是线粒体大小形态的分析，则需要 40 倍，60 倍甚至 100 倍的放大倍率。

在选择物镜的时候，除了需要考虑物镜的放大倍率，有时候还需要基于具体的实验需求在不同数值孔 (NA 值) 的物镜之间进行选择。高数值孔径值的物镜工作距离短，工作距离长的物镜数值孔径较低。通常对于荧光强度较弱的样品，可以选择高数值孔径的物镜，通过增加激发光的入射量提高激发的强度，从而提高样品的荧光强度。对于活细胞成像，通常也可以考虑通过提高物镜的数值孔径，降低样本的曝光时间来减轻光毒性。但高数值孔径的物镜因为成像距离较短，因此需要搭配使用薄底微孔板；高数值孔径的物镜直径大，容易引起物镜与微孔板裙边的碰撞，从而限制微孔板边缘孔的成像，因此在使用高数值孔径的物镜时，需要选择底薄且裙边比较低的微孔板，同时需要排除微孔板边缘成像受限的孔。工作距离长的物镜对于微孔板的板底厚度的容忍度相对较高，但是在使用长工作距离物镜时，需要注意调整校正环，以保证校正环的数值与微孔板板底厚度数值相等或接近，从而保证较好的成像质量。

2. 微孔板及包被材料的选择

高内涵成像中微孔板的选择对最终获取的图像的质量至关重要，常用的微孔板类型有 96、384 及 1536 孔板，如果配备一定的玻片适配器，高内涵也可对切片类型的组织样本进行成像。常用的微孔板根据其板底材质可分为聚苯乙烯 (polystyrene, 简称 PS) 和玻璃两种。PS 材质的微孔板价格相对经济，但透光性略差。玻璃材质的微孔板透光性好，但并不适用于所有贴壁细胞的直接培养。PS 材质的微孔板，能够满足大部分高内涵成像实验的需要，其中板底透明的黑色微孔板在高内涵成像中应用最广泛。对透光度较高的实验，可以使用玻璃底材质的微孔板。

通过对玻璃底微孔板进行包被可以增加板底对细胞的粘附力，从而支持细胞在其上生长。常用的包被材料包括多聚赖氨酸 (Vozzi *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2012)，胶原蛋白 (Vozzi *et al.*, 2012)，明胶 (D L Patton *et al.*, 1988) 以及纤连蛋白 (Sun *et al.*, 2012)。微孔板的选择除了通量、价格、板底厚度和材质的考虑，实验前往往更重要的是根据自己的成像需求结合所需要选择的物镜进行综合考虑，这一部分在上一小节物镜的选择中已经详细描述。

3. 细胞类型的选择及接种密度的优化

进行高内涵检测，通常推荐选择贴壁牢固且单层生长的贴壁细胞。若使用悬浮细胞进行高内涵检测，一般需要提前对微孔板进行包被，提高微孔板对细胞的粘附性，使细胞相对疏松的粘附于板底，方可进行高内涵成像。而对于没有进行微孔板包被的悬浮细胞，成像前可采用低速离心的方法保证细胞落在板底 (通常 500 g 以下离心 2-5 min)。通常成像时细胞汇合率达到 70%-80% 左右，细胞不聚团生长且分散度好的样品，比较适合用于高内涵图像分析。对于一些分析细胞质膜特定信号的实验，较低的汇合率 40%-60% 更能够降低细胞膜之间的信号叠加。因此需要根据细胞的生长速度和生长时间，优化细胞的接种量，以保证在进行高内涵成像时细胞密度合适。但在实际工作中，我们也遇到一种特殊情况，即细胞发生接触生长时，会引起信号通路的改变，从而导致待研究的细胞表型消失。针对这种情况，只能降低细胞接种量，优化细胞接种密度，以确保在进行高内涵成像时大多数细胞处于稀疏的单细胞生长状态，另外，一般铺好细胞的板子可以在室温下放置 20-30 min，让细胞分布均匀沉降于板底，防止局部抱团密集生长。

