

開始時間までお待ちください



Bringing Valuable Solutions from Around the World to your Lab.

蛍光イメージングスキャナー

Odyssey[®] イメージングシステム

For quantitative & reproducible high-quality western blot
data analysis

株式会社スクラム プロダクト営業
稲葉 亮平

LI-COR[®]

本日の内容

- 定量ウェスタンブロットの最新の論文投稿規定
- 蛍光法ウェスタンと化学発光法ウェスタンの違いについて
- Odysseyシリーズの特徴
- Odyssey Mのアプリケーション例
(In-Cell Western、組織切片イメージングなど)
- 最新の定量解析ソフトウェア



シグナル検出方法



イメージング



アッセイ
バリデーション



データ解析



×

LI-COR®

テクニカルサポート

**Be More Confident In Your
Data Than Ever Before**

データにより確信を



どのような実験データを求めていますか？



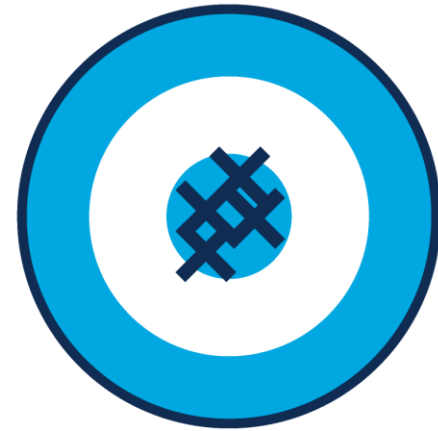
バラつきの大きい
不正確なデータ



正確だが
バラつきの大きいデータ

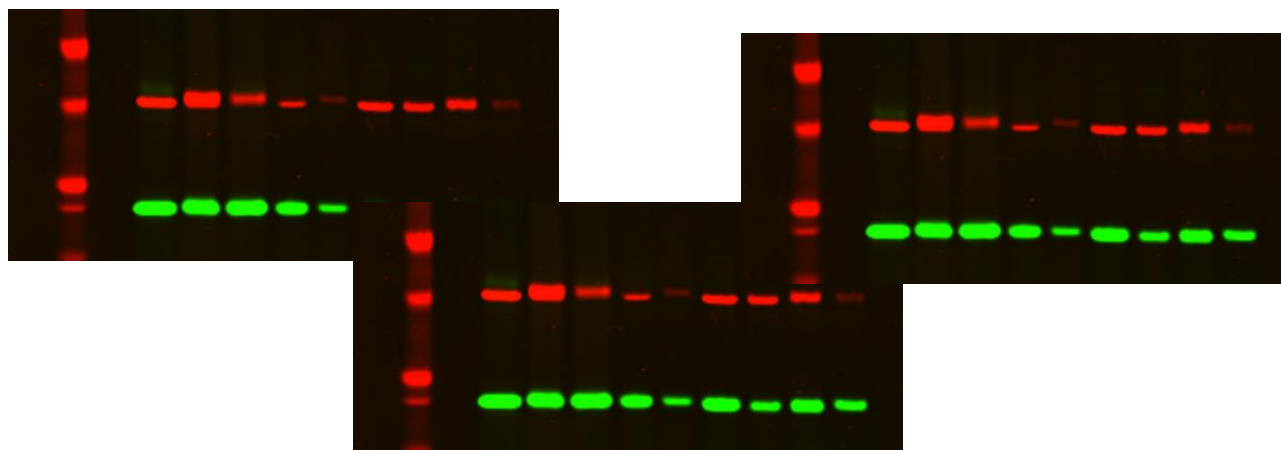
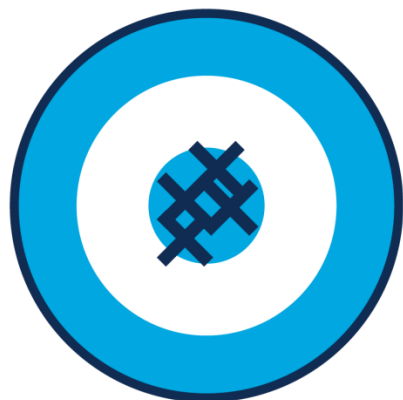
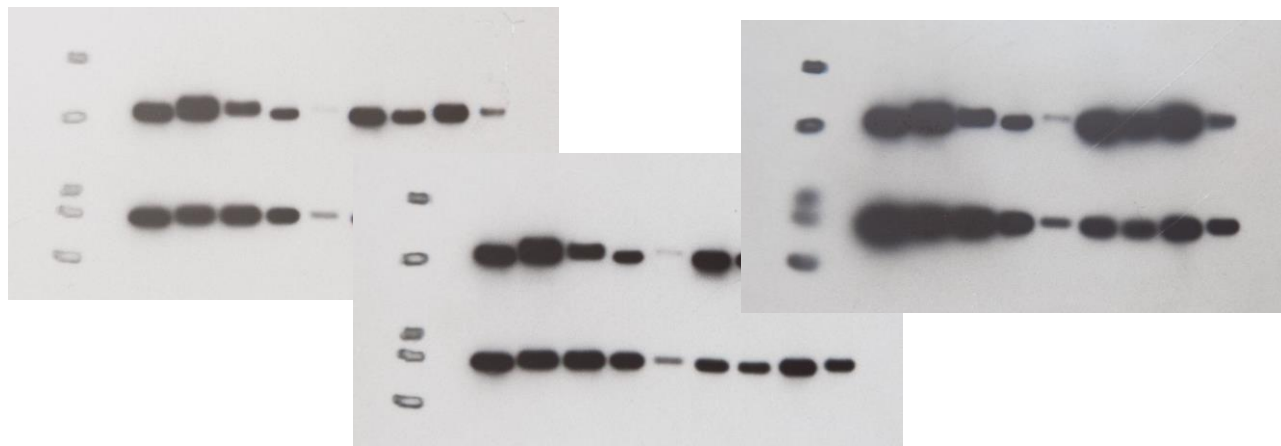


バラつきは小さいが
不正確なデータ



バラつきが少なく
正確なデータ

再現性の高い実験と常に均一な画像取得



本日の内容

- 定量ウェスタンブロットの最新の論文投稿規定
- 蛍光法ウェスタンと化学発光法ウェスタンの違いについて
- Odysseyシリーズの特徴
- Odyssey Mのアプリケーション例
(In-Cell Western、組織切片イメージングなど)
- 最新の定量解析ソフトウェア

定量ウェスタンブロットの論文投稿規定

The screenshot shows the JBC (Journal of Biological Chemistry) website. The navigation bar includes links for HOME, COLLECTING AND PRESENTING DATA, WRITING YOUR MANUSCRIPT, ETHICS IN RESEARCH AND PUBLISHING, PEER REVIEW AT JBC, PUBLICATION, FURTHER READING, and a button to Read our latest issue at jbc.org. The main content area is titled 'COLLECTING AND PRESENTING DATA' and features a background image of green and yellow biological cells. Below the title, there is a paragraph of text explaining the purpose of the guidelines and a list of 'best practices' topics in a grid format.

JBC JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY

HOME COLLECTING AND PRESENTING DATA WRITING YOUR MANUSCRIPT ETHICS IN RESEARCH AND PUBLISHING PEER REVIEW AT JBC PUBLICATION FURTHER READING Read our latest issue at jbc.org

COLLECTING AND PRESENTING DATA

COLLECTING AND PRESENTING DATA

These guidelines do not presuppose that a perfect experiment or an ironclad conclusion exists. In fact, variation between studies and experiments is an important source of new discoveries. For this reason it is important to report data and experimental conditions as fully and transparently as possible both to verify findings and also to help future researchers identify sources of variation and anomalies.

Depending on the research question being asked or experimental system being used, some of the following "best practices" may not be feasible or appropriate for your study. In that case, exercise the "best practice" of explaining and justifying any deviation from the norm.

THE BASICS	BLOT IMAGES AND QUANTIFICATION	-OMICS DATASETS
DESCRIPTIONS OF BIOLOGICAL MATERIALS	STRUCTURES AND MODELS	ANIMAL AND HUMAN STUDIES
QUANTITATIVE DATA AND STATISTICS	CHEMICALS	GENE EXPRESSION AND GENETIC MANIPULATION
IMAGE DATA	ENZYME ACTIVITY DATA	FACS DATA



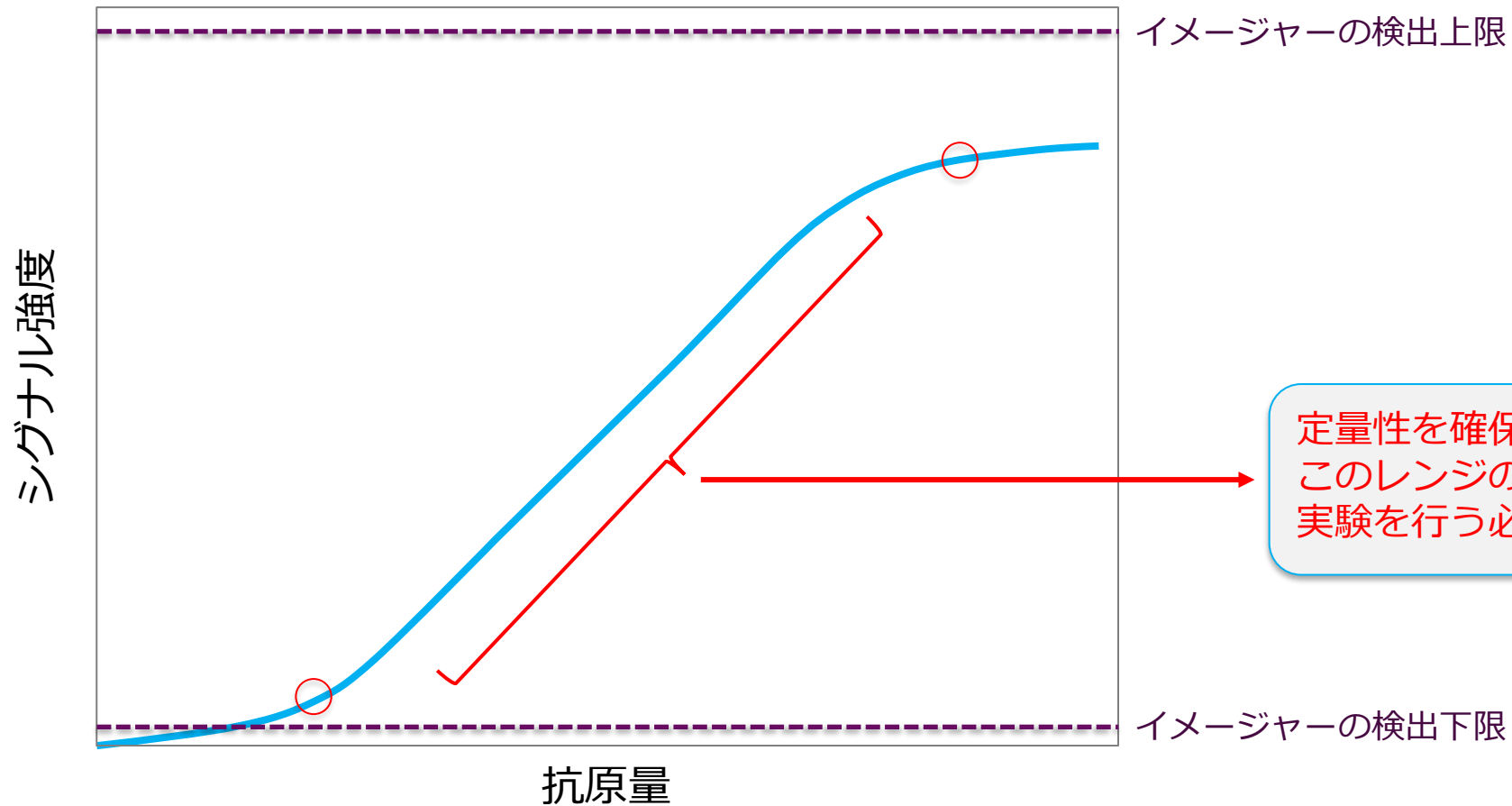
JBCの定量ウェスタンブロットについてのガイドライン

- シグナル強度が泳動した抗原量に対して直線性があるか、ノーマライゼーションをどのようにして行ったのかなど、定量データの算出法を記録して提出する必要がある。いくつかの検出方法（ECLなど）は極めて定量直線性が狭いので注意すべき。
- 可能ならば総タンパク量によるノーマライゼーションを行う（メンブレンを総タンパク質染色試薬で染色）。
ハウスキーピングタンパク質は、実験群間（実験処理間）でその発現量が変わらないことをデータで示さない限り使用するべきではない。
- 翻訳後修飾を認識する抗体による実験では、ターゲットタンパク質のトータルの発現量に対してノーマライゼーションを行う。

ポイント ①

定量直線性の検証

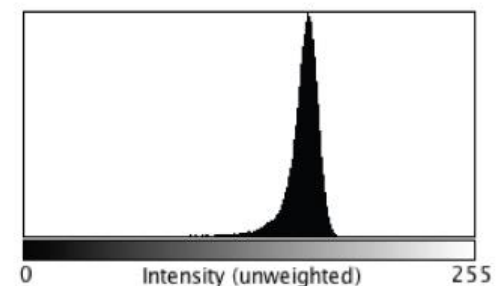
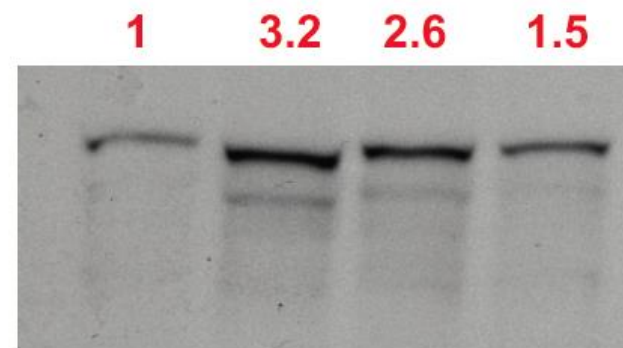
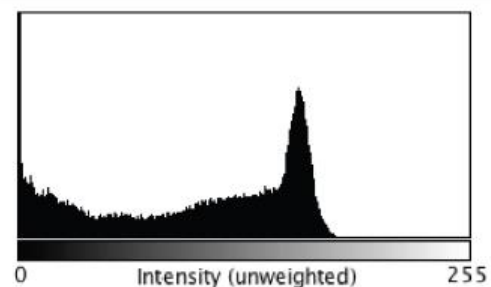
直線性のあるゲルローディング量で実験を行う



ポイント ①

定量直線性の検証

直線性のあるゲルローディング量で実験を行う



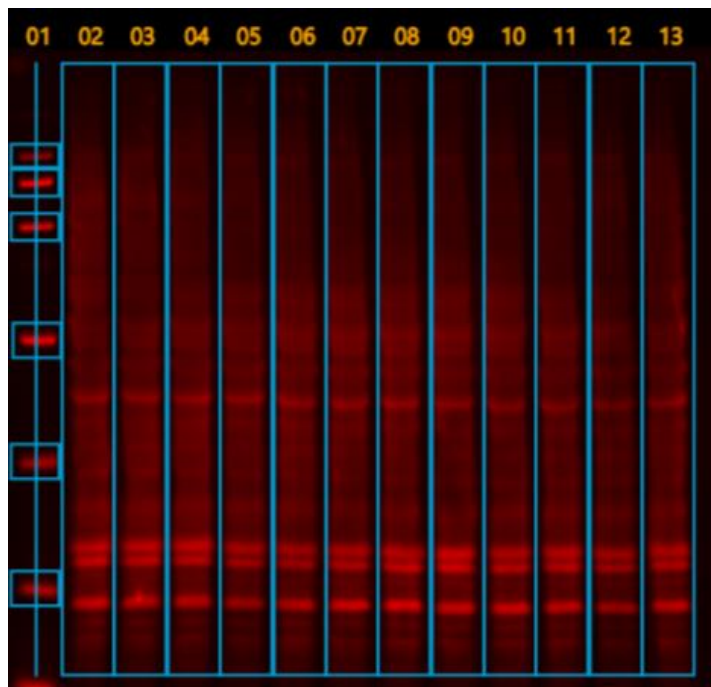
Make sure you are in the linear range of detection of your protein of interest!

