利用高内涵成像分析系统测定大型溞体内活性氧的含量及分布

Using High-content Screening Analysis System to Determine the Content and Distribution of Reactive Oxygen Species in *Daphnia magna*

张优, 柳姝*

空间与环境工程学院, 北京航空航天大学, 北京

*通讯作者邮箱: liushu@buaa.edu.cn

引用格式: 张优, 柳姝. (2021). 利用高内涵成像分析系统测定大型溞体内活性氧的含量及分布. // 高内涵成像及分析实验手册. *Bio-101* e1010835. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010835.

How to cite: Zhang, Y. and Liu, S. (2021). Using High-content Screening Analysis System to Determine the Content and Distribution of Reactive Oxygen Species in *Daphnia magna*. // High-Content Imaging and Analysis Protocol eBook. *Bio-101* e1010835. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010835. (in Chinese)

摘要: 荧光探针标记生物体内的活性氧因具有灵敏度高, 显微成像分辨率高, 实时检测等优点成为一种具有发展前景的方法, 本研究采用大型溞为研究对象, 高浓度铜离子为模式毒物, 利用 DCFH-DA 和 CellROX Orange Reagent 两种荧光探针标记铜诱导大型溞体内的活性氧, 其中 DCFH-DA 是一种传统的检测总氧化应激的指示剂, 可以被活性氧氧化成绿色荧光物质 (EX/EM = 485/530 nm), CellROX Orange Reagent 是一种新型的检测总活性氧的荧光探针, 可以被活性氧氧化成橙黄色荧光物质 (EX/EM = 545/565 nm)。大型溞自身也会产生绿色的自发荧光, 为了将探针与活性氧反应产生的荧光与自发荧光区分开来, 本实验采用两种荧光探针标记以更准确地测定大型溞体内活性氧的含量。最后借助高内涵系统从成像层面测定了铜诱导大型溞体内活性氧的含量及分布。

关键词: 高内涵, 荧光探针, 活性氧, 大型溞

研究背景

水体重金属污染是目前日益严重的环境问题之一, 铜作为一种典型的重金属污染物, 对水生生物构成严重威胁, 其可以直接扰乱蛋白质结构, 抑制过氧化氢酶 CAT、超氧化物歧化酶 SOD 和谷胱甘肽过氧化物酶 GPx 等抗氧化酶的活性, 导致活性氧的形成

(Gaetke and Chow, 2003)。过量的活性氧会对生物体产生氧化损伤，导致细胞死亡，因此准确测定生物体内的活性氧的含量和分布十分重要。荧光标记由于具有灵敏度高，活性高，显微成像分辨率高，实时检测等优点，成为一个检测活性氧的有发展前景的有利工具。本研究中使用 DCFH-DA 和 CellROX Orange Reagent 两种荧光探针，这两种探针本身没有荧光，可自由穿过细胞膜，一旦与细胞内的活性氧反应便分别会产生明亮的绿色荧光和橙黄色荧光，且荧光物质不能穿过细胞膜，因此，荧光强度与细胞内的活性氧成正比。但是大型蚤自身会产生绿色的自发荧光，为了将荧光探针与活性氧反应产生的荧光与自发荧光区分开来，本研究采用两种探针标记以便更好地验证大型蚤体内活性氧产生的含量 (Fan *et al.*, 2020)。

本方法选用大型蚤为研究对象，一种理想的毒性试验模型生物，用两种荧光探针标记铜暴露后大型蚤体内的活性氧，最后借助高内涵成像系统进行分析。高内涵成像分析系统因具有转盘式共聚焦快速扫描，灵活的激发发射波长搭配，超大的成像视野，超强的图像分辨率以及强大的图像分析功能，可以很好地帮助我们分析了铜诱导的大型蚤体内活性氧的含量及分布。

