



APPLICATION NOTE

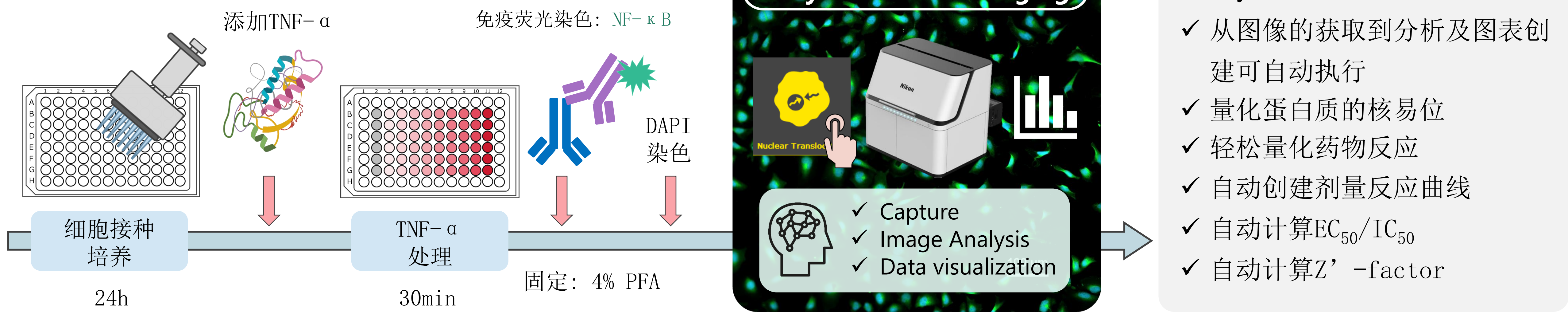
Smart Imaging System ECLIPSE Ji
显微图像处理软件NIS-Elements SE
Nuclear Translocation (Option)

使用AI-Driven全自动智能成像系统ECLIPSE Ji 进行的核易位分析

ECLIPSE Ji搭载了Smart Experiment，与显微图像处理软件NIS-Elements SE结合使用，从图像获取到分析及图表创建可自动执行。训练有素的Artificial Intelligence (AI)和预定义成像流程自动优化图像获取和分析条件的设置，因此通过简单的操作即可获得可视化数据和EC₅₀信息。转录因子NF-κB作为癌症和炎症性疾病的药物标的广为人知。激活的NF-κB从细胞质转移到细胞核，并诱导与疾病相关的基因表达。本应用指南中，介绍使用Smart Experiment的Nuclear Translocation模块，量化TNF-α刺激后的NF-κB从细胞质向细胞核的易位。