ポイント ②

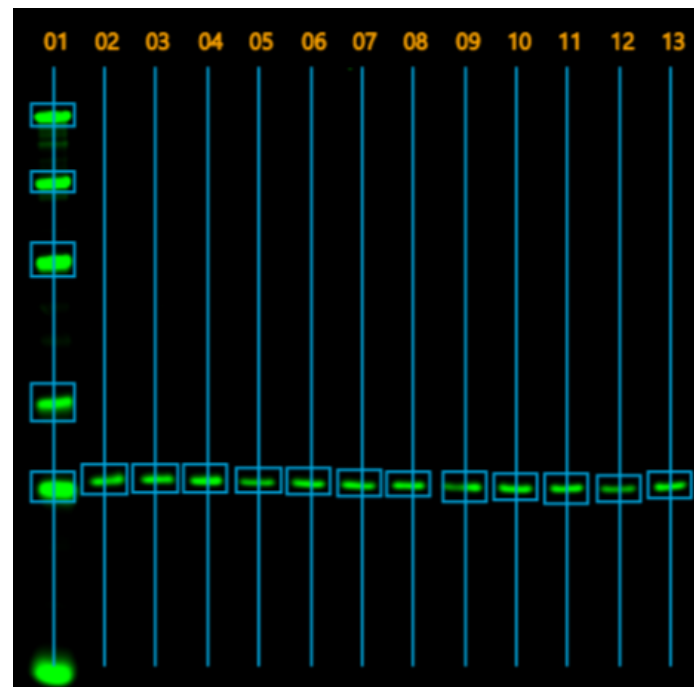
総タンパク質を内部標準とするノーマライゼーション

ハウスキーピングタンパク質はオールマイティーではない

メンブレン上での総タンパク質染色



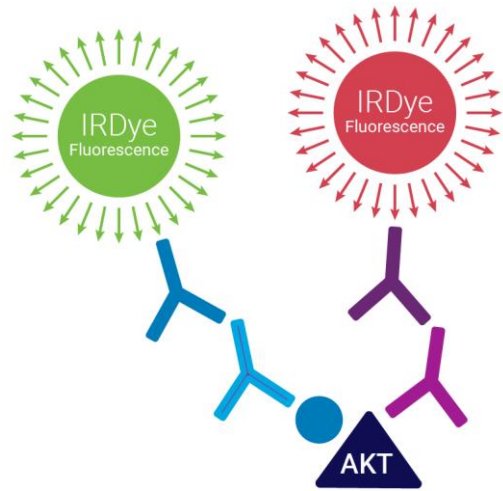
ターゲットタンパク質



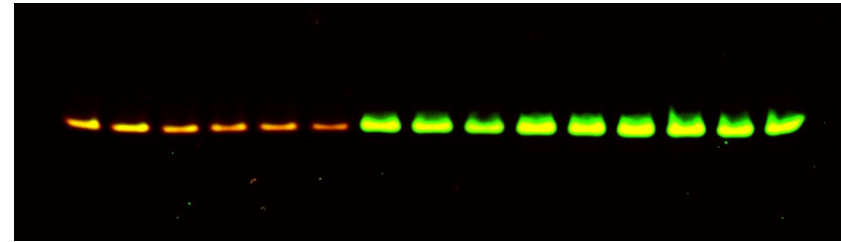
ポイント ③

リン酸化解析におけるノーマライゼーション

同じレーンからリン酸化したタンパク質とトータルのタンパク質を検出する

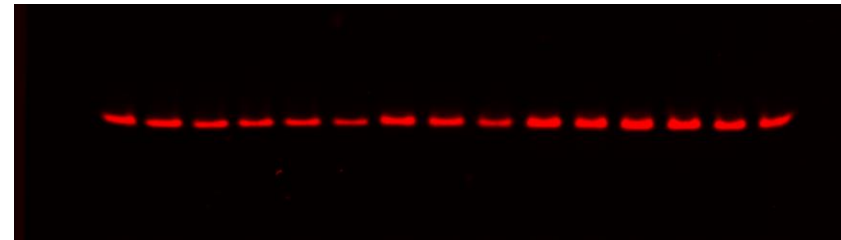


Overlay



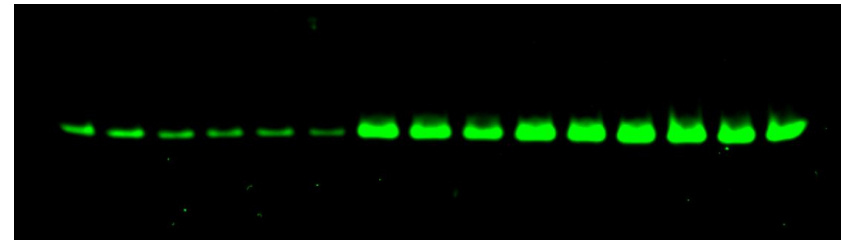
Total Akt
Phospho Akt

700 nm



Akt

800 nm

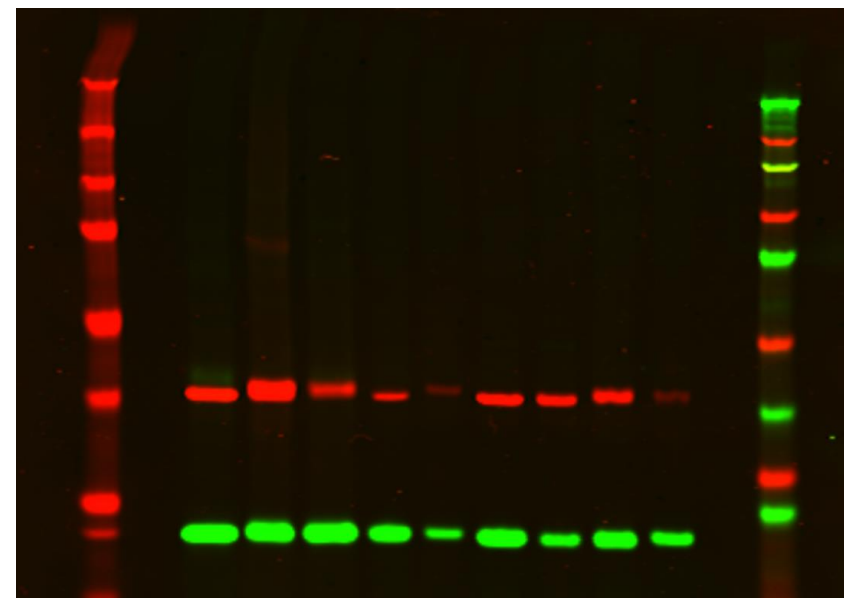


Phospho Akt

蛍光ウェスタンブロット法

こんな方におすすめ

- 最新の論文投稿規定に従った解析を行いたい。
- 定量ウェスタンブロットのデータが安定しない。
- ウェスタンブロットって定量性あるの？
- バンドがぼやける、すぐにサチュレーションする。
- 適したハウスキーピングタンパク質がない。
- リン酸化解析を行っている。



本日の内容

- 定量ウェスタンブロットの最新の論文投稿規定
- 蛍光法ウェスタンと化学発光法ウェスタンの違いについて
- Odysseyシリーズの特徴
- Odyssey Mのアプリケーション例
(In-Cell Western、組織切片イメージングなど)
- 最新の定量解析ソフトウェア



シグナル検出方法



イメージング



アッセイ
バリデーション



データ解析



×

LI-COR

テクニカルサポート

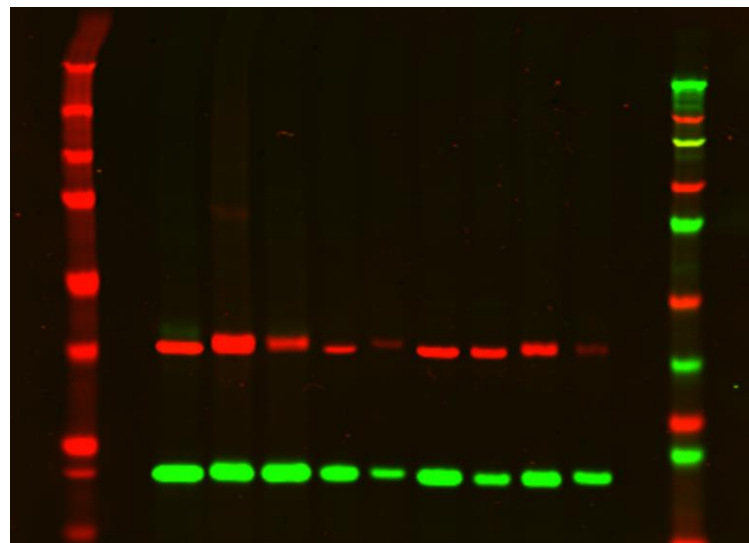
ウエスタンブロットの検出

化学発光

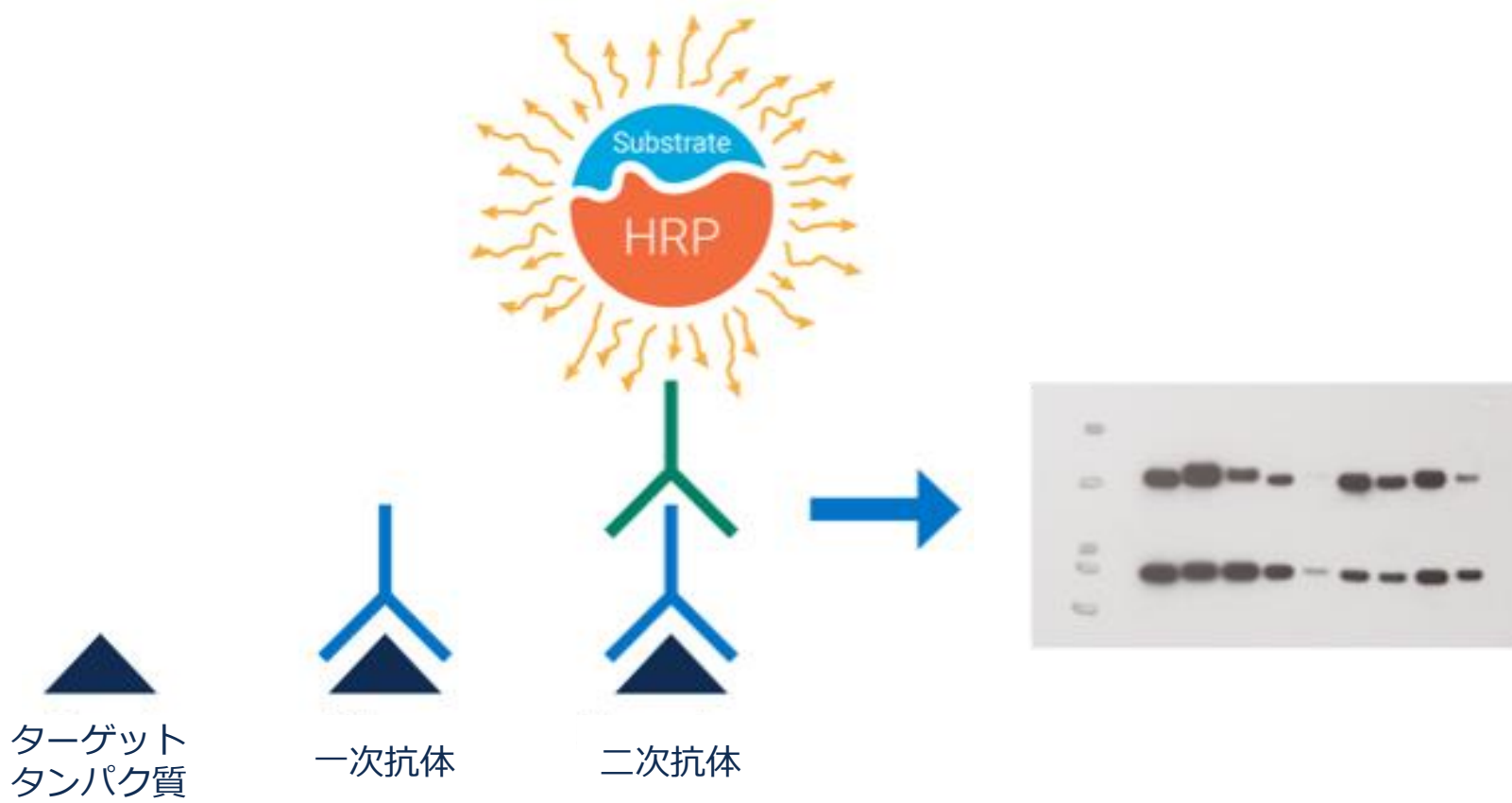


化学発光 = ケミルミ (≒ECL)

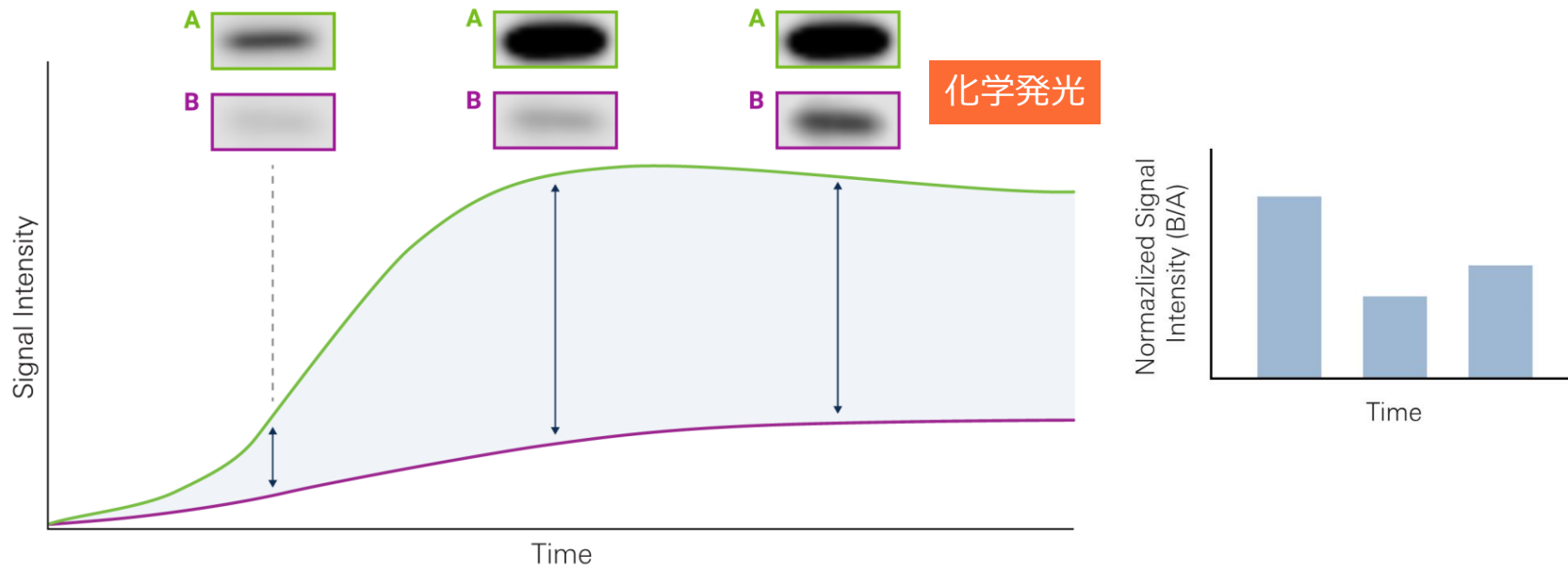
蛍光



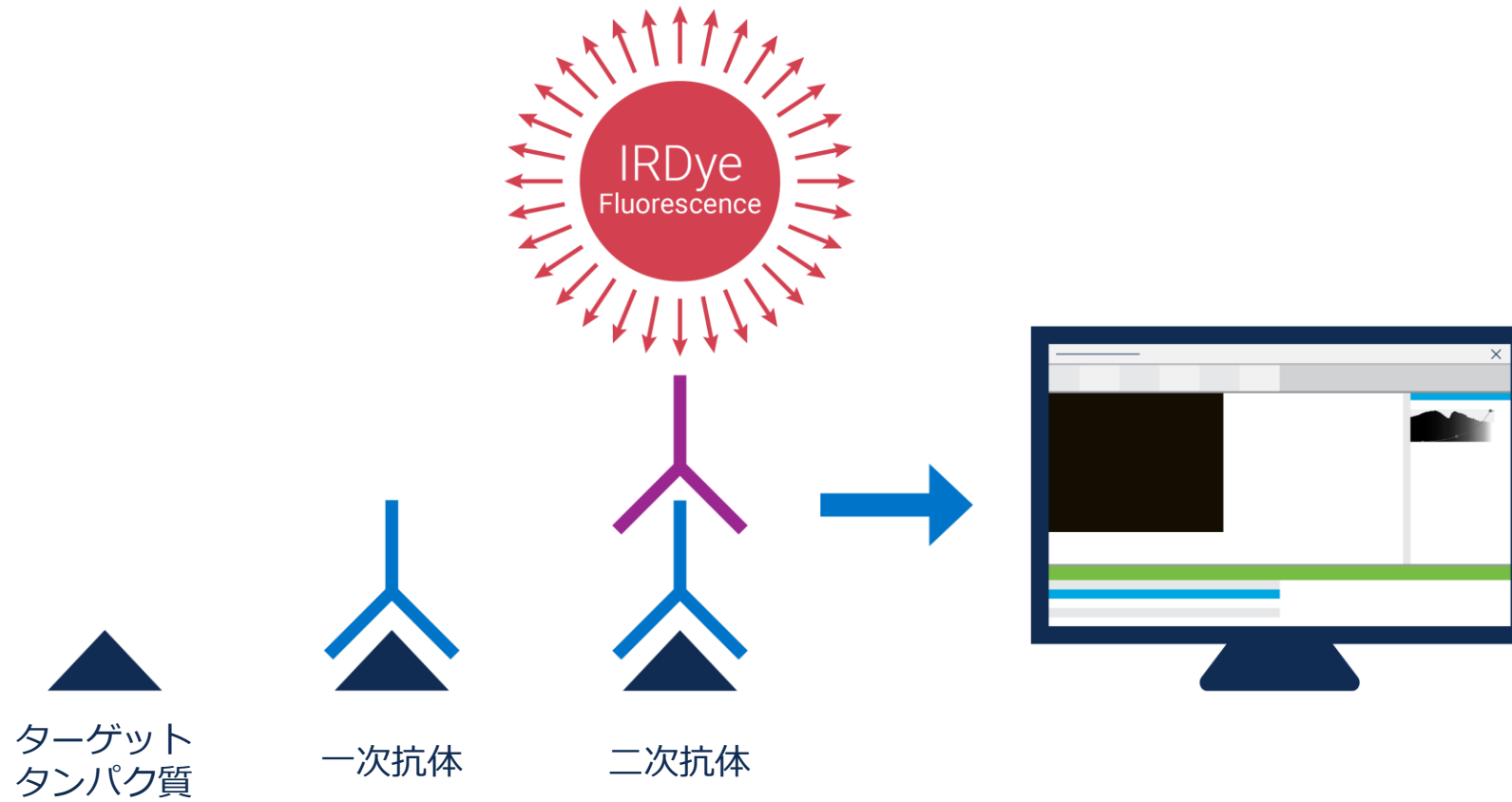
化学発光法 (ケミルミ・ECL法)



