通过高内涵成像分析系统进行小分子与溶酶体共定位分析及溶酶体通膜透性检测

Lysosomal Localization and Lysosomal Membrane Permeability Assay of Small Molecules by LimageXpress Micro XLS

张园媛¹, 张慧雯¹, 田莉¹, 周怡¹, 郝静², 刘云军^{1,*}

¹药学院, 广东药科大学, 广州市, 广东省; ²生命科学与生物制药学院, 广东药科大学, 广州市, 广东省

*通讯作者邮箱: lyiche@gdpu.edu.cn

引用格式: 张园媛, 张慧雯, 田莉, 周怡, 郝静, 刘云军. (2021). 通过高内涵成像分析系统进行小分子与溶酶体共定位分析及溶酶体通膜透性检测. // 高内涵成像及分析实验手册. *Bio-101* e1010849. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010849.

How to cite: Zhang, Y. Y., Zhang, H. W., Tian, L., Zhou, Y. Hao, J. and Liu, Y. J. (2021). Lysosomal Localization and Lysosomal Membrane Permeability Assay of Small Molecules by LimageXpress Micro XLS. // High-Content Imaging and Analysis Protocol eBook. *Bio-101* e1010849. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010849. (in Chinese)

摘要: 高内涵成像分析系统通过细胞高清晰快速成像, 能够获得细胞、蛋白分布、基因表达的高清晰图像。通过软件系统对高清晰细胞图像进行分析, 能够快速获得细胞形态学、功能学等性状改变情况, 并能通过细胞内蛋白表达改变、GPCR 受体内吞、细胞凋亡和死亡, 细胞粘附等特征快速准确高效获得细胞变化的数据, 并以此为依据, 研究细胞变化的规律及疾病状态下细胞的变化和细胞间的相互作用, 为研究疾病发生和寻找相应的药物提供依据和手段。高内涵成像分析系统是在保持细胞结构和功能完整性的前提下, 同时检测被筛样品对细胞形态、生长、分化、迁移、凋亡、毒性、代谢途径及信号传导各个环节的影响, 在单一实验中获取大量与基因、蛋白及其他细胞成分相关的信息, 确定其生物活性和潜在毒性的过程。同时, 也是一种应用高分辨率的荧光数码影像系统, 旨在获得被筛样品对细胞产生的多维立体和实时快速的生物效应信息, 在细胞水平上检测

多个指标的多元化、功能性筛选技术平台。高内涵成像分析系统广泛应用于细胞凋亡机制的研究, 溶酶体在细胞凋亡调节中的研究越来越受到重视, 溶酶体膜通透性(LMP)改变可以启动溶酶体凋亡途径, LMP 改变可能被证明是一种有价值的治疗方法, 可以作为细胞死亡的触发器, 也可以作为治疗药物释放参与细胞凋亡的指标之一。

因此，本文通过高内涵分析对配位化合物 1-3 进行溶酶体共定位分析。在实验过程中，需要对高内涵 plate、wavelength 等参数进行调整，还需对图片通道、自动曝光、自动聚焦、图片颜色及清晰度进行选取，最后合理保存所拍图片以便进行结果分析。实验结果表明，配位化合物 1-3 定位溶酶体腔内且可以使溶酶体通透性增强。溶酶体内包含了多种蛋白水解酶，在细胞细胞凋亡中起关键作用，因此我们进一步研究配位化合物 1-3 作用于溶酶体并参与细胞凋亡的机制。

关键词：配合物，高内涵成像分析系统，溶酶体定位，溶酶体膜透性。

材料与试剂

1. 细胞株 (SGC-7901) (中山大学细胞库)
2. 胎牛血清 (FBS) (美国 Gibco 公司, catalog number: 10270106)
3. 新生牛血清 (NBCS) (美国 Gibco 公司, catalog number: 16010142)
4. RPMI-1640 培养液 (美国 Gibco 公司, catalog number: 31870082)
5. DMEM 高糖培养液 (美国 Gibco 公司, catalog number: 11965092)
6. 溶酶体红色荧光探针 (Beyotime 生物技术有限公司, catalog number: C1046)
7. 吖啶橙 (AO) (Beyotime 生物技术有限公司, CAS number:: 494-38-2)
8. 青霉素/链霉素 (Beyotime 生物技术有限公司, catalog number: C0222)
9. RPMI-1640/DMEM (Gibco) 的配制 (见溶液配方, catalog number: 31800022/12800017)

