

APPLICATION NOTE

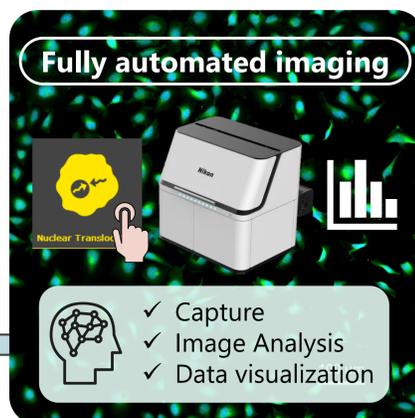
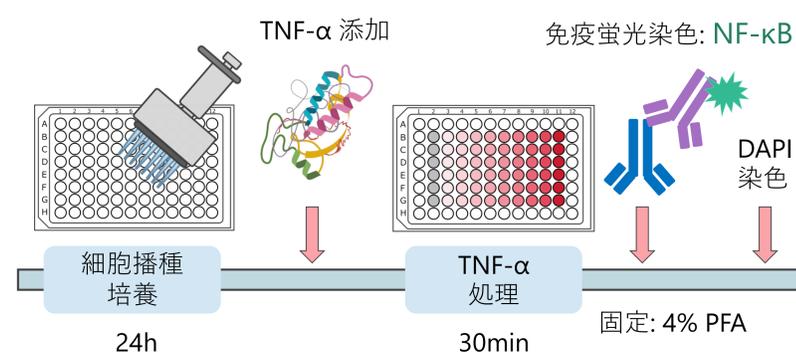
 Smart Imaging System ECLIPSE Ji
 画像統合ソフトウェアNIS-Elements SE
 Nuclear Translocation (Option)

AI-Driven 全自動スマートイメージングシステム ECLIPSE Jiを用いた核移行の解析

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、簡単な操作で可視化されたデータやEC₅₀ の情報が得られます。転写因子であるNF-κBは、癌や炎症性疾患の薬物標的として広く知られています。活性化したNF-κBは細胞質から核に移行し、疾患に関わる遺伝子の発現を誘導します。本アプリケーションノートでは、Smart ExperimentのNuclear Translocationモジュールを使用して、TNF-αの刺激によるNF-κBの細胞質から核への移行を定量化することを紹介します。

キーワード：核移行、シグナル伝達、抗がん剤、抗炎症薬、自動設定、EC₅₀、用量反応曲線

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
- ✓ タンパク質の核移行を定量化
- ✓ 薬物の反応を簡単に定量化
- ✓ 用量反応曲線を自動で作成
- ✓ EC₅₀/IC₅₀を自動で算出
- ✓ Z'-factorを自動で算出

(1) 96ウェルプレートにHeLa細胞を播種し、24時間培養。(2) 被験物質のTNF-αを10段階の濃度に調整し、各ウェルに添加して30分間インキュベート。(3) 4% PFAで細胞を固定。0.1% Triton X-100で膜透過処理。(4) Rabbit anti NF-κB p65 antibody (一次抗体) と Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 488) (二次抗体) で蛍光免疫染色。DAPIで核を染色。(5) ウェルプレートをECLIPSE Jiに設置し、Nuclear Translocationアイコンを選択し、画像取得と解析を実行してNF-κBの細胞質から核への移行を計測した。

Detection region	Fluorescence label	Ex/Em (nm)
Nucleus region	DAPI	345/455
Target protein	Rabbit anti NF-κB p65 antibody (primary), Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 488) (secondary)	495/519
Magnification	Field of view	
20X	0.88 x 0.88 mm	

