

APPLICATION NOTE

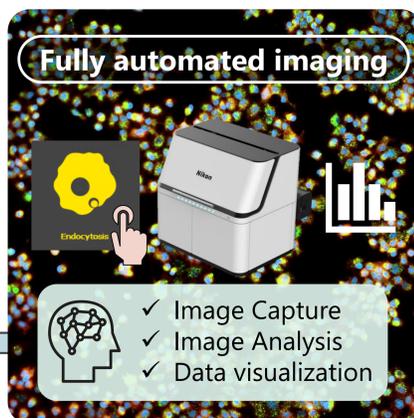
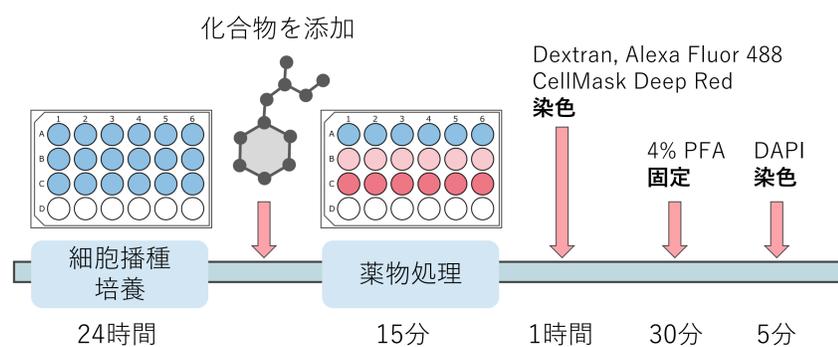
 Smart Imaging System ECLIPSE Ji
 画像統合ソフトウェアNIS-Elements SE
 Endocytosis (Option)

AI-driven 全自動スマートイメージングシステム ECLIPSE Jiを用いたエンドサイトーシスの解析

エンドサイトーシスは、細胞外物質が細胞に取り込まれ、利用または分解される基本的な細胞プロセスです。小さな病原体やウィルスの感染経路としても知られています。エンドサイトーシスを観察すると、候補薬や病原体などの様々な物質に対する細胞反応について有益な洞察が得られます。NIS-Elements Smart Experiment (SE) ソフトウェアを搭載した ECLIPSE Ji デジタル倒立顕微鏡は、画像取得から解析、データの視覚化までの自動化されたシームレスなイメージングワークフローを可能にします。本アプリケーションノートでは、Smart ExperimentのEndocytosisモジュールを使用して、A431細胞に取り込まれた蛍光標識デキストランの蛍光強度と分布を測定することによりエンドサイトーシスの活性を定量した例を紹介します。

キーワード：感染症の研究、飲食作用、エンドサイトーシス、薬理試験、創薬

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
- ✓ エンドサイトーシスを定量化
- ✓ 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A431細胞を播種し、24時間培養。(2) 被験物質のCytochalasin Dを0 μ M, 3 μ Mおよび10 μ Mの濃度に調整し、各ウェルに添加して15分インキュベート。(3) Cytochalasin Dを含む Dextran, Alexa Fluor™ 488 (終濃度: 100 μ g/mL) およびCellMask™ Deep Red (終濃度: 5 μ g/mL) を添加した培地に交換。1時間、インキュベート。(4) 4% PFAで細胞を固定。(5) DAPI (終濃度: 2 μ g/mL) で核を染色。(6) ウェルプレートをECLIPSE Jiに設置し、Endocytosis 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)
核	DAPI	341/452
Puncta	Dextran, Alexa Fluor™ 488	495/519
細胞領域	CellMask™ Deep Red	649/666
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

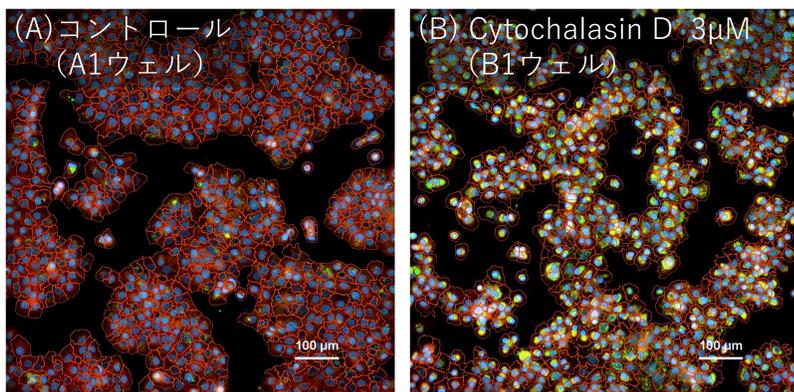
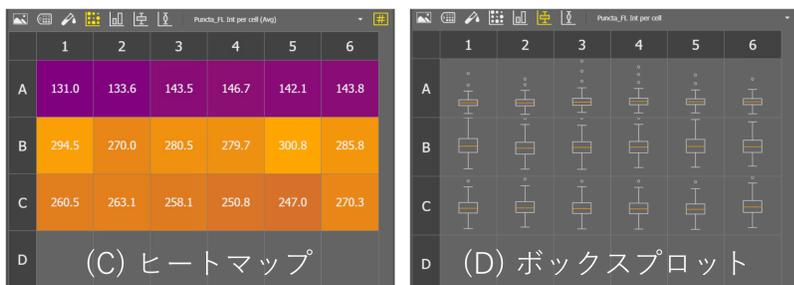


図1. 二値化の方法とDextran, Alexa Fluor™ 488の蛍光強度測定

DAPIで検出した核領域から核マスクを作成。CellMask™ Deep Redで検出した細胞領域から細胞マスクを作成。細胞マスク領域におけるDextran, Alexa Fluor™ 488の蛍光強度を測定した。

(A, B) A431細胞の蛍光画像にマスクの輪郭をオーバーレイした画像 (青: DAPI、緑: Dextran, Alexa Fluor™ 488、赤: CellMask™ Deep Red、青色マスク: 核、赤色マスク: 細胞マスク)、スケールバー: 100 μ m



(C, D) 細胞あたりのDextran, Alexa Fluor™ 488の平均蛍光強度の解析結果を各ウェルごとに表示。Cytochalasin Dの濃度は、ウェルプレートマップの上から 0 μ M, 3 μ M, 10 μ M。A431細胞に取り込まれたDextran, Alexa Fluor™ 488の平均蛍光強度は、コントロールと比較して、サイトカラシンDの濃度が3 μ M以上のウェルで高い値を示しました。

まとめ

- ✓ 蛍光により検出される細胞マスクの領域における Dextran, Alexa Fluor™ 488の平均蛍光強度を測定できました。
- ✓ A431 細胞に取り込まれた Dextran, Alexa Fluor™ 488 の平均蛍光強度は、サイトカラシン D の濃度が 3μM 以上のウェルで高い値を示しました。
- ✓ 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に設置して、Endocytosis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。
- ✓ 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	A431						
増殖培地	DMEM (HG) + 10% hi-FBS						
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	Cytochalasin D						
試験濃度	Negative control: 0μM Positive control: 3μM A: 0μM, B: 3μM, C: 10μM						
プレートマップの例		1	2	3	4	5	6
	A	0	0	0	0	0	0
	B	3	3	3	3	3	3
	C	10	10	10	10	10	10
	D	b	b	b	b	b	b
Unit : μM "b" : blank well							

□ 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

L He, *et al.*, Contrasting roles for actin in the cellular uptake of cell penetrating peptide conjugates. *Scientific Reports* **8**, Article number: 7318 (2018)

試薬		
製品名	カタログ番号	メーカー名
Cytochalasin D	C8273	Sigma-Aldrich
Dextran, Alexa Fluor™ 488; 10,000 MW, Anionic, Fixable	D22910	Thermo Fisher Scientific
CellMask™ Deep Red Plasma Membrane Stain	C10046	Thermo Fisher Scientific
DAPI Solution (1mg/mL)	62248	Thermo Fisher Scientific
Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose (DMEM (HG))	D5796	Sigma-Aldrich
Fetal Bovine Serum (FBS)	172012	Sigma-Aldrich
CultureSure DMSO (DMSO)	031-24051	Fujifilm-Wako
Penicillin-Streptomycin (Pc/Sm) (10,000 U/mL)	15240122	Thermo Fisher Scientific
16%-Paraformaldehyde Aqueous Solution (16% PFA) *Dilute by 4% with PBS before use	11850-14	Nacalai Tesque
DPBS, no calcium, no magnesium (PBS (-))	14190144	Gibco™
D-PBS (+) Preparation Reagent (Ca, Mg solution) (100x) (100x Ca, Mg solution)	02492-94	Nacalai Tesque

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 Endocytosis (Option)

- ✓ 画像の取得から解析、グラフ表示まで全自動で実施
- ✓ 細胞領域における蛍光色素で標識したデキストランの分布に基づく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、解析結果をPDFで出力できます。

