

MetaMorph 应用模块说明及应用实例介绍

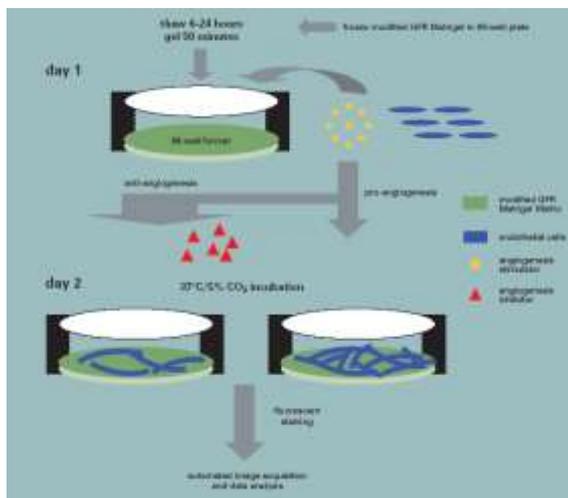
世界知名的图像分析软件 MetaMorph 能够解决相关实验中的几乎所有问题。其包含的应用模块涵盖了目前细胞生物学和药物研究的热点研究。这些模块可以应用于肿瘤、免疫疾病、心血管疾病、神经疾病、肥胖症等的机理研究；涵盖了细胞凋亡、信号通路、神经生长、血管生成、细胞活力、细胞核细胞器转位、细胞表面位移、离子通道、GPCR 已知、未知受体、细胞增殖、细胞毒性分析、分子相互作用……等一系列的基础和药物研究。用户还可以根据自己实验的特殊要求，点击鼠标，即可实现编程获得自己所需的应用模块和功能。

应用实例 1: 血管生成分析 (Angiogenesis Tube Formation)

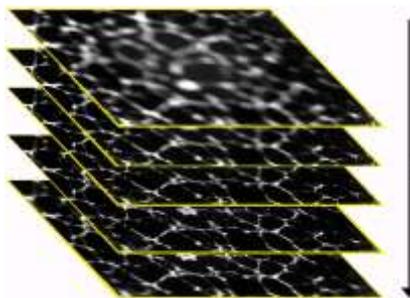
血管发生是新生血管的生长过程，是生理和病理过程中重要的自然过程。健康的人体组织在创伤后，血管生发过程能够修复创伤并恢复组织血流。

在许多严重疾病，身体组织失去了对血管生发的控制。当血管过度生长或生长不足会导致血管生发依赖性疾，如肿瘤、糖尿病视网膜病变、银屑病、冠脉疾病、风湿性关节炎和中风的发生。

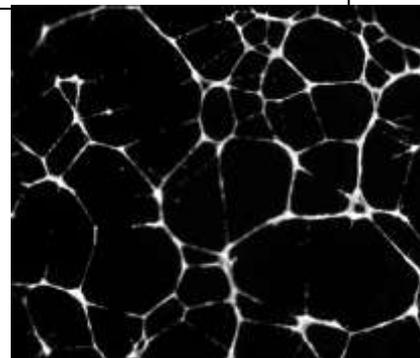
体外进行血管形成的分析为成像提出了挑战。将细胞种植入培养基后，细胞长入培养基，血管会沿着平行于基质表面或垂直生长入基质。要想获得该三维信息，MetaMorph能够进行Z轴图像的系列捕获，并能够提取出各个不同Z轴深度的清晰血管图像，并进行分析，从而得到三维基质空间中所有血管的量化信息，从而能够简单、快速的实现血管生成实验的分析。



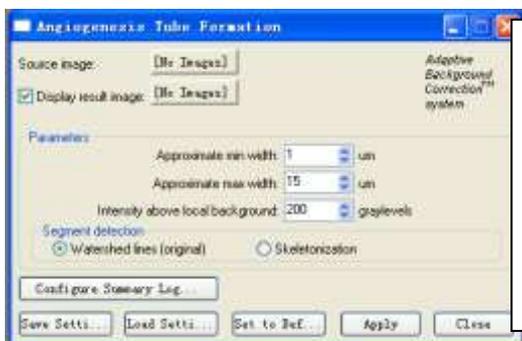
- ★ 将内皮细胞种植入 BD MatriGel™ Matrix 培养基，培养基含有血管生成激活物，抑制剂
- ↓
- ★ 孵育 16-18 h
- ↓
- ★ Calcein AM 细胞染色，冲洗
- ↓
- ★ 用 2X 物镜成像



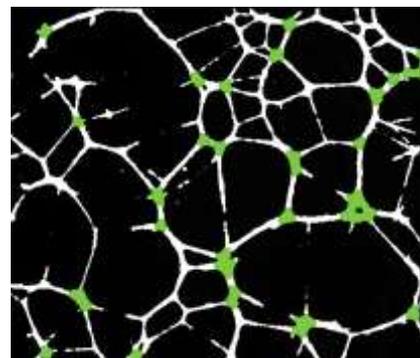
从三维基质获得的血管Z系列原始图像



由Z系列原始图像获得的最佳聚焦图像



输入血管最大和最小宽度和相对背景的亮度值



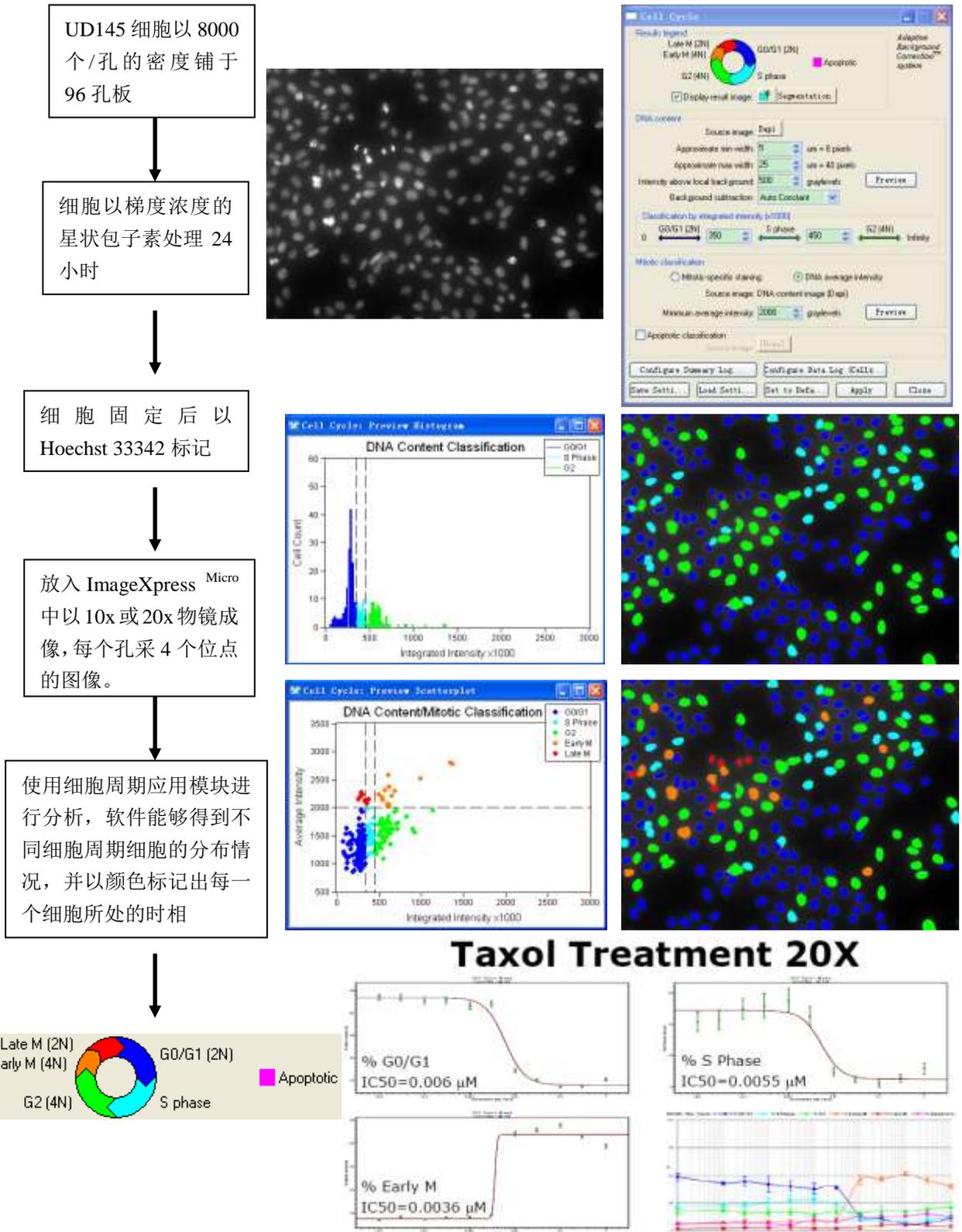
MetaXpress 辨认的血管和分支节点

Total Tube Length	Mean Tube Length	Total Tube Area	Mean Tube Area	Tube % Area Covered	Average Tube Thickness	Segments	Branch Points	Nodes	Total Node Area	Mean Node Area	Node % Area Covered	Tube Length Per Set
7449.7282	17.0474383	46786.594	107.06314	7.82043457	6.280308003	437	168	48	43324.978	902.6037	7.2418213	677.24811