表1. 検出領域と蛍光ラベル、画像取得の条件

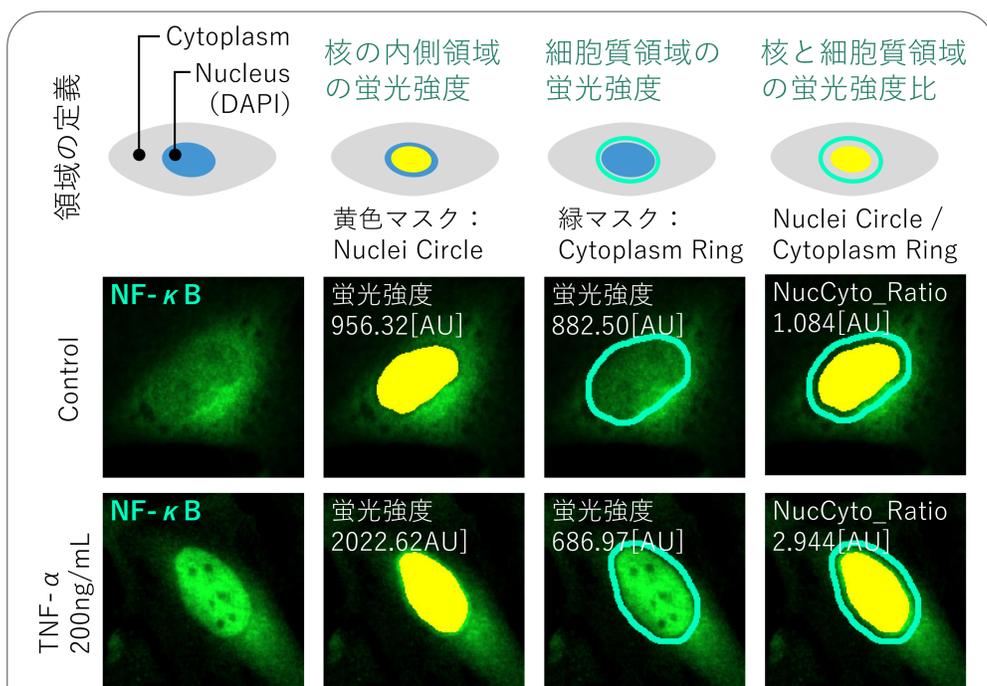
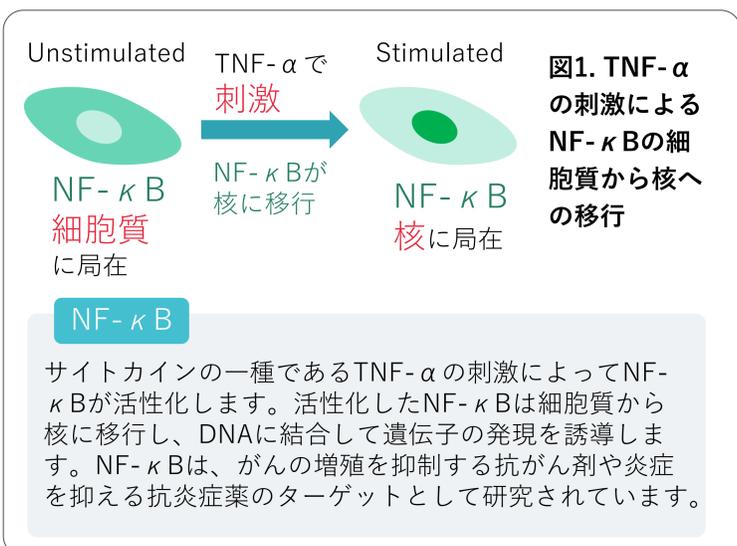


図1. マスク領域の定義と核移行の定量方法

上段：DAPIで検出した核領域の内側からNuclei Circleマスク（黄色）を作成。核の外側にRing状のマスク（緑）を作成し、細胞質領域と定義する。核の内側（Nuclei Circle）と細胞質リングの蛍光強度比を計測して、NF-κBの核移行を定量化する。中段：Control画像（NF-κBが細胞質に局在）下段：TNF-α 200ng/mLを30分間処理した画像（NF-κBが核に局在）。HeLa細胞におけるNF-κB(緑)の免疫蛍光染色画像。