材料与试剂

1. Corning® 96-well Flat Clear Bottom Black Polystyrene TC-treated Microplates (Individually Wrapped, with Lid, Sterile, 3603, Corning)
2. Cypress® 15 ml 离心管 (BaiCheng Technology Co., Ltd)
3. 一次性使用培养皿 70 mm (江苏天力医疗器械有限公司)
4. $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, National Institute of Metrology)
5. $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (10035-04-8, Sigma)
6. $\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (10034-99-8, Sigma)
7. NaNO_3 (7631-99-4, Aladdin)
8. NaHCO_3 (144-55-8, Sigma)
9. $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (13517-24-3, 西陇化工有限公司)
10. NaCl (7647-14-5, 西陇科学股份有限公司)
11. H_3BO_3 (10043-35-3, Sigma)
12. KCl ((GB/T 646-1993) 9320, 北京化工厂)
13. KH_2PO_4 (7778-77-0, Sigma)

14. K_2HPO_4 (7758-11-4, Sigma)
15. $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (13472-35-0, 西陇科学股份有限公司)
16. Na_2HPO_4 (7558-79-4, 国药集团化学试剂有限公司)
17. 50%戊二醛 (111-30-8, Aladdin)
18. 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein (DCFH-DA) (4091-99-0, 上海懋康科技有限公司)
19. CellROX Orange Reagent (50103ES50, 上海翊圣生物科技有限公司)
20. 二甲基亚砜 (DMSO) (67-68-5, Aladdin)
21. 人工配水 (见溶液配方)
22. Krebs-Ringer 磷酸盐缓冲液 (见溶液配方)
23. DCFH-DA 孵育溶液 (见溶液配方)
24. CellROX Orange Reagent 孵育溶液 (见溶液配方)
25. 麻醉溶液 (见溶液配方)

仪器设备

1. 恒温恒湿培养箱 (GXZ, 宁波江南仪器厂)
2. 高内涵成像分析系统 (PerkinElmer, USA)

实验步骤

具体的实验操作步骤如图 1 所示，主要分为四个部分：

1. 大型蚤的暴露：

在人工配水中加入 $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 标准溶液，使 Cu^{2+} 的最终浓度分别为 10 $\mu\text{g}/\text{L}$ ，将没有 Cu^{2+} 的作为对照，加入 14 d 统一大小的大型蚤，使大型蚤与暴露溶液的比例为 1:10 ml，在恒温恒湿的培养中暴露 3 h。

2. 荧光探针孵育：

- a. 暴露结束后，将大型蚤从暴露溶液中取出，在培养皿中用超纯水清洗干净。
- b. 将每个处理的活体大型蚤按照数量随机等分成两份，一份活体大型蚤 (10 只) 暴露于 5 ml 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 DCFH-DA 溶液中，另一份活体大型蚤 (10 只) 暴露于 5 ml 2.5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 CellROX Orange Reagent 溶液中，室温下避光孵育 4 h。

3. 麻醉：

- a. 在探针中避光孵育 4 h 后，将大型蚤取出，再次用超纯水清洗干净。
 - b. 将大型蚤放于 2.5%戊二醛溶液中麻醉 10 min。
4. 高内涵成像系统检测:
- a. 将麻醉后的大型蚤封装到 96 孔板中，每个孔中放置一只大型蚤。
 - b. 高内涵成像分析：在 5 倍水镜下，于 EX 485 nm/EM 530 nm (绿色荧光通道) 下对 DCFH-DA 溶液中孵育的大型蚤进行拍照，于 EX 545 nm/EM 565 nm (橙色荧光通道) 下对 CellROX Orange Reagent 溶液中孵育的大型蚤进行拍照，高内涵技术实现了高速显微成像，综合海量信息以便更快做出决策，其聚焦时间小于 400 ms，孔板孔间位移速率小于 800 ms，在 3 min 内完成对 96 孔板中大型蚤的扫描，根据明场和荧光叠加后大型蚤的显微图像计算活性氧的含量，同时与大型蚤的身体构造图进行对比以确定活性氧的分布位置。

