

## APPLICATION NOTE

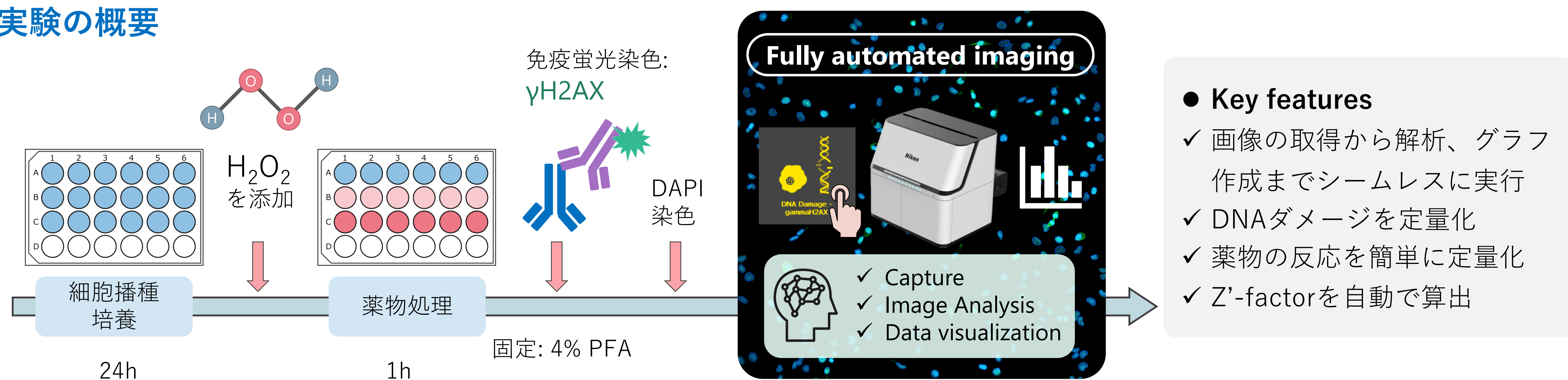
 Smart Imaging System ECLIPSE Ji  
 画像統合ソフトウェアNIS-Elements SE  
 DNA Damage - gammaH2AX (Option)

# 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DNAダメージの解析

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、グラフ作成までシームレスに実行できる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が得られます。 $\gamma$ H2AXは、DNA損傷およびDNA修復のマーカーです。ヒストンタンパク質H2AXは、DNA二本鎖切断（double-strand break: DSB）部位でリン酸化されて $\gamma$ H2AXを形成し、DNA修復に関与することが知られています。本アプリケーションノートでは、Smart ExperimentのDNA Damage - gammaH2AXモジュールを使用して、核領域における免疫蛍光染色した $\gamma$ H2AX由来の蛍光強度を測定することにより、DNAダメージを定量化する例を紹介します。

キーワード：DNAダメージ、 $\gamma$ H2AX、創薬、毒性学、毒性試験、毒性評価、安全性薬理試験、自動設定

## 実験の概要



### Key features

- ✓ 画像の取得から解析、グラフ作成までシームレスに実行
- ✓ DNAダメージを定量化
- ✓ 薬物の反応を簡単に定量化
- ✓ Z'-factorを自動で算出

(1) 24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Hydrogen Peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)を0mM, 0.1mMおよび0.3mMの濃度に調整し、各ウェルに添加して1時間インキュベート。(4) 4% PFAで細胞を固定。0.1% Triton X-100で膜透過処理。(5) Anti-gamma H2A.X (phospho S139) antibody (一次抗体) と Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 488) (二次抗体)で免疫蛍光染色。DAPIで核を染色。(6) ウェルプレートをECLIPSE Jiに設置し、DNA Damage - gammaH2AXアイコンを選択して自動で画像取得と解析を実施した。

検出領域	蛍光ラベル	Ex/Em (nm)
全ての細胞の核	DAPI	345/455
DNAダメージ ( $\gamma$ H2AX)	Anti-gamma H2A.X (phospho S139) (primary), Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 488) (secondary)	495/519
倍率	視野 (FOV)	
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