結果

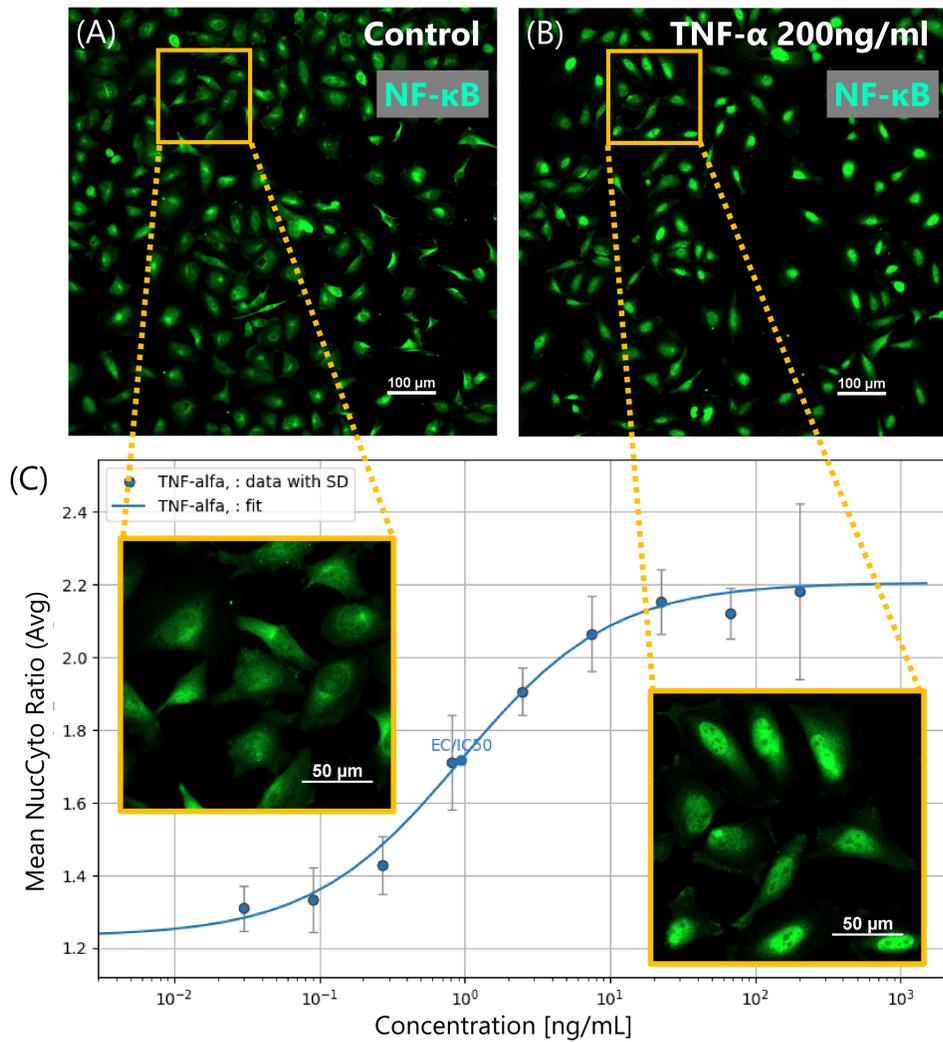
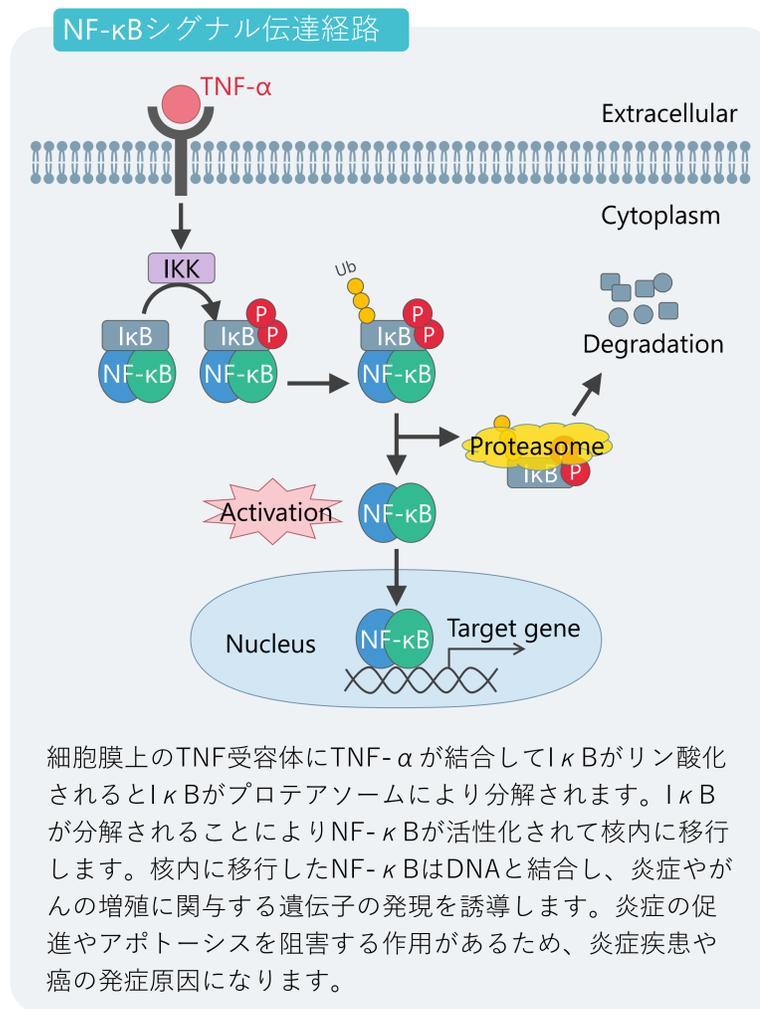