图 1. 高内涵成像分析系统检测大型蚤体内活性氧含量及分布的实验操作步骤

结果与分析

图 2 的结果表明高内涵分析系统从成像层面更直观的显示出铜诱导大型蚤体内活性氧的产量与分布。用 DCFH-DA 标记大型蚤体内的活性氧中，可以看到 Cu^{2+} 处理组的大型蚤体内的荧光强度明显高于对照组。同时，CellROX Orange Reagent 荧光探针的结果也表明 Cu^{2+} 诱导大型蚤体内产生了大量的活性氧。另外，通过图像也看到活性氧分布在大型蚤的肠道内，这可能与其滤食行为有关，但肠道不是铜诱导活性氧产生的唯一器官，大量的活性氧还同时分布于胸肢，盲囊，顎腺等部位 (如图 2 所示)。

通过高内涵成像分析系统，对大型蚤的荧光照片进行了批量分析，本实验中采用了 8 个平行。图 3 描述了 CellROX Orange Reagent 荧光探针标记下大型蚤体内的活性氧的荧光强度。从图中可以看出，对照组中大型蚤体内的荧光强度为 275.05 ± 15.31 a.u.，铜污染物的存在显著增加了大型蚤体内的 ROS 生成量 (是对照组的 1.77 倍， 488.21 ± 136.39 a.u.)。

图 2. 高内涵成像分析系统对 DCFH-DA 和 CellROX Orange Reagent 两种荧光探针标记的大型蚤成像

图 3. CellROX Orange Reagent 荧光探针标记的大型蚤体内活性氧的荧光强度 数据为平均值 $\pm$ 标准方差 ($n = 8$), *表示在 0.05 水平上有显著性差异

溶液配方

1. 人工配水:

根据经济合作与发展组织的标准 (OECD) (OECD, 2004), 人工配水的组成为 CaCl_2 (293.8 mg/L), MgSO_4 (123.3 mg/L), K_2HPO_4 (0.184 mg/L), NaNO_3 (0.274 mg/L), NaHCO_3 (64.8 mg/L), Na_2SiO_3 (10 mg/L), H_3BO_3 (0.175 mg/L), KCl (5.8 mg/L) 及 KH_2PO_4 (0.143 mg/L)。

2. Krebs-Ringer 磷酸盐缓冲液:

NaCl (8.415 g/L), KCl (0.343 g/L), MgSO_4 (0.289 g/L), CaCl_2 (0.111 g/L), NaH_2PO_4 (0.445 g/L) 及 Na_2HPO_4 (1.725 g/L)。

3. DCFH-DA 孵育溶液:

称取 4.87 mg DCFH-DA 粉末溶于 1 ml DMSO 中, 配成 10 mmol/L 的储备液, 然后用 Krebs-Ringer 磷酸盐缓冲液稀释至孵育浓度 10 $\mu\text{mol/L}$ 。

4. CellROX Orange Reagent 孵育溶液:

CellROX Orange Reagent 以浓度为 2.5 mmol/L 的 DMSO 溶液提供, 用 Krebs-Ringer 磷酸盐缓冲液将其稀释 1000 倍, 配成 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 的孵育溶液。

5. 麻醉溶液:

用超纯水将 50%戊二醛稀释 20 倍, 配成 2.5%戊二醛麻醉溶液。

致谢

感谢中科院过程所生化工程重点实验室提供高内涵成像分析及王瑜老师的辅助。该项目受国家自然科学基金 51708012 的支持资助。

参考文献

1. Gaetke, L. M. and Chow, C.K. (2003). [Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients](#). *Toxicology* 189, 147-163.
2. Fan, W. H., Zhang, Y., Liu, S., Li, X. M. and Li, J. Y. (2020). [Alleviation of copper toxicity in *Daphnia magna* by hydrogen nanobubble water](#). *J Hazard Mater* 389, 122155.
3. OECD. (2004). [Test No. 202: *Daphnia* sp. acute immobilisation test](#). In: *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Section 2*. OECD Publishing, 1-12.