Shedding New Light On **MICROSCOPY**

APPLICATION NOTE

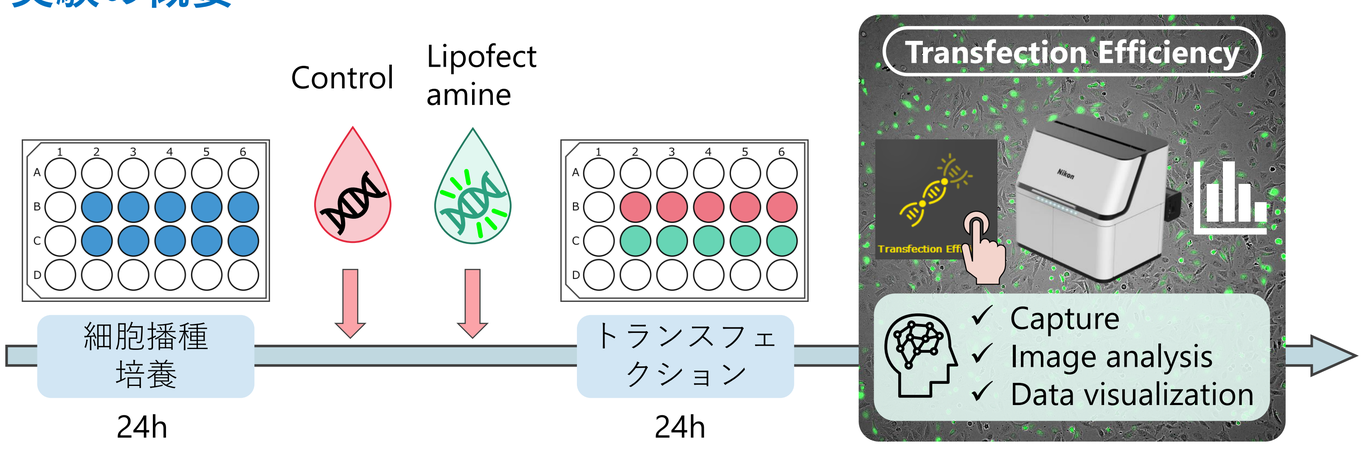
Smart Imaging System ECLIPSE Ji
画像統合ソフトウェアNIS-Elements SE
Transfection Efficiency

明視野画像から核と細胞領域を検出するAIを活用したトランスフェクション効率の最適化

ECLIPSE Ji は、画像統合ソフトウェアNIS-Elements SEと組み合わせて使用することで、画像取得から解析、グラフ作成まで自動で実行できるSmart Experimentを搭載しています。事前に学習させたArtificial Intelligence (AI) と事前に定義されたイメージングプロセスが画像取得と解析条件の設定を自動的に最適化するため、簡単な操作で数値データやグラフを得ることができます。トランスフェクションは、細胞に核酸（DNAまたはRNA) を導入する技術です。標的タンパク質を発現させ、蛍光で可視化してタンパク質の機能を分析できます。しかし、最適なトランスフェクション試薬の濃度と核酸の量は細胞ごとに異なります。したがって、視野全体の総細胞数に対する蛍光タンパク質発現細胞数の割合を測定し、トランスフェクション条件を最適化する必要があります。本アプリケーション ノートでは、Smart ExperimentのTransfection Efficiencyモジュールを使用して明視野画像から核および細胞領域を検出することにより、細胞へのダメージを最小限に抑えたトランスフェクション効率の評価法を紹介します。

キーワード：トランスフェクション効率、遺伝子導入、最適化、ラベルフリー、Artificial Intelligence (AI)、自動設定

実験の概要



- **Key features**
  - ✓ 画像の取得から解析、グラフ作成まで自動で実行
  - ✓ 明視野画像から核と細胞領域を学習済みのAIが識別するラベルフリー検出
  - ✓ 蛍光発現細胞の割合を計測