図2. コントロールとTNF- α で30分間処理したHeLa細胞の画像と用量反応曲線

(A, B) HeLa細胞におけるNF- κ B (緑)の免疫蛍光染色画像、スケールバー：100 μ m、(A) コントロールの画像、(B) TNF- α 200ng/mLを30分間処理した画像、(C) TNF- α の用量依存的にNF- κ Bの核移行が増加した結果を示した用量反応曲線。X軸：薬物濃度 (対数)、Y軸：核と細胞質の蛍光強度比 (平均)、NucCyto Ratio: Nuclei Circle Fluorescence intensity/Cytoplasm Ring Fluorescence intensity、 EC_{50} = 0.950ng/ml、 Z' -factor = 0.724、左の画像：NF- κ Bが細胞質に局在している。右の画像：NF- κ Bが核に局在している。



まとめ

- ✓ 核移行モジュールにより、TNF- α の用量依存的なNF- κ Bの核移行を定量できました。 EC_{50} は0.950ng/mLでした。
- ✓ 核と細胞質領域の蛍光強度比からタンパク質の核移行を定量し、サイトカインや薬物の EC_{50} を算出できます。
- ✓ Smart Experimentは、画像の取得から解析、グラフ表示まで全自動で実施できます。
- ✓ CellFinder.aiが自動でフォーカスを合わせるため、複雑なオートフォーカスの設定は不要です。
- ✓ 画像の取得と解析の条件が事前に定義されており、イメージングに関する高度な知識は不要です。誰でも簡単に解析結果を得ることができます。
- ✓ ウェルプレートにJiを設置して、Nuclear Translocationのアイコンを選択し、サンプルの情報を入力するシンプルな操作です。今回の実験条件では、撮影開始からグラフ表示まで約20分で実施できました。
- ✓ 面倒な設定は、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96ウェルプレートに 1×10^4 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) TNF- α を0、0.03、0.09、0.27、0.82、2.47、7.40、22.2、66.7、および200 ng/mlの濃度に培地で希釈し、0.1%BSAを含む各濃度の培地を各6ウェルに添加する。細胞をTNF- α で30分間、37°C、5% CO_2 インキュベーター内で処理する。
- 3) 細胞をPBSで1回洗浄する。
- 4) 4% PFAをウェルに添加し、室温で10分間静置して細胞を固定する。
- 5) 細胞をPBSで3回洗浄する。
- 6) 0.1% Triton X-100, 0.1%BSA in PBSをウェルに添加し、室温で5分間静置して膜透過処理をする。
- 7) 細胞をPBSで3回洗浄する。
- 8) 0.1%BSAを含むPBSで希釈した一次抗体 (1:200) をウェルに添加し、室温で1時間静置する。
- 9) 細胞をPBSで3回洗浄する。
- 10) 0.1%BSAを含むPBSで希釈した二次抗体 (1:500) をウェルに添加し、室温で1時間静置する。
- 11) 細胞をPBSで3回洗浄する。
- 12) DAPI (2 μ g/ml)をウェルに添加し、室温で5分間静置する。
- 13) 細胞をPBSで3回洗浄する。