4. 荧光标记

高内涵成像系统的发展，与生物样品荧光标记技术的发展密不可分。对生物样本进行荧光标记，有三种方式可以选择：荧光染料/探针标记、荧光蛋白标签标记和免疫荧光染色。在实际应用中，由于荧光基团的激发光谱和发射光谱都相对比较宽，理想的互不干扰的荧光基团对比较少，所以搭配不同的荧光基团进行标记时，需要慎重选择，从而避免在荧光成像时发生串色。进行荧光基团的选择，可以通过 Invitrogen 公司网站的荧光光谱查看器 (<https://www.thermofisher.com/cn/zh/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html#!/>) 模拟不同荧光基团间的搭配，或者自行根据不同荧光基团的激发光谱和发射光谱进行比

较，选择合适荧光基团的搭配，尽量避免不同荧光基团之间的串色。

使用激发光光谱比较宽的成像系统时，也容易发生荧光串色问题，在实际使用中，可以通过搭配不同的激发光和发射光滤光片，或者通过对不同荧光通道分别成像避免串色问题。在实际应用中还有一种常见情况就是仪器配置的激发光滤光片，不是用于某个荧光基团最适滤光片，但是滤光片的波段也包含在这个荧光基团的激发光谱之内。这种情况下，通常选择最接近最适激发光波长但比最适激发光波长短的滤光片作为激发滤光片，而不是比最适激发光波长更长的滤光片，这样做可以减少激发光向发射光发生光谱渗漏，从而避免增加图像的荧光背景。而当仪器配置的发射光滤光片，不是某个荧光基团的最适发射光波段，但是滤光片的波段又在这个荧光基团的发射光光谱范围之内的时候，则需要选择最接近最适发射光波长但波长比最适波长略长的滤光片作为发射光滤光片，目的同样是为了避免增加图像的荧光背景 (Reference 4)。

二、高内涵成像过程中的注意事项

1. 成像模式：共聚焦成像与宽场成像

高内涵成像系统就光学成像模式而言，包括共聚焦成像和宽场成像两种成像模式 (Mattiuzzi *et al.*, 2016)。选择哪种成像模式是在高内涵筛选实验之初就需要面对的问题。由于激发层面更薄和收集到的非聚焦平面的杂散光更少，使得共聚焦成像对比度更高，分辨率也更高 (Niederlein *et al.*, 2009)。但是，共聚焦成像对比度和分辨率的提高，是以牺牲图像的亮度为代价的。为了获取合适荧光强度的图像，共聚焦成像需要更长的曝光时间或能量更强的激发光。宽场成像 (即非共聚焦成像) 由于非焦平面杂散光的缘故，虽然图像分辨率较低，但荧光信号更高，需要的曝光时间也相对更短。容易发生淬灭的荧光样品更加适合使用宽场成像。

进行活细胞成像时，长时间曝光及高强度曝光会对细胞造成光毒性，所以活细胞成像更适合使用宽场成像模式，而且应该选择尽量低的激发光能量和较短的曝光时间。进行 3D 微组织或类器官成像时，也需要根据具体的实验需求选择宽场成像或者共聚焦成像。对于一些呈空心球生长的 3D 微组织，进行低倍镜宽场成像，足以达到对 3D 微组织进行计数或大小统计的实验目的。而对于体积较大的实心 3D 微组织或类器官，尤其是进行免疫荧光染色或过表达荧光蛋白的 3D 样品，需要实现对 3D 实心球内部细胞的荧光成像，进而实现图像的 3D 重构，则需要选择激发

光穿透能力更强的激光共聚焦成像。总之选择哪种成像模式，需要根据具体的实验需求权衡取舍。

2. 物镜、视野数、层扫与成像时间的权衡考虑

由于实验通量高周期长，所以对于高内涵筛选而言成像速度是一个很重要的问题。为了提高图像分辨率，提高物镜的放大倍数是一种最直接的选择。但是，提高物镜放大倍数在提高图像的分辨率的同时，也会减小成像视野的物理面积。在其他条件不变的情况下，对于同一个样品而言，获取相同数目的细胞，使用 20 倍的物镜需要成像的视野数是 10 倍物镜的 4 倍，成像时间也会成比例增加。对于一些只是为了统计细胞数目或对细胞的整体荧光强度进行分析的实验如：细胞增殖实验、细胞转染效率的测定等通常选择 10 倍物镜以缩短成像时间。而一些需要对细胞的亚结构进行成像分析的实验如：细胞质膜蛋白定量及转位分析等为了获取研究目标的清晰图像，需要选择能够提高分辨率的物镜，如高倍物镜，高数值孔径物镜或者水镜进行图像获取。

