

用于活细胞成像的报告基因系统对 iPSC 来源的神经元细胞进行成像

Elizabeth Vu¹, Kris Zimmerman¹, Michael Hendrickson², Roxanne Alvarez², Lance Encell¹, Thomas Kirkland¹

¹Promega Corporation, 2800 Woods Hollow Rd, Madison, WI 53711; ²BrainXell, Inc, 455 Science Dr #210, Madison, WI 53711

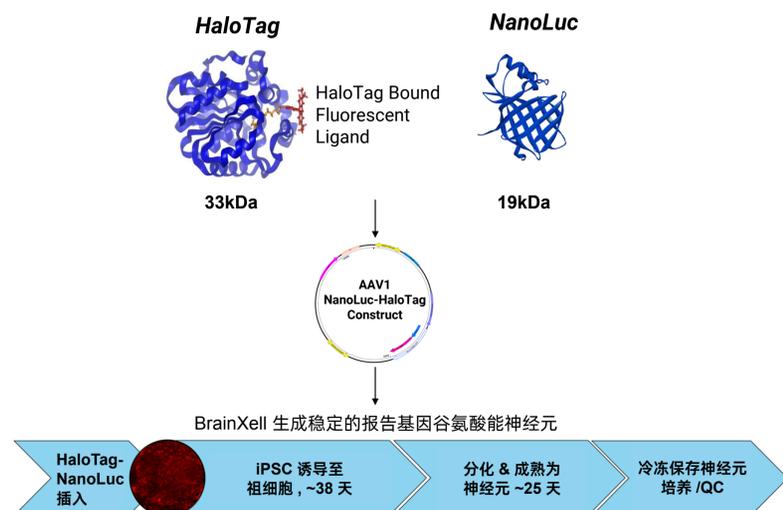


Poster Assignment Number: 1367-D

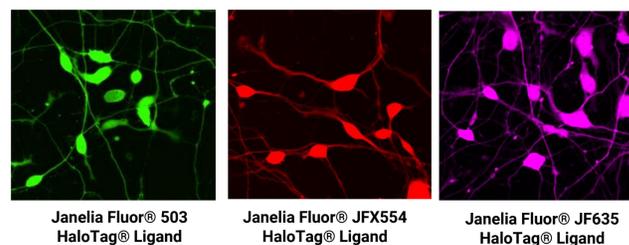
1. 背景介绍

使用诸如诱导多能干细胞 (iPSC) 衍生的神经细胞等生理学相关的细胞模型, 对于获取能够最终影响人类疾病的生物学见解是十分重要的。然而, 在这类非永生细胞培养中实施活细胞成像报告基因系统是一项重大挑战。活细胞成像要求使用亮度高且光稳定性强的荧光染料, 以尽量减少对细胞的损害, 并能够在长时间观察过程中保持稳定。在这里, 我们展示了稳定表达 HaloTag[®] 报告基因蛋白 (Promega) 的 iPSC 来源的神经元细胞 (BrainXell), 该细胞与最新版本的 HaloTag[®] 荧光成像染料 (Janelia Research Campus) 具有良好的兼容性。这些 HaloTag[®] 染料的关键特性包括: 增强的荧光形成能力, 这对于降低背景至关重要; 以及仅需添加染料而不必洗涤的染色方案, 能够最大程度地减少对敏感神经元培养物的影响。此外, 当将 HaloTag[®] 报告基因蛋白引入这些细胞时, 可以将其与 NanoLuc[®] 萤光素酶这一生物发光报告基因相连接, 从而实现目标细胞或感兴趣的蛋白质 (POI) 丰度的定量测定。

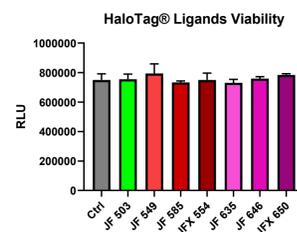
2. 荧光和发光报告基因



3. 在神经元细胞中利用 HaloTag[®] 进行多色荧光成像

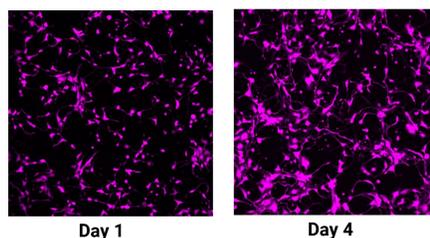


在体外培养第 7 天时, 对活的 iPSC 衍生神经元细胞使用三种位于绿色、红色和远红光谱区的 HaloTag[®] 配基进行染色。在第 7 天更换细胞培养基的同时, 向培养体系中添加 JF503 和 JFX554 这两种配基, 并孵育 30 分钟。为了去除多余的配基, 进行了更换一半培养基的处理。JF635 是一种荧光生成型配基, 背景极低, 在加入到细胞培养物中时无需额外去除培养基, 这样可以最大限度地减少对神经元细胞培养环境的干扰。