(1) 24ウェルプレートにHeLa細胞を播種し、24時間培養。(2)プラスミドDNA（GFP発現ベクター）を混合したコントロール溶液とトランスフェクション試薬（Lipofectamine)の溶液を各ウェルに添加。培地を各ウェルに500μl/wellで添加し、 細胞を24時間処理。(3) ウェルプレートをECLIPSE Jiに設置し、Transfection Efficiencyアイコンを選択して自動で画像取得と解析を実施した。

Point

学習済みのAI

明視野画像から**核**と**細胞領域**を自動で識別

Detection region	Fluorescence label	Ex/Em (nm)
Nucleus of all cells	None (Detect from brightfield image using AI)	Brightfield
Cell region	None (Detect from brightfield image using AI)	Brightfield
Target protein	GFP	488/509
Magnification	**Field of view**	
10X	1.76 x 1.76 mm	

表1. 検出領域と蛍光ラベル、画像取得の条件

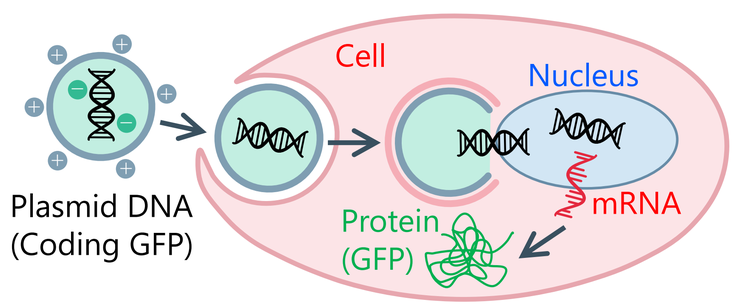