对 3D 微组织或类器官进行成像时，为了获取完整的 3D 信息，需要对样品进行 3D 层扫，而多层扫描必然会导致成像时间的成倍增长。对于一些细小的细胞亚结构进行高内涵成像，有时也需要进行 3D 层扫。例如对细胞内的点状结构进行成像时，考虑到这些点状结构大小不一，且分布在细胞内的不同层面，有时也需要对细胞进行高倍共聚焦层扫才能反映真实的细胞表型。

很多高内涵系统的软件都具备预扫功能，这个功能在进行 3D 微组织成像、模式动物成像（斑马鱼或线虫）以及稀疏细胞成像时非常实用。通过在低倍镜下进行预扫，可以快速确定样品区域，减少非必要视野的成像，可以极大的节省图像扫描时间，以及缩小图像文件的大小。

3. 高内涵图像质量优化

高内涵图像质量主要取决于样品制备的质量，也与成像条件的选择有很大关系。首先，利用 Z 轴层面扫描，找到图像清晰锐利的聚焦平面，再调整激发光强度和曝光时间，选择信噪比高的曝光条件。当然，这些只是标准操作。如果多孔板是存储于 4 °C 的样品，需要将样品平衡至室温再进行成像，既可以避免板底冷凝的水雾造成的图像模糊，也可以避免在图像拍摄过程中因为温度升高导致板底厚度增大造成成像失焦。在使用长工作距离物镜进行成像时，调整校正环数值，也是确保图像清

晰的一个方面。

高内涵荧光成像通常是灰度成像，图像的灰度值与细胞的荧光强度正相关，所以高内涵图像可以用于图像的定量分析，因此在进行高内涵成像时需要确认图像灰度的线性范围，防止过度曝光，确保定量的准确性（通常利用对照进行预扫后进入分析界面预分析以确定适合分析的最佳曝光条件）。通常图像的荧光强度由样品的荧光基团密度、激发光源的能量以及曝光时间三部分综合决定。样品的荧光基团比较稳定，不容易发生明显的荧光淬灭时，确保样品的阴性对照和阳性对照都在线性范围之内，且能够确保样品信噪比的曝光时间和激发光强度即可适用。而对于荧光基团容易发生淬灭的样品，在进行曝光条件的测试时用到的曝光区域，要在正式成像时进行规避，且选择尽量低的激发光能量和尽量短的曝光时间，能够保证一定信噪比的曝光条件即可。进行活细胞动态观察的样品，则需要考虑到光毒性，尽量减少曝光时间，确保长时间成像时细胞活性的保持。

多通道成像时，还需要考虑不同荧光通道之间的曝光顺序的问题。一般的曝光顺序是先进行长波长的荧光通道的曝光，后进行短波长荧光通道的曝光。但如果有的荧光通道的荧光基团容易淬灭的话，如常用细胞质染色的荧光通道 **Calcein**、**CMFDA** 等染料，应该先对容易淬灭的荧光通道进行成像，再进行其他荧光通道的成像（Reference 7）。

三、高内涵图像分析

从高内涵筛选获得的图像中提取需要的生物学信息，需要对其进行图像分析。高内涵图像分析的流程一般包括图像校正，图像分割，生物学参数的提取，生物学参数的聚类或分类分析以及最终的结果输出。经过图像分析，可以得到与图像信息关联的细胞特征，包括荧光强度、细胞形态、表面纹理和位置信息等多维数据。对于输出的生物学参数进行数据挖掘，寻找生物学表型和生物学功能之间的各种联系，是高内涵数据分析的最终目的。