仪器设备

1. 超净工作台(苏洁医疗器械有限公司, model: SJ-CJ-2FD)
2. 二氧化碳培养箱 (日本松下电器公司, model: 371)
3. 倒置生物显微镜 (奥林巴斯公司, model: CKX31-A11RC)
4. 立式压力蒸汽灭菌器 (上海申安医疗器械厂, model: LDZM-60KCS-II)
5. 电热鼓风干燥箱 (上海凯朗仪器设备厂, model: DHG-9140A)
6. 低速离心机 (上海安亭科学仪器厂, model: TDL-5-A)
7. 高速冷冻离心机 (上海卢湘仪仪器有限公司, model: TGL-16M)
8. -86 °C 医用低温箱 (日本松下公司, model: MDF-193)

9. 高内涵细胞成像系统 (MOLECULAR DEVICES, model: ImageXpress Mcro XLS)

实验步骤

一、溶酶体定位及溶酶体膜透性检测

1. 将细胞置于 12 孔微量分析培养板 (NEST) 中。
2. 待细胞长至 40%-60%，加药 (3.5 μ M) 作用 1-2 h。
3. 细胞与染液 LysoTracker Red (150 nM, λ_{ex} = 577 nm, λ_{em} = 590 nm) 在 37 °C 孵育 1 h。
4. 孵育完成后，将孔板用 4 °C PBS 洗涤 3 次。
5. 洗涤完毕后，在所有孔中加入 300-500 μ L/孔 PBS，将细胞在高内涵成像分析系统下成像。

5.1 开机

高内涵分析系统如图 1

- 1) 插电源并且打开光源等开关 (三个开关朝上，皆亮绿灯)。
- 2) 开电脑主机和电脑显示屏。
- 3) 打开软件 Matepress，输入密码：MOLDEV。

图 1. 高内涵成像分析系统外观图

5.2 批量拍照步骤(适用于仪器稳定，细胞培养板平整的情况)

高内涵成像分析系统操作界面图 2

- 1) 点击开窗按钮 ，取下细胞培养板的盖子，板孔 A 对应板孔槽的右上角，放入细胞培养板，关闭窗口。
- 2) 点击 **screening** → 点第一个选项：选择 **File 名称** → 选中需要拍摄的板孔和视野 (选中即为绿色，视野最好不少于 20 个，五点取样)。
- 3) 点击 **configure** → 选取板孔样式：**plate-celler 12-well-plastic** 或者是 **plate-celler 6-well-plastic** (此处应根据所购买的细胞培养板的种类做适宜更改，选择合适的板孔样式)。
- 4) 选择需要拍照的通道数目及范围：绿光 (**FITC**)、红光 (**Texas Red**)、蓝光 (**DAPI**)、明场 (**TL ON**)。
- 5) 选中所要拍摄的某个通道 → 自动曝光 (**Auto exposure**) → 自动聚焦 (**calculated effect**，曝光值较大时此过程会较为缓慢) → 聚焦完毕后，弹出对话框，拉动进度条选择最为清楚的一张照片 → **OK** → 以同样的方法调整好每个通道的清晰度 → 点 **preview** 即可预览。
- 6) 点击 **run** → 更改 **folder Name** (例如：**GYG AOEB 20200624**) → 复制 **folder Name**，粘贴到下一行 → 点击 **Acquire plate** 后开始拍照。从第一个板孔开始按“S”型进行拍照，若曝光值较大，则此过程较为缓慢；若一开始选择了 12 个板孔和 20 个视野，则每个板孔各拍摄 20 张图片，一共拍摄 240 张照片，第 1-20 张图片属于第一个板孔，第 21-40 张属于第二个板孔以此类推。

图 2. 高内涵成像分析系统操作界面图

5.3 批量保存图片 (适用于保存批量拍摄的图片)

拍摄完毕 → 点击 screening → 再点击 review plate → 点击 select plate → 按拍摄时间和命名选中所需文件 → 勾选 “all”，并勾选所有板孔 →

选择所拍摄的所有通道如

<div style="font-size: 4em; line-height: 1;">[</div>	FITC	<div style="font-size: 4em; line-height: 1;">]</div>	点击 display
	Texas Red →		
	DAPI		

