

APPLICATION NOTE

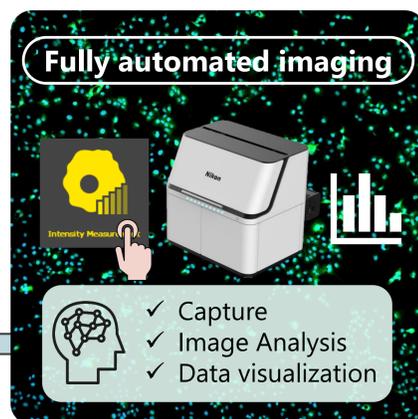
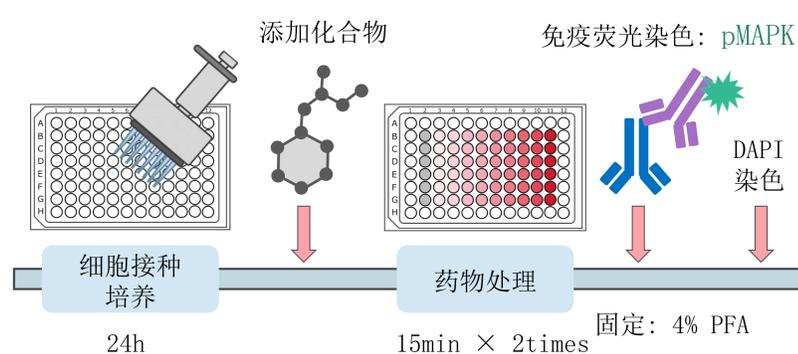
 Smart Imaging System ECLIPSE Ji
 显微图像处理软件NIS-Elements SE
 Intensity Measurement

使用训练有素的AI模型，从明场图像中无标记检测细胞区域并测量细胞水平的荧光强度

ECLIPSE Ji搭载了Smart Experiment，与显微图像处理软件NIS-Elements SE结合使用，可使从图像获取到分析及图表创建无缝自动执行。训练有素的Artificial Intelligence (AI) 和预定义成像流程将自动优化图像获取和分析条件的设置，因此通过简单操作，即可获得可视化数据和EC₅₀信息。无论是蛋白质或是酶活性的定量，荧光强度试验从细胞生物学基础研究到药物研发领域都得到广泛应用。本应用指南中，介绍使用Smart Experiment的Intensity Measurement模块从明场图像中无标记检测细胞区域，测量细胞水平的荧光强度的示例。此外，还介绍了自动将来源于pMAPK剂量依赖性荧光强度减少可视化，计算出IC₅₀以量化药物效果的示例。

关键词：荧光强度、蛋白质的量化、药物研发、抗癌药物研究、自动设置、IC₅₀、剂量反应曲线

实验概要



Key features

- ✓ 从图像的获取到分析及图表创建可自动执行
- ✓ 测量荧光强度
- ✓ 轻松量化药物反应
- ✓ 自动创建剂量反应曲线
- ✓ 自动计算EC₅₀/IC₅₀
- ✓ 自动计算Z' -factor

(1) 将COS7细胞接种到96孔板，培养24小时。(2) 将受试物U0126调整为10种梯度浓度，添加到各孔中，培养15分钟。(3) 更换为含有各试验浓度的U0126及10ng/ml PMA的增殖培养基，培养15分钟。(4) 用4% PFA固定细胞。用 0.2% Triton X-100 进行膜透化。(5) 用 Rabbit anti-pMAPK antibody (第一抗体) 和Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 488) (第二抗体) 进行荧光免疫染色。用DAPI对细胞核进行染色。(6) 将孔板放置到ECLIPSE Ji中，选择Intensity Measurement图标，自动进行图像获取和分析。