図1. 脂質ベースのトランスフェクション試薬による遺伝子導入の模式図

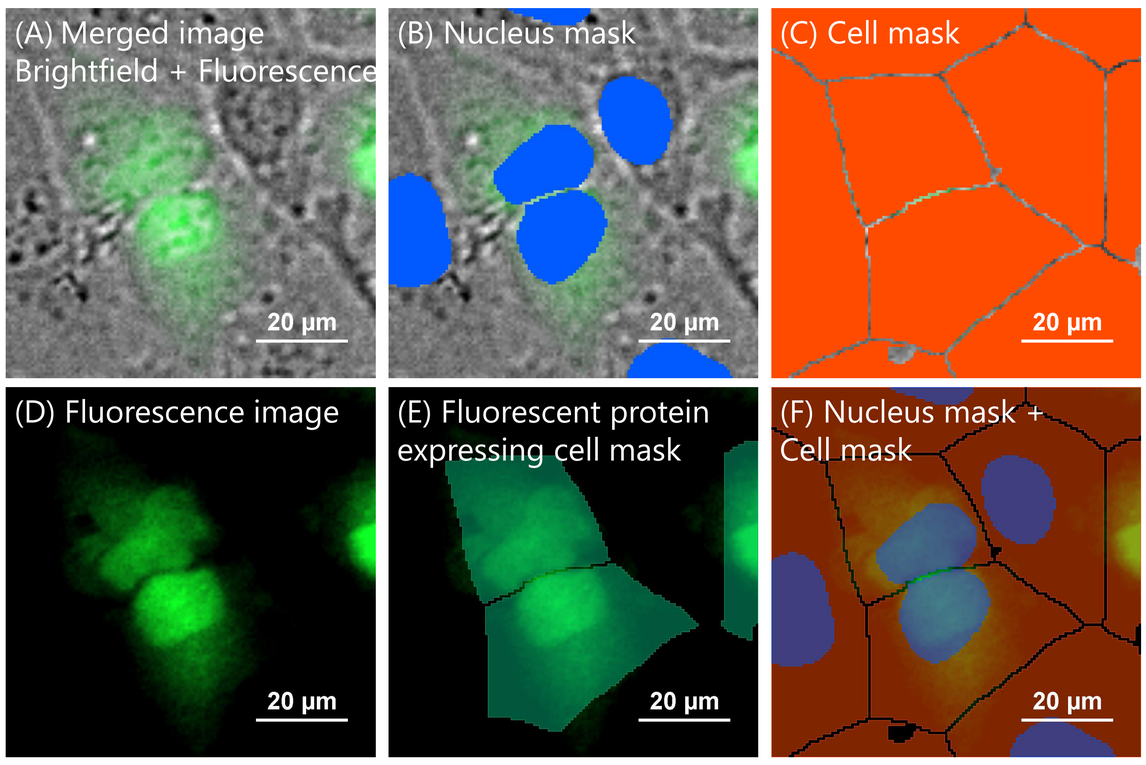


図2. 二値化とセグメンテーション
上段：明視野＋蛍光のマージ画像、下段：蛍光画像、（B、C）学習済みAIにより明視野画像から核マスク（青）と細胞マスク（赤）を作成。(E)細胞マスク (赤色マスク) と GFP 発現領域の重複領域から蛍光タンパク質発現細胞マスク (緑色) を作成します。(F) 核マスク (青) と細胞マスク (赤) を重ねた蛍光画像、スケール バー: 20μm

結果

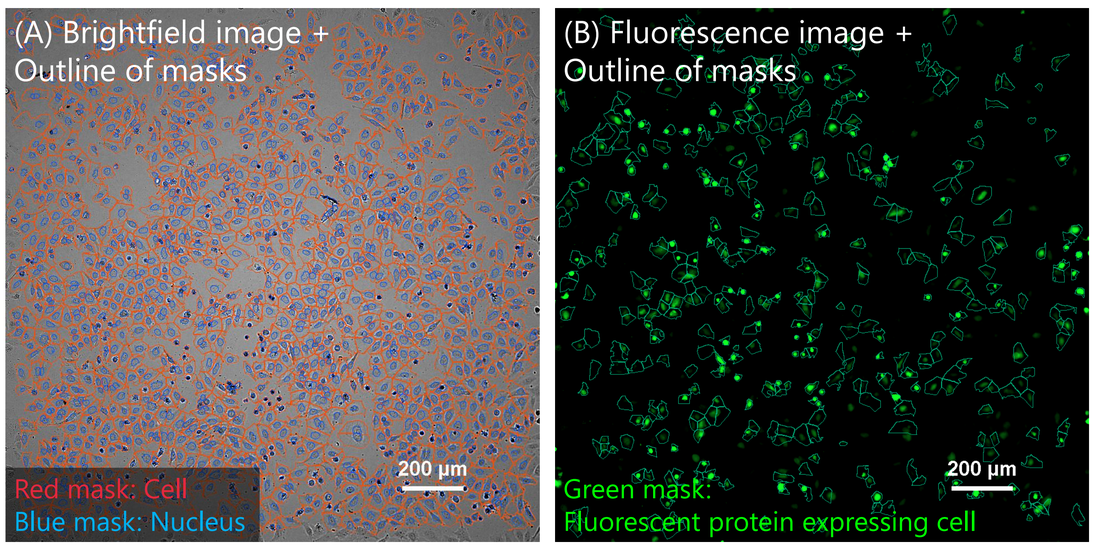


図3.リポフェクタミン 0.75 µl/ウェルで 24 時間処理した HeLa 細胞の画像
(A) 明視野画像にマスクの輪郭を重ね合わせた画像、 (B) 蛍光画像にマスクの輪郭を重ね合わせた画像、青色マスク：核、赤色マスク：細胞領域、緑色マスク：GFP発現細胞、全細胞数：1,450個、蛍光タンパク質発現細胞数：406個、蛍光タンパク質発現細胞率（トランスフェクション効率）：28%、スケールバー：200 µm
計算式：蛍光タンパク質発現細胞率[%] = (蛍光タンパク質発現細胞数 / 全細胞数) X 100