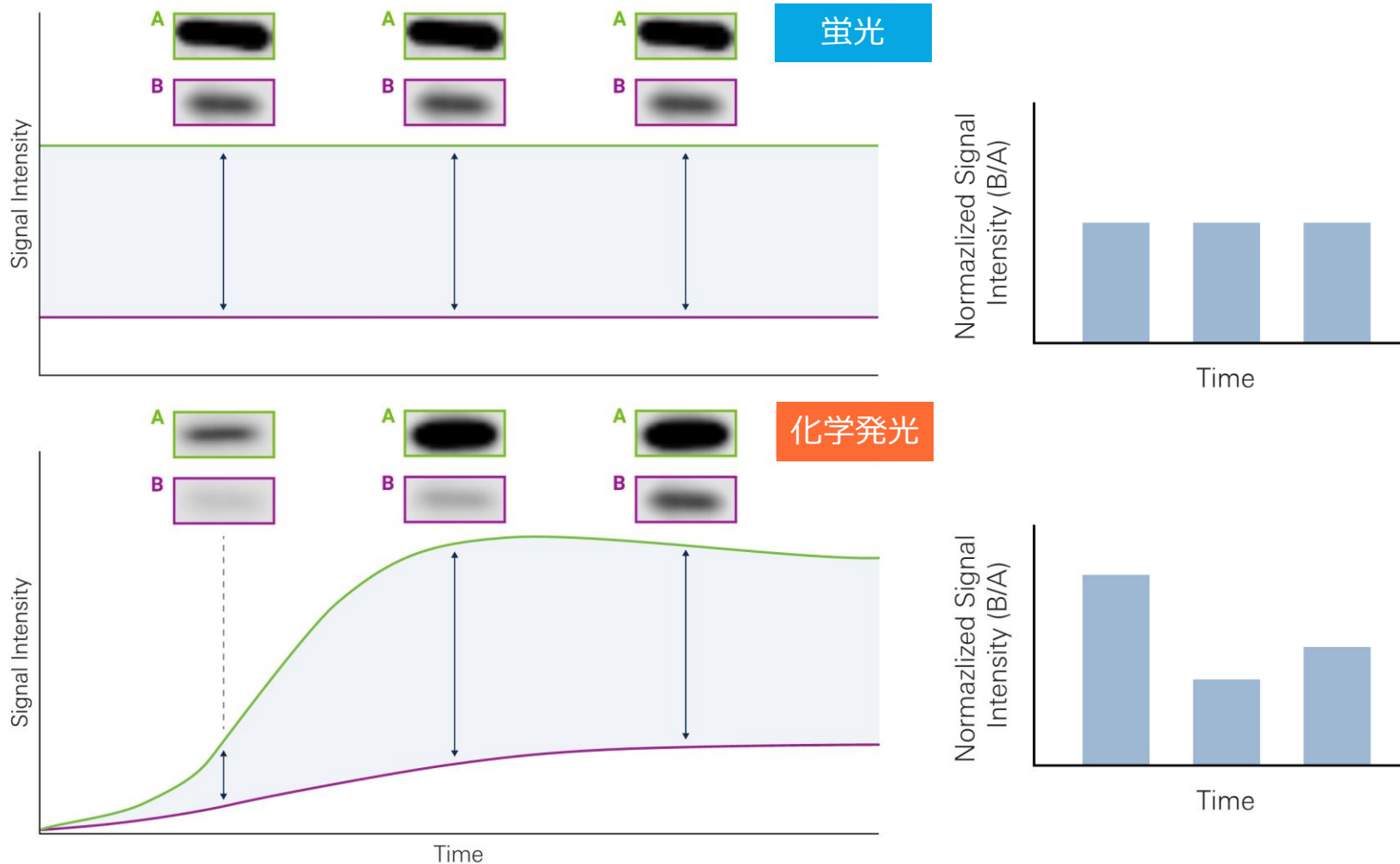
化学発光 = 酵素反応



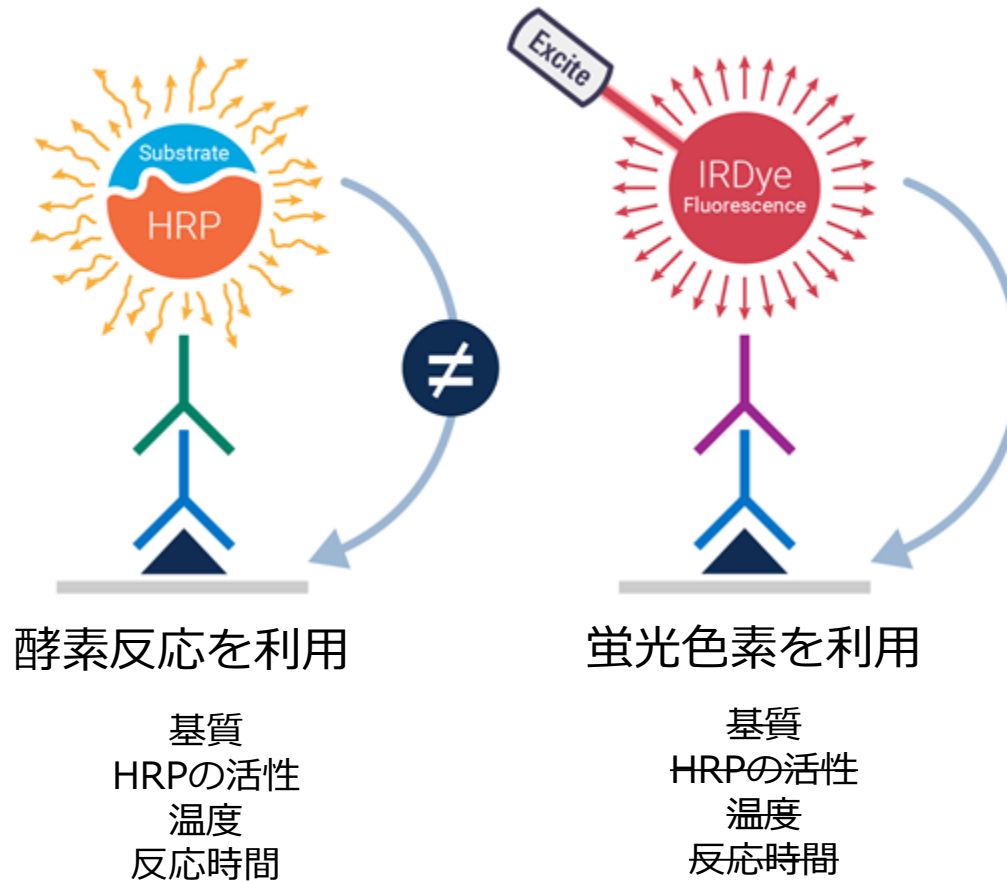
蛍光法



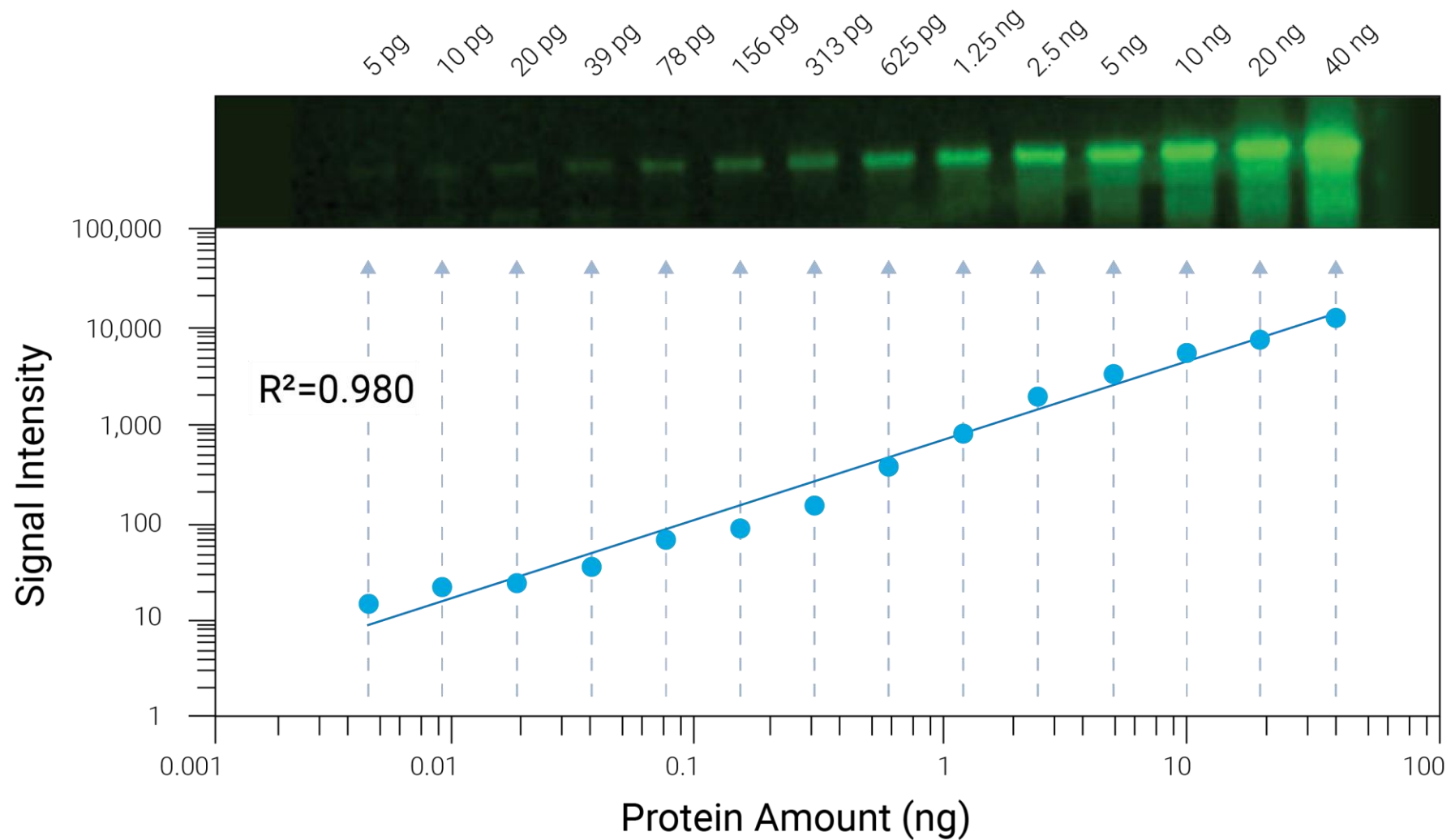
蛍光法は安定したシグナルを得られる



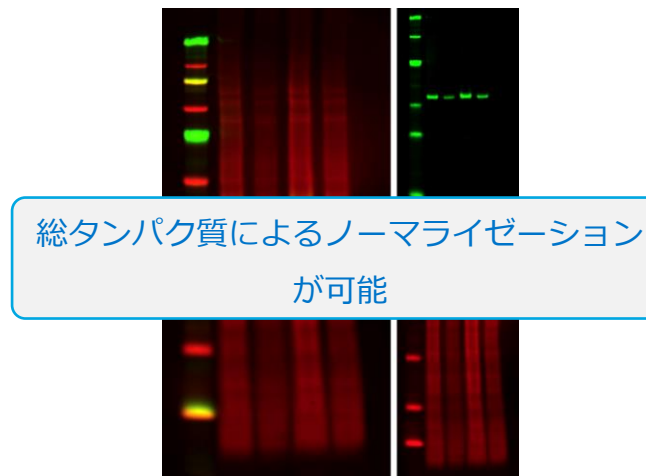
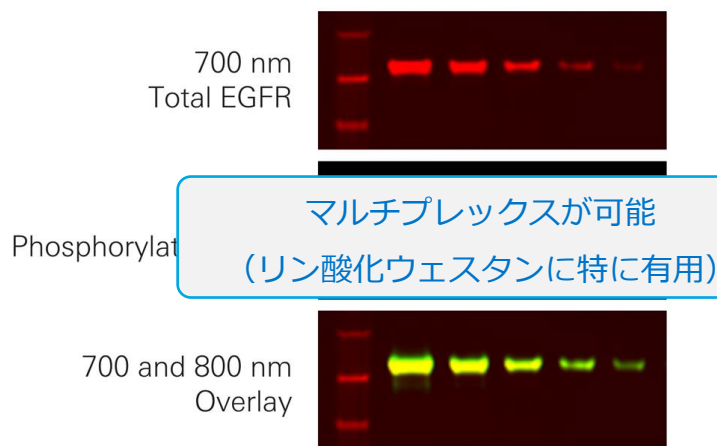
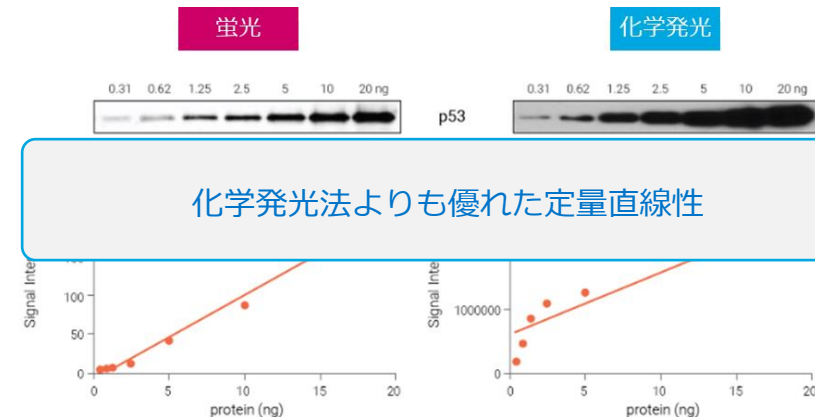
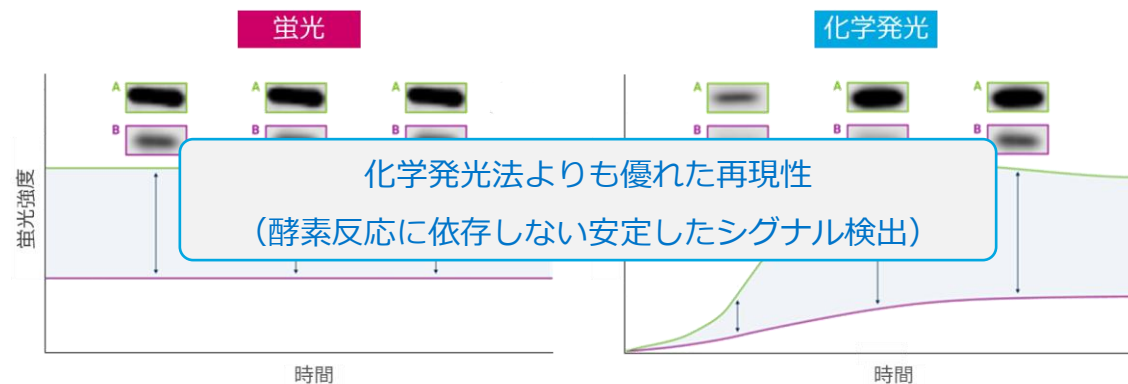
化学発光法 vs 蛍光法



直線性 = 定量性の確保に必須



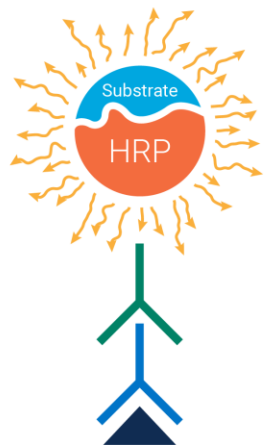
蛍光ウェスタンブロットの利点



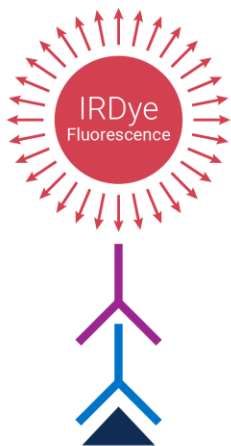
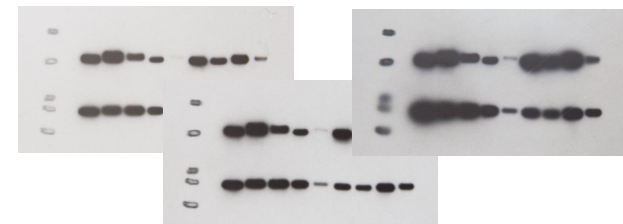
化学発光法の課題

- 酵素反応を利用した検出
 - × 様々なパラメーター（時間、温度など）でシグナル強度が変わる
 - × シグナル強度が抗原量を直接的に反映しない
- 1回の撮影につき1ターゲットのみ検出
 - × ストリッピング&リプロービング
 - × メンブレンをカットして反応させる必要性

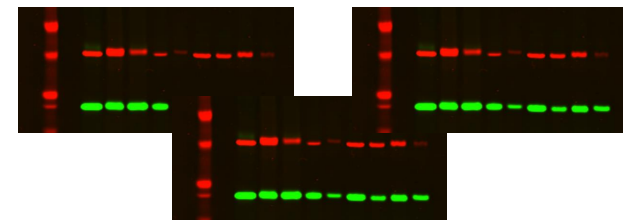
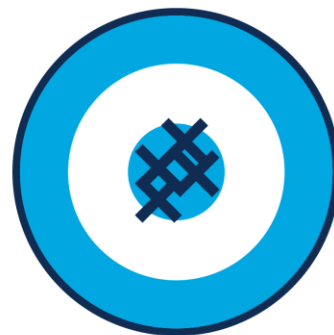
蛍光法は結果のばらつきを最小限にする



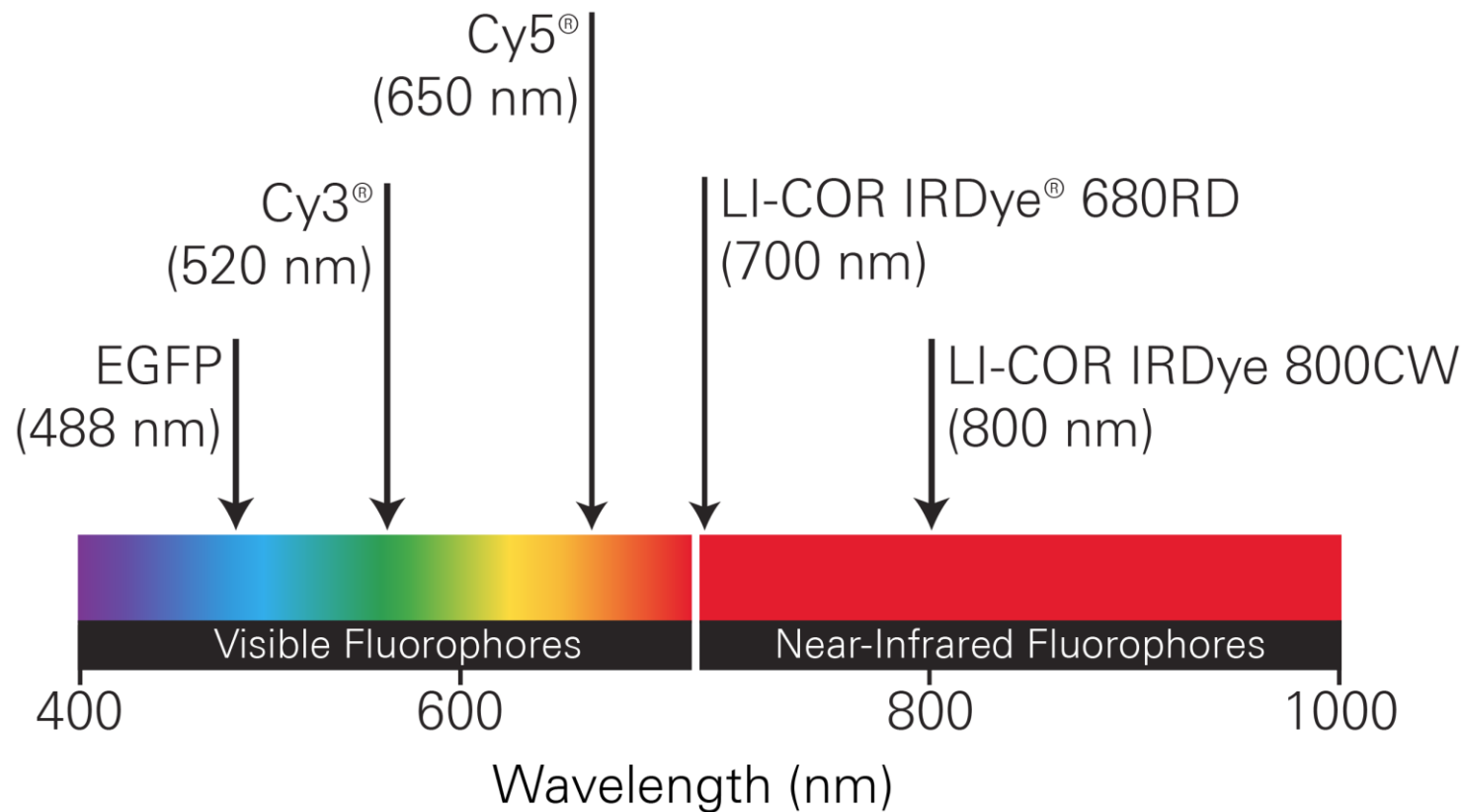
酵素反応 = データのバラツキ



安定したシグナル



検出波長による感度の違い



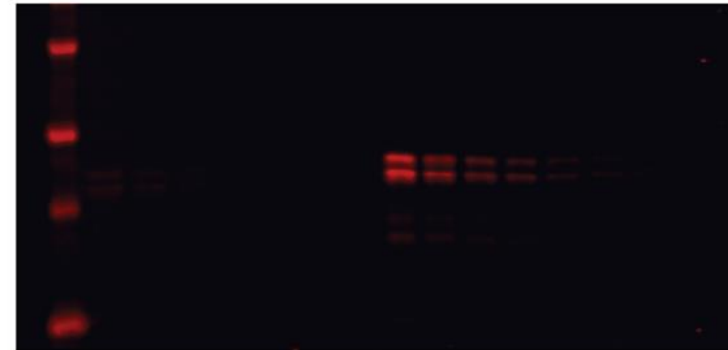
膜由来の自家蛍光

可視波長蛍光 (532 nm)