关键词：核易位、信号传导、抗癌药、抗炎药、自动设置、EC₅₀、剂量反应曲线

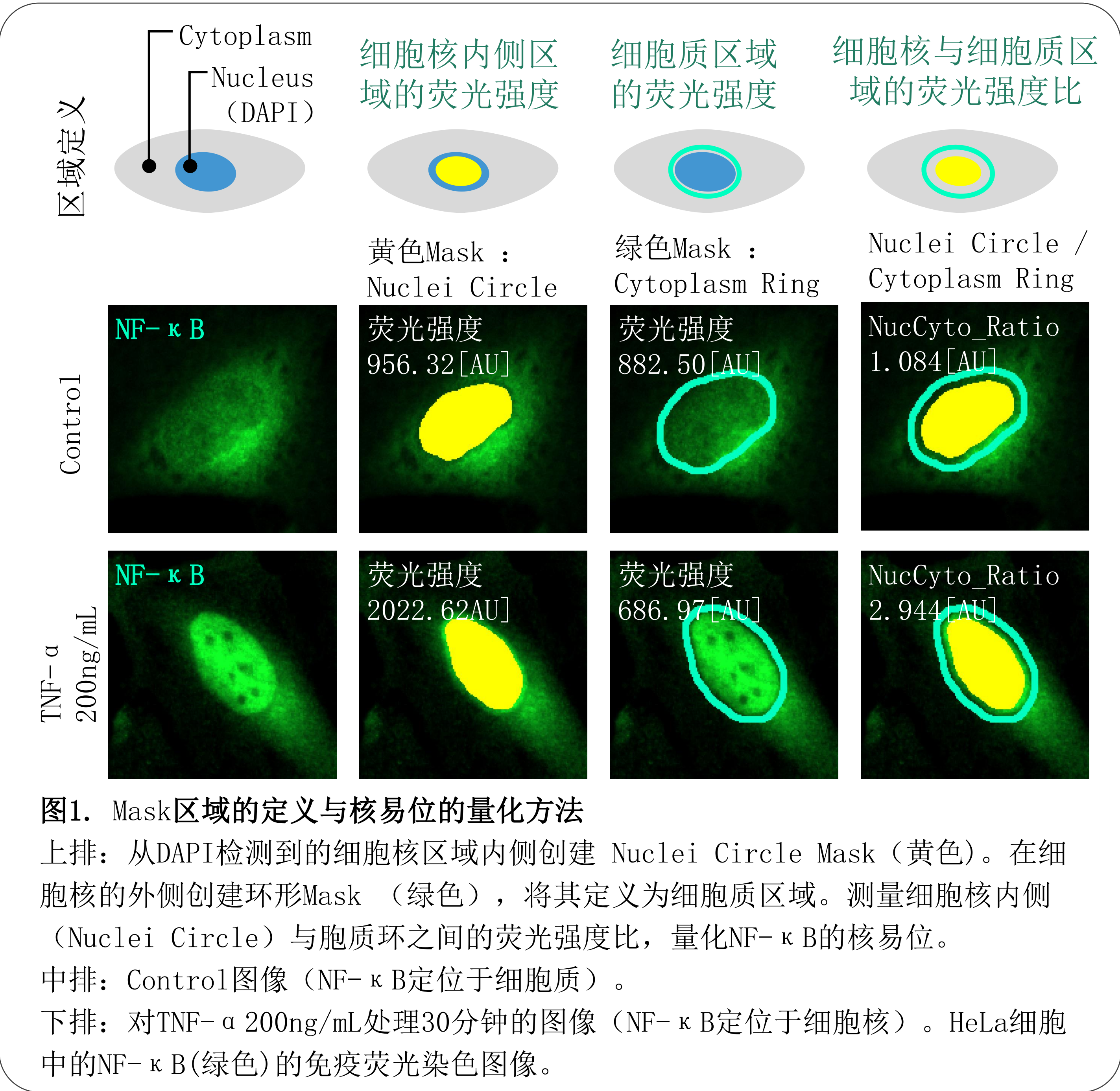