检测区域	荧光标记	Ex/Em (nm)
所有细胞的细胞核	DAPI	345/455
细胞区域	None (Detect from brightfield image using AI)	Brightfield
目标分子 (pMAPK)	Rabbit anti-pMAPK (primary), Goat anti-rabbit IgG H&L Alexa Fluor™ 488 (secondary)	495/519
倍率	视场 (FOV)	
10X	1.76 × 1.76 mm	

表1. 检测区域、荧光标记和图像获取条件

Point

训练有素的AI AI自动从明场图像中识别细胞区域

用AI识别细胞区域，对细胞区域的识别不再需要细胞膜染色。由此，可将荧光波长用于荧光蛋白的检测，从而可实现更广泛的实验。

Label-free

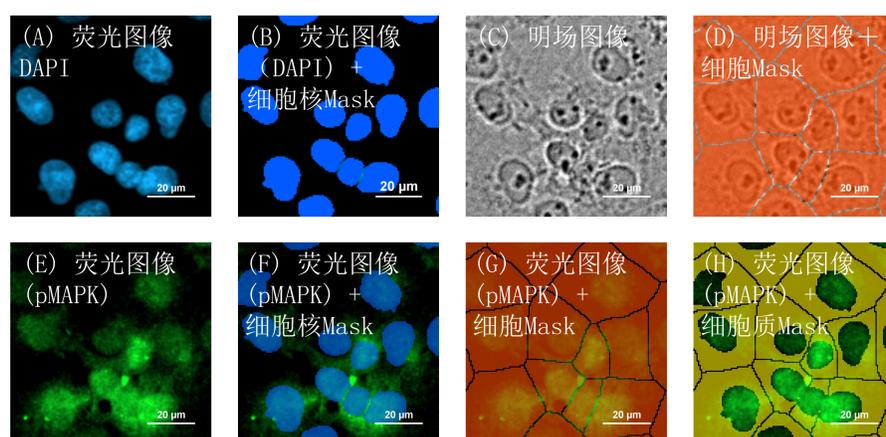


图1. 二值化方法和目标分子测量

将DAPI检测到的细胞核区域 (A) 二值化，制作细胞核Mask (B)。训练有素的AI从明场图像 (C) 中识别背景和细胞区域。使用细胞核Mask (B) 将全体细胞区域分割，制作每个细胞Mask (D)。从细胞Mask (D) 区域减去细胞核Mask (B)，制作细胞质Mask (H)。从荧光图像 (E) 测量经免疫荧光染色后细胞内各Mask区域 (细胞核、细胞、细胞质) 中来源于pMAPK的荧光强度，量化目标蛋白pMAPK的表达量 (F、G、H)。比例尺: 20 μm