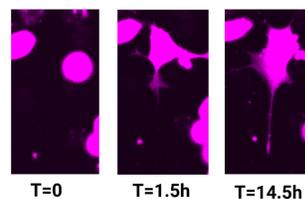


实验表明, HaloTag[®] 配基对 iPSC 衍生的神经元细胞并无细胞毒性影响。在细胞培养的第 7 天, 向神经元细胞中添加 200 nM 浓度的 HaloTag[®] 配基。48 小时后, 使用 CTG 2.0 试剂盒对细胞进行了活力检测。结果显示, 经 HaloTag[®] 配基处理的细胞其相对发光单位 (RLU, Relative Light Units) 与对照组相比无显著差异。

4. 通过 HaloTag[®] 进行长时程活细胞成像和延时成像

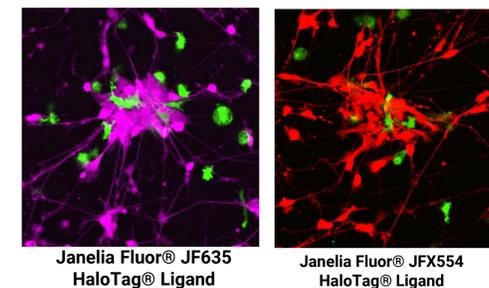


神经元细胞在培养第 1 天时使用 JF635 HaloTag[®] 配基对其进行标记并成像, 在此过程中未移除配基。然后, 在不额外添加配基的情况下, 利用相同的成像设置在培养第 4 天再次对这些细胞进行成像。结果显示, 第 4 天的图像中染色强度并未减少, 这表明该配基至少可以在细胞培养体系中持续稳定存在 3 天以上。



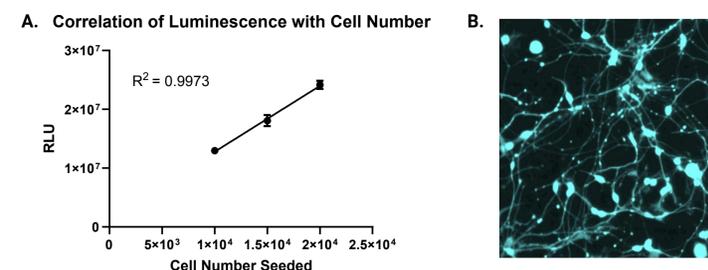
神经元细胞在培养第 0 天时使用 JF635 HaloTag[®] 配基对其进行标记。这些细胞被放置在一个活细胞腔室中, 并通过共聚焦显微镜进行成像。在不添加新的配基的情况下, 每隔 15 分钟对细胞采集一次图像, 持续记录 15 小时。在整个长时程且频繁的成像过程中, 在捕捉到神经突起生长的同时, 未观察到荧光漂白 (photobleaching) 现象。

5. HaloTag[®] 神经元与小胶质细胞共培养实时成像



将 HaloTag[®] 标记的神经元细胞培养 7 天。到第 7 天时, 稳定表达 GFP (绿色荧光蛋白) 的小胶质细胞被接种到已经成熟的神经元培养体系中, 从而形成共培养系统。到第 11 天时, 使用 JF635 或 JFX554 这两种不同颜色的 HaloTag[®] 配基对共培养体系进行染色处理。实时获取的图像展示了在与小胶质细胞 (BrainXell) 共培养条件下, 利用单一 HaloTag[®] 报告基因系统结合两种不同颜色的配基, 能够有效区分两种不同类型的细胞, 且这种技术也更具有灵活性。

6. 在活神经元细胞中的生物发光报告基因



BrainXell 公司成功构建了稳定表达 HaloTag[®] 和 NanoLuc[®] 报告基因的神经元细胞。

A. 在培养第 10 天时, 将这些细胞以三种不同的密度接种, 并对生物发光信号进行了定量测定, 结果显示细胞数量与生物发光信号之间存在线性关系。当 NanoLuc[®] 与感兴趣的蛋白质 (POI) 融合时, 这一方法同样适用于评估蛋白质丰度。

B. 这些具有生物发光特性的活神经元细胞能够在 GloMax[®] Galaxy 生物发光成像仪上进行成像。

7. 结论

- iPSC (诱导多能干细胞) 来源的稳定表达荧光 HaloTag[®] 和发光 NanoLuc[®] 报告基因的神经元细胞能够成功地被制备和培养并利用该报告基因系统进行成像。
- 使用 HaloTag[®] 荧光配体染色神经元, 能够使细胞在共培养条件下被标记上多种不同颜色的荧光, 从而实现共聚焦成像, 并且在进行时间序列成像时, 未显示出明显的光漂白迹象。HaloTag[®] 配体在至少 48 小时内的使用是无毒的。
- NanoLuc[®] 生物发光报告基因则允许活细胞定量细胞的数量以及进行细胞的成像研究。