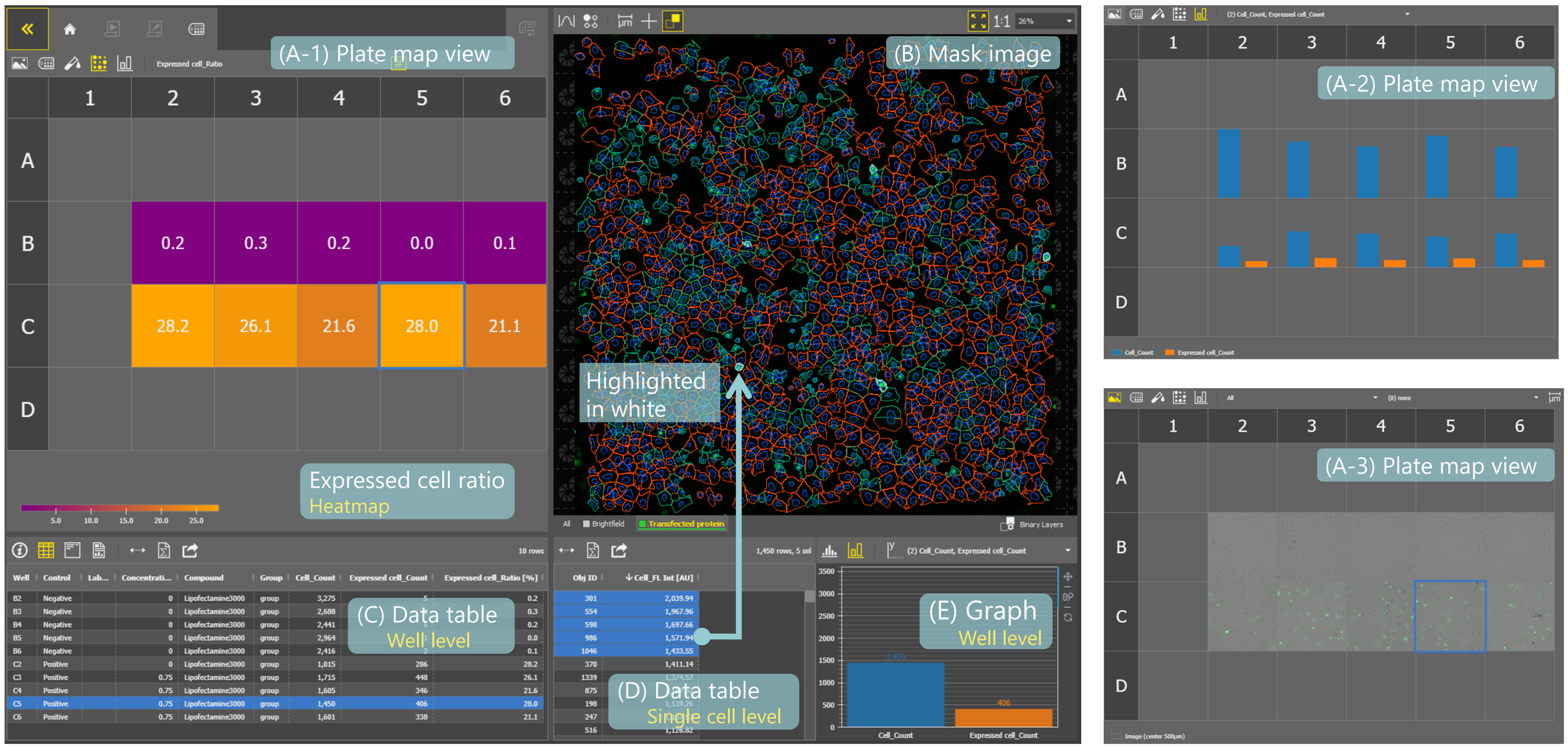


図4. トランスフェクション効率の解析結果、分析しやすいGUIを備えたソフトウェア
プレートマップビューのヒートマップ (A-1) や棒グラフ (A-2) 表示でプレート全体の解析結果を直感的に確認できます。プレートマップビューにはサムネイル画像 (A-3) も表示できます。データテーブルからウェルレベル (C) とシングルセルレベル (D) の情報が得られます。データと画像はリンクしているため、シングルセルレベルのデータテーブル (D) でオブジェクトを選択すると、選択した細胞が画像上 (B) に白色のマスクでハイライト表示されます。シングルセルレベルのデータテーブル (D) では、個々の細胞の蛍光強度の情報が得られます。(E) ウェルレベルのデータをグラフで表示できます。