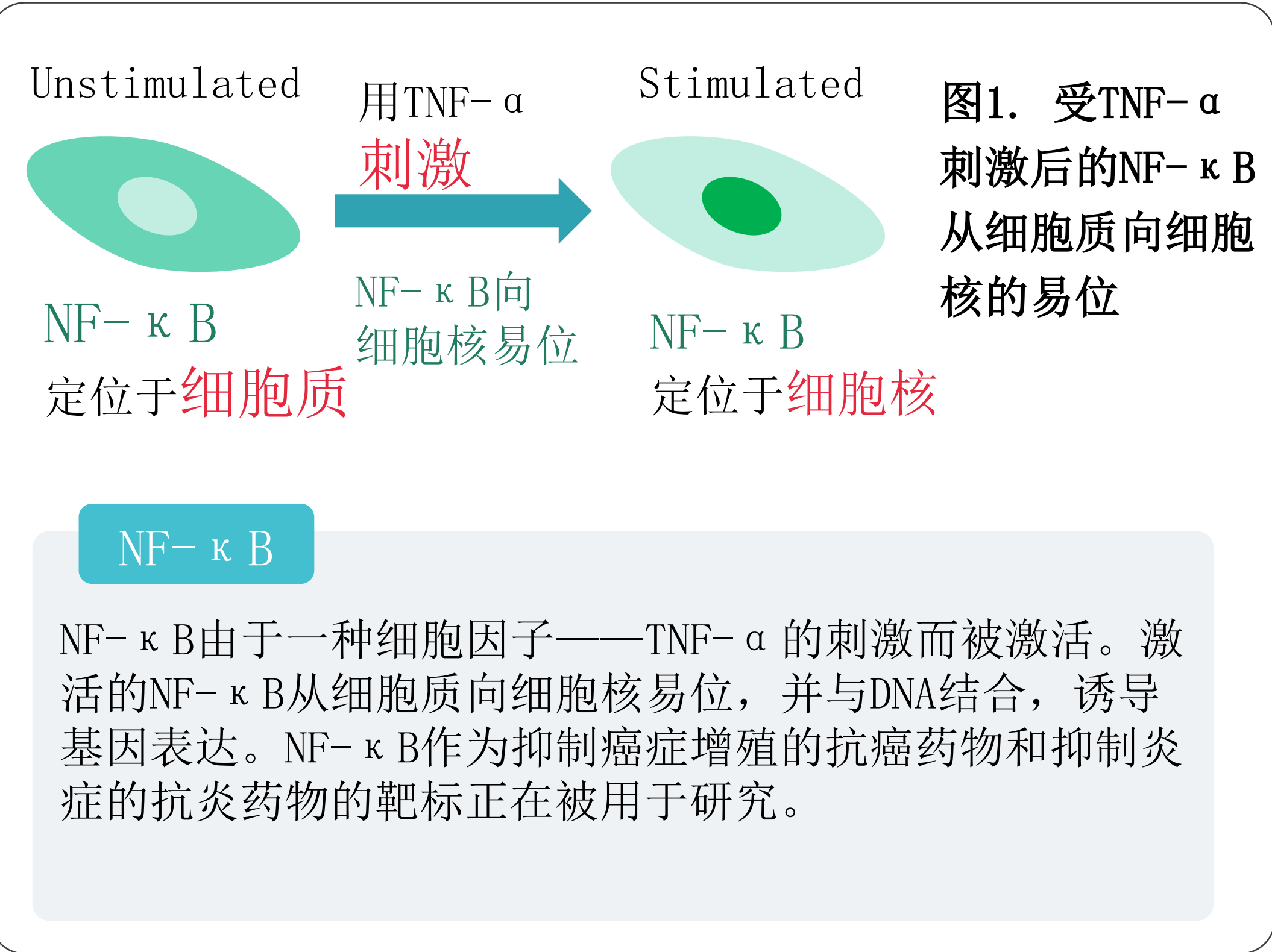
实验概要