MetaMorph 对于血管的分析结果

应用实例 2: 细胞周期 (Cell Cycle)

检测细胞周期是肿瘤研究和肿瘤治疗研究中非常重要的项目。目前对于细胞周期的研究方法，如流式细胞仪，需要大量的细胞，且流式细胞仪分辨率低，无法获得细胞的更加详实的数据。MD 针对该应用，开发了 Cell Cycle 分析模块，该方法能够测定每个细胞所处的细胞周期 G0/G1, S, G2, M 早期, M 晚期，并能报告细胞各个时期亚群的分布，并能同时根据细胞凋亡特异性标记同时区分活细胞和调亡细胞，获得大量丰富的相关信息。



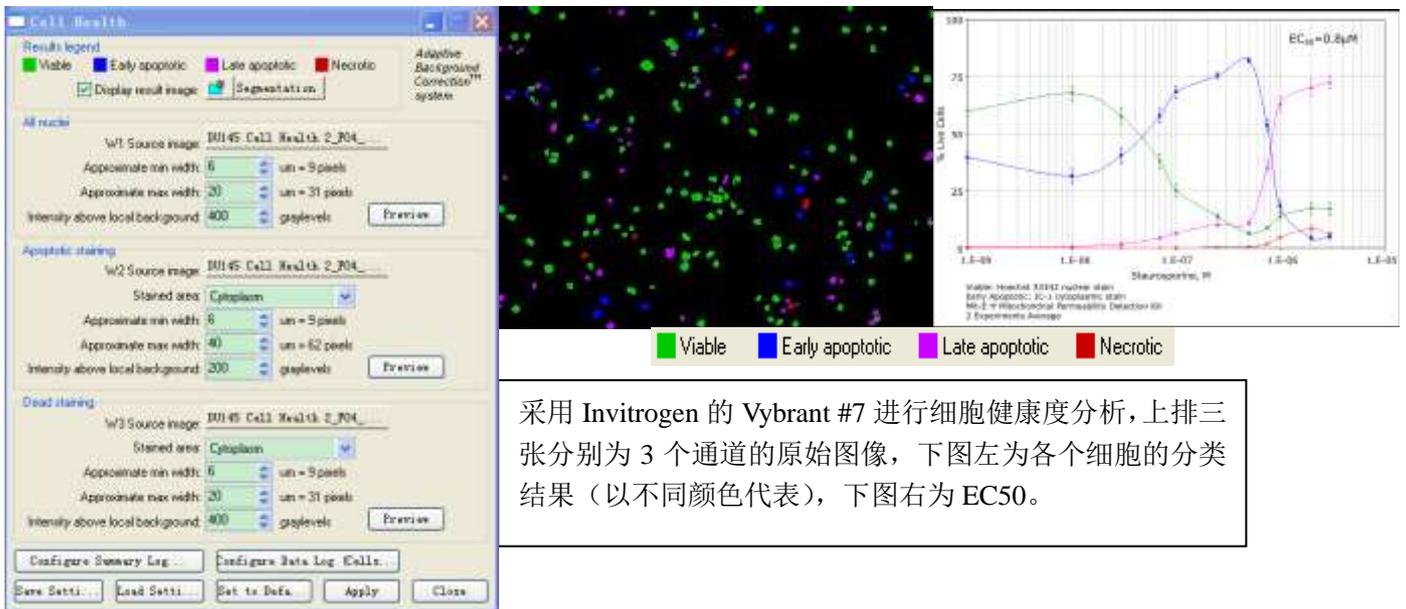
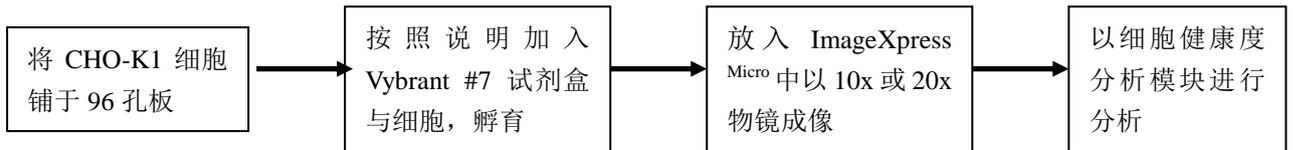
应用实例 3: 细胞健康状况检测 (Cell Health)

细胞学方法检测细胞的健康度已经成为了药物研究和开发的重要方法。细胞学的方法为模拟药物的毒性作用和诱导细胞坏死和凋亡的特异性抗增殖作用提供了一种有效方法。

Cell Health 能够根据图像信息获得每个细胞的特征, 并将所有细胞定义为活细胞、凋亡

早期细胞、凋亡晚期细胞和坏死细胞 (■ Viable ■ Early apoptotic ■ Late apoptotic ■ Necrotic)

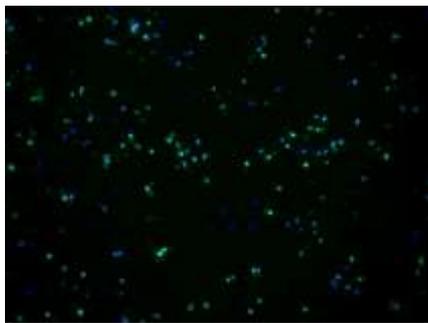
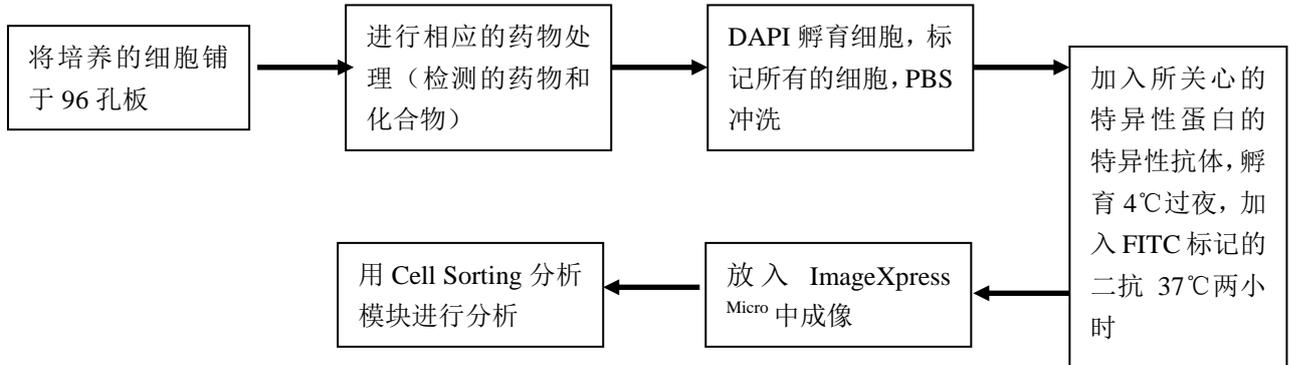
并以各种不同颜色表示。采用该模块无需特定试剂盒, 能够分析各种商用试剂盒 (如 Invitrogen 的 Vybrant #3 和 #7) 也和采用 Hoechst 33342 和 Mit-E-Ψ、Hoechst 和 JC-1 等多种荧光标记物进行实验的分析。



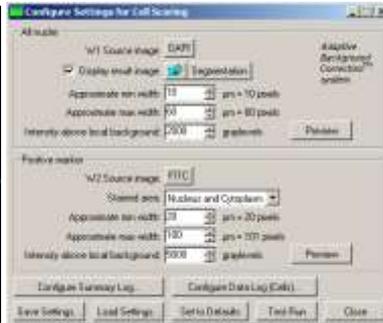
应用实例 4：细胞分类分析（Cell Sorting）

在进行蛋白磷酸化过程的分析、脂肪摄取、肿瘤研究和干细胞分化的过程中，需要对细胞进行区分，以辨认和分析磷酸化蛋白、脂肪细胞、分化的干细胞等。

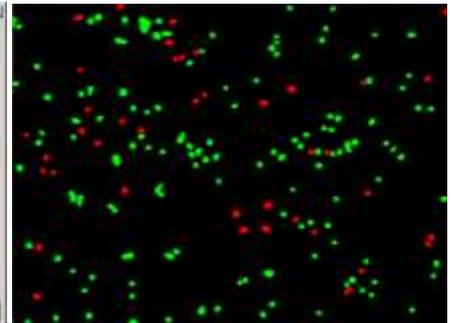
细胞分类检测模块能够检测双荧光标记的标本，可以用一个荧光标记标记所有细胞核，同时使用另一种荧光标记来标记感兴趣的成分，如细胞核、胞浆或存在于胞核和胞浆内的蛋白。该方法分析方法成熟，速度快，相比传统的流式细胞仪的分析所需细胞更少，且能够得到两个波长下所有细胞的特性和分类。