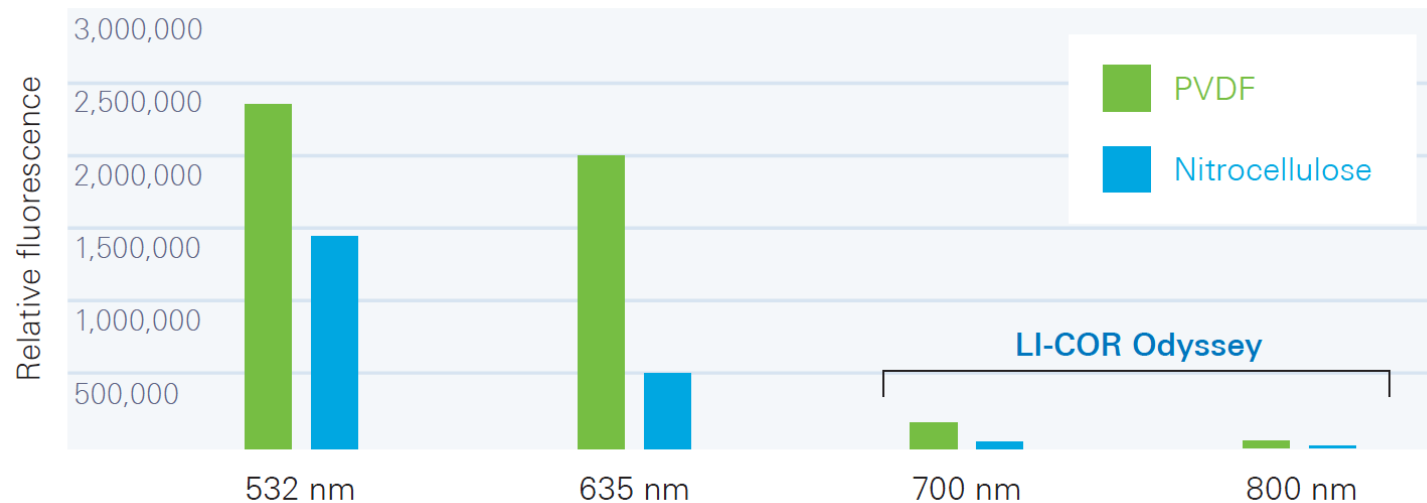


Unstimulated Stimulated

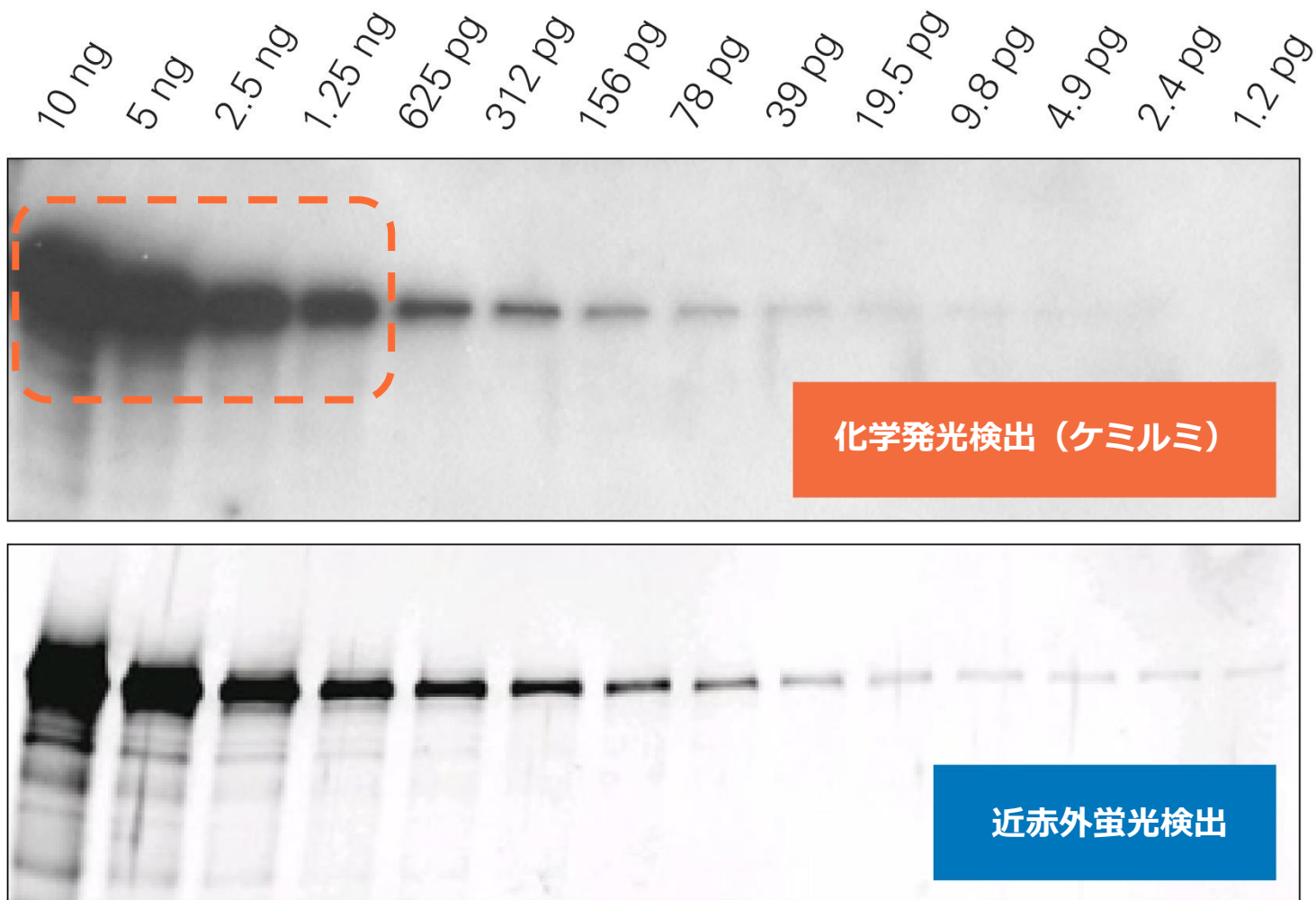
近赤外蛍光 (700 nm)



Unstimulated Stimulated

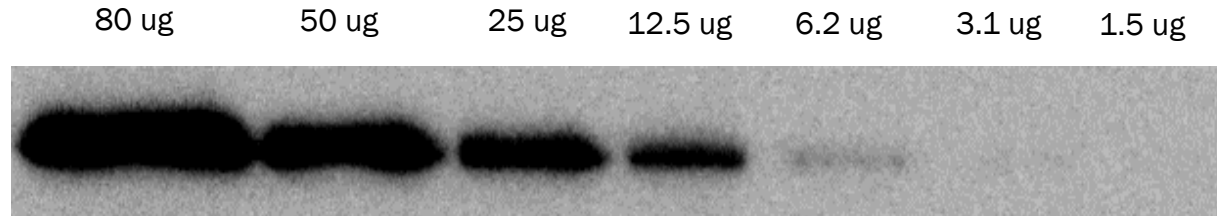


近赤外蛍光 vs 化学発光



Serial dilutions of purified transferrin were detected on nitrocellulose with rabbit anti-Tf primary and IRDye® Secondary Antibody.

近赤外蛍光 vs 化学発光 (感度比較)

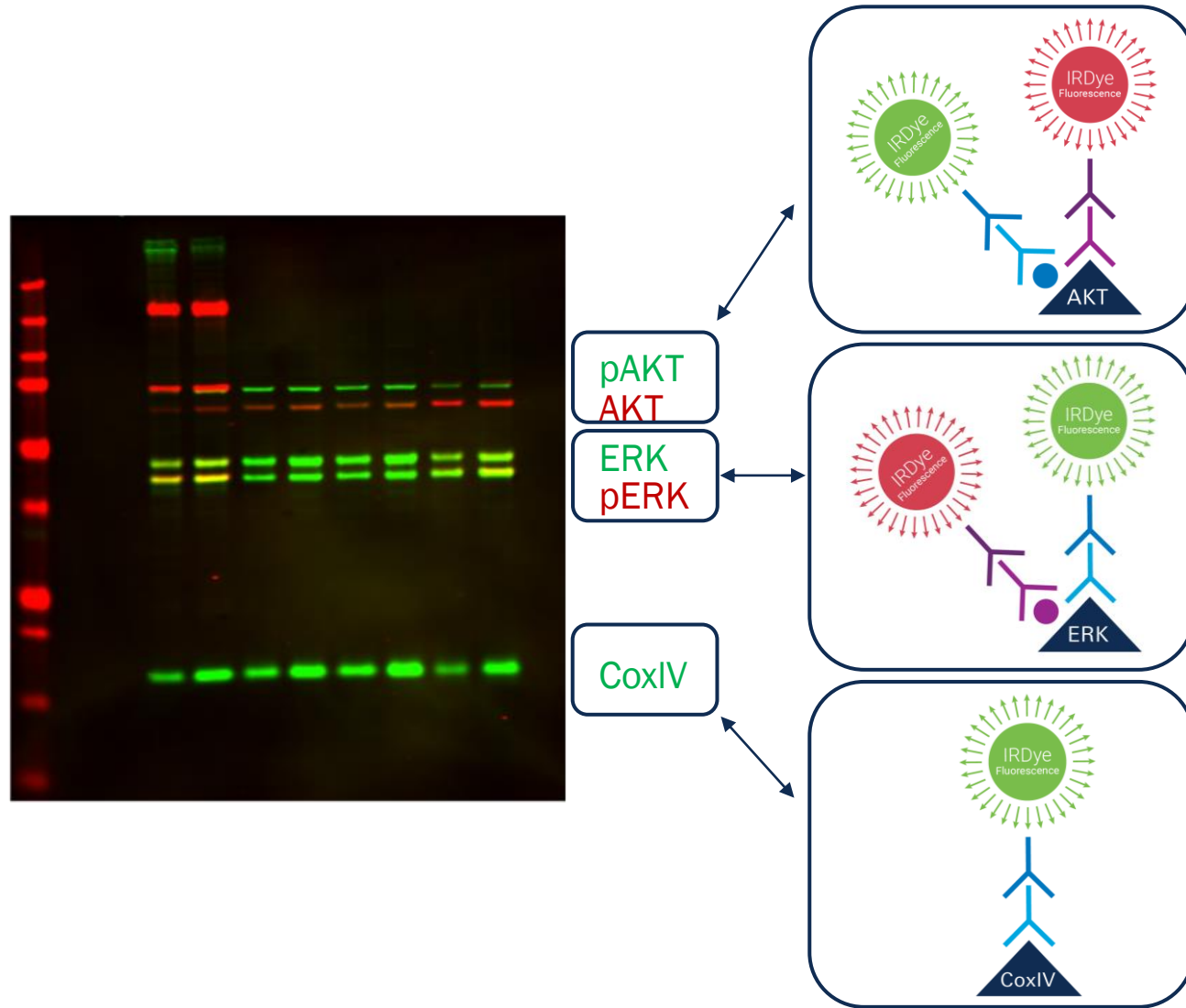


Chemiluminescence on a CCD Camera System
10-minute exposure time



Near-infrared IRDye® 800CW on Odyssey® Imager
5-minute scan time

2ターゲット以上を同時検出するには？



本日の内容

- 定量ウェスタンブロットの最新の論文投稿規定
- 蛍光法ウェスタンと化学発光法ウェスタンの違いについて
- **Odysseyシリーズの特徴**
- Odyssey Mのアプリケーション例
(In-Cell Western、組織切片イメージングなど)
- 最新の定量解析ソフトウェア

Odyssey シリーズ



Odyssey XF



Odyssey DLx



Odyssey M



シグナル検出方法



イメージング



アッセイ
バリデーション



データ解析

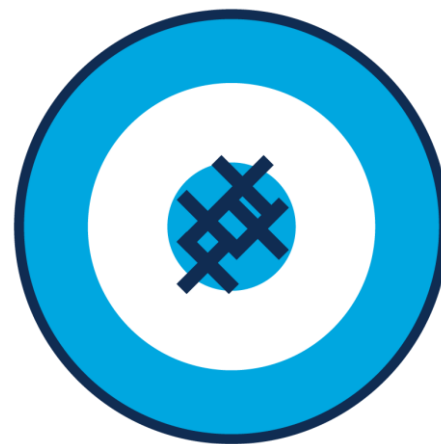


×

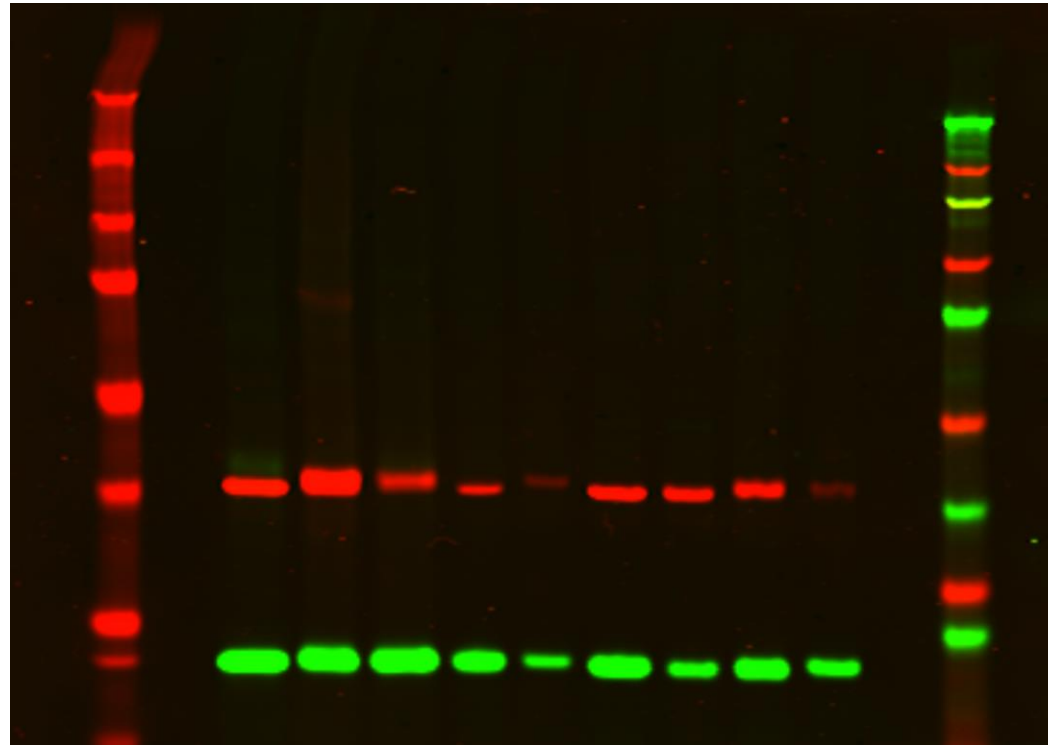
LI-COR

テクニカルサポート

常に再現性高く画像を取得するには？



常に1回の露光ですべてのデータを得ること
(露光時間の調整をしないこと)



どうすればそれを達成できる？

世界的な
導入実績と歴史

レーザー励起による
高感度イメージング

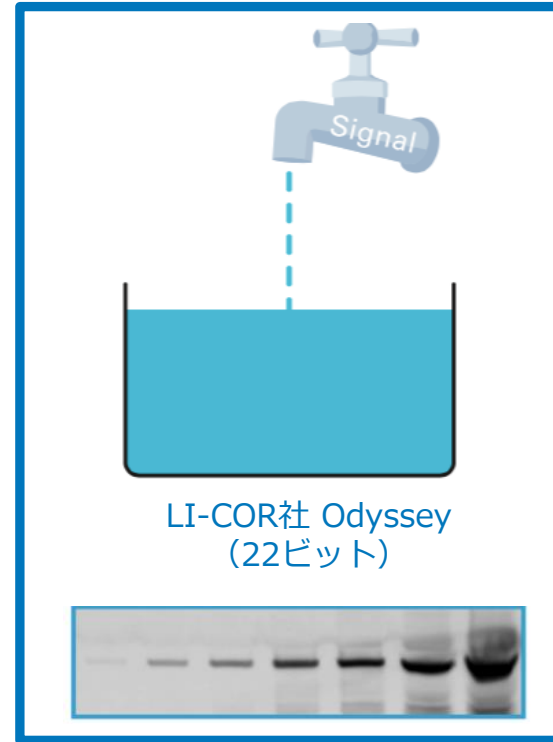
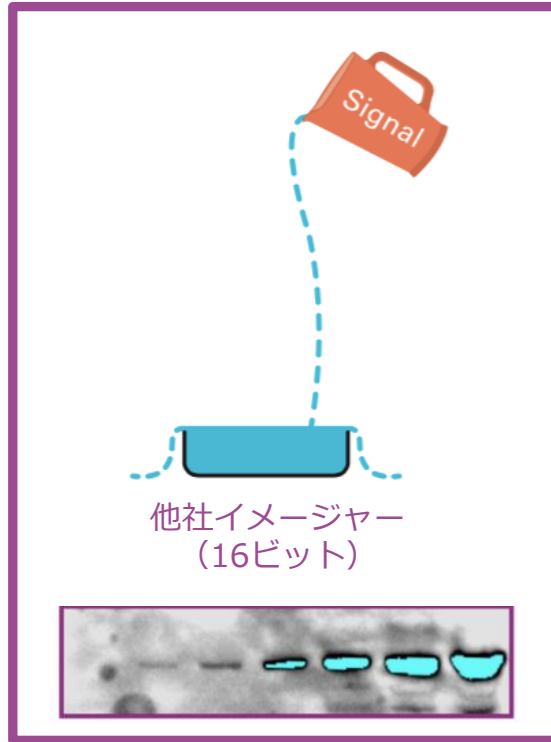
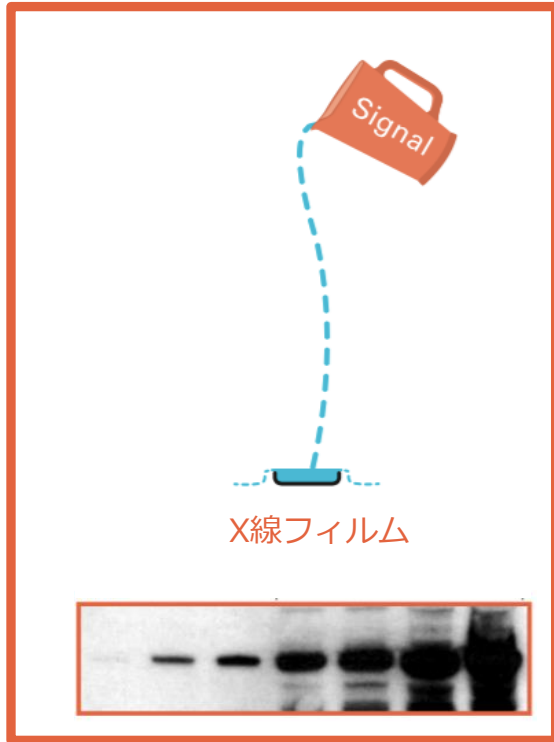
> 6桁の
ダイナミックレンジ