(1) 将HeLa细胞接种到96孔板中，培养24小时。(2) 将受试物TNF-α调整成10种梯度浓度，添加到各孔中，培养30分钟。(3) 用4% PFA固定细胞。用0.1% Triton X-100进行膜透化。(4) 用Rabbit anti NF-κB p65 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。(5) 将孔板放置到ECLIPSE Ji中，选择Nuclear Translocation图标，执行图像获取和分析，测量了NF-κB从细胞质向细胞核的易位。

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 × 0.88 mm	

表1. 检测区域、荧光标记和图像获取条件



结果

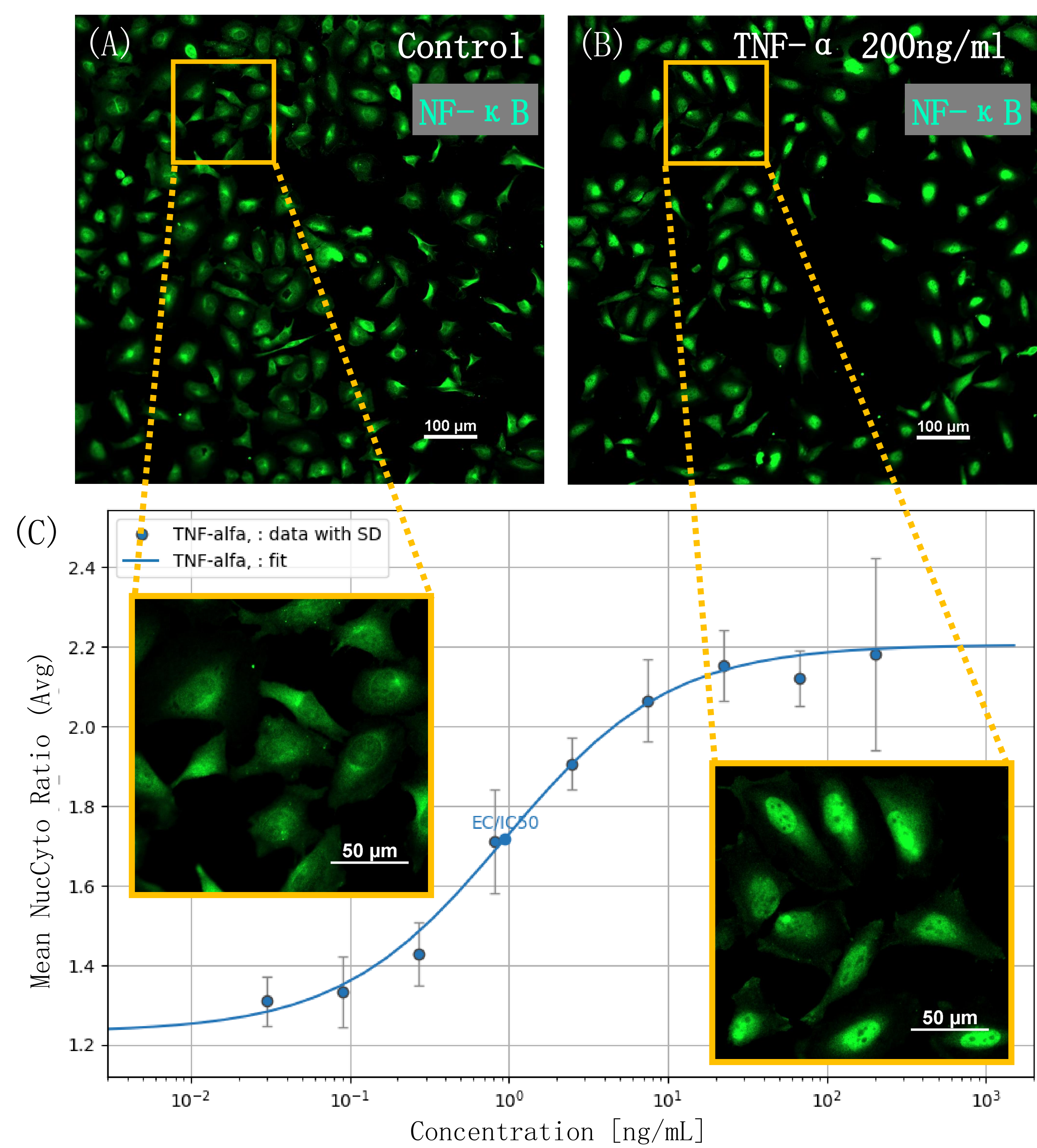
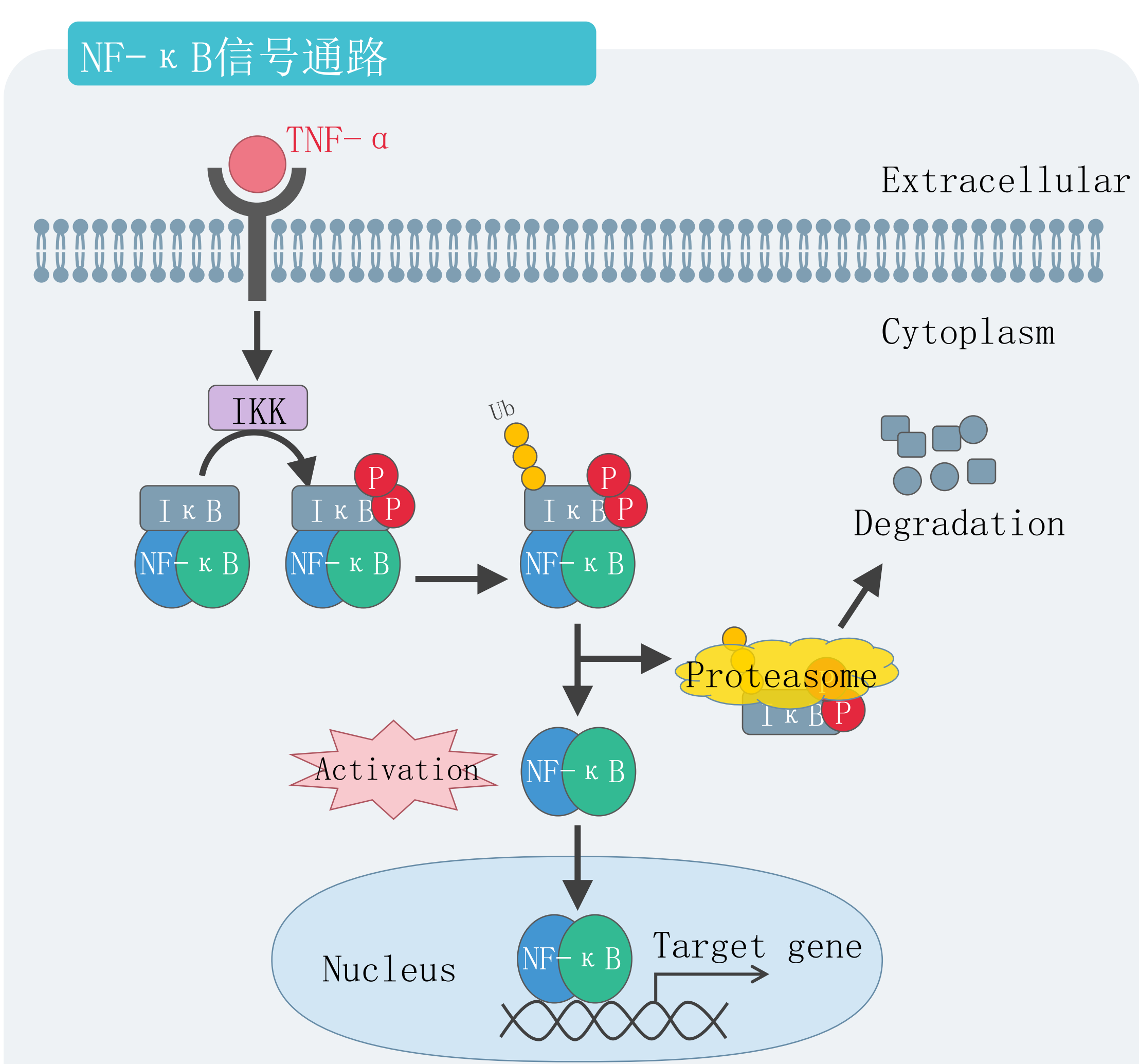