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 B (Glass Bottom Plate) Microplate 96 well (AGC techno glass (IWAKI), 5866-096)																																																																																																																					
被験物質																																																																																																																						
物質	TNF-α																																																																																																																					
試験濃度	Negative control: 0 ng/ml Positive control (1): 66.7 ng/ml Positive control (2): 200 ng/ml To make a dose-response curve, design required concentration points as follows: Ex: (0) 0 ng/ml, (1) 0.03 ng/ml, (2) 0.09 ng/ml, (3) 0.27 ng/ml (4) 0.82 ng/ml, (5) 2.47 ng/ml, (6) 7.40 ng/ml, (7) 22.2 ng/ml, (8) 66.7 ng/ml, (9) 200 ng/ml																																																																																																																					
プレートマップの例	<table border="1"> <tr> <td></td> <td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td><td>6</td><td>7</td><td>8</td><td>9</td><td>10</td><td>11</td><td>12</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>b</td><td>b</td><td>b</td><td>b</td><td>b</td><td>b</td><td>b</td><td>b</td><td>b</td><td>b</td><td>b</td><td>b</td> </tr> <tr> <td>B</td> <td>b</td><td>(0)</td><td>(1)</td><td>(2)</td><td>(3)</td><td>(4)</td><td>(5)</td><td>(6)</td><td>(7)</td><td>(8)</td><td>(9)</td><td>b</td> </tr> <tr> <td>C</td> <td>b</td><td>(0)</td><td>(1)</td><td>(2)</td><td>(3)</td><td>(4)</td><td>(5)</td><td>(6)</td><td>(7)</td><td>(8)</td><td>(9)</td><td>b</td> </tr> <tr> <td>D</td> <td>b</td><td>(0)</td><td>(1)</td><td>(2)</td><td>(3)</td><td>(4)</td><td>(5)</td><td>(6)</td><td>(7)</td><td>(8)</td><td>(9)</td><td>b</td> </tr> <tr> <td>E</td> <td>b</td><td>(0)</td><td>(1)</td><td>(2)</td><td>(3)</td><td>(4)</td><td>(5)</td><td>(6)</td><td>(7)</td><td>(8)</td><td>(9)</td><td>b</td> </tr> <tr> <td>F</td> <td>b</td><td>(0)</td><td>(1)</td><td>(2)</td><td>(3)</td><td>(4)</td><td>(5)</td><td>(6)</td><td>(7)</td><td>(8)</td><td>(9)</td><td>b</td> </tr> <tr> <td>G</td> <td>b</td><td>(0)</td><td>(1)</td><td>(2)</td><td>(3)</td><td>(4)</td><td>(5)</td><td>(6)</td><td>(7)</td><td>(8)</td><td>(9)</td><td>b</td> </tr> <tr> <td>H</td> <td>b</td><td>b</td><td>b</td><td>b</td><td>b</td><td>b</td><td>b</td><td>b</td><td>b</td><td>b</td><td>b</td><td>b</td> </tr> </table> <p>"b" : blank well</p>		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	A	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	B	b	(0)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	b	C	b	(0)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	b	D	b	(0)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	b	E	b	(0)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	b	F	b	(0)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	b	G	b	(0)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	b	H	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12																																																																																																										
A	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b																																																																																																										
B	b	(0)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	b																																																																																																										
C	b	(0)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	b																																																																																																										
D	b	(0)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	b																																																																																																										
E	b	(0)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	b																																																																																																										
F	b	(0)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	b																																																																																																										
G	b	(0)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	b																																																																																																										
H	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b																																																																																																										