## 結果

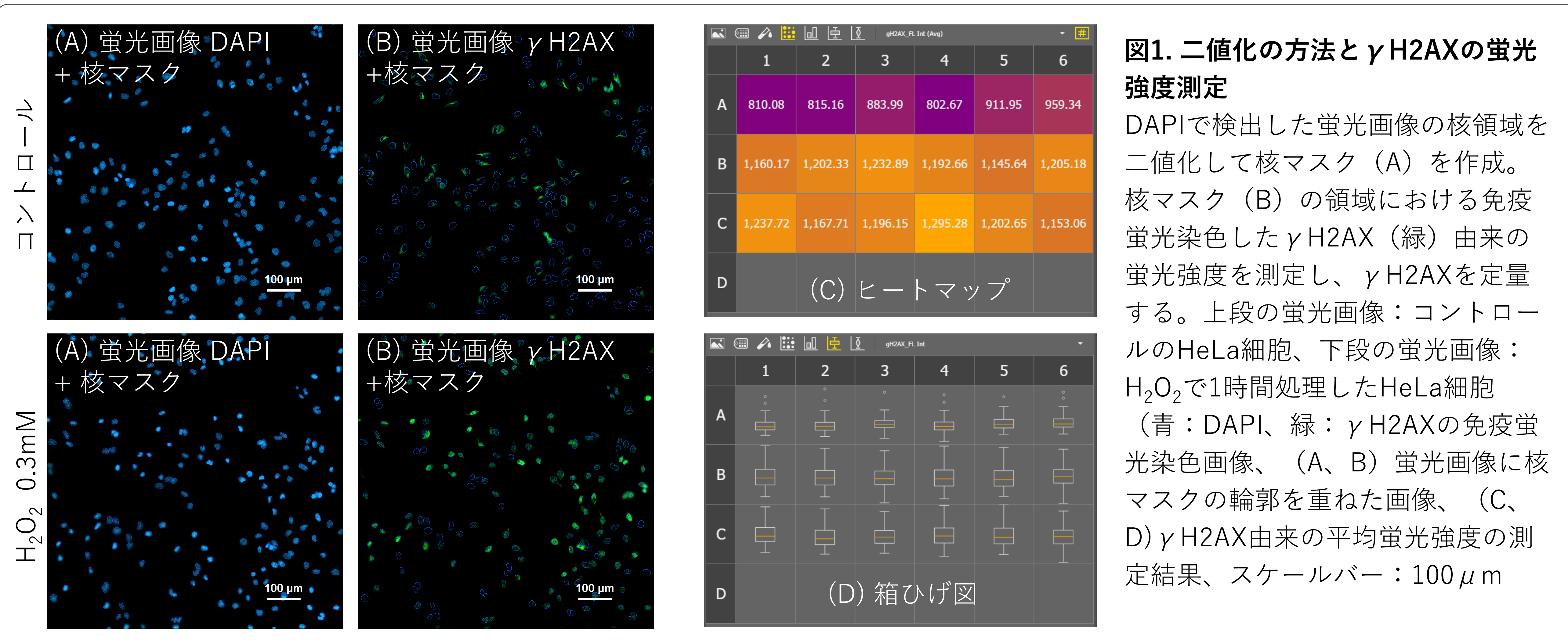


図1. 二値化の方法と $\gamma$ H2AXの蛍光強度測定

DAPIで検出した蛍光画像の核領域を二値化して核マスク (A) を作成。核マスク (B) の領域における免疫蛍光染色した $\gamma$ H2AX (緑) 由来の蛍光強度を測定し、 $\gamma$ H2AXを定量化する。上段の蛍光画像：コントロールのHeLa細胞、下段の蛍光画像：H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>で1時間処理したHeLa細胞 (青：DAPI、緑： $\gamma$ H2AXの免疫蛍光染色画像、(A、B) 蛍光画像に核マスクの輪郭を重ねた画像、(C、D)  $\gamma$ H2AX由来の平均蛍光強度の測定結果、スケールバー：100  $\mu$ m



## まとめ

- ✓ 蛍光により検出される核マスク領域における  $\gamma$  H2AX由来の平均蛍光強度を測定できました。
- ✓ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の用量依存的な  $\gamma$  H2AX由来の蛍光強度の増加を確認することができました。
- ✓ 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。
- ✓ ウェルプレートにJiを設置して、DNA Damage - gammaH2AX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。
- ✓ CellFinder.aiが最適な焦点面を見つけるため、面倒なオートフォーカスの設定は必要ありません。
- ✓ 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。

## 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	Hydrogen Peroxide (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )						
試験濃度	Negative control: 0 mM Positive control : 0.3 mM						
プレートマップの例		1	2	3	4	5	6
	A	0	0	0	0	0	0
	B	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
	C	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
	D	b	b	b	b	b	b

"b" : blank well

試薬		
製品名	カタログ番号	メーカー名
Hydrogen Peroxide (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	084-07441	Fujifilm-Wako
Anti-gamma H2A.X (phospho S139) antibody	ab11174	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
Bovine Serum Albumin (BSA)	A4919	Sigma-Aldrich
Polysorbate 20 (Tween-20)	103168	MP Biomedicals
Triton™ X-100	T8787	Sigma-Aldrich
DPBS, no calcium, no magnesium (PBS)	14190144	Thermo Fisher Scientific

### □ 対応容器\*

・ 24, 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

Löbrich, M, *et al.*, gammaH2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: strengths, limitations and optimization. *Cell Cycle* **9** 662 -9 (2010)

## 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 DNA Damage - gammaH2AX (Option)

- ✓ 画像の取得から解析、グラフ表示まで全自動で実施
- ✓ 蛍光により検出された核領域における  $\gamma$  H2AX由来の蛍光強度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、EC<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub>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