图2. 对照和TNF-α 处理30分钟的HeLa细胞的图像及剂量反应曲线
(A, B) HeLa细胞中NF-κ B (绿色) 的免疫荧光染色图像, 比例尺: 100 μ m。(A) 对照组图像。(B) TNF-α 200 ng/mL处理30分钟的图像。(C) 显示TNF-α 剂量依赖性NF-κ B的核易位增加结果的剂量反应曲线。X轴: 药物浓度 (对数)、Y轴: 细胞核与细胞质的荧光强度比 (平均)、NucCyto Ratio: Nuclei Circle Fluorescence intensity/Cytoplasm Ring Fluorescence intensity 、EC₅₀ = 0.950ng/ml、Z' -factor = 0.724。左图像: NF-κ B定位于细胞质。右图像: NF-κ B定位于细胞核。



当TNF-α 与细胞膜上的TNF受体结合, Iκ B被磷酸化后, Iκ B 将被蛋白酶体降解。Iκ B被降解后, NF-κ B被激活, 并易位到细胞核内。易位到细胞核内的NF-κ B与DNA结合, 诱导参与炎症或癌症增殖的基因表达。其具有促进炎症、阻止细胞凋亡的作用, 是炎症性疾病或癌症的发病原因。

总结

- ✓ 通过核易位模块, 可量化TNF-α 剂量依赖性NF-κ B的核易位。EC₅₀ 为0.950ng/mL。
- ✓ 通过细胞核与细胞质区域的荧光强度比, 可量化蛋白质的核易位, 并计算出细胞因子和药物的EC₅₀。
- ✓ Smart Experiment从图像的获取到分析及图表显示可全自动执行。
- ✓ CellFinder.ai可自动对焦, 因此无需进行复杂的自动对焦设置。
- ✓ 图像的获取和分析的条件已预先定义, 无需成像领域的专业知识。任何人都能轻松获得分析结果。
- ✓ 操作简单, 将孔板放置到ECLIPSE Ji中, 选择Nuclear Translocation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。
- ✓ 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HeLa细胞按照1x10⁴ cells/well的密度接种到96孔板中, 在37℃、5% CO₂的培养箱内培养24小时。
- 2) 用培养基将TNF-α 稀释为0、0.03、0.09、0.27、0.82、2.47、7.40、22.2、66.7、200 ng/ml的浓度, 将含0.1% BSA的各浓度培养基分别添加到6个孔中。在37℃、5% CO₂的培养箱内用TNF-α 处理细胞30分钟。
- 3) 用PBS清洗细胞1次。
- 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0.1% Triton X-100、0.1% BSA in PBS添加到孔中, 在室温下静置5分钟, 进行膜透化。
- 7) 用PBS清洗细胞3次。
- 8) 将用含0.1% BSA的PBS稀释后的第一抗体 (1: 200) 添加到孔中, 在室温下静置1小时。
- 9) 用PBS清洗细胞3次。
- 10) 将用含0.1% BSA的PBS稀释后的第二抗体 (1:500) 添加到孔中, 在室温下静置1小时。
- 11) 用PBS清洗细胞3次。
- 12) 将DAPI (2 μ g/ml) 添加到孔中, 在室温下静置5分钟。
- 13) 用PBS清洗细胞3次。