1. 图像分割的优化

高内涵图像分析的软件很多，但是无论是哪种分析软件，图像分割都是最具挑战性的分析步骤（Niederlein *et al.*, 2009）。荧光标记使得图像分割变的简单，通过对细胞核、细胞质或细胞器进行荧光标记，可以很方便的实现对细胞不同区域的图像分割。目前，对于图像分割影响最大的因素依然是样品质量。如果成像样品本身

是贴壁牢固的细胞，且密度适中，分布均匀，这种细胞样品是最适合用于高内涵分析的。但在实际的应用中，细胞拥挤成团的情况经常遇到，对于这种样品的细胞分割要尝试很多办法，包括调整细胞识别方法的荧光阈值或者对比度，调整细胞切割方法的限定因素等，从而达到相对较好的细胞分割。提高样品制备的质量，是获得良好的图像分割，获取可靠分析数据的关键。如果细胞荧光太弱，细胞边界难以区分，可以将细胞区域和背景区域进行分隔，对细胞区域进行整体分析。缺乏荧光信息的明场图像，可以通过纹理识别和机器自学习等功能实现明场图像的分隔。图像分割的质量，影响着最终的数据分析结果。图像的分割方法最终确定之前，最好用不同孔的细胞进行多次测试和调整，让细胞分割方法尽量适用于图像中所有细胞的分割。

2. 图像分析参数提取

高内涵图像分析过程中，可以从图像中提取大量的生物学信息。单细胞水平可以获取的生物学参数信息如表 1 所示。对于细胞表型相对简单的实验，基于单个细胞的信息可以对整个孔的细胞群体的生物学信息进行各种求和、求平均、求中值、最大值、最小值以及方差、变异系数等数学运算，从而可以从群体水平上对生物学信息进行汇总和比较。而对于细胞表型异质性高的高内涵实验，则需要先根据单个细胞的生物学参数对不同表型的细胞进行分群，然后再对不同的细胞群体分别进行分析。所以高内涵图像分析产生的生物学信息是相当巨大的 (赵宏伟, 2017)。

表 1. 高内涵分析从图像中可以提取的单个细胞的生物参数信息

荧光强度	平均荧光强度
	总荧光强度
	荧光强度中值
	荧光强度的最大值
	荧光强度的最小值
	荧光强度的分布
	对比度
	标准差
	变异系数
形态学特征	周长
	面积
	长度
	宽度
	圆度
	长宽比
	对称性
	轴
	辐射
	轮廓
纹理特征	SER 特征
	Gabor 特征
	Haralick 特征

如何对大量的生物学参数进行取舍是数据输出过程中的重要步骤。通常阴性对照样品和阳性对照样品的整孔的平均荧光强度的差异可以反应表型的变化趋势，因此对于荧光样品而言，平均荧光强度是最常用的参数。这个差异与我们从图像上直观感受到的差异也是最一致的。与这个参数比较相似的参数是荧光强度的中值。而总荧光强度通常反应一个细胞内的荧光基团总量，其变化趋势与 western-blot 等实

验所反应出来的数据趋势是一致的。而荧光强度的最大值、最小值以及荧光强度的分布、标准差和变异系数等参数通常在对细胞群体进行分群时作为特异性参数单独使用或组合使用。

对于细胞的形态学参数的选择，细胞的面积通常是最常用的反应细胞表型变化趋势的一个参数，另外细胞的长度、宽度或者周长也可以作为同样的用途。而细胞的圆度、长宽比、对称性、轴、辐射、轮廓以及纹理特征的 **SER** 特征、**Gabor** 特征以及 **Haralick** 特征等参数通常组合使用，用于基于形态学参数的细胞分群或者是复杂表型的判定。