今までにない
ソフトウェア

撮影エリア全体で
均一な撮影が可能

>6桁の広いダイナミックレンジ



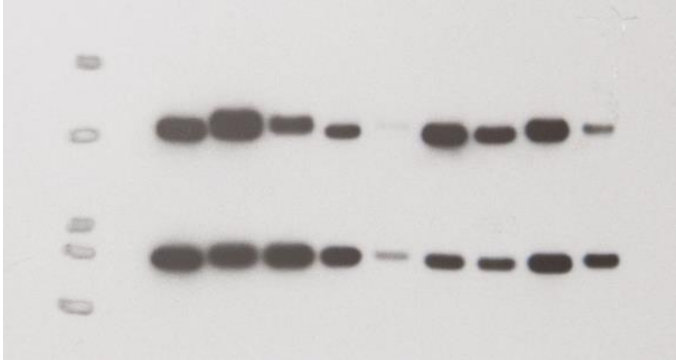
X線フィルム (1.5桁)

他社イメージャー (4桁)

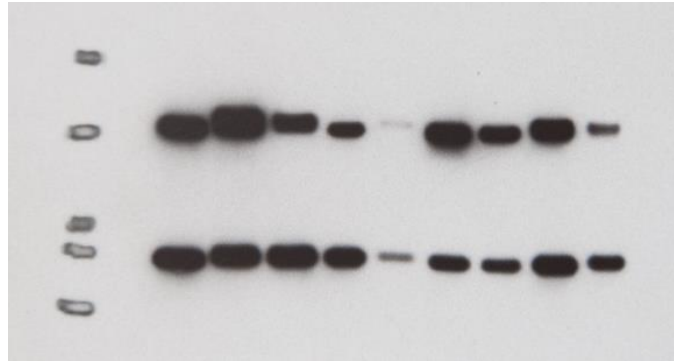
LI-COR社Odyssey (6桁)

Odysseyイメージャーの利点 ①

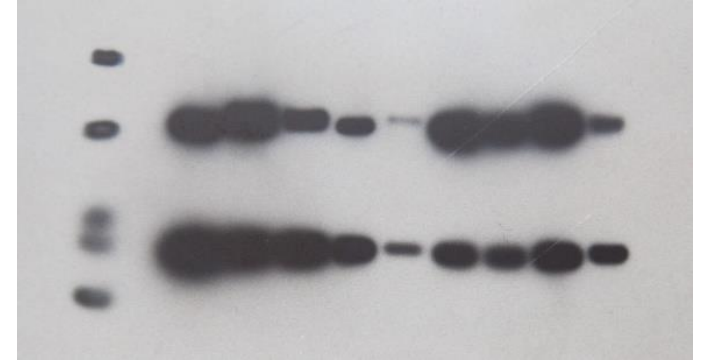
>6桁の広いダイナミックレンジ



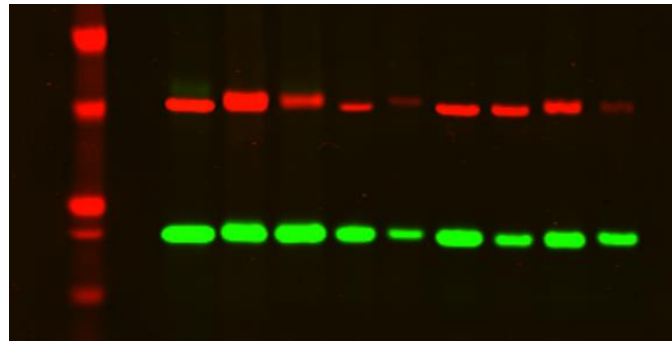
10 秒



20 秒

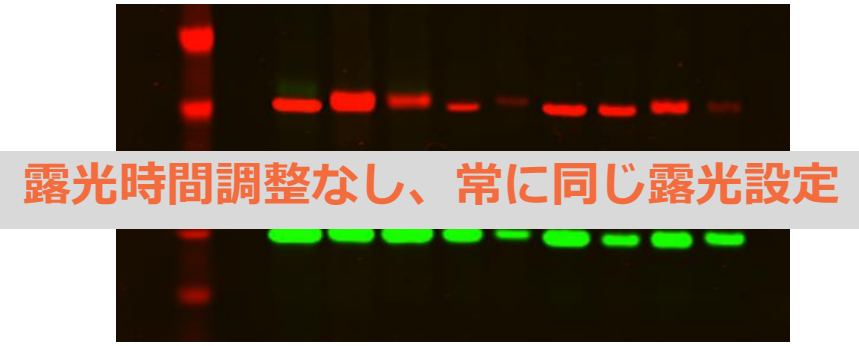


30秒



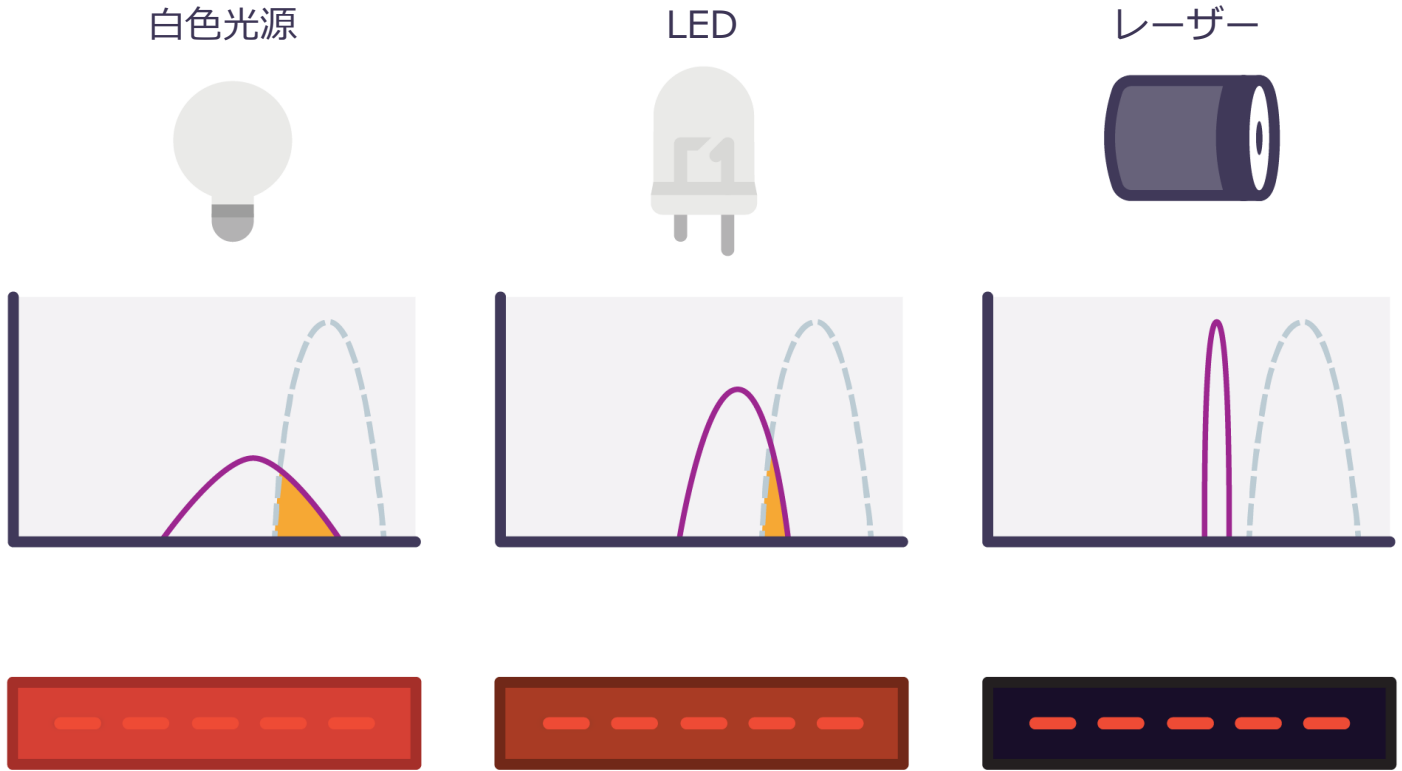
露光調整をしなくても、ワンショットですべてのバンドに対して最適な撮影が可能

>6桁の広いダイナミックレンジ



露光調整をしなくても、ワンショットですべてのバンドに対して最適な撮影が可能

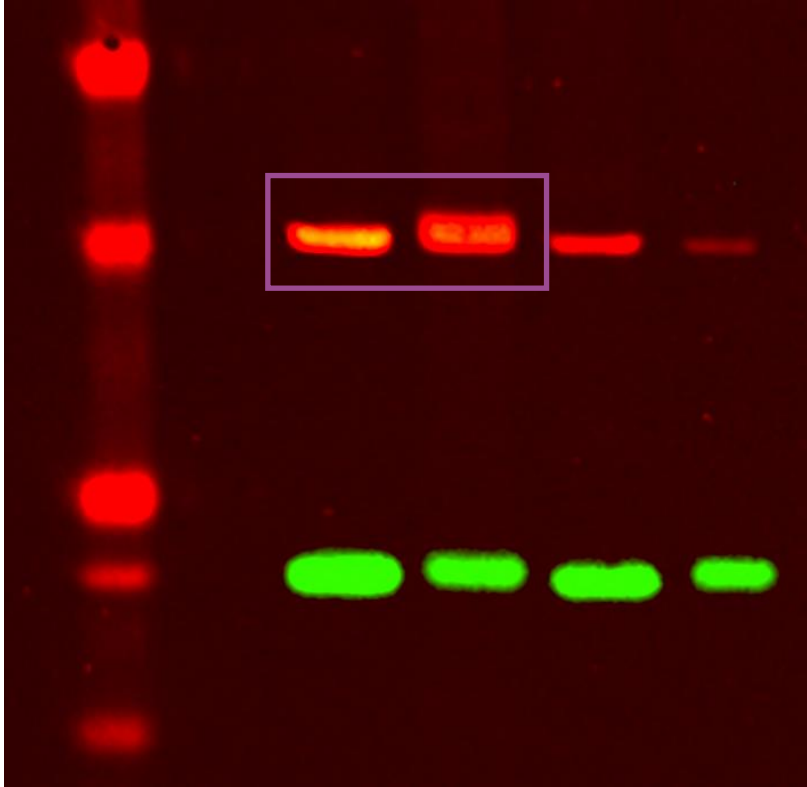
レーザー光源による励起



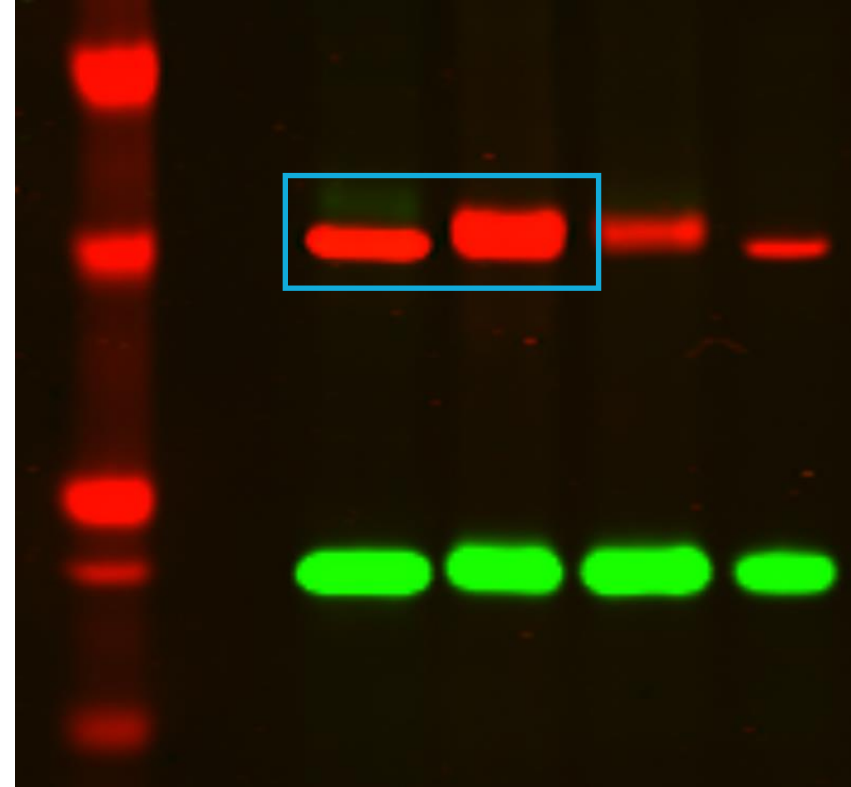
低いバックグラウンド
→ 高いS/N比
→ 高い検出感度

- エミッション光
- 励起光
- 検出側に漏れ出た光

レーザー光源による励起



LED光源を使ったイメージャー
→ 蛍光チャンネル間のクロストーク（干渉）

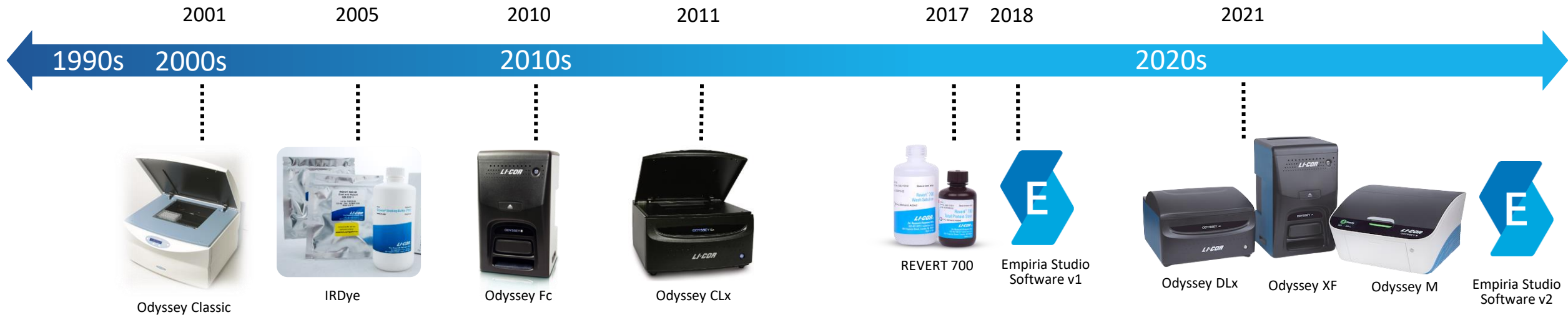


Odysseyイメージャー（レーザー光源）
→ 蛍光チャンネル間のクロストーク（干渉）がほとんどない

世界的な導入実績と歴史

- 蛍光ウェスタンブロットのパイオニア
- 20年の実績
- 蛍光ウェスタンブロットの歴史 = Odysseyイメージャーの歴史

USの市場2位
蛍光ではダントツ



本日の内容

- 定量ウェスタンブロットの最新の論文投稿規定
- 蛍光法ウェスタンと化学発光法ウェスタンの違いについて
- Odysseyシリーズの特徴
- Odyssey Mのアプリケーション例
(In-Cell Western、組織切片イメージングなど)
- 最新の定量解析ソフトウェア

マルチイメージングスキャナー

Odyssey M イメージングシステム

- 多くの撮影チャンネル
 - ・ 近赤外蛍光だけでなく可視蛍光にも対応
 - ・ 明視野撮影が可能
 - ・ 化学発光イメージングも可能
- ラインスキャンによる高速画像取得
- 最小解像度 5 μm
- 25 x 18 cmの撮影エリアで均一な撮影
- より多くのアプリケーションに対応
- > 6桁のダイナミックレンジ



Odyssey M

製品仕様



Odyssey M

タイプ

- ラインスキャン + CCDイメージング

励起光源

- 488 nm 半導体レーザー
- 520 nm 半導体レーザー
- 685 nm 半導体レーザー
- 785 nm 半導体レーザー

蛍光チャンネル

- 9種類

化学発光撮影

- 可能モデルと不可モデルを選択

明視野撮影

- 反射光源 / 透過光源撮影

イメージングエリア

- 25 cm x 18 cm (蛍光/明視野)
- 15 cm x 11 cm (化学発光)

ダイナミックレンジ

- >6 桁

解像度

- 5-100 μm

本体サイズと重量

- 61 x 76 x 38 cm
- 52 / 55 kg

ソフトウェア

- LI-COR Acquisition Software
- Empiria Studio Software

撮影チャンネル一覧

蛍光撮影
(レーザー励起)

化学発光撮影
(ケミルミ)

明視野撮影
(LED照明)

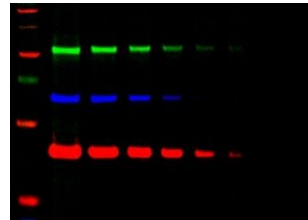
	Channel	Excitation / Illumination	Emission Filter Range	Odyssey M Channel	Default Color	Assay Category / Imaging Mode
1	800	785 nm	816 – 840 nm	"785Ex-820Em"	Green	Membrane, ICW/OCW, Cell Analysis, Microscope Slides, Custom
2	700	685 nm	721 – 740 nm	"685Ex-720Em"	Red	Membrane, Gel, ICW/OCW, Cell Analysis, Microscope Slides, Custom
3	520	520 nm	570 – 610 nm	"520Ex-590Em"	Blue	Membrane, Gel, ICW/OCW, Cell Analysis, Microscope Slides, Custom
4	520A	520 nm	721 – 740 nm	"520Ex-720Em"	Red	Custom
5	520B	520 nm	816 – 840 nm	"520Ex-820Em"	WoB	Custom
6	488	488 nm	519 – 543 nm	"488Ex-530Em"	WoB	Membrane, Gel, ICW/OCW, Cell Analysis, Microscope Slides, Custom
7	488A	488 nm	570 – 610 nm	"488Ex-590Em"	WoB	Gel, Custom
8	488B	488 nm	721 – 740 nm	"488Ex-720Em"	WoB	Custom
9	488C	488 nm	816 – 840 nm	"488Ex-820Em"	WoB	Custom
10	Chemi	NA	NA	"Chemi"	BoW	Membrane, Custom
11	RGB Epi	470, 525, 630 Epi	NA	"RGBEpi"	RGB	Custom
12	630 Epi	631 – 659 nm	Clear window	"630Epi"	WoB	Membrane
13	525 Epi	500 – 530 nm	Clear window	"535Epi"	WoB	Membrane
14	470 Epi	447 – 472 nm	Clear window	"470Epi"	WoB	Custom
15	RGB Trans	470, 525, 630 Trans	NA	"RGBTrans"	RGB	Microscope Slides, Custom
16	630 Trans	631 – 659 nm	Clear window	"630Trans"	WoB	Gel, ELISA
17	525 Trans	500 – 530 nm	Clear window	"525Trans"	WoB	Custom
18	470 Trans	447 – 472 nm	Clear window	"470Trans"	WoB	Gel, ELISA

Odyssey M

アプリケーション



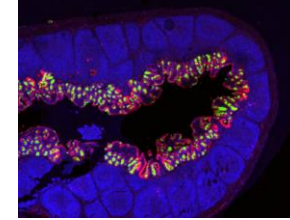
Odyssey M



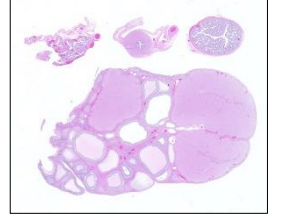
蛍光ウェスタンブロット (3色)



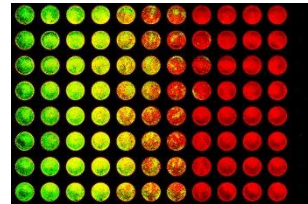
化学発光ウェスタンブロット



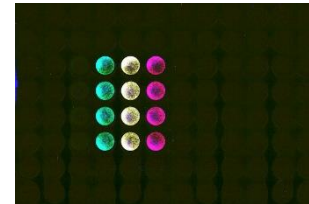
蛍光免疫染色



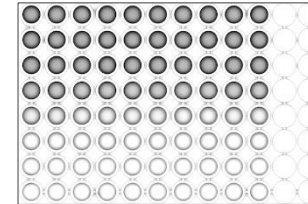
病理染色/免疫組織化学



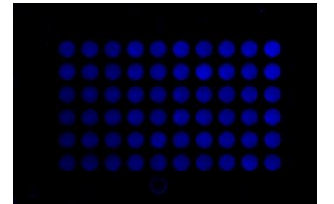
In-Cell Western™ アッセイ



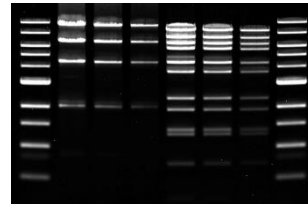
On-Cell Western アッセイ



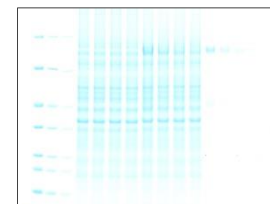
ELISA



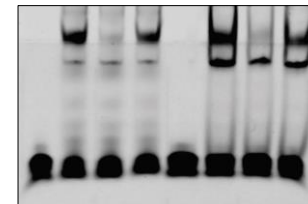
細胞増殖アッセイ



DNAゲル



タンパク質ゲル



ゲルシフトアッセイ (EMSA)



プロテインアレイ

その他のアプリケーション

- 発色法ウェスタンブロット
- ノーザンブロット
- ex vivo イメージング
- 二次元電気泳動
- サザンブロット
- GFP発現細胞
- 逆相プロテインアレイ
- In Gel ウェスタンアッセイ
- and More...