结果

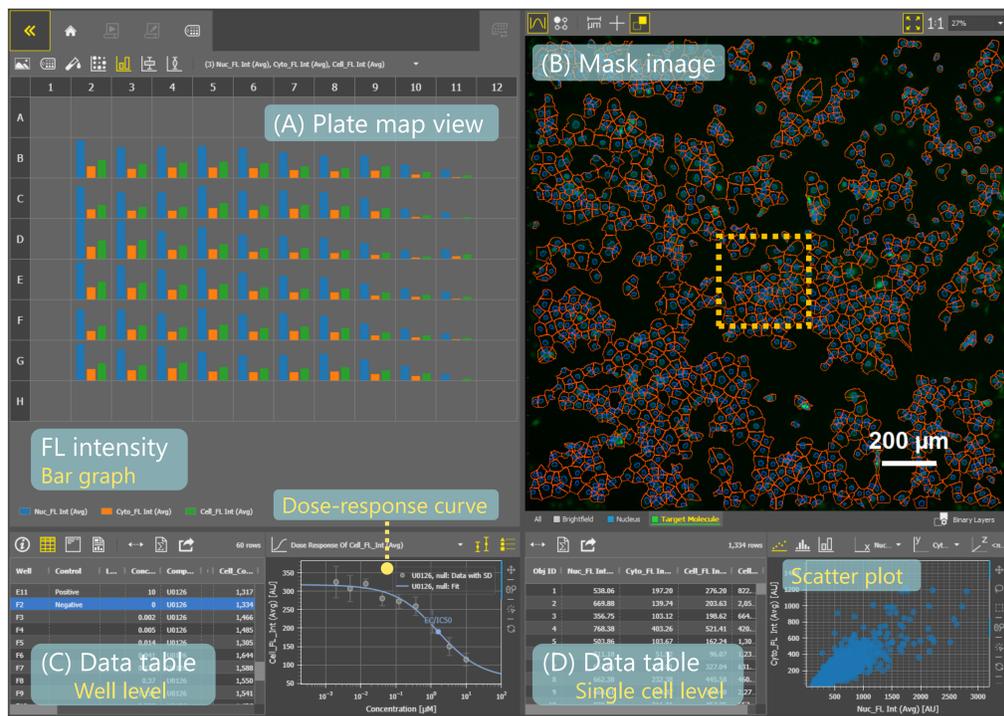


图2. 荧光强度的分析结果及具有易分析GUI的软件

孔板图视图 (A) 显示热图、条形图、箱线图、小提琴图, 可直观确认孔板整体的分析结果。从数据表可以获得孔水平 (C) 和单细胞水平 (D) 的信息。可显示剂量反应曲线、散布图、直方图、条形图等图表。孔板图视图的条形图 (A) 依据细胞核、细胞、细胞质的各Mask区域显示, 来源于pMAPK的平均荧光强度呈试剂浓度依赖性减少。在本实验中, 基于细胞Mask区域的来源于pMAPK的荧光强度的 IC_{50} 为1.665。比例尺: $200 \mu m$

