

FV3000共聚焦显微镜对细胞球三维延时成像：抗体依赖性细胞介导的细胞毒性作用（ADCC）48小时连续观察

抗体依赖性细胞介导的细胞毒性作用（ADCC）是抗体药物作用的机制之一。诸如自然杀伤（NK）细胞和单核细胞等效应细胞可识别被抗体结合的靶细胞（如肿瘤细胞）。识别抗体后，效应细胞通过释放细胞毒性因子，诱导细

胞裂解，破坏靶细胞。本应用中，我们对HT-29细胞（人结肠癌细胞）和表达功能性Fc γ 受体的KHYG-1细胞（自然杀伤细胞）进行了三维共培养实验，并使用EGFR标记靶向的治疗性单克隆抗体，在FLUOVIEW FV3000共聚焦显微镜上进行48小时连续观察。由此产生的ADCC三维成像让我们成功捕获NK细胞攻击癌细胞的过程。

以更低光毒性进行3D活细胞球成像

在3D培养系统中生长的细胞球因其厚度而难以成像。最简单的应对方法是提高激发光强度，从而增加荧光亮度，然而高光照强度又不可避免地产生光毒性，对细胞造成损伤。为了解决这一难题，我们使用了奥林巴斯FV3000共聚焦显微镜。FV3000采用TruSpectral全真光谱检测技术，可以更有效地采集3D细胞球内部弱荧光信号，并降低激光的光毒性影响。此外，在深度观察时我们使用60倍硅油物镜，硅油物镜折射率更接近活细胞，比其它类型物镜更容易拍到分辨率更高信号更强的图像。因此，我们成功捕获了48小时的3D细胞球动态变化，并观察到NK细胞介导HT-29细胞死亡。

Video: [spheroid_3d_imaging_fv3000_480.mp4](#)

图1：48小时连续观察NK细胞攻击HT-29肿瘤细胞球

将表达功能性Fc γ 受体和ZsGreen荧光蛋白的NK细胞系KHYG-1（绿色）与HT-29细胞（人结肠癌细胞）肿瘤球进行共同培养。其中，HT-29细胞用抗EGFR单克隆抗体西妥昔单抗（Alexa Fluor 647，蓝色）标记。在连续48小时XYZT成像过程中，被杀死的肿瘤细胞因为吸收了培养液中的碘化丙啶（PI，死细胞标记物）而呈现红色。

成像条件

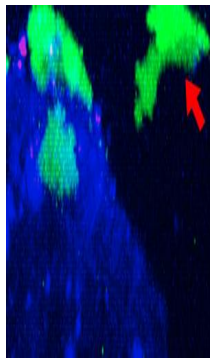
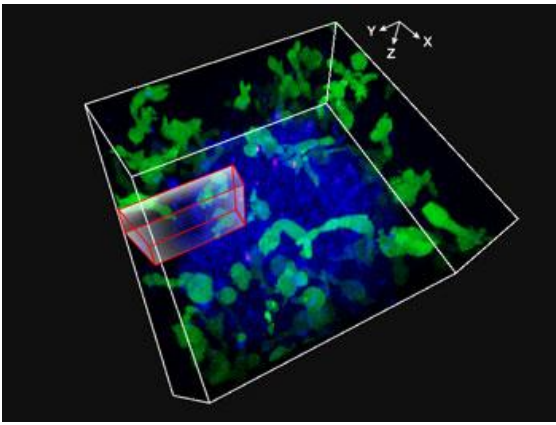
物镜：60倍硅油物镜（UPLSAPO60XS）

显微镜：FLUOVIEW FV3000共聚焦显微镜系统

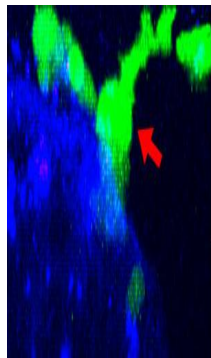
激光：488 nm（ZsGreen，绿色），561 nm（PI，红色），640 nm（Alexa Fluor 647，蓝色）

Z轴防漂移补偿系统实现精确的延时成像

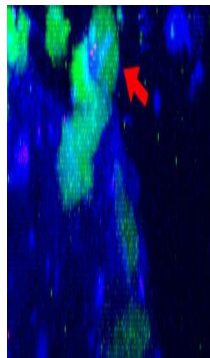
活细胞的长时间成像对于评估抗体药物有效性必不可少。为了更精确地捕获NK细胞对肿瘤细胞球的作用，我们使用Z轴防漂移补偿系统（IX3-ZDC2）来避免因外部环境变化（如温度变化）导致的焦面变化。IX3-ZDC2让我们能够在长达48小时里稳定观察3D肿瘤细胞球观察，并帮助我们鉴定NK细胞在攻击和进入肿瘤块时会主动产生形变。