Odyssey M

ラインスキャン（蛍光イメージング）



Odyssey M

反射光源（明視野イメージング）



Odyssey M

透過光源（明視野イメージング）



Odyssey M

化学発光／生物発光イメージング



Odyssey M

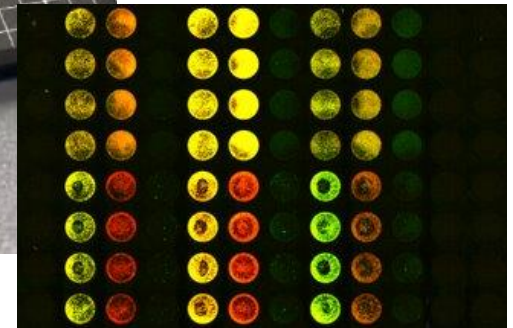
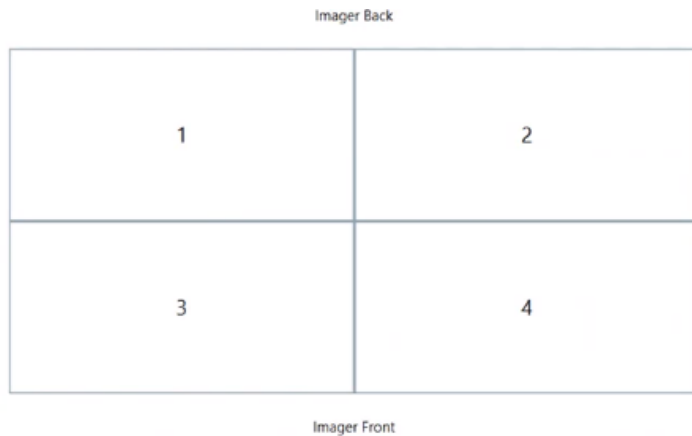
スループット



Odyssey M

プレートイメージング

- イメージング枚数:
最大4枚
- 使用アクセサリ:
プレートホルダー (標準付属)



Odyssey M

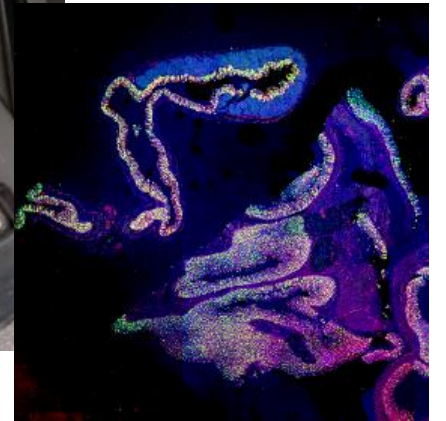
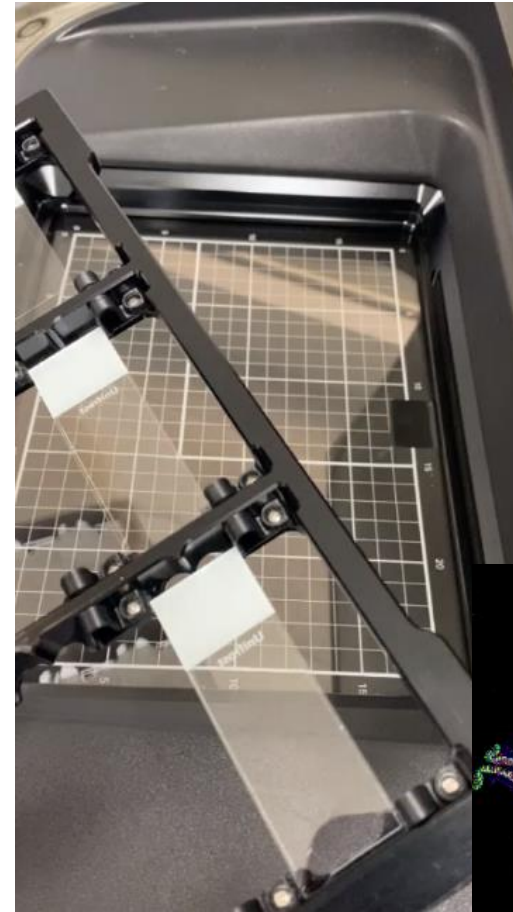
スライドイメージング

- イメージング枚数:
最大12枚
- 使用アクセサリ:
スライドホルダー (標準付属)

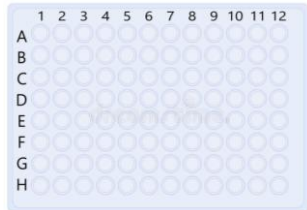
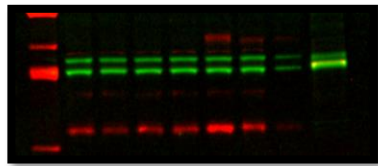
Select Slide Location Imager Back

1			
2			
3			
4			
	A	B	C

Imager Front

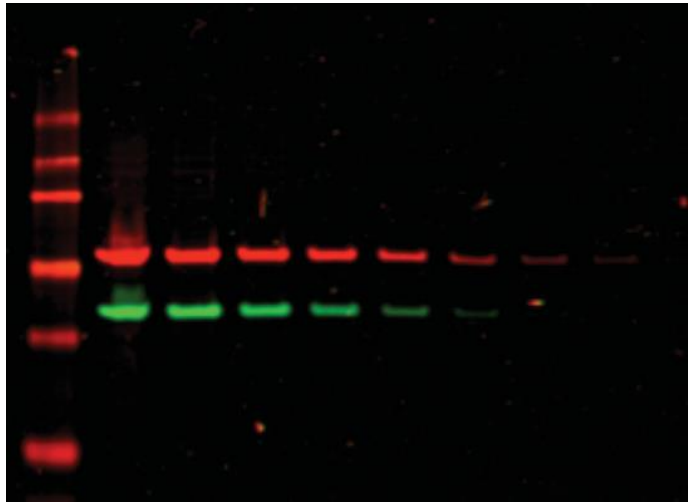


撮影スピード

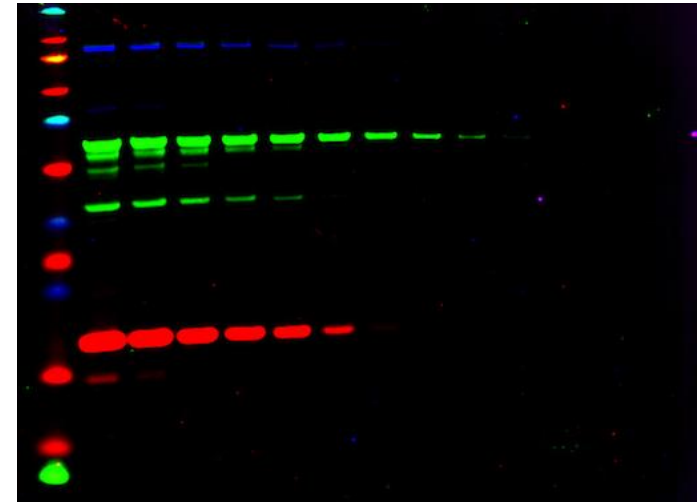


	XF	DLx	M
ウェスタンブロット ・サイズ: 9 cm x 7 cm ・チャンネル: 2色 (700/800)	解像度: 125 μ m 4m 43s	解像度: 169 μ m 5m 54s	解像度: 100 μ m 4m 10s
プレート ・サイズ: 12.5 cm x 8 cm ・チャンネル: 2色 (700/800)	N/A	解像度: 169 μ m 8m 18s	解像度: 100 μ m 5m 00s
スライドガラス ・サイズ: 2.55 cm x 2.5 cm ・チャンネル: 2色 (700/800)	N/A	解像度: 21 μ m 7m 51s	解像度: 10 μ m 3m 43s

蛍光ウェスタンブロット

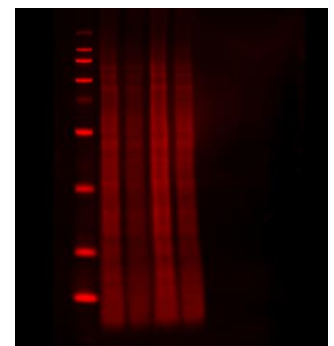


最大2波長 (2色)

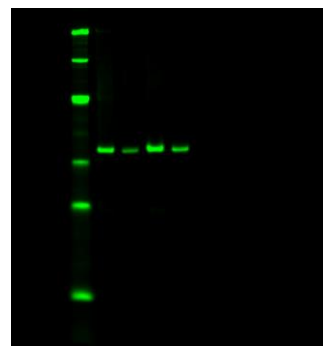


最大3波長 (3色)

蛍光ウェスタンブロット (総タンパク質補正)

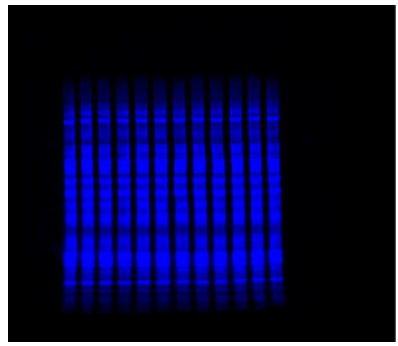


総タンパク質 (REVERT 700)

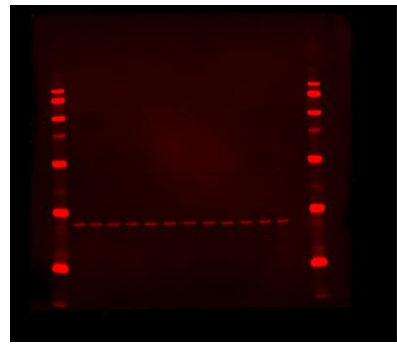


ターゲットタンパク質 (800 nm)

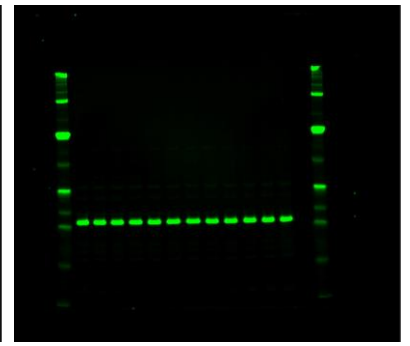
最大2波長 (2色)



総タンパク質 (REVERT 520)



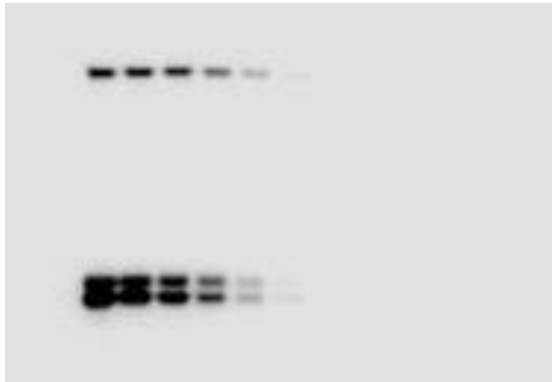
ターゲットタンパク質 1 (700 nm)



ターゲットタンパク質 2 (800 nm)

最大3波長 (3色)

化学発光ウェスタンブロット



- 最大メンブレンサイズ: 12 x 10 cm
- 発色分子量マーカーとの重ね合わせ : 不可
(発光分子量マーカーを使用、ケミルミペンを使用、青色マーカーを700nm蛍光で撮影)



Not available



- 最大メンブレンサイズ: 15 x 13 cm
- 発色分子量マーカー撮影との重ね合わせ : 可能

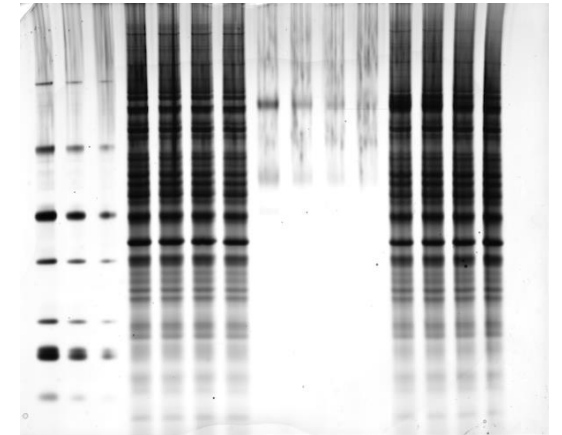
タンパク質ゲル撮影 (発色法)



Not available



Not available



- クマシー染色ゲル
- 銀染色ゲル



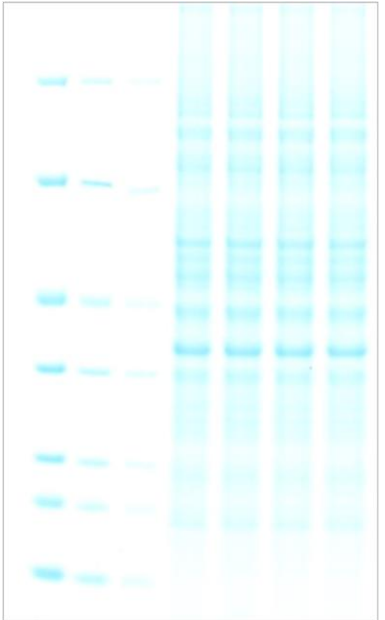
タンパク質ゲル撮影 (発色法)



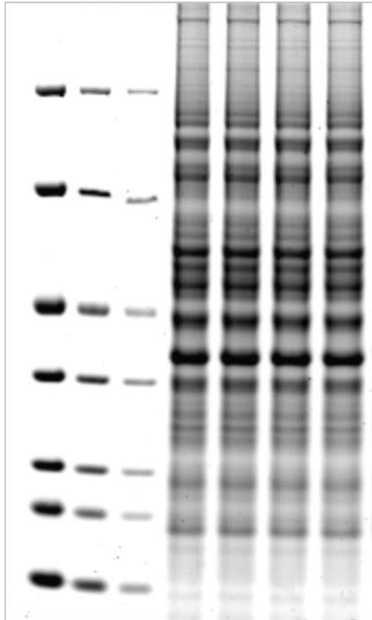
- Channel 525 Trans : 銀染色ゲル
- Channel 630 Trans : クマシー染色ゲル
- Channel RGB Trans : クマシー染色ゲル、銀染色ゲル



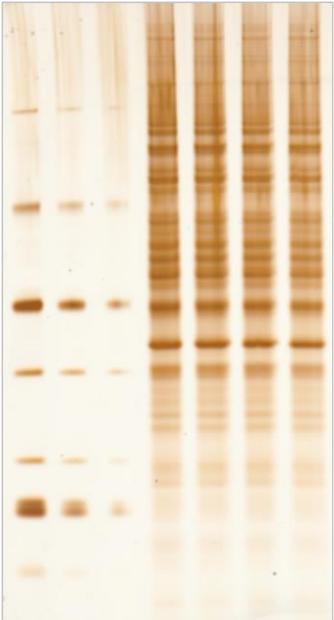
感度: クマシー染色 (CBB) < 銀染色



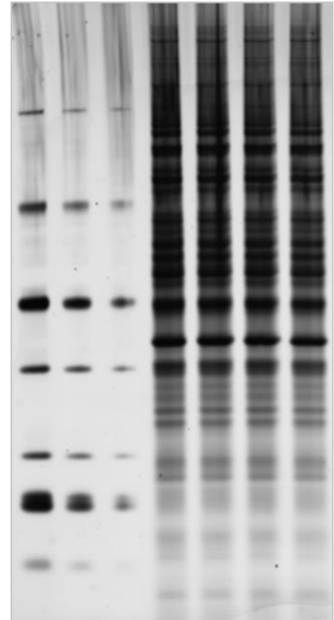
クマシー染色ゲル
RGB Trans



クマシー染色ゲル
630 Trans

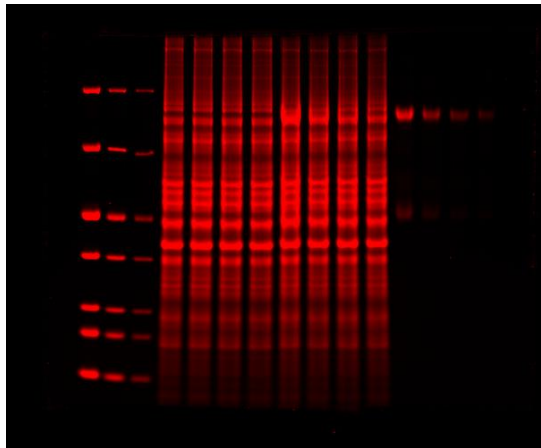


銀染色ゲル
RGB Trans

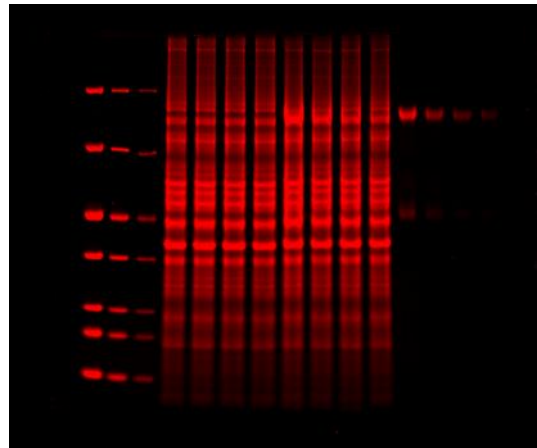


銀染色ゲル
470 Trans

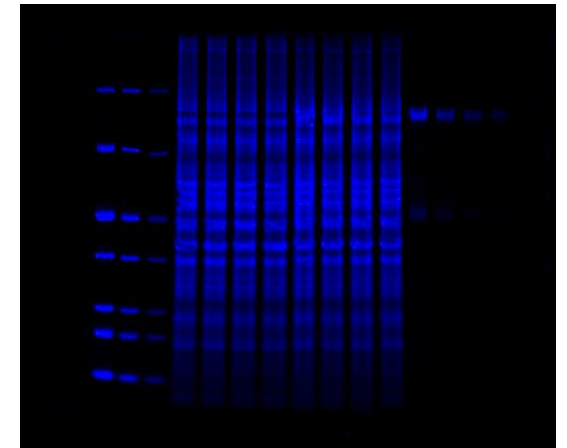
タンパク質ゲル撮影 (蛍光)



