

Single cell tracking을 통한 migration ability analysis (Operetta CLS, PerkinElmer)

세포체학실험실에 보유 중인 Operetta CLS (PerkinElmer, MA, US)는 high content analysis (HCA)가 가능한 96-well 또는 384-well 기반 imaging screening 장비로서, well-based & cell-based fluorescence quantification, target cell counting & distribution analysis, apoptosis rough screening & cell scoring without specific fluorescent marker (with Hoechst only), cell morphology & classification, texture (specific superficial features on cells) analysis 및 machine learning을 통한 분석 algorithm building block까지 대량(multi-well plate기반)의 sample의 screening에 활용되고 있습니다. 뿐만 아니라, 실험군과 대조군간에 Z-factor를 자동계산하여 제공하므로써, 해당실험이 추후 대량 scale-up이 가능한지 등의 유효성 여부를 판단하는데 도움을 주고 있습니다. 이번에 살펴 볼 single cell tracking은 HCA장비가 제공하는 분석 tool중에서 cell fluorescent marker 유무에 관계없이 세포의 이동능력을 평가하는 손쉬운 방법입니다.

실험 준비 및 전처리:

세포체학실험실에 준비된 Operetta CLS 전용 96-well 또는 384-well plate (Cat. 6055302 or 6057302, PerkinElmer)에 목적하는 cells을 seeding합니다. 이때, cell culture media의 양은 200 μ L를 넘지 않도록 합니다. 또한, cell seeding density는 1×10^4 (96-well plate) 혹은 0.1×10^4 (384-well plate)를 준수하여, 24-48 hrs이후 cell confluency가 80%정도(over growth될 경우, auto-focusing error가 발생)가 되도록 합니다. 분석하고자 하는 well의 개수가 60개 미만이라면, well plate (96-well 기준)의 가장자리는 비워두고, 가운데 영역 (B2-11, C2-11, D2-11, E2-11, F2-11, G2-11)만 사용하도록 하며, 가장자리 wells에는 PBS를 채워 humid한 환경을 조성하여 줍니다. 세포가 exogenously transfection된 fluorescent proteins (CFP, GFP, YFP 또는 RFP)를 발현하지 않을 경우, live cell 전용 dye (cell tracking fluorescence)를 이용하여 labeling하여 줍니다.

Short-term cell tracking dyes: CellTracker Green CMFDA, CellTracker Orange CMRA, CellTracker CM-Dil, CellTracker Deep Red

Long-term cell tracking dyes: Qtracker 525, Qtracker 565, Qtracker 585, Qtracker 655

HCS전용 dyes: HCS CellMask Blue, HCS CellMask Green, HCS CellMask Orange, HCS CellMask Red, HCS CellMask Deep Red

분석 Process:

Input image (IF형광 또는 digital phase contrast; DPC) -> Find Cells (specific fluorescent dye에 labeling된 cells를 threshold와 cell size를 기준으로 자동으로 찾아서 counting -> Unlabeled cells의 경우, digital phase contrast (DPC)기능 이용하여 cell auto counting (specificity is lower than dye labeling) -> Track objects: cell counting과정에서 marking된 cells의 migration movement 확인(이 과정에서 cells의 이동경로에 따라 화살표가 화면에 나타남) -> Calculate kinetic properties: 이동한 cells의 속도, 방향성(X,Y기준) -> Calculate Track properties: tracking된 individual cell의 특성(generation, age, 평균이동속도(s), 거리(μm), displacement)를 계산하여 통계자료 제시 -> Define Results: 전체 well분석을 위한 formula build-up



Image Analysis Results												
Results		Summary		Properties Cells								
Field	Number of Tracked Cells	Age[s]	Current Step [μm]	Current Speed [$\mu\text{m/s}$]	Mean Square Displacement	Current Displacement X [μm]	Current Displacement Y [μm]	Number of Tracks	Number of Timepoints per Track	Accumulated Distance [μm] per Track	Displacement [μm] per Track	Average Speed [$\mu\text{m/s}$] per Track
1	179	4863.02	6.17968	0.0171666	4492.59	4.29472	8.06232	475	9.55789	52.0547	35.1853	0.0175587

HCS 실험관련 문의: 세포체학실험실(ext. 1714 / e mail: 21117@snuh.org)