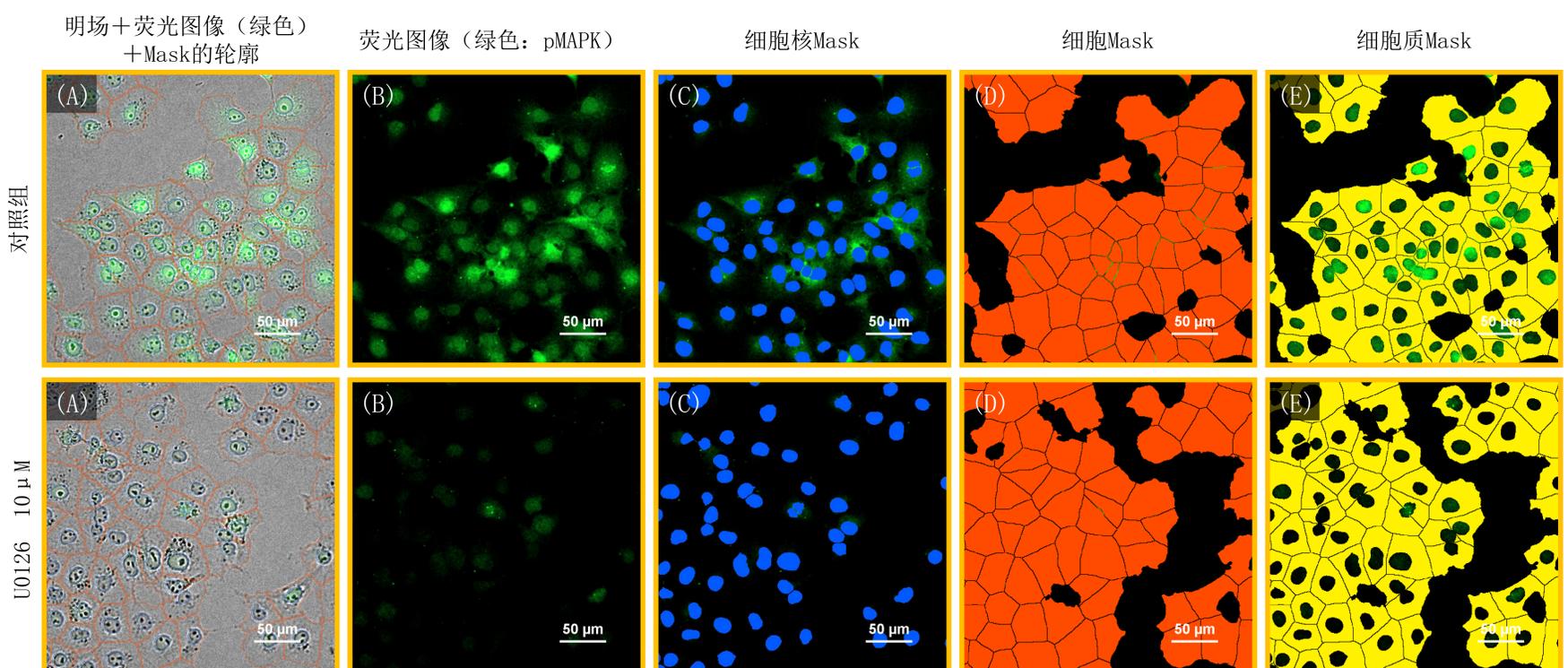


图3. 在对照组 (未处理) 及用U0126处理30分钟的HeLa细胞的图像、荧光图像上叠加Mask的图像

在Advanced模式下打开图像文件, 图2橙色虚线框 ($0.31mm \times 0.31mm$) 范围截取后的放大图像。上排: 对照组 (未处理)、下排: 用U0126 $10 \mu M$ 处理24小时、(A) 在明场和荧光 (绿色: pMAPK) 的Merge图上叠加Mask轮廓 (蓝色: 细胞核Mask、红色: 细胞Mask) 的图像、(B) pMAPK的免疫荧光图像、(C-E) 在荧光图像 (绿色: pMAPK) 上叠加各Mask的图像、(C) 蓝色: 细胞核Mask、(D) 红色: 细胞Mask、(E) 黄色: 细胞质Mask、比例尺: $50 \mu m$

总结

- ✓ 训练有素的AI可自动从明场图像中识别细胞区域, 测量从荧光通道到细胞Mask区域来源于pMAPK的平均荧光强度。
- ✓ 证实了来源于pMAPK的荧光强度呈U0126剂量依赖性减少。
- ✓ Smart Experiment从图像的获取到分析及图表创建可全自动执行。
- ✓ 可自动创建剂量反应曲线, 计算出 IC_{50} 。
- ✓ 操作简单, 将孔板放置到ECLIPSE Ji中, 选择Intensity Measurement图标, 输入样品信息即可。在本次实验条件下, 从开始拍摄到图表显示用时约20分钟。

- ✓ CellFinder.ai会找到最佳焦平面, 因此无需进行繁琐的自动对焦设置。
- ✓ 繁琐的设置工作交给AI, 研究人员可以专注于更具有创造性的研究活动。

样品制备protocol

- 1) 将COS7细胞按照 1×10^4 cells/well的密度接种到96孔板中, 在 $37^\circ C$ 、 $5\% CO_2$ 的培养箱内培养24小时。
- 2) 用培养基将U0126稀释为0、0.002、0.005、0.014、0.041、0.123、0.370、1.111、3.333及 $10 \mu M$ 浓度的预处理培养基分别添加到6个孔中。在 $37^\circ C$ 、 $5\% CO_2$ 的培养箱内处理细胞15分钟。

- 3) 清除预处理培养基，将正式处理培养基（含有各试验浓度的U0126及10ng/ml PMA的增殖培养基）分别添加到6个孔中。在37℃、5% CO₂的培养箱内处理细胞15分钟。
- 4) 将4% PFA添加到孔中，在室温下静置10分钟，固定细胞。
- 5) 用PBS清洗细胞3次。
- 6) 将0.2% Triton X-100 in PBS添加到孔中，在室温下静置15分钟，进行膜透化。
- 7) 用PBS清洗细胞3次。