まとめ

- ✓ Smart Experimentは、画像の取得から解析、グラフ作成まで全自動で実施できます。
- ✓ Transfection Efficiencyモジュールは、学習済みのAIが明視野画像から核と細胞領域を識別するため、ラベルフリーで全細胞数を計測できます。また、蛍光画像から蛍光発現細胞を識別して蛍光発現細胞数の割合を計測できます。
- ✓ 細胞を染色することなく明視野画像から核と細胞領域をラベルフリーで識別するAI技術は、ダウンストリームアプリケーションにおいて最大限の柔軟性を提供します。
- ✓ ウェルプレートをJiに設置して、実験アイコンを選択し、サンプルの情報を入力するシンプルな操作です。
- ✓ 面倒な設定作業は、AIに任せて研究者はより創造的な研究活動に専念できます。

サンプル作成のプロトコル

1) HeLa細胞を24ウェルプレートに9x10e4 cells/wellの密度で播種し、 37°C、5% CO_2インキュベーター内で24時間培養する。
2) コンフルエンシーが80～90%程度であることを確認する。
3) 陽性対照用としてOpti-MEM 23.5 µl/wellとLipofectamine 0.75 µl/wellを混合する。陰性対照用としてOpti-MEM 25 µl/wellを用意する。
4) Opti-MEM 25 µl/wellとP3000 1 µl/well、Plasmid 500 ng/wellを混合する。
5) 手順3で作製した溶液と手順4で作製したプラスミド溶液を1:1の割合で混合し、室温で5分間静置する。
6) 手順5の混合液に観察用培地（10%FBS + 4mM L-Glutamine + 1%Pc/Sm in FluoroBright DMEM）を500 µl/well加える。
7) 一晩培養した細胞の増殖培地を手順6で作製した試験培地500 µl/wellに置換して、 37°C、5% CO_2インキュベーター内で24時間培養する。
8) ECLIPSE Jiにウェルプレートを設置して、Transfection Efficiencyを実行してGFP発現細胞数の割合を計測する。

材料と試薬

細胞培養	
細胞	HeLa (RIKEN RCB0007)
増殖培地	MEM + 10%FBS + 1%Pc/Sm
培養容器	EZVIEW® Culture Plate LB (Glass Bottom Plate) Microplate 24 well (AGC techno glass (IWAKI), 5826-024)
被験物質	
化合物	Lipofectamine® 3000 (Lipofectamine)
試験濃度	Negative control: (0) 0 µl/well Positive control: (1) 0.75 µl/well
プレートマップの例	

	1	2	3	4	5	6
A	b	b	b	b	b	b
B	b	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
C	b	(0.75)	(0.75)	(0.75)	(0.75)	(0.75)
D	b	b	b	b	b	b

"b" : blank well

試薬		
製品名	製品番号	メーカー名
MEM (Minimum Essential Medium)	11095080	Thermo Fisher Scientific
FluoroBrite™ DMEM	A1896701	Thermo Fisher Scientific
Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent	L3000008	Thermo Fisher Scientific
Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium	31985062	Thermo Fisher Scientific
Plasmid DNA (coding GFP in this experiment)	-	-
L-Glutamine (200 mM)	25030081	Thermo Fisher Scientific

□ 対応容器*

・ 6, 12, 24 well plate

＊ガラスおよびポリスチレン底のウェルプレートに対応しています。画質よりも底面への細胞の接着を優先する場合は、ポリスチレン底のウェルプレートを使用してください。

参考情報

トランスフェクションのサンプル作成プロトコルは、製造元のThermo Fisher Scientific L3000008 Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagentのプロトコルをご参照ください。