材料和试剂

细胞培养																																																																																																																						
细胞	HeLa (RIKEN RCB0007)																																																																																																																					
增殖培养基	MEM + 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																																																																																																																						
物质	TNF-α																																																																																																																					
试验浓度	Negative control: 0ng/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																																																																																																																					
孔板图示例	<table><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> “b” : blank well		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																																																																																																										

试剂		
产品名称	产品目录编号	厂商名称
Recombinant Human TNF-α	300-01-A	PeproTech
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

□ 适用容器*

- 24-well plate * 仅适用玻璃底的孔板。
- 96-well plate

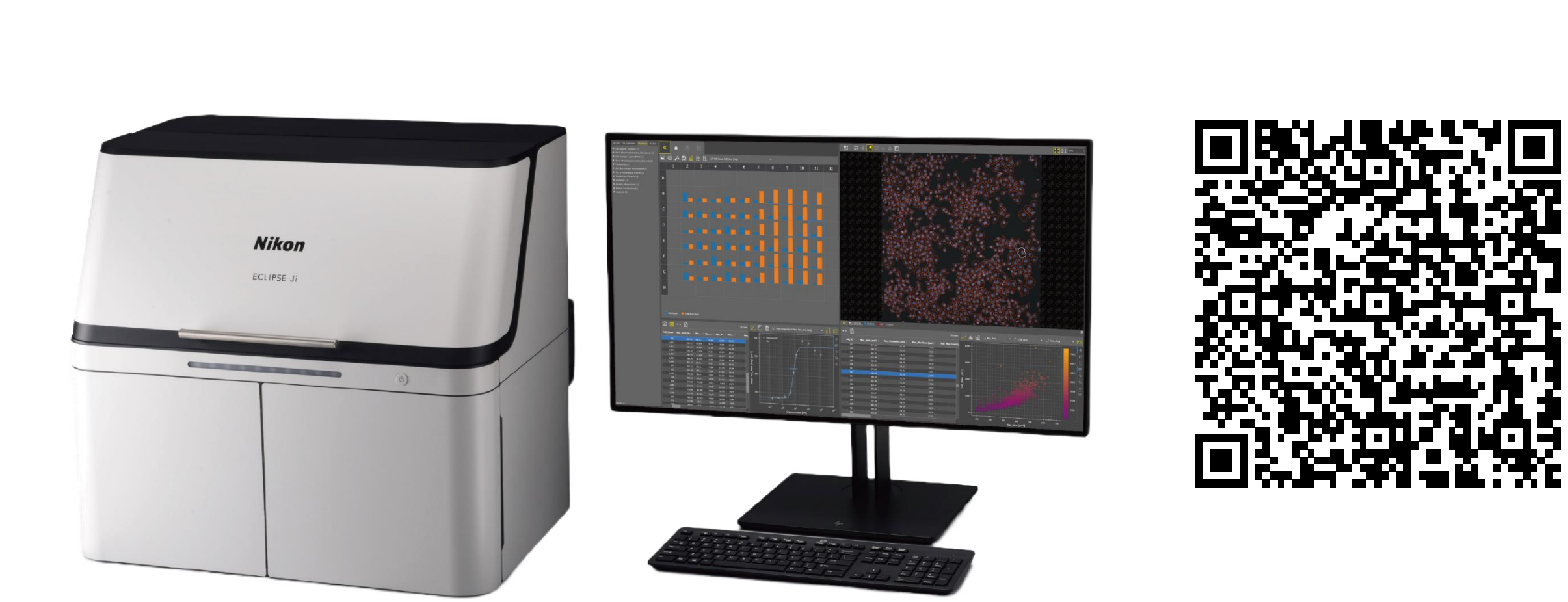
参考文献

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

产品信息

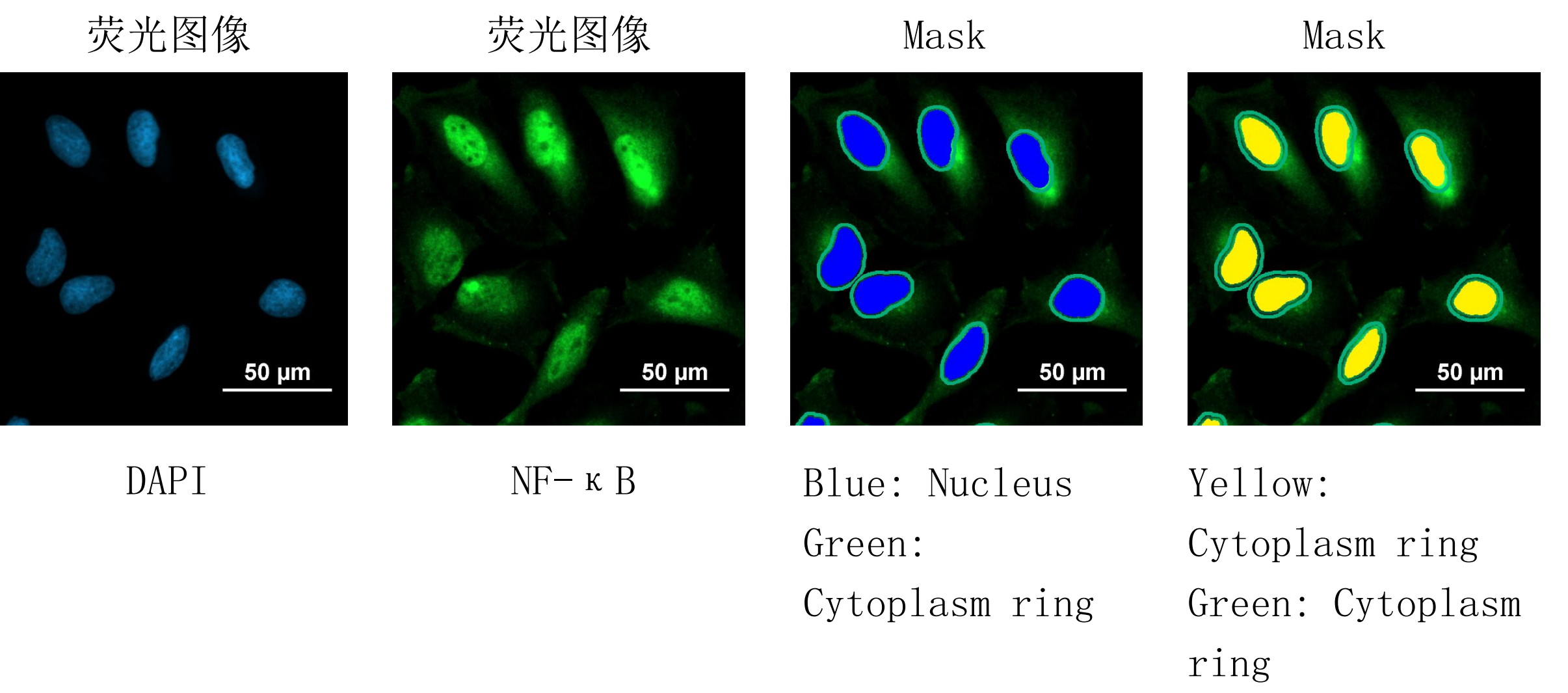
Smart Imaging System ECLIPSE Ji

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，在需要人工进行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 Nuclear Translocation (Option)

- ✓ 从图像的获取到分析及图表显示可全自动执行。
- ✓ 可全自动轻松分析蛋白质从细胞质向细胞核的易位。
- ✓ 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的计算结果。
- ✓ 使细胞成像和分析更轻松、更快捷。



通过Smart Experiment实现实验自动化，减少工序数