→ 勾选

<div style="font-size: 4em; line-height: 1;">[</div>	color composite 例如保存 FITC 通道图片	<div style="font-size: 4em; line-height: 1;">]</div>	G- source G None-source R None-source B
	show values → 则只保留绿光，不保留		
	Auto scale 红光和蓝光。选择：		

→ 点击 Load select images → 随后弹出图片 → 右击 save as → 选择所要保存的文件夹
→ 改格式 TIFF File Format (*.tif) → 改前缀 G-、R-、B-等等以区分各个通道图片。

5.4 单独拍摄保存照片(适用于仪器不够稳定及细胞培养板不平整的情况)

高内涵成像分析系统数据保存操作如图 3

与批量拍照步骤类似，打开 **configure**，根据所要拍摄的通道在最上方选择合适的模板 (如 **hm ROS**、**wyj** 等等)，在根据个人铺板的情况选中所要拍摄的板孔和视野，先点击 **Auto exposure** 自动曝光，然后点击 **calculate effect** 自动聚焦，在弹出的对话框中选择最清晰的一张照片，点击 **OK**。若此时照片还是不够清晰，则可缓慢调节自动聚焦后的参数，使图片更为清晰。或者把实时 **Live** 打开，缓慢调节 **z** 坐标轴，直至调出清晰的图片。

调出清晰的图片后，单独保存图片则遵循如下步骤：点击 **Edit** → **display** → **Overlay Images** → 此刻弹出对话框 → 按所要保存的通道选择合适的选项(例如保存 **FITC** 通道图片则只选择 **FITC**，其他通道选择 **None**；若同时选择 **FITC** 与 **DAPI**通道则保存的是两个通道下的叠加图) → 点击 **Apply** → 右击 **Save as** → 命名保存于合适的文件夹 → 后面则可换孔、换视野继续如上操作

图 3. 高内涵成像分析系统数据保存操作图

5.5 关机步骤

拍摄完毕，点击开窗按钮，取出拍摄的细胞培养板，随后关窗，防止镜头落灰。退出软件，用专用的 **U** 盘获取拍摄的数据，关闭计算机主机和显示屏。关闭灯源等三个开关 (绿灯灭)，最后拔掉计算机插头和光源插头 (荧光显微镜插

头不拔)。

二、溶酶体定位及溶酶体膜透性检测

1. 将细胞置于 12 孔微量分析培养板 (NEST) 中。
2. 待细胞长至 40%-60%，加药 (3.5 μ M) 作用 4-8 h。
3. 细胞与 AO (1 μ g/ml) 在 37 °C 孵育 1 h。
4. 孵育完成后，将孔板用 4 °C PBS 洗涤 3 次。
5. 洗涤完毕后，所有孔加入 300-500 μ L/孔 PBS，将细胞在高内涵成像分析系统下成像(具体操作见第一点)。

结果与分析

1. 溶酶体定位及溶酶体膜透性检测

溶酶体中含有多种水解酶，能够降解几乎所有的生物分子。溶酶体完整性的破坏可导致溶酶体膜通透性 (LMP) 启动细胞死亡 (Boya *et al.*, 2003; Nylandsted *et al.*, 2004; Blomgran *et al.*, 2007; Boya and Kroemer, 2008; Repnik *et al.*, 2014)。用 LysoTracker Red 染色法检测配位化合物在溶酶体中的位置。如图 5 (A) 所示，用 LysoTracker Red 染色的溶酶体显示亮红色。SGC-7901 细胞暴露于 3.5 μ g/mL 的配位化合物 1-3 后，配位化合物发射绿色荧光。合并暗示红色和绿色荧光重叠，表明配位化合物 1-3 靶向溶酶体。

然后用吖啶橙 (AO) 染色法观察溶酶体通透性。AO 是一种异色荧光染料，在酸性 pH 下 (在完整溶酶体中) 表现出明亮的红色荧光。当溶酶体通透性增强，进入溶酶体的 AO 红色荧光逐渐减弱 (Chang *et al.*, 2016)。如图 5 (B) 所示，在对照组 (a) 中，发现绿色荧光包含多个明亮的红色荧光点。3.5 μ g/mL 的配位化合物 1 (b)、2 (c) 和 3 (d) 处理 SGC-7901 细胞 24 h 后红色荧光减弱，表明溶酶体通透性增强。