培养的细胞固定后，用 DAPI 标记细胞核（蓝色），用 FITC 标记的二抗标记细胞内特异性蛋白



使用 Cell Sorting 分析模块，输入细胞大概的大小范围



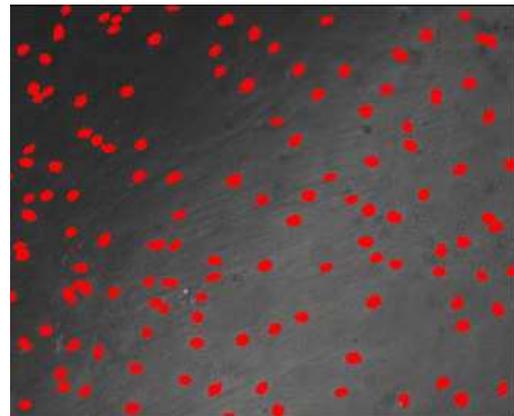
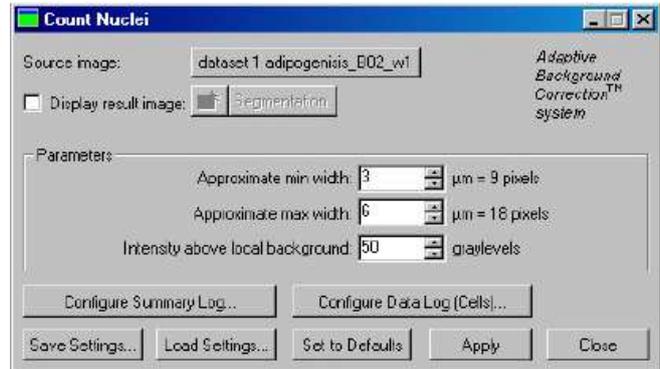
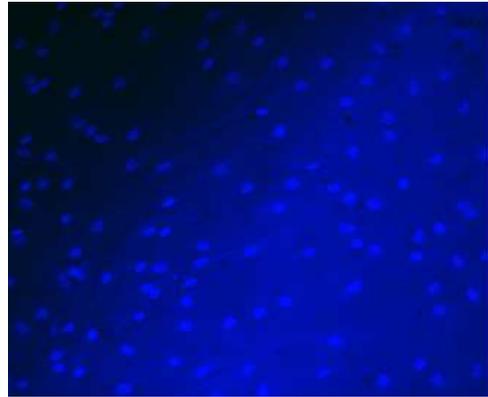
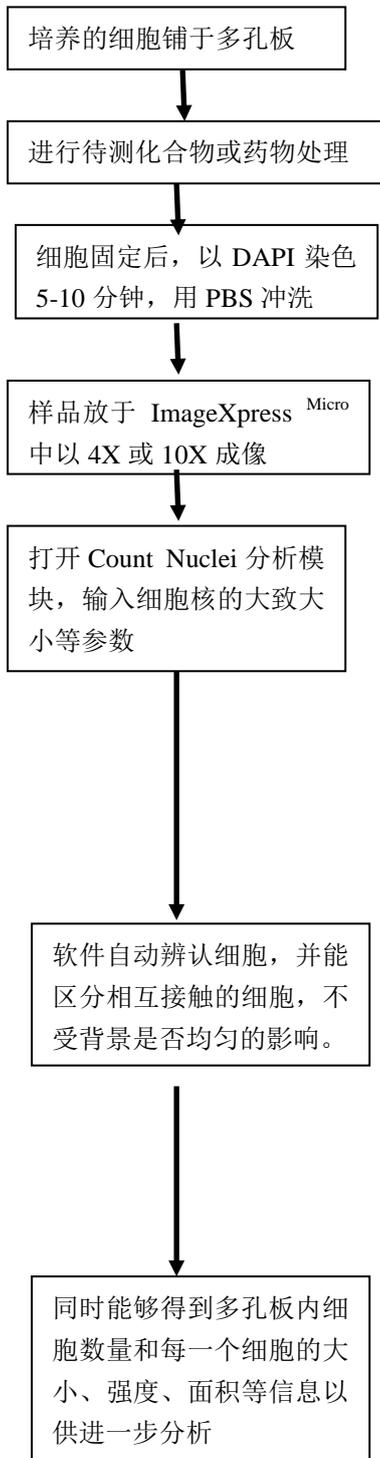
软件分析结果示意图。
红色：特异性蛋白阳性的细胞
绿色：特异性蛋白阴性的细胞

Cell Classification	Cell: Nuclear Area	Cell: Cell Area	Cell: W1 Integrated Nuclear Intensity	Cell: W1 Average Nuclear Intensity	Cell: W1 Integr. Nucl. Inten.
22 Negative	259.574	259.574	174257	268.915	107179
23 Negative	240.346	240.346	153126	255.21	108974
24 Negative	156.626	156.626	94166	240.834	62630
25 Negative	177.055	177.055	92470	209.208	74180
26 Negative	215.51	215.51	121829	226.448	90143
27 Negative	224.724	224.724	148471	264.654	145769
28 Positive	228.329	228.329	188913	331.426	342038
29 Negative	196.283	196.283	121140	247.224	111569
30 Negative	167.041	167.041	118556	284.307	77052
31 Negative	197.084	197.084	121893	247.75	95121
32 Negative	211.905	211.905	138064	260.991	102910
33 Negative	191.476	191.476	149550	312.866	88411
34 Negative	223.121	223.121	138227	248.163	105867
35 Negative	148.614	148.614	104078	280.534	71806
36 Negative	120.173	120.173	56186	187.287	50317
37 Negative	226.726	226.726	150336	265.611	111836
38 Positive	193.479	193.479	129925	268.996	227677
39 Negative	170.646	170.646	109512	257.07	88411

软件除了能够获得特异性标记阴性和阳性细胞的分类统计信息外，还能获得所有细胞的信息：包括细胞核和细胞的面积，阳性强度和每一个细胞的分类信息，信息量极大。

应用实例 5: 细胞核计数 (Count Nuclei)

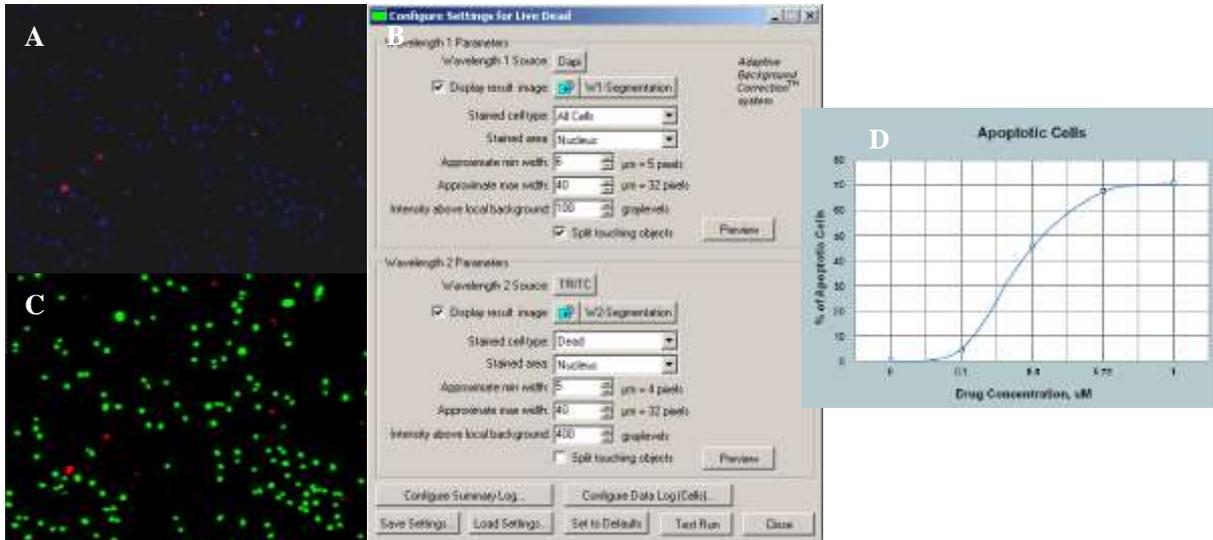
细胞核的计数, 作为进行细胞计数的一种方法是细胞生物学基本的分析方法之一。在肿瘤学研究和免疫学等研究中常常会用到细胞的计数。传统方法主要采用流式细胞仪、放射学方法和人工计数的方法来完成。这些方法具有耗费人力, 所需细胞数量多等缺陷。Count Nuclei 具有简单易用, 方法成熟, 所需细胞量较流式细胞仪少, 且能够自动适应背景, 能够准确分辨细胞和相互接触的细胞, 信噪比高等优点。



	A	B	C	D
	Cell: Assigned Label #	Cell: Area	Cell: Integrated Intensity	Cell: Average Intensity
1	1	7.53121	56131	547.439
2	2	8.55919	29051	337.347
4	3	10.0416	30912	351.273
5	4	10.9545	36336	378.5
6	5	11.4109	47104	471.04
7	6	11.6391	40765	309.657
8	7	17.3738	58468	541.648

应用实例 6: 死/活细胞检测 (Live/Dead)

检测细胞处于存活状态亦或死亡状态是细胞毒性检测中重要的内容和方法。该软件模块无需特定试剂盒，分析方法灵活，能够通过双荧光标记（标记细胞任意部位），来准确区分细胞的死/活状态，并能得到所有细胞的面积、荧光强度、状态等细胞学数据。