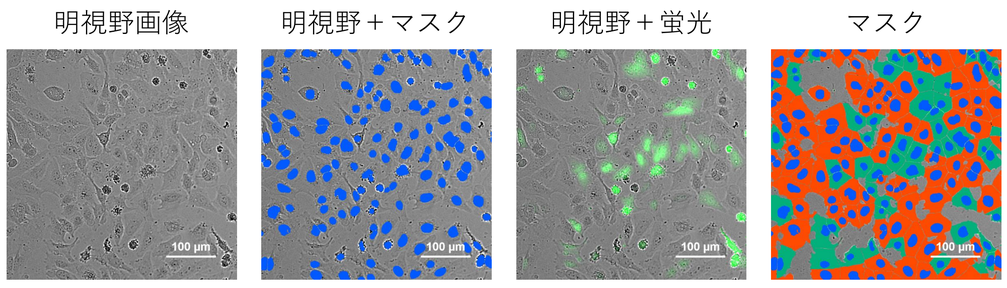
製品情報

Smart Imaging System ECLIPSE Ji

ECLIPSE Jiは、AI-Driven全自動イメージングシステムです。NIS-Elements SEと組み合わせて使用することで、画像取得・解析・グラフ作成をシームレスに自動で実行できます。人による高度な判断が必要なオートフォーカスの設定にはAIが最適な焦点面を見つけるCellFinder.aiを搭載。画像取得や解析のプロセスに多くの学習済みAIを実装。これにより、設定や最適化の工程数が大幅に削減され、誰もが簡単に結果を得ることができます。

画像統合ソフトウェアNIS-Elements SE SmartExperiment Basic Set Transfection Efficiency

- ✓ 画像の取得から解析、グラフ表示まで全自動で実施
- ✓ 蛍光発現細胞数の割合を計測
- ✓ ワンクリックでレポートを作成し、画像、解析結果をPDFで出力できます。
- ✓ 細胞イメージングと解析をより簡単に、より快適に



青：核マスク

緑：蛍光蛍光タンパク質発現細胞マスク

Smart Experimentで実験を自動化し、プロセス数を削減

従来の手法：Input by Human

1. ウェルプレートの種類を選択
2. ウェルプレートのアライメント
3. 対物レンズを選択
4. 波長を選択
5. 露光条件の設定
6. オートフォーカスの設定

} Jiでは設定不要

7. サンプル（薬物）情報の入力
8. 二値化のパラメーターを設定
9. 計測項目の設定
10. グラフ作成

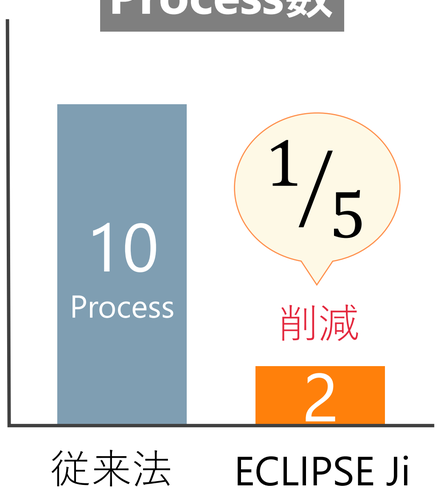
} Jiでは設定不要

Smart Experiment

1. Experimentのアイコンを選択
2. サンプル（薬物）情報の入力

\Simplified settings/

Process数



Smart Experiment のワークフロー

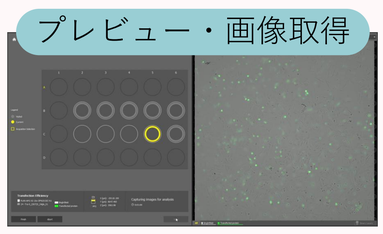
Input by Human

Select Experiment icon
Sample information

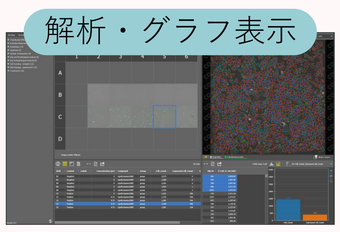
Fully Automated process

オーバービュー

プレビュー・画像取得



解析・グラフ表示



レポート