吖啶橙 (AO) 能透过核膜完整的细胞，与细胞 DNA 结合，使之发出明亮的绿色荧光，当细胞发生早期凋亡时，吖啶橙 (AO) 能透过胞膜完整的早期凋亡细胞，早期凋亡细胞常伴有核固缩 (Taylor *et al.*, 2008; Marino *et al.*, 2014; Cao *et al.*, 2017)。如图 5B 所示，在对照组 (a) 中，发现 SGC-7901 细胞显现明亮的绿色荧

光且细胞核结构完整，细胞核呈正常的米粒状。3.5 $\mu\text{g/mL}$ 配位化合物 1 (b)、2 (c) 和 3 (d) 处理 SGC-7901 细胞 24 h 导致核固缩，表现明显的凋亡特征，例如：细胞膜起泡、核固缩、染色质凝结。

图 4. A. SGC-7901 细胞用 3.5 μM 的复合物 1-3 处理 1 小时后，复合物在溶酶体的位置。B. SGC-7901 细胞 (a) 加入 3.5 μM 的复合物 1 (b)、2 (c) 和 3 (d) 8 小时后，溶酶体通透性的检测，细胞用 AO 进行染色。

溶液配方

1. RPMI-1640/DMEM (Gibco) 的配制

- 1.1 高压 1 L 超纯水、过滤装置、玻璃棒、1 L 烧杯。
- 1.2 称取 2.0 g 碳酸氢钠 (调 PH)，青霉素-链霉素双抗解冻。
- 1.3 将高压的 1 L 超纯水、过滤装置、玻璃棒、烧杯，RPMI-1640/DMEM 粉末一包放于超净台紫外 1 h。
- 1.4 进入超净台进行溶液配制，先倒一瓶高压后的超纯水于 1 L 烧杯中，后加入

RPMI-1640/DMEM 粉末、碳酸氢钠 2.0 g、青霉素-链霉素双抗 10 ml，充分溶解后加入另一瓶超纯水。

1.5 搭过滤装置并且检查过滤装置是否漏液。

1.6 将滤液分装于两个 500 ml 玻璃瓶内，用封口膜封口，随后拿出超净台放入 4 °C 冰箱。

致谢

这项工作得到了中国国家自然科学基金的支持 (No 21877018)。

参考文献

1. Boya, P., Andreau, K., Poncet, D., Zamzami, N., Perfettini, J. L., Metivier, D., Ojcius, D. M., Jaattela, M., Kroemer, G. (2003). [Lysosomal membrane permeabilization induces cell death in a mitochondrion-dependent fashion.](#) *J Exp Med* 197: 1323-34.
2. Blomgran, R., Zheng, L., Stendahl, O., (2007). [Cathepsin-cleaved Bid promotes apoptosis in human neutrophils via oxidative stress-induced lysosomal membrane permeabilization.](#) *J Leukoc Biol* 81: 1213-23.
3. Boya, P., Kroemer, G. (2008). [lysosomal membrane permeabilization in cell death.](#) *Oncogene* 27: 6434-6451.
4. Chang, Y., Li, Y., Ye, N., Guo, X., Li, Z., Sun, G., Sun, Y. (2016). [Atorvastatin inhibits the apoptosis of human umbilical vein endothelial cells induced by angiotensin II via the lysosomal-mitochondrial axis.](#) *Apoptosis* 21: 977-996.
5. Cao, J. J., Tan, C. P., Chen, M. H., Wu, N., Yao, D. Y., Liu, X. G., Ji, L. N., Mao, Z. W. (2017). [Targeting cancer cell metabolism with mitochondria-immobilized phosphorescent cyclometalated iridium \(III\) complexes.](#) *Chem Sci* 8: 631-640.
6. Marino, G., Niso-Santano, M., Baehrecke, E. H., Kroemer, G., (2014). [Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis.](#) *Nat Rev Mol Cell Biol* 15: 81-94.
7. Nylandsted, J., Gyrd-Hansen, M., Danielewicz, A., Fehrenbacher, N., Lademann, U., Hoyer-Hansen, M., Weber, E., Multhoff, G., Rohde, M. (2004). [Heat shock protein 70 promotes cell survival by inhibiting lysosomal membrane permeabilization.](#) *J Exp Med* 200: 425-35.

8. Repnik, U., Hafner Cesen, M., Turk, B. (2014). [Lysosomal membrane permeabilization in cell death: concepts and challenges](#). *Mitochondrion* 19: 49-57.
9. Taylor, R. C., Cullen, S. P., Martin, S. J., (2008). [Apoptosis: controlled demolition at the cellular level](#). *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 231-41.