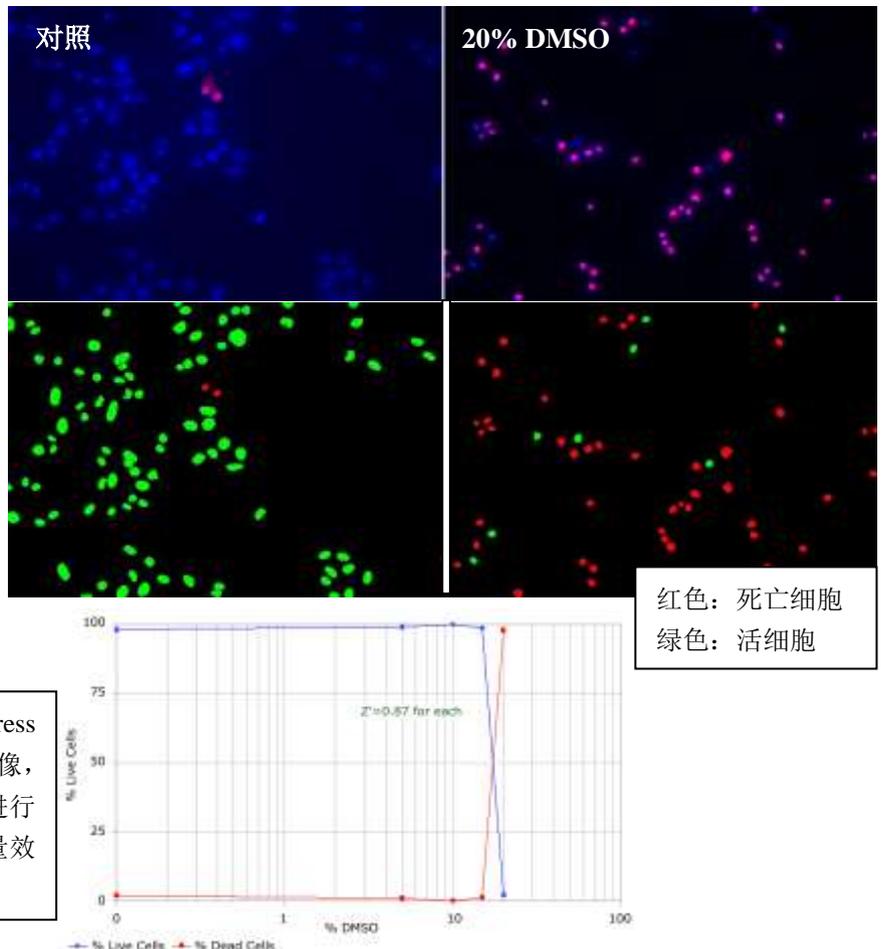
A) 培养的细胞通过 Hoechst 33342 标记所有细胞，通过 PI 标记死亡细胞；B) 在 Live/Dead 分析模块中设置细胞的近似大小和相对背景的亮度，即可分辨死/或细胞；C) 分析结果示意图，绿色为存活细胞，红色为死亡细胞；D) 分析结果可以进行进一步分析，计算 EC/IC50

CHO 细胞以 10000cell/well 的密度铺于 96 孔板中

细胞培养 24 小时后，对照孔中加入纯水，实验孔中加入 20% DMSO 6 小时，诱导细胞死亡。

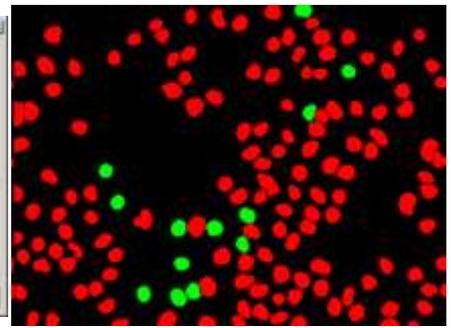
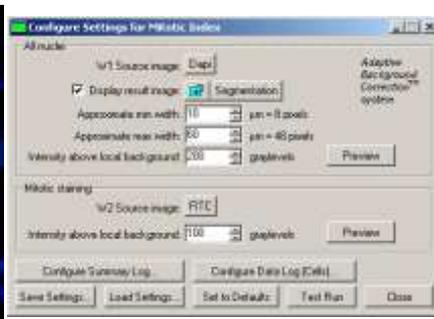
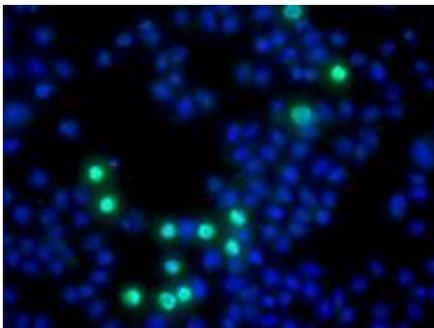
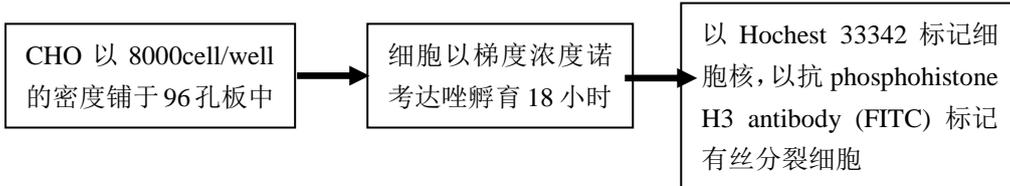
将细胞分别以 Hoechst 和 PI 进行着色。

将样品放入 ImageXpress Micro 中以 10x 进行成像，并以 Live/Dead 模块进行分析，并将结果生成量效曲线图



应用实例 7: 有丝分裂指数 (Mitotic Index):

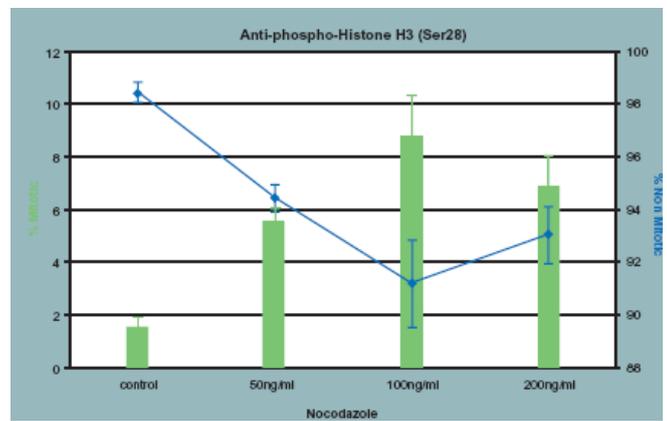
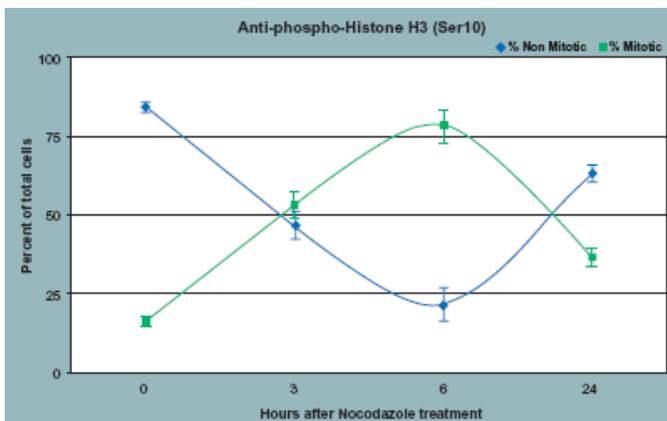
以细胞为基础的细胞周期状态方法学已经成为肿瘤药物研究的重要方法,如潜在的抗肿瘤治疗药物/方法依赖于停止肿瘤细胞的有丝分裂,来抑制肿瘤细胞不受控的增值。有些肿瘤,可以仅仅通过干扰有丝分裂纺锤体的形成而控制肿瘤演进。而另外一些肿瘤,其分裂反馈缺失,细胞通过非正常的染色体分离和染色体突变而演变为肿瘤细胞。细胞学的方法能够有效地模拟药物对于细胞周期的影响,定量分析处于有有丝分裂的细胞。MetaXpress 的 Mitotic Index 分析模块能够快速可靠的分析细胞的有丝分裂指数,并能产生大量的细胞学数据,便于进一步统计和分析。