3. 将细胞群体划分为不同表型的细胞亚群，增大信号窗口

高内涵图像分析的目的，通常是选择某一个或某一些生物学参数的整孔的平均值作为参考标准，然后用对照组的结果做数据均一化处理后再进行后续的数据分析。但在实际操作中，也有很多情况下，孔内的细胞表型异质性比较大，直接用整孔的平均值进行均一化处理信号窗口比较小，这种情况下需要先基于某些参数对细胞群体进行细分，划分为不同表型的细胞亚群，然后再针对这些亚群进行数据分析，可以极大的提高信号窗口以及 **Z'**值，方便后续数据分析。鉴于高内涵筛选实验的复杂程度，有些复杂的细胞表型无法用某个或某些参数进行简单区分，这时候可以结合软件的机器学习功能，利用多参数对细胞群体进行智能分类，从而达到划分不同细胞亚群的目的。

4. 高内涵数据质量评价

通常我们用 **Z'**值 (Zhang *et al.*, 1994)来评价高内涵筛选数据的质量。据统计，已发表的高内涵筛选的文献中，约有 40%左右使用 **Z'**值作为数据评价标准 (Singh *et al.*, 2014)。对于基于图像的高内涵筛选系统，如果 **Z'**值能够达到 0.5 以上是非常稳定的系统，通常细胞学筛选系统的 **Z'**值能够达到 0.3 就可以认定为系统差异显著，可以进行高内涵筛选 (Reference 12)。在实际应用中，对于一些荧光强度比较低的样品，阴性对照和阳性对照之间的差别又不是很大的时候，通过扣除背景信号，可以提高阴阳性之间的信号窗口，从而提高筛选系统的 **Z'**值。在我们的实际应用中，当信号窗口较小，**Z'**值为负值时，也可以考虑采用 **t-test** 来评估高内涵筛选数据质量。

致谢

感谢中科院分子细胞科学卓越创新中心化学生物学技术平台的全体成员的建议和帮助。

参考文献

1. 赵宏伟. (2017). [高内涵成像与数据分析](#). *生命的化学* 37(3): 434-438
2. Vozzi, G., Lenzi, T., Montemurro, F., Pardini, C., Vaglini, F. and Ahluwalia, A. (2012). [A novel method to produce immobilised biomolecular concentration gradients to study cell activities: design and modelling](#). *Mol Biotechnol* 50(2): 99-107.
3. D L Patton, K Y Chan, C C Kuo, Y T Cosgrove, L Langley. (1988). [In vitro growth of Chlamydia trachomatis in conjunctival and corneal epithelium](#). *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 29(7): 1087-95
4. Sun, Y., Huang, Z., Liu, W., Yang, K., Sun, K., Xing, S., Wang, D., Zhang, W. and Jiang, X. (2012). [Surface coating as a key parameter in engineering neuronal network structures in vitro](#). *Biointerphases* 7(1-4): 29.
5. Operetta® Application Guid 3rd Edition. (2012). A Guid for High-Content Analysis (HCA) Imaging Cell-Based Assays. Chapter 2: Experimental Setup: 60-61
6. Mattiazzi Usaj, M., Styles, E. B., Verster, A. J., Friesen, H., Boone, C. and Andrews, B. J. (2016). [High-Content Screening for Quantitative Cell Biology](#). *Trends Cell Biol* 26(8): 598-611.
7. Niederlein, A., Meyenhofer, F., White, D. and Bickle, M. (2009). [Image analysis in high-content screening](#). *Comb Chem High Throughput Screen* 12(9): 899-907.
8. Operetta® Application Guid 3rd Edition. (2012). A Guid for High-Content Analysis (HCA) Imaging Cell-Based Assays. Chapter 1: Designing Cell Based Imaging Applications: 39
9. Niederlein, A., Meyenhofer, F., White, D. and Bickle, M. (2009). [Image analysis in high-content screening](#). *Comb Chem High Throughput Screen* 12(9): 899-907.
10. Zhang, J. H., Chung, T. D. and Oldenburg, K. R. (1999). [A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays](#). *J Biomol Screen* 4(2): 67-73.
11. Singh, S., Carpenter, A. E. and Genovesio, A. (2014). [Increasing the Content of](#)

[High-Content Screening: An Overview.](#) *J Biomol Screen* 19(5): 640-650.

12. Operetta® Application Guid 3rd Edition. (2012). A Guid for High-Content Analysis (HCA) Imaging Cell-Based Assays. Chapter 3: High Content Analysis: Getting Started: 126