試薬		
製品名	カタログ番号	メーカー名
Recombinant Human TNF-α	300-01-A	PeptoTech
Rabbit anti NF-κB p65 antibody (primary antibody)	ab16502	Abcam
Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 488) (secondary antibody)	ab150077	Abcam
DAPI Solution	62248	Thermo Fisher Scientific
MEM (Minimum Essential Medium)	11095080	Thermo Fisher Scientific
Fetal bovine serum (FBS)	10437028	Thermo Fisher Scientific
Penicillin-Streptomycin (Pc/Sm) (10,000 U/ml)	15140122	Thermo Fisher Scientific
16%-Paraformaldehyde Aqueous Solution (16% PFA) *Dilute by 4% with PBS before use	11850-14	Nacalai Tesque

□ 対応容器*

- ・ 24-well plate
 - ・ 96-well plate
- * ガラス底のウェルプレートにのみ対応しています。

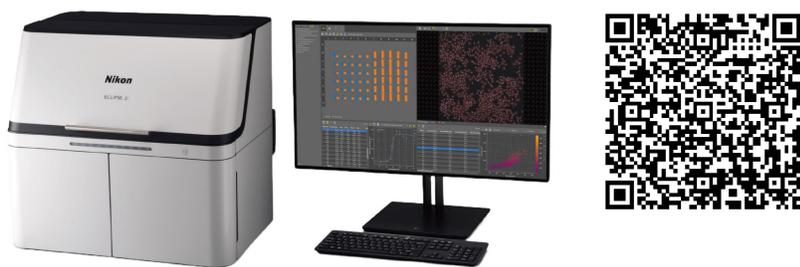
参考文献

Trask, OJ, Nuclear Factor Kappa B (NF-κB) Translocation Assay Development and Validation for High Content Screening. *Assay Guidance Manual* (2012)

製品情報

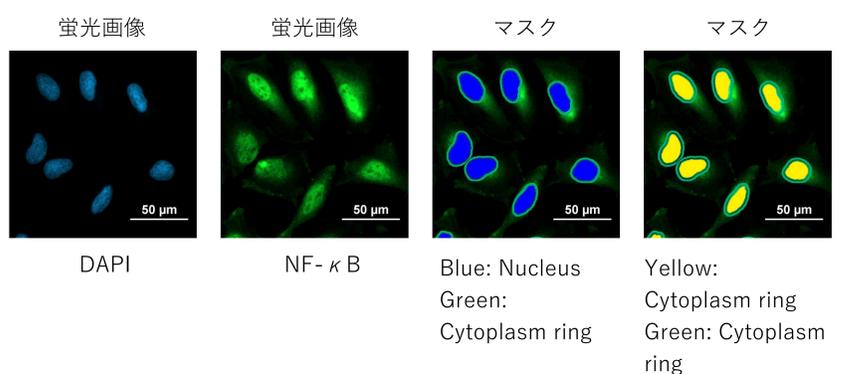
Smart Imaging System ECLIPSE Ji

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 Nuclear Translocation (Option)

- ✓ 画像の取得から解析、グラフ表示まで全自動で実施
- ✓ 細胞質から核へのタンパク質の移行を全自動で簡単に解析できます。
- ✓ ワンクリックでレポートを作成し、画像、解析結果、用量反応曲線、EC₅₀/IC₅₀の算出結果を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



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
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

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