96 孔板置于 ImageXpress 进行成像, 成像时间约为 3 分钟

以 Mitotic Index 模块进行分析, 能够得到分析结果示意图 (绿色: 有丝分裂细胞; 红色: 间期细胞), 并能获得每个细胞的详细分析信息。

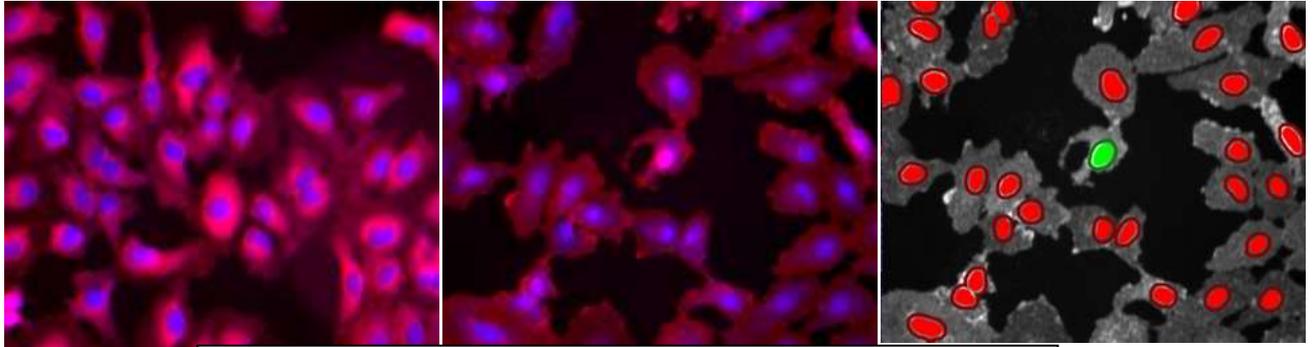
Cell Mitotic Classification	Cell Total Area	Cell W1 Integrated Intensity	Cell W1 Average Intensity	Cell W2 Integrated Intensity	Cell W2 Average Intensity
43: Interphase	66.643	89008	211.423	70010	168.195
44: Interphase	69.444	99167	210.844	77630	183.995
45: Mitotic	71.046	114743	258.719	338074	462.609
46: Mitotic	71.046	148736	248.308	302296	426.309
47: Interphase	71.046	105617	245.941	72514	172.164
48: Interphase	71.847	83174	217.109	70084	182.014
49: Interphase	72.649	134006	287.722	95790	198.996
50: Interphase	73.049	109220	243.102	70362	164.26
51: Interphase	73.45	108179	249.934	69106	158.638
52: Mitotic	76.254	141989	321.016	309792	476.725
53: Mitotic	77.496	141172	316.676	329944	474.976
54: Interphase	78.498	111718	245.371	69290	154.799
55: Interphase	79.099	108715	244.254	73252	176.509
56: Interphase	82.663	91144	199.077	71045	165.809
57: Interphase	82.663	104881	229.488	69230	176.579
58: Interphase	84.365	96958	207.737	70712	163.722
59: Interphase	86.066	97737	211.952	71664	166.117



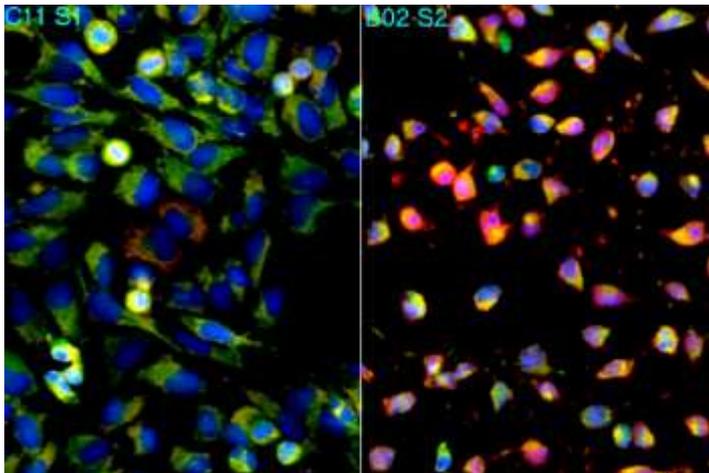
比较诺考达唑不同浓度和不同处理时间, CHO 细胞有丝分裂指数的变化

应用实例 8: 转位分析 (Translocation)

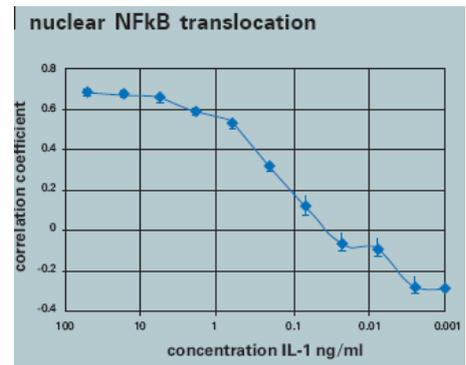
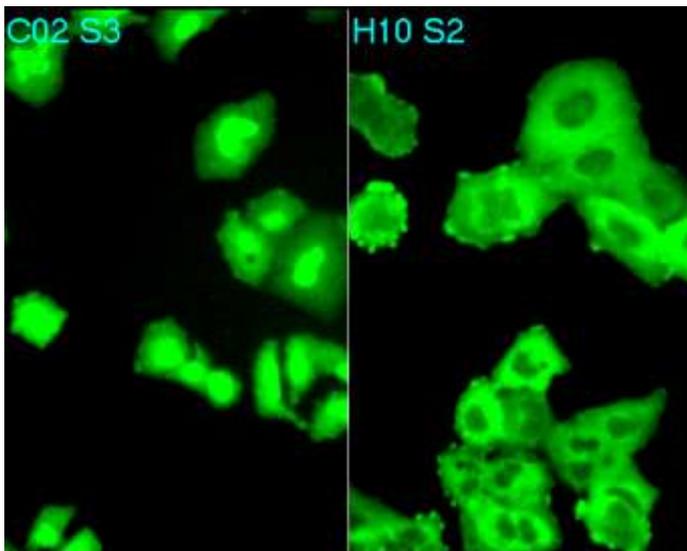
转位是指分子从细胞内的一个地方移动到另一个地方,通常能够反映第二信使系统的生物信号转导过程。信号转导过程是一个生物大分子激活和转位的复杂系统,包括配体与受体的结合, NFkB、NFAT、C-jun、STATs 等转录因子的信号转导过程。这些分子会在细胞中移动并重新定位,从而传到生物信号。



左: 无转位发生; 中: 核转位; 右: 绿色代表转位阳性的细胞。



Hela 细胞用星状孢子素处理后,以 MitoTracker(虹), DAPI(蓝), 和抗细胞色素 c 抗体(绿)标记处理,能够明显观察到细胞色素 c 向核内转位



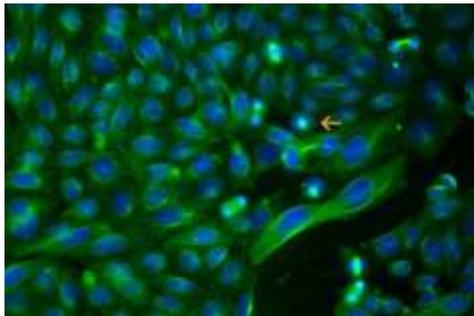
A549 细胞经过药物处理后,以 NFkB 抗体标记,通过 ImageXpress 成像后,软件进行转位分析后获得的药物浓度与转位的关系。

应用实例 9：单极检测 (Monopole Detection)

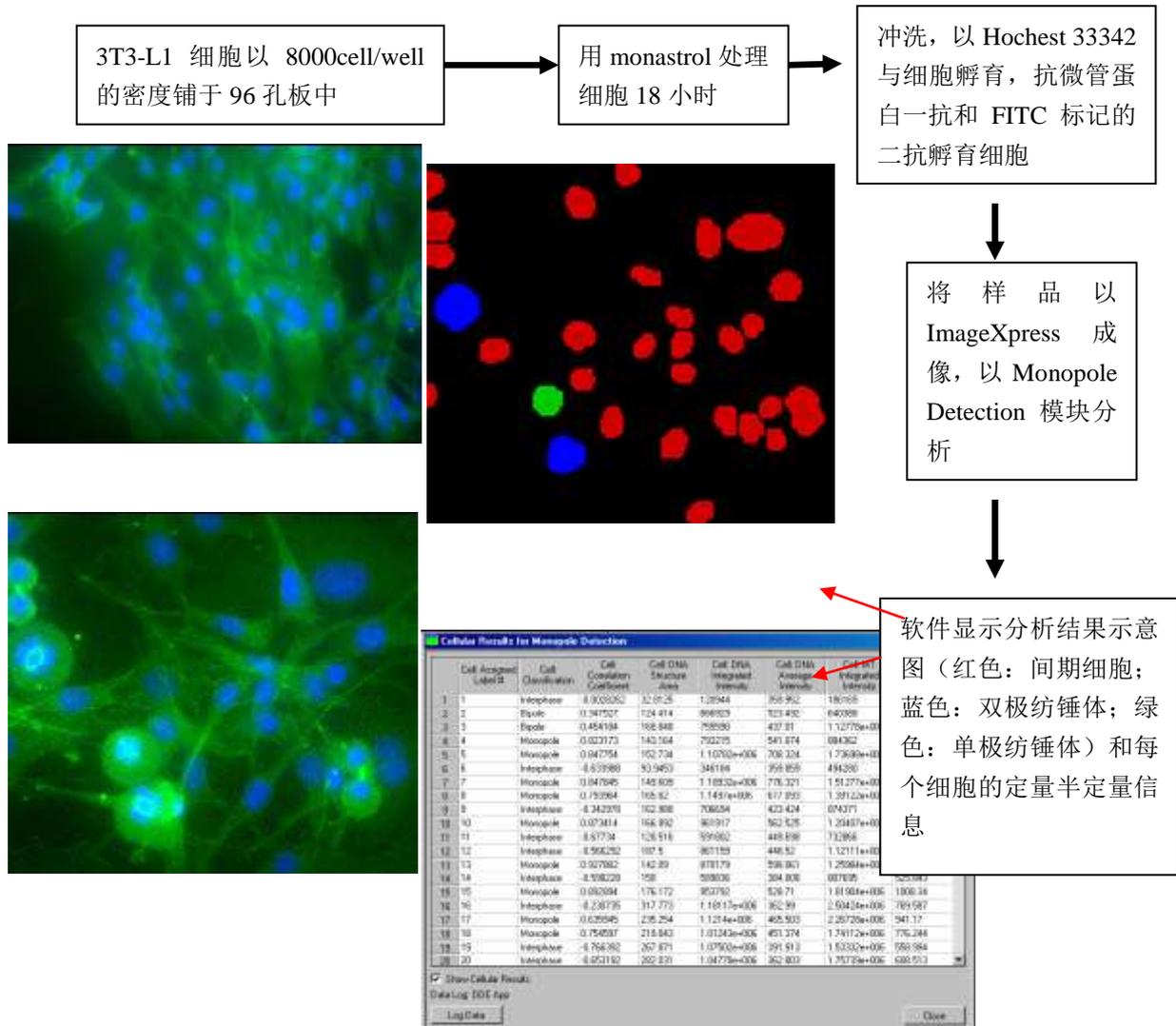
在有丝分裂过程中，双极纺锤体的形成对于基因分离至关重要。在有些严重疾病如肿瘤，细胞的增值不调控，能够干扰细胞正常的双极纺锤体的形成。一些经典的化疗药物能够作用于微管蛋白，中断双极纺锤体的形成，然而，这些药物也会造成间期细胞的一些副作用。