• クマシー染色ゲル (700nm蛍光)



• クマシー染色ゲル (700nm蛍光)



• 様々な蛍光染色法に対応



タンパク質ゲル撮影 (蛍光)



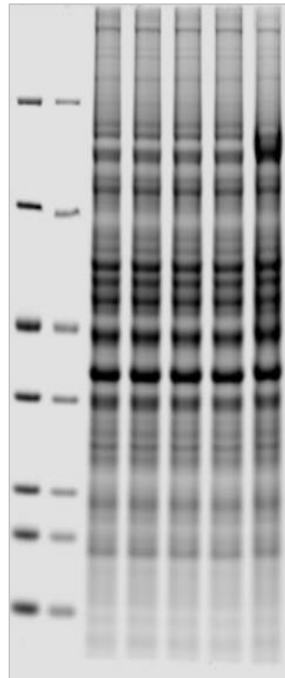
- Channel 700 : クマシー染色ゲル
- Channel 520 : Pro-Q Diamond 染色ゲル など
- Channel 488 : Pro-Q Emerald 染色ゲル など
- Channel 488A : SYPRO Ruby 染色ゲル、SYPRO Orange 染色ゲル など



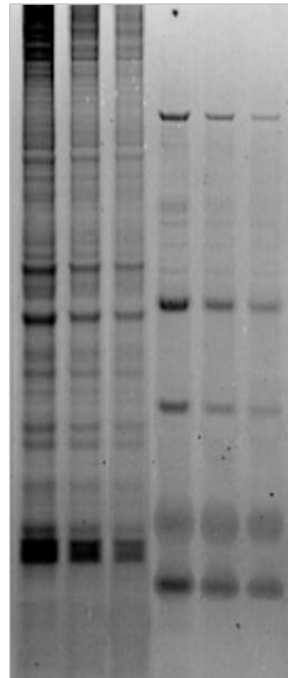
Pro-Q Diamond: 糖タンパク質を特異的に染める

Pro-Q Emerald: リン酸化タンパク質を特異的に染める

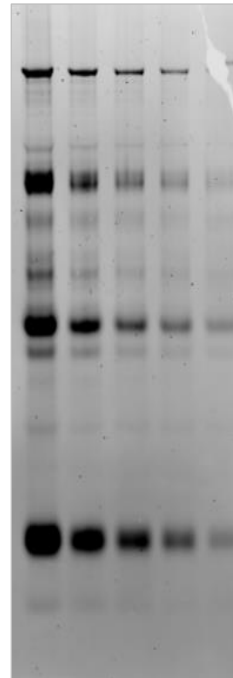
感度 : クマシー染色 < 銀染色 ≒ SYPRO Ruby



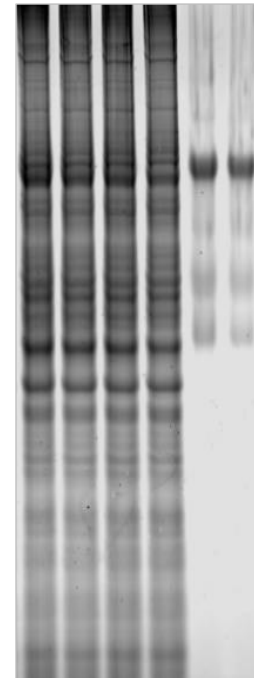
クマシー染色ゲル
700 nm



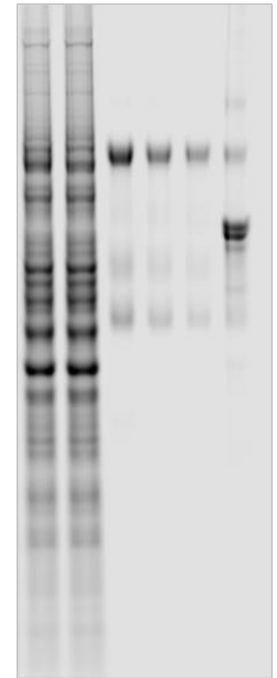
Pro-Q Diamond 染色ゲル
520 nm



Pro-Q Emerald 染色ゲル
488 nm

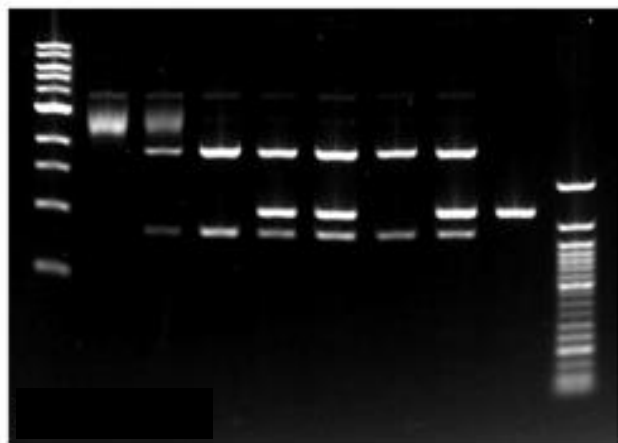


SYPRO Ruby 染色ゲル
488A nm

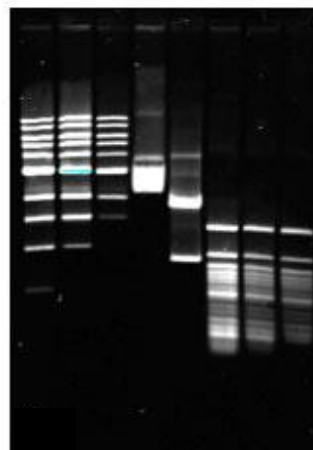


SYPRO Orange 染色ゲル
488A nm

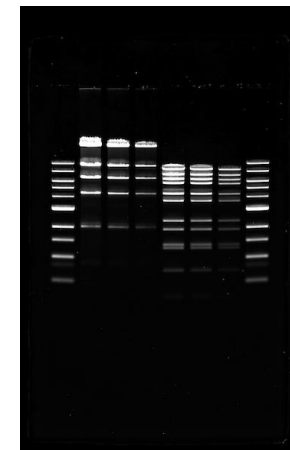
DNAゲル撮影 (蛍光)



- エチジウムブロマイド 染色ゲル
- SYBR Safe / Green 染色ゲル



- SYTO 60 染色ゲル (700nm蛍光)



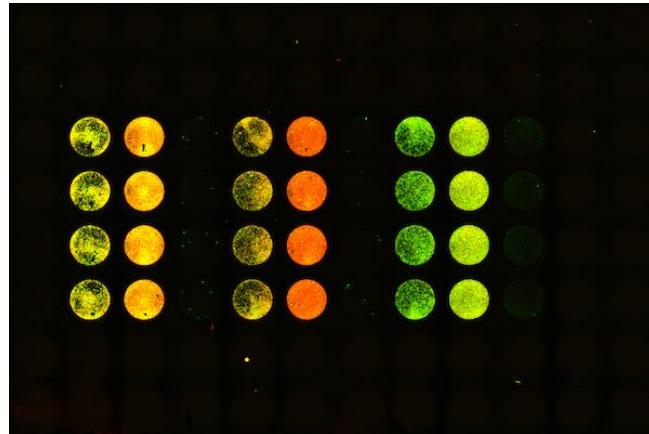
- 様々な蛍光染色法に対応



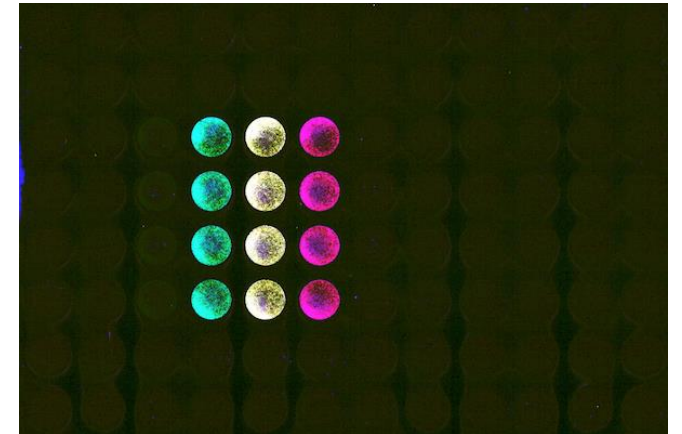
In-Cell Western™ アッセイ



Not officially supported



最大2波長 (2色)



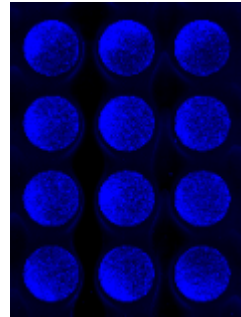
最大3波長 (3色)



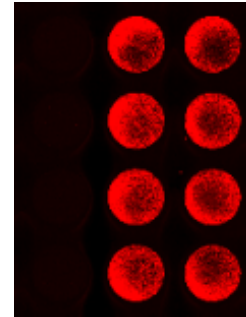
In-Cell Western™ アッセイ



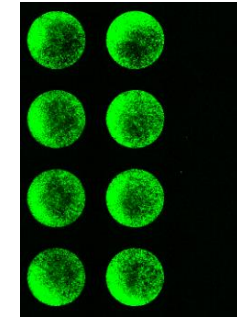
Single Channels:



CellTag 520

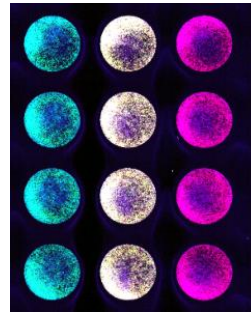


IRDye 680RD

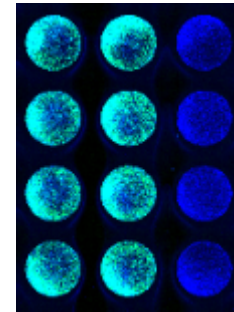


IRDye 800CW

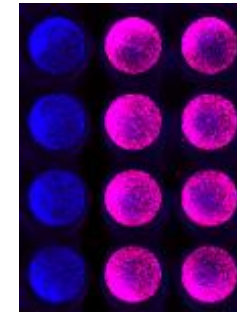
Multiplexes:



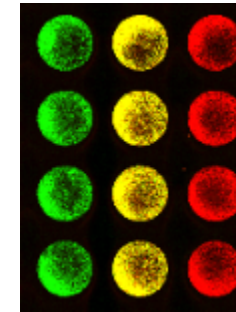
CellTag 520
IRDye 680RD
IRDye 800CW



CellTag 520
IRDye 800CW

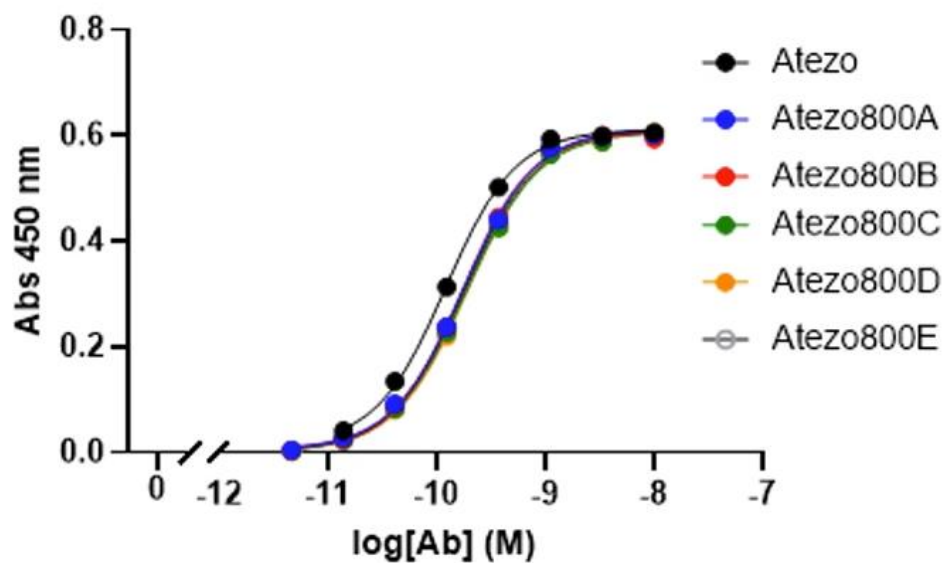
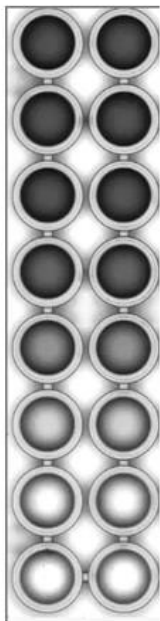


CellTag 520
IRDye 680RD

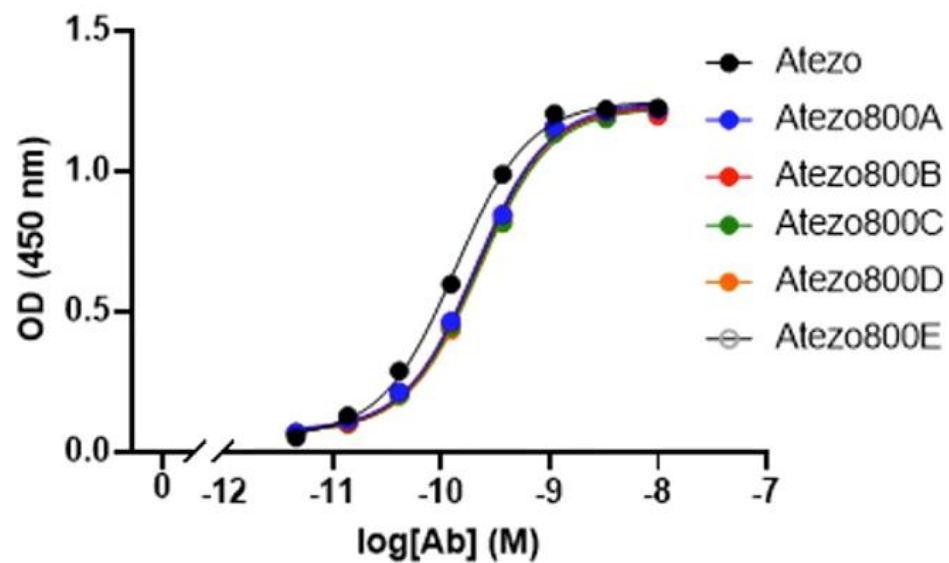


IRDye 680RD
IRDye 800CW

Odyssey M

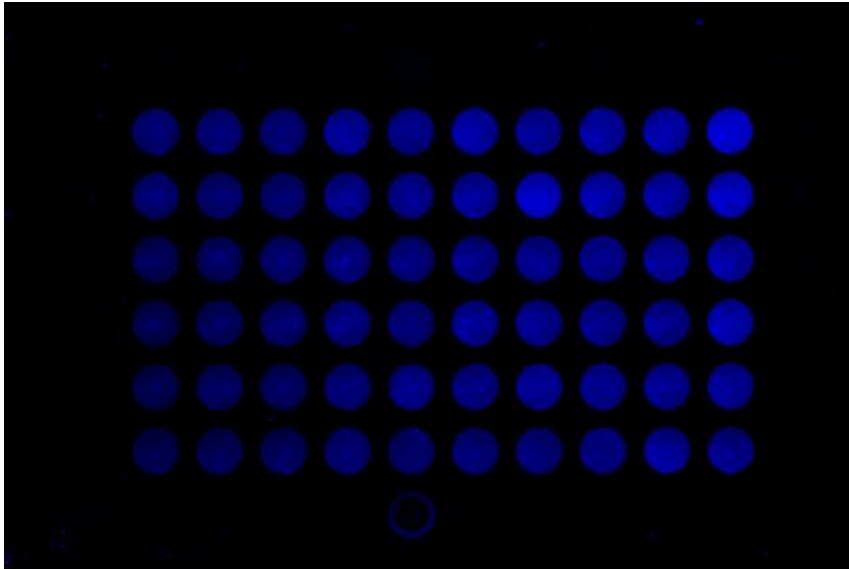


BioTek Plate Reader



※ Perkin Elmer社のAlphaLISAには対応できません。

細胞アッセイ（細胞増殖アッセイなど）



- MTTアッセイ（MTS/XTT/WST-1/WST-8 アッセイ）
- LDHアッセイ
- Promega社アッセイキット
- 同人化学アッセイキット
- Sapphire 700

など

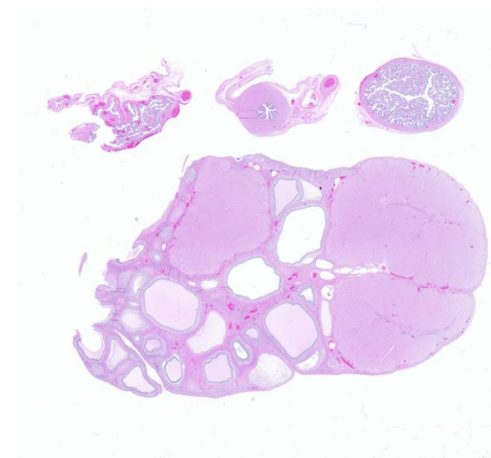
病理染色 / 免疫組織化学 (明視野)



Not available



Not available

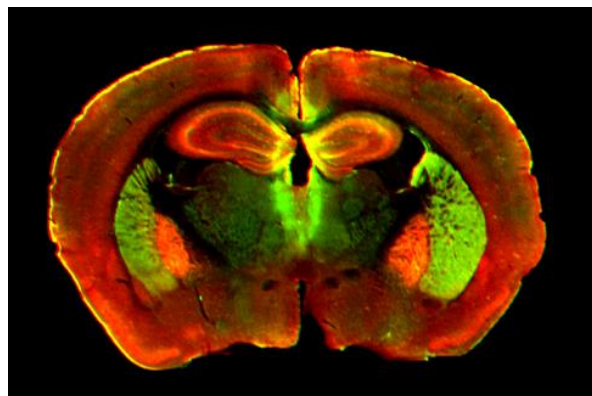


例：H&E染色スライド

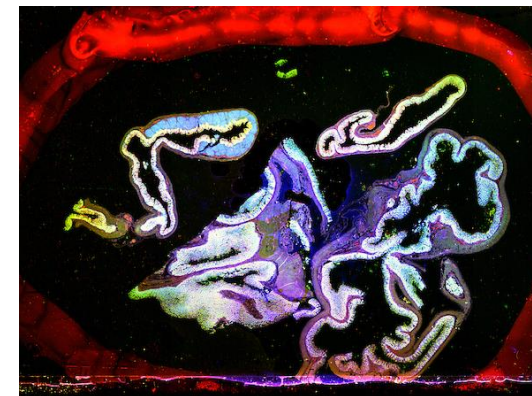
蛍光免疫染色



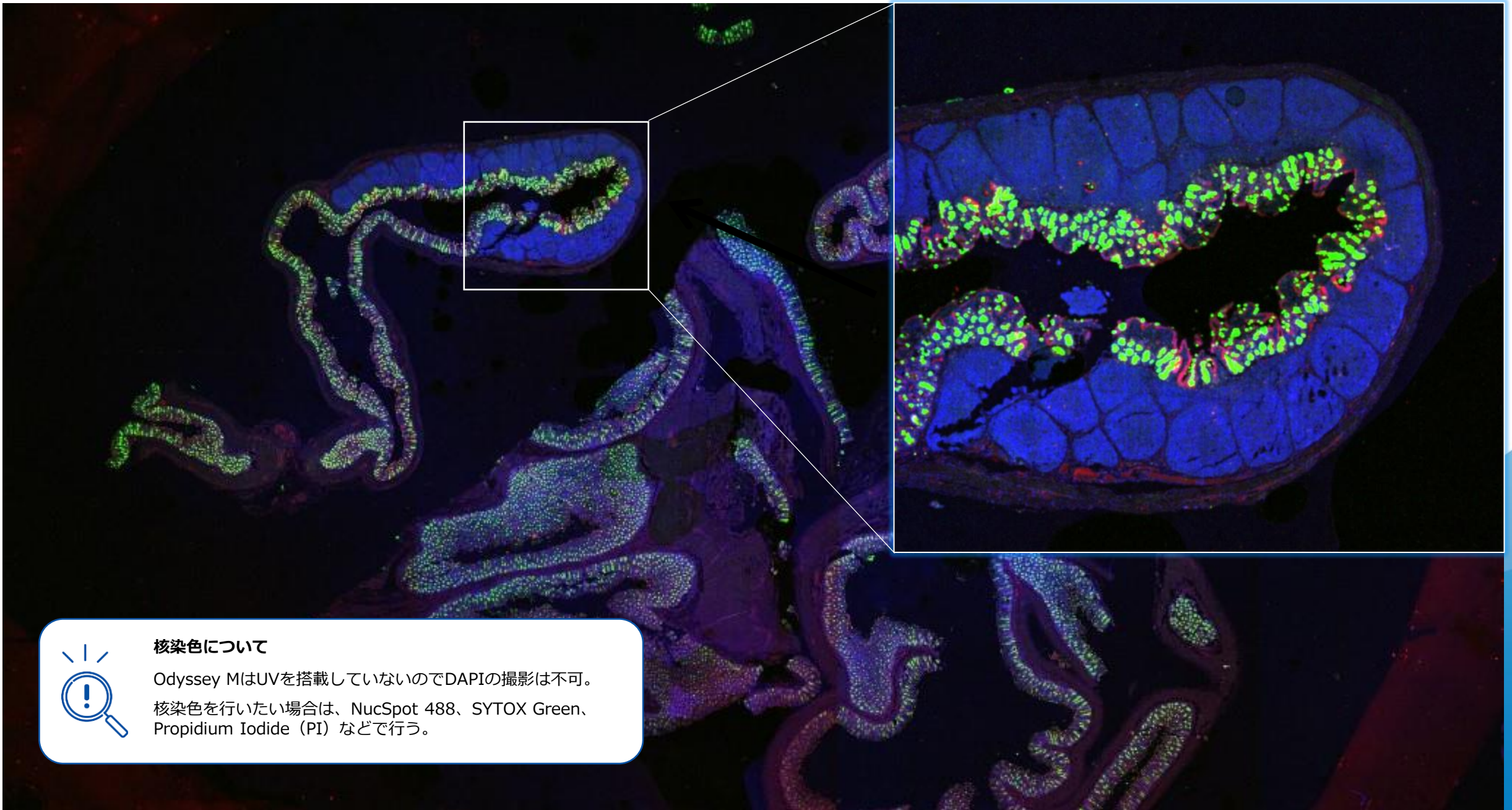
Not available



- 解像度: 最大 21 μ m
- 波長: 近赤外蛍光のみ



- 解像度: 最大 5 μ m
- 波長: 近赤外蛍光だけでなく可視蛍光も可能



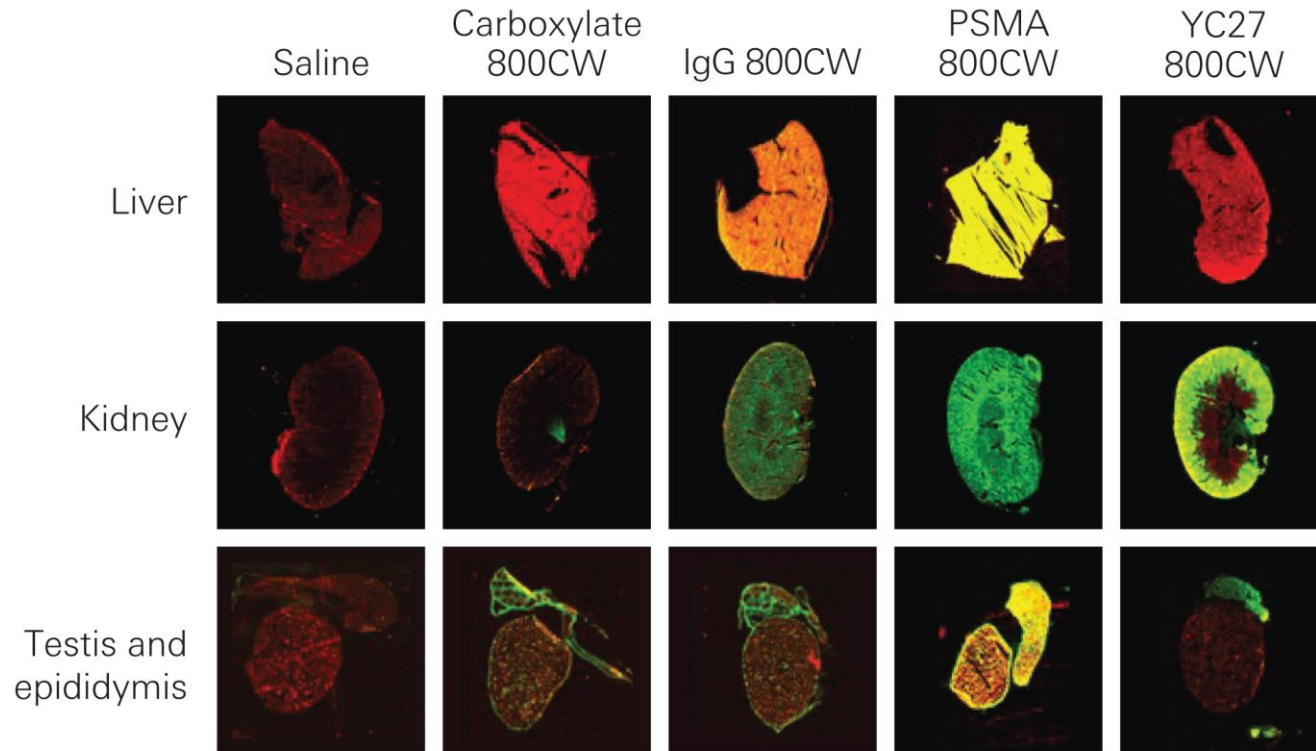
核染色について

Odyssey MはUVを搭載していないのでDAPIの撮影は不可。
核染色を行いたい場合は、NucSpot 488、SYTOX Green、
Propidium Iodide (PI) などで行う。

Tissue sections Imaging

LI-COR®

近赤外蛍光標識プローブの生体分布試験



[Prostate Cancer. 2014;2014:104248.](#)

- 腫瘍ターゲティング蛍光標識プローブのインビボでの生体分布イメージングのあとに、同じ個体からターゲット部位以外で蛍光シグナルが強かった臓器を取り出し、凍結切片（8 μm厚）を作製して、Odyssey imagerで組織レベルの検索を行った。緑が蛍光プローブのシグナル、赤は組織の自家蛍光。
 - Saline : 1x PBS (ネガティブコントロール)
 - Carboxylate 800CW : IRDye 800CW Carboxylateのみ (ネガティブコントロール)
 - IgG 800CW : Non-specificなIgG抗体をIRDye 800CWで標識したもの (ネガティブコントロール)
 - PSMA 800CW : PSMA (前立腺特異的膜抗原) に対する抗体をIRDye 800CWで標識したもの
 - YC27 800CW : PSMAに結合する低分子をIRDye 800CWで標識したもの

組織切片イメージング プロトコル

Protocol

Tissue Section Imaging

LI-COR

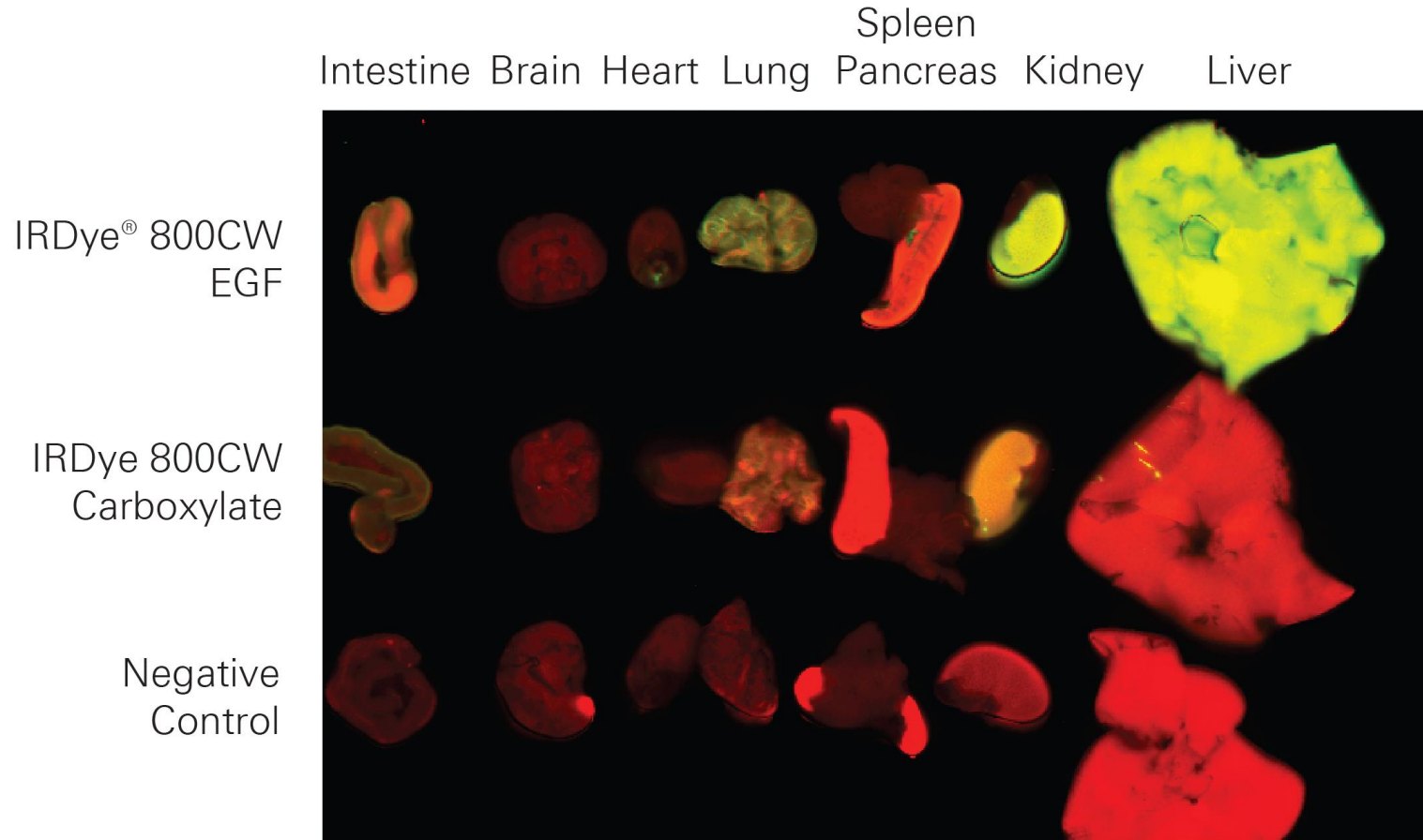
Published August 2017. Revised July 2019. The most recent version of this document is posted at [licor.com/bio/support](https://www.licor.com/bio/support).

LI-COR

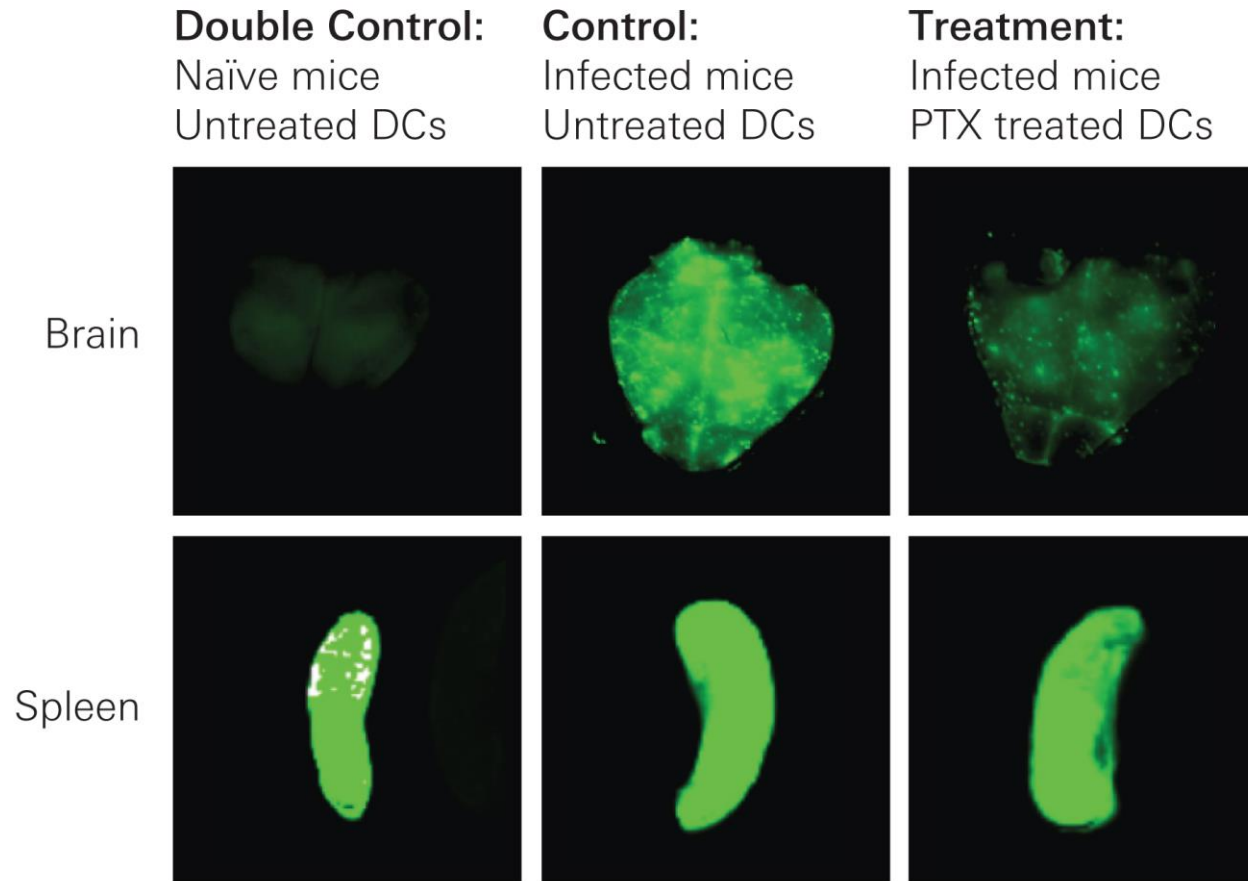
Biodistribution and Organ Imaging

LI-COR[®]

ex vivo イメージングによる 近赤外蛍光標識プローブの生体分布試験



臓器イメージング



[PLoS Pathog. 2011 Sep;7\(9\):e1002246.](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002246)

- トキソプラズマ脳炎マウスにおける脳と脾臓の臓器イメージング。樹状細胞を近赤外蛍光ポリマソームでラベルし、脳と脾臓をOdyssey Imagerで撮影した。
- PTX（百日咳菌由来毒素）で処理した樹状細胞は脾臓から脳へのmigrationが少ない。

組織切片イメージング 試薬消耗品

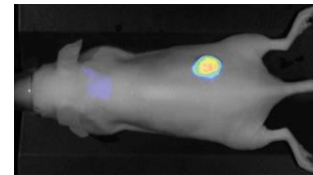
- IRDye標識二次抗体



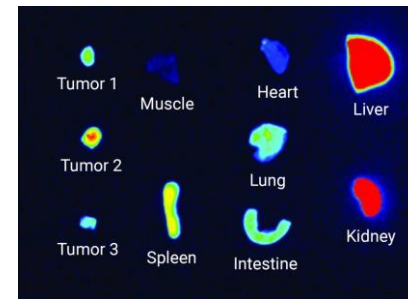
anti-sheep以外のほぼすべての動物種のIgGに対する二次抗体

- IRDye 800CW (800nm)
- IRDye 680RD (700nm)
- IRDye 680LT (700nm)

近赤外蛍光標識した分子標的プローブの バイオディストリビューション研究



プローブの生体内分布を
in vivo イメージングで
調べる



マウスから臓器を取り出し、
ex vivo イメージングで
検証する

顕微鏡スライドは顕微鏡を使えばよいのでは？

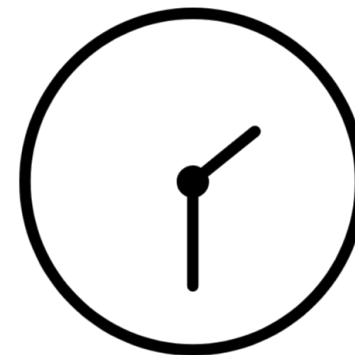


最終的にプレゼンや論文に載せるのは