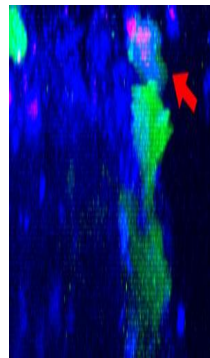
9h



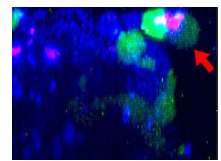
11h



17h



22h

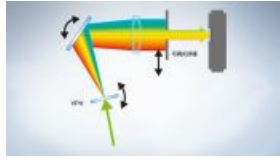


24h

图2：NK细胞系KHYG-1（绿色）在攻击和杀死以西妥昔单抗（蓝色）标记的HT-29肿瘤细胞时形态会发生变化，PI摄取（红色）代表细胞死亡。

FV3000共聚焦显微镜如何助力我们的实验

全光谱系统实现高灵敏检测



FV3000共聚焦显微镜采用奥林巴斯全真光谱TruSpectral检测技术，通过体相位全息透射光栅提高检测效率。与采用反射型光栅的传统光谱检测单元相比，该技术可实现更高的光通量，并将组织深部观察所需的激光功率降至最低。

利用Z轴防漂移补偿（ZDC）系统保持在焦

IX3-ZDC2 Z轴防漂移补偿系统利用光毒性最低的红外光（1级激光）识别样品焦面。采用一键式自动对焦（AF）模式可根据需要在更厚的样品中设置多个焦面，从而在多点实验中实现高效的Z-stack采集。

Video: [TruFocus_Z-Drift_Compensator_480.mp4](#)

硅油物镜可实现活细胞深度高分辨率观察

硅油折射率（ $n_e \approx 1.40$ ）接近于活组织的折射率（ $n_e \approx 1.38$ ），因而能够减少折射率不配的问题，以极小的球差对细胞球或活组织内部进行高分辨率观察。硅油不会挥发，也不易变干或变硬，非常适合活细胞和活组织长时间观察。

Video: [Silicone_Objectives_withVO\(4\)_720.mp4](#)

Dr. Yuji Mishima的点评



Dr. Yuji
Mishima

近年来，肿瘤研究中对荧光成像的需求不断增长，特别是3D肿瘤球在临床前药物筛选的应用，可以更直观地检验和评估抗体药物药效。3D细胞球因为厚度的缘故，使用荧光方法也很难观察其内部信息。得益于FV3000共聚焦显微镜，我们能够对3D肿瘤细胞球进行完整的48小时观察。在整个ADCC实验过程中，我们能够准确测量活肿瘤细胞、死细胞和效应细胞（NK细胞）对抗体治疗的反应。我认为FV3000共聚焦系统对于评估抗体药物的治疗效果非常有效。

致谢

本应用指南的编写得到以下研究人员的协助：

The Cancer Chemotherapy Center of JFCR, Dr. Yuji Mishima

相关产品



激光扫描共焦显微镜

FV4000

- 改变了游戏规则的大动态范围，实现从宏观尺度到亚细胞结构的成像
- 采用TruSpectral技术可扩展多达6个通道的同步多色成像能力
- 重新设计的高速、高分辨率扫描单元，可进行固定细胞和活细胞的高效成像
- 凭借出色的近红外（NIR）功能和高品质光学器件，提供优异的成像深度和灵敏度
- 可靠、可重复的SiIVIR探测器让研究者安枕无忧
- 业界出色的*10条激光谱线，提供从405 nm到785 nm的更广泛光谱范围

*截至2023年10月。

学习更多内容 ▶ <https://www.olympus-lifescience.com/laser-scanning/fv4000/>

"平场超级复消色差硅油物镜 / 平场超级复消色差水镜"



UPLSAPO-S/UPLSAPO-W

这些超级复消色差物镜提供球面像差和色差补偿以及从可见光到近红外区域的高透过率。它们使用硅酮油或水浸介质，其折射率与活细胞的折射率很接近，可在活组织深层实现高分辨率成像。

- 补偿球面像差和色差，并且从可见光到近红外区域具有高透过率
- 硅酮油或水浸介质有助于在活组织深处实现高分辨率成像和减少球面像差，因为它们的折射率与活细胞折射率相近

学习更多内容 ▶ <https://www.olympus-lifescience.com/objectives/uplsapo/>

Z Drift Compensator



IX3-ZDC2

- 随时保持焦点
- 易用性设计
- 专为活细胞影像设计
- 通过cellSens软件实现高精度，多区域成像

学习更多内容 ▶ <https://www.olympus-lifescience.com/microscopes/inverted/ix83/TruFocus/>