近年来，人们找到一种新型药物 monastrol，该药物通过影响中心粒的分离来阻断纺锤体的形成。与作用微管蛋白的药物相比，该药物只针对于有丝分裂。当中心粒无法复制或分离，就会形成单极纺锤体而非正常的双极纺锤体。

Monopole Detection 功能主要用于定量检测有丝分裂的具有单极或双极纺锤体的细胞。该方法使用简单，只需将细胞进行 DNA 标记即可，也可同时对微管蛋白进行标记。

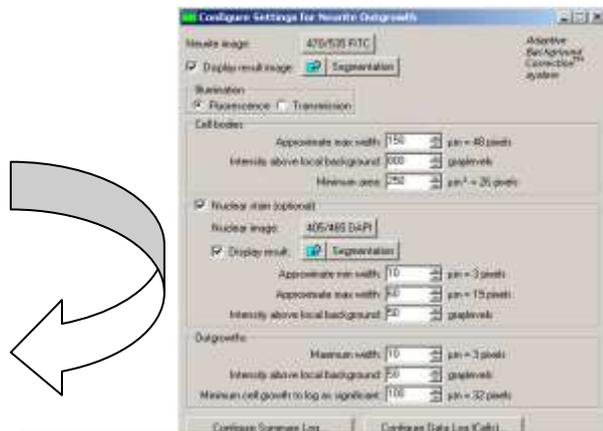
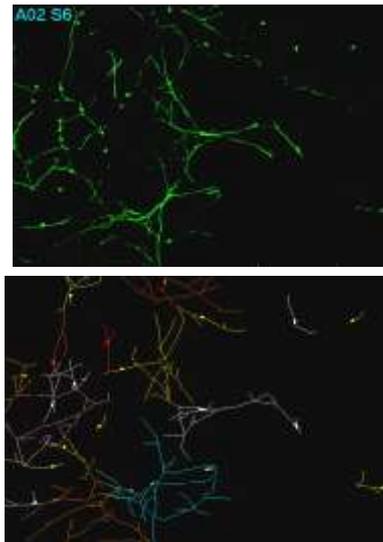


CHO-K1 细胞经 monastrol 处理后，以鼠抗微管蛋白一抗处理和 FITC 标记的二抗标记微管蛋白，以 Hoechst 33342 标记细胞核，在 ImageXpress 上成像，箭头所指为单极纺锤体。

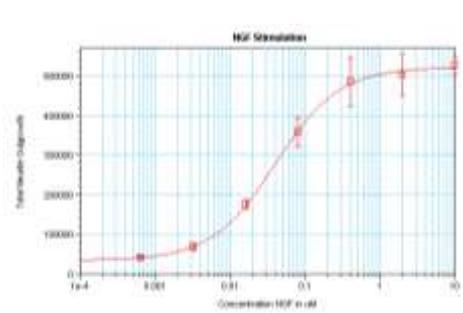
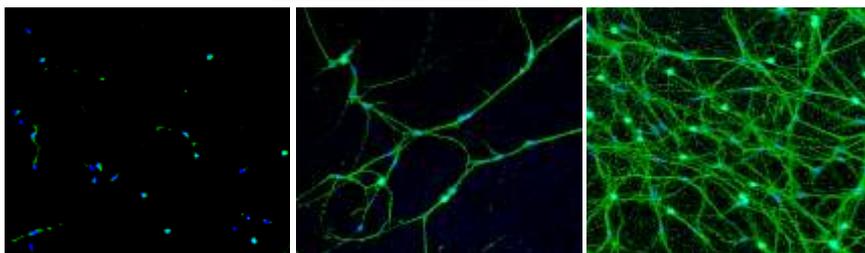
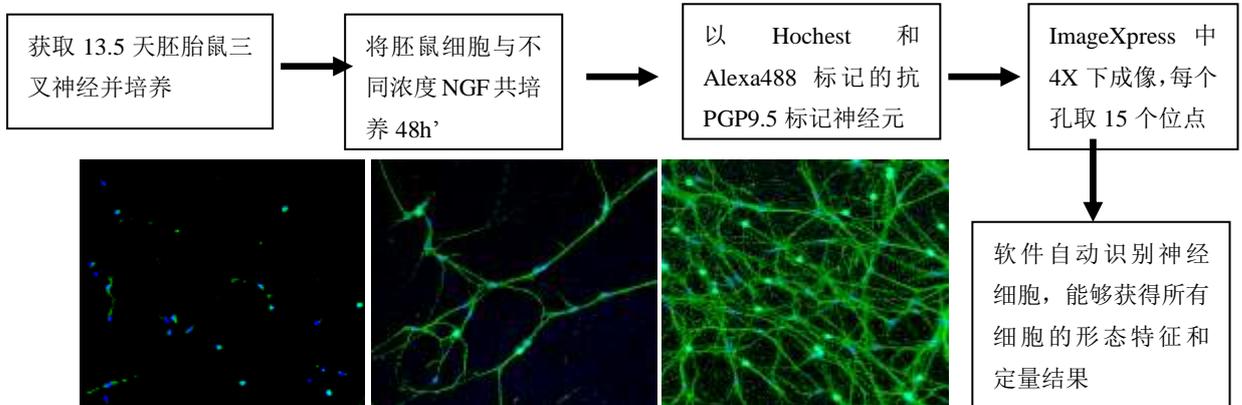


应用实例 10: 神经生长 (Neurite Outgrowth)

神经元的生长, 尤其是中枢神经系统中的神经元的生长是一个极其复杂的过程, 其形态受到多种因素的影响, 如神经生长因子、神经胶质细胞的支持、Nogo 蛋白的抑制作用等等。因此, 能够快速识别神经元极其突起, 快速自动地分析神经元形态学变化是神经学研究中的一个瓶颈。Neurite Outgrowth 软件模块能够自动快速识别神经元胞体极其突起, 并能快速获得神经元的形态特征和定量结果, 包括神经元的荧光强度、胞体的面积、神经元突起的长度、总长度极其分支等。可通过该方法分析神经递质和细胞内特异性蛋白的表达、及神经前体细胞的分化, 能够得到每个细胞和细胞亚群的形态学特征, 并能在多个亚群之间进行比较。



神经元细胞成像后, 通过 Neurite Outgrowth 能够辨认每一个神经细胞, 并能由此获得所有神经细胞的形态特征和定量结果, 如神经细胞数量, 胞体面积, 神经元突起长度和总长度、分支数等。



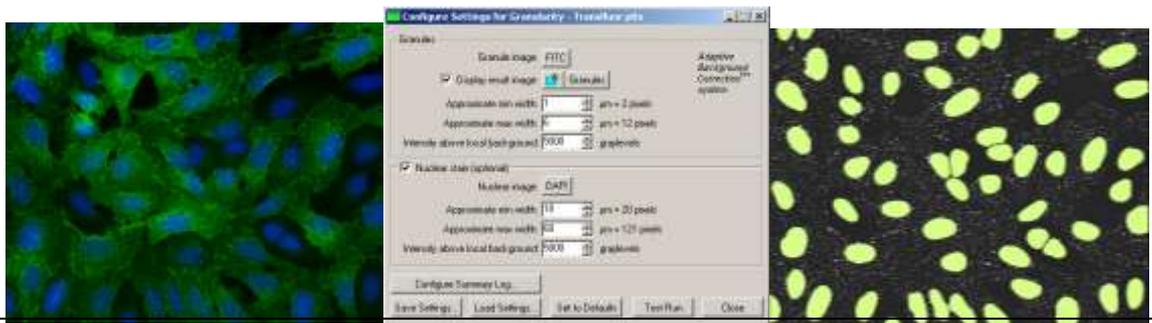
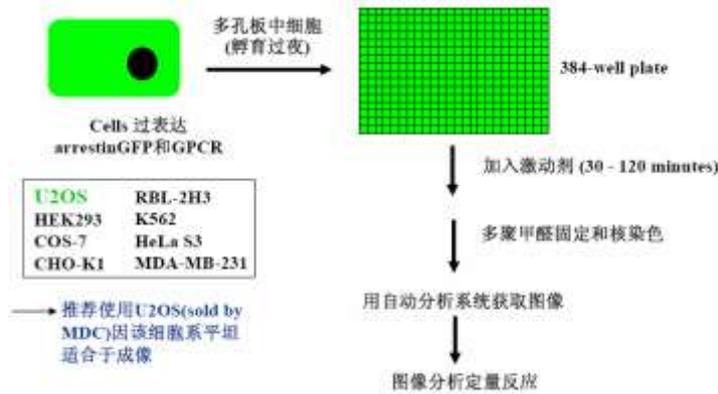
不同浓度 NGF 下, 胚鼠神经元突起总长度

	A	B	C	D	E	F	G	H
Stage Label	Total Outgrowth	Mean Process Length	Median Process Length	Max Process Length	Branches	Straightness	Cell Body Area	
1	4618.29	2309.14	2309.14	4025.31	94	0.93	205.08	
2	A02	131.16	32.79	35.13	57.77	3	0.94	224.61
3	A03	894.53	298.18	227.09	573.25	23	0.93	224.61
4	A04	178.16	59.39	61.62	115.98	5	0.97	224.61
5	A05	939.56	469.79	409.79	921.36	12	0.93	224.61
6	A06	140.00	40.07	45.00	54.04	1	0.94	224.61
7	B01	507.62	253.81	253.81	345.21	10	0.92	224.61
8	B02	28.88	14.44	14.44	25.76	0	0.91	263.67
9	B03	524.32	131.08	77.02	343.47	8	0.94	273.44
10	B04	5918.89	303.76	160.13	3188.91	30	0.91	273.44
11	B05	211.24	70.41	50.22	148.52	0	0.90	292.97
12	B06	4432.04	2216.02	2216.02	4430.62	71	0.93	292.97
13	C01	1290.45	669.22	669.22	1130.33	36	0.92	292.97
14	C02	529.27	176.43	27.59	486.08	9	0.93	292.97
15	C03	342.09	85.52	32.39	252.39	1	0.93	292.97
16	C04	113.93	56.96	56.96	100.13	0	0.94	292.97
17	C05	890.87	296.96	22.63	863.15	17	0.92	322.27
18	C06	169.32	84.66	84.66	197.01	0	0.80	322.27
19	D01	1371.31	274.26	195.24	1652.61	37	0.91	322.27
20	D02	405.97	202.99	202.99	343.25	7	0.94	322.27
21	D03	2518.02	1259.01	1259.01	2488.51	60	0.93	322.27
22	D04	233.42	77.61	18.08	210.80	6	0.96	322.27
23	D05	800.11	133.35	105.02	303.52	7	0.94	322.27
24	D06	144.42	72.21	72.21	114.24	2	0.94	332.03
25	E01	276.65	138.32	138.32	262.72	3	0.93	341.80
26	E02	157.68	157.68	157.68	157.68	8	0.94	341.80
27	E03	1952.89	488.17	429.62	1064.08	31	0.95	341.80
28	E04	446.75	148.58	195.16	247.45	11	0.93	361.33
29	E05	1050.16	218.43	111.87	808.51	16	0.93	361.33
30	E06	80.94	80.94	80.94	80.94	4	0.95	371.09
31	F01	82.27	41.36	41.36	76.22	0	0.94	371.09
32	F02	735.59	363.30	363.30	363.12	7	0.93	371.09
33	F03	1150.01	369.61	236.49	201.91	16	0.95	361.33

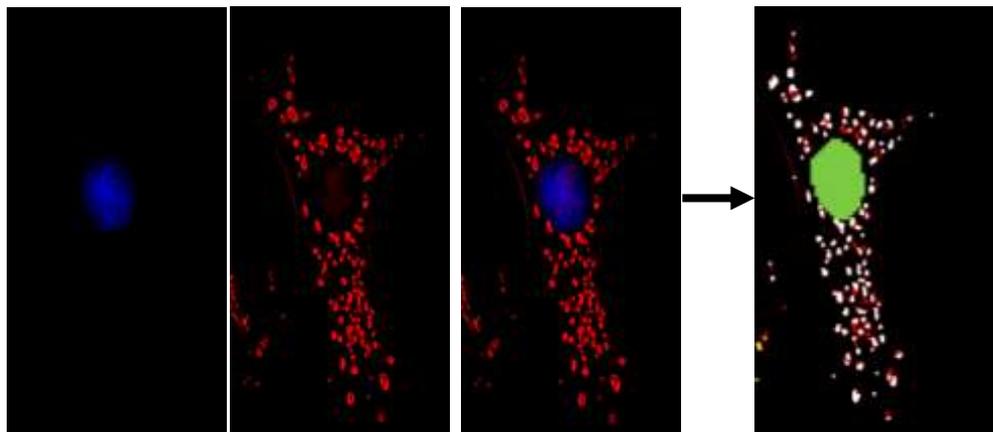
获得的每个神经细胞的形态学特征和定量结果, 包括神经细胞数量, 胞体面积, 神经元突起长度和总长度、分支数等

应用实例 11：颗粒度的检测（Granularity）

颗粒度检测能够检测和计算细胞内颗粒结构的数量，并能获得颗粒结构的物理特性。该方法同样适用于细胞内各种亚细胞结构（溶酶体、线粒体等）的检测和分析，能够获得细胞内颗粒结构/亚细胞结构的多种参数，包括其数量、面积、平均面积、荧光总强度、平均荧光强度和每个细胞所含颗粒/亚细胞结构的数量等，同时能在此基础上延伸多种应用，如基于亚细胞结构的共定位等。



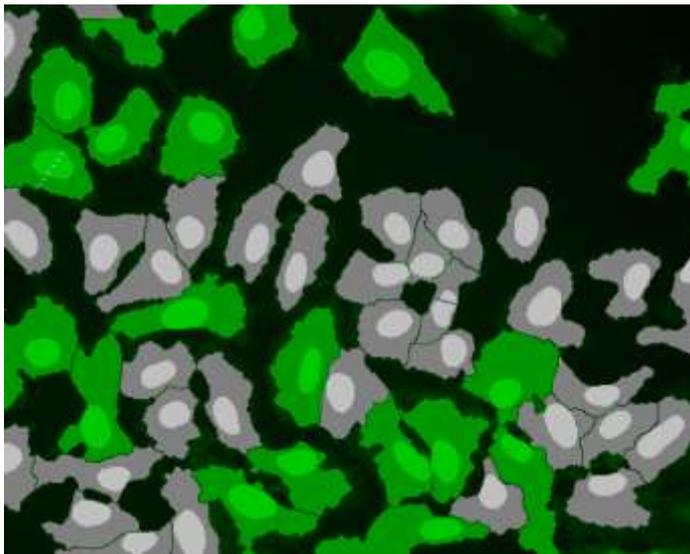
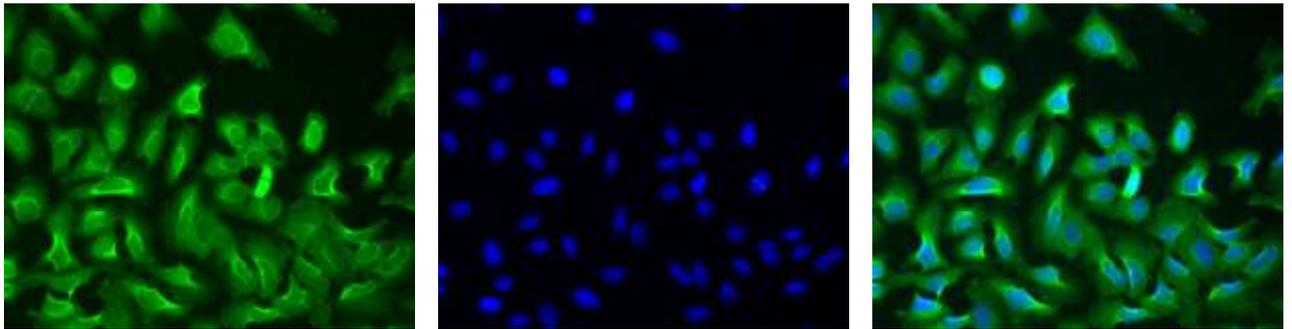
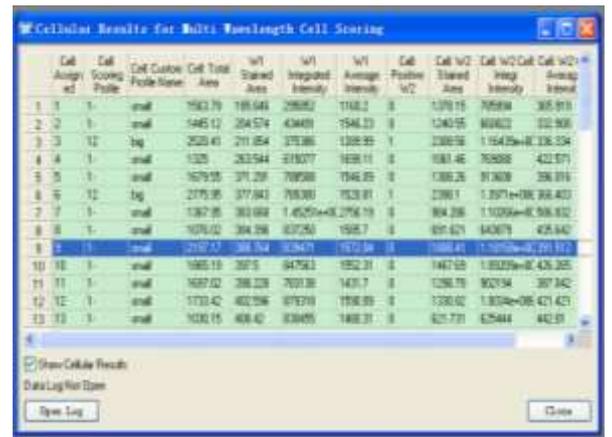
Transfluor 细胞经 ImageXpress micro 成像后，进行图像分析，右图为软件分析结果，黄色为细胞核，白色为细胞结合 GPCR 激动剂后形成的斑点。