- 8) 用3% BSA in PBS封闭，在室温下静置30分钟。
- 9) 更换为已添加用封闭液稀释过的第一抗体（1:200）的PBS，在室温下静置2小时。
- 10) 用PBS清洗细胞3次。
- 11) 更换为已添加用封闭液稀释过的第二抗体（1:500）的PBS，在室温下静置1小时。
- 12) 用PBS清洗细胞3次。
- 13) 将DAPI（最终浓度2 μg/ml）添加到孔中，在室温下静置5分钟。
- 14) 用PBS清洗细胞3次。

材料和试剂

细胞培养																																																																																																																						
细胞	COS7 (RIKEN RCB0539)																																																																																																																					
增殖培养基	DMEM (Low Glucose) + 10%FBS + 1%Pc/Sm																																																																																																																					
培养容器	EZVIEW® Culture Plate B (Glass Bottom Plate) Microplate 96 well (AGC techno glass (IWAKI), 5866-096)																																																																																																																					
受试物																																																																																																																						
化合物	U0126																																																																																																																					
试验浓度	Negative control: 0 μM Positive control: 10 μM To make a dose-response curve, design required concentration points as follows: Ex: (0) 0 μM, (1) 0.002 μM, (2) 0.005 μM, (3) 0.014 μM, (4) 0.041 μM, (5) 0.123 μM, (6) 0.370 μM, (7) 1.111 μM, (8) 3.333 μM, (9) 10 μM																																																																																																																					
孔板图示例	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>1</th> <th>2</th> <th>3</th> <th>4</th> <th>5</th> <th>6</th> <th>7</th> <th>8</th> <th>9</th> <th>10</th> <th>11</th> <th>12</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <th>A</th> <td>b</td> </tr> <tr> <th>B</th> <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> <th>C</th> <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> <th>D</th> <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> <th>E</th> <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> <th>F</th> <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> <th>G</th> <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> <th>H</th> <td>b</td> </tr> </tbody> </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																																																																																																										

□ 适用容器*

- 24、48、96孔板

* 适用玻璃底及聚苯乙烯底的孔板。优先考虑图像质量时，请使用玻璃底的孔板。

试剂		
产品名称	产品目录编号	厂商名称
U0126, Selective MKK inhibitor	ab120241	Abcam
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) XP® Rabbit mAb (primary antibody)	4370	Cell Signaling Technology
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ 488	A-11008	Thermo Fisher Scientific, Invitrogen™
DAPI Solution	62248	Thermo Fisher Scientific
Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)	11885084	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
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	276855	Sigma-Aldrich
Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)	P8139	Sigma-Aldrich

参考文献

Favata, MF, et al., Identification of a Novel Inhibitor of Mitogen-activated Protein Kinase Kinase *Journal of Biological Chemistry* **273** 18623-18632 (1998)

产品信息

Smart Imaging System ECLIPSE Ji

ECLIPSE Ji是AI-Driven全自动成像系统。与NIS-Elements SE结合使用，可使图像获取、分析及图表创建无缝自动执行。搭载CellFinder.ai，在需要人工精准判断的自动对焦设置中，由AI找到最佳焦平面。实装了学习多种图像获取以及分析流程方法的AI，由此大幅度削减设置和优化的工序数，任何人都能轻松获得结果。

显微图像处理软件NIS-Elements SE SmartExperiment Basic Set Intensity Measurement

- ✓ 从图像的获取到分析及图表显示可全自动执行。
- ✓ 可全自动轻松分析细胞核、细胞、细胞质区域的荧光强度。
- ✓ 可一键创建报告，并以PDF形式输出图像、分析结果、剂量反应曲线、EC₅₀/IC₅₀计算结果。
- ✓ 使细胞成像和分析更轻松、更快捷。