细胞用 Hochest 和 MitoTracker 标记细胞核和线粒体，经 ImageXpress 成像后，使用颗粒度分析，能够准确辨认细胞核（绿色）和细胞内的线粒体（白色）

应用实例 12: 多波长细胞分类计数 (Multi Wavelength Cell Scoring)

在药物筛选过程中,常常需要对细胞内的特异性标记进行分析。当细胞内有多种特异性标记物时,确切分析每一种 Marker 在细胞内分布和表达的情况时,就会使分析过程变得异常的困难和繁琐,需要很多的时间和人力。MWCS 就是针对多种细胞内 Marker 定量分析的一种解决方法,该分析模块能够检测、定量分析和计算多达 7 中 Marker 在细胞内的分布情况,该方法操作简单,对于细胞的处理简单。多达 7 中的 Marker 可为胞核或胞浆内的任意 Marker,无需特定试剂盒,分析后能够获得如细胞数量、各种 Marker 阳性和阴性细胞的数量和比例、各种 Marker 在细胞内的荧光总强度、平均强度,及 Marker 在细胞内分布的面积等。

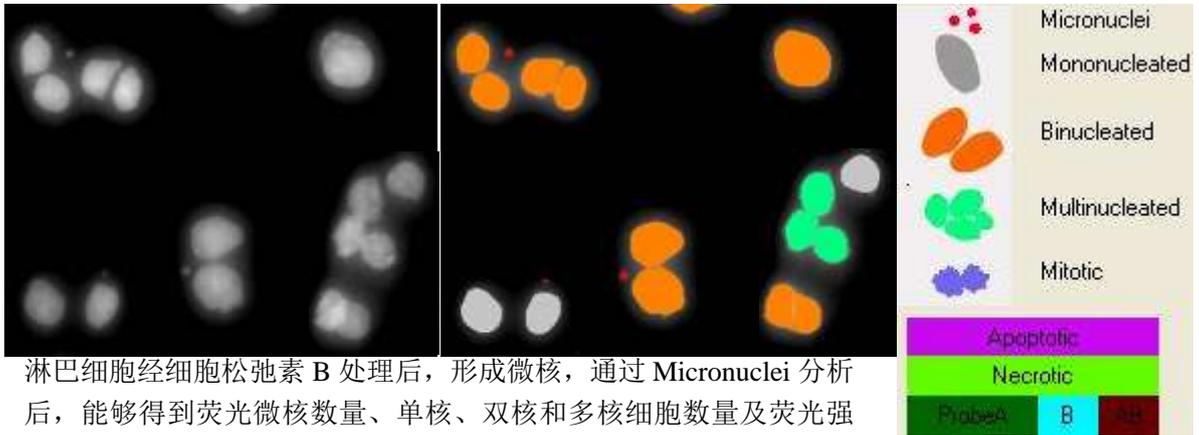
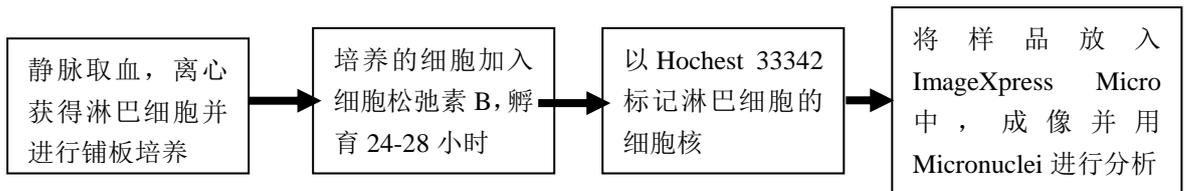
Cell ID	Cell Score	Cell Profile	Cell Custom Profile Name	Cell Total Area	W1 Stained Area	W1 Integrated Intensity	W1 Average Intensity	Cell Positive W2	Cell Stained Area	Cell W2 Integrated Intensity	Cell W2 Average Intensity
1	1	1	small	1563.79	189.646	298052	1148.23	0	1379.15	70594	365.919
2	2	0	small	1445.12	264.574	434031	1546.23	0	1240.95	69602	552.905
3	3	12	big	2520.41	211.854	375386	1300.95	1	2389.59	1164256	487.134
4	4	1	small	1320	263244	218277	1650.11	0	1881.46	35869	422.071
5	5	1	small	1679.25	371.237	709280	1546.02	0	1389.26	91369	396.016
6	6	12	big	2175.35	377.943	718301	1513.01	1	2390.1	1.3571e+06	364.423
7	7	1	small	1367.85	383.688	1.4525e+06	2794.19	0	84.286	1.1228e+06	596.832
8	8	1	small	1079.02	364.296	837263	1925.7	0	697.621	64079	425.642
9	9	11	small	2197.47	368.764	632471	1672.54	0	1888.41	1.1707e+06	411.917
10	10	1	small	1485.19	307.5	647543	1952.31	0	1467.68	1.0522e+06	426.265
11	11	1	small	1687.82	386.228	702139	1431.7	0	1299.79	92134	397.842
12	12	1	small	1733.42	402.596	878719	1958.09	0	1330.02	1.822e+06	421.423
13	13	1	small	1630.15	408.42	838495	1488.21	0	621.721	62944	442.01

细胞经 Hoechst 33342 和 FITC 标记的微管蛋白抗体标记后,放入 ImageXpress Micro 中移 20X 成像,经 MWCS 分析,可见软件准确辨认细胞核细胞的边缘(左下图),其中绿色细胞为细胞面积大于某个特定阈值(用户设定)的细胞,灰色细胞为细胞面积小于特定阈值的细胞。软件能够得到每个细胞的多个参数(右下图),包括细胞的大小、面积等,及每个细胞内 FITC 的荧光强度。

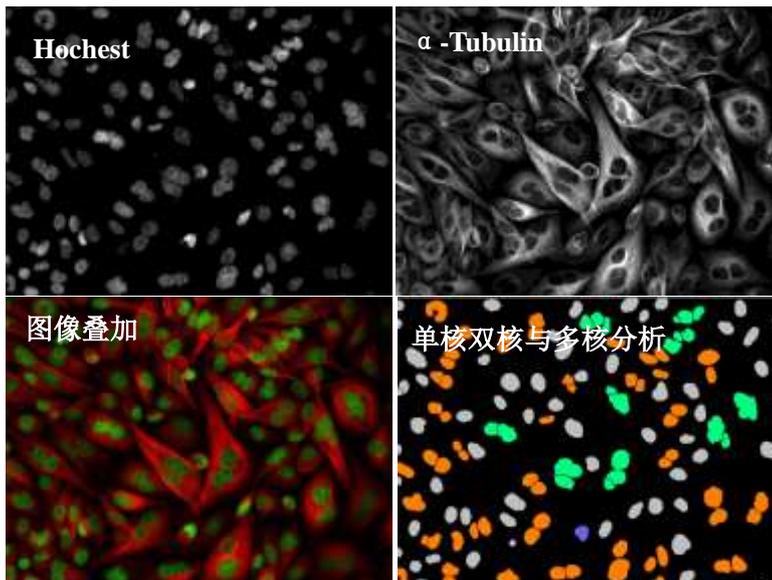
应用实例 13: 微核检测 (Micronuclei)

微核是细胞分裂过程中分裂过程落后的染色体或整个染色体形成的小细胞核。在细胞毒性物质，尤其是染色体毒性物质作用下，细胞分裂过程中通常会产生微核，因此，细胞微核能够反映出化合物的染色体毒性，检测细胞内微核能够定量检测化合物的染色体毒性。

Micronuclei 是一个功能强大的软件功能，其样品准备简单，只需使用核荧光标记物 (DAPI、Hochest、吖啶橙等) 标记细胞，即可进行细胞荧光微核的检测。同时结合其他特异荧光标记物 (如凋亡、坏死等，可使用 4 种)，在荧光微核检测同时，检测出单核细胞、双核细胞、多核细胞、有丝分裂细胞、凋亡细胞、坏死细胞、特异性荧光标记细胞等多种细胞分类及相关分析参数。



淋巴细胞经细胞松弛素 B 处理后，形成微核，通过 Micronuclei 分析后，能够得到荧光微核数量、单核、双核和多核细胞数量及荧光强度等定量结构，其示意图如右图。



能够利用该分析方法分析无微核细胞图像，用以区分单核、双核和多核细胞，还能同时对细胞进行凋亡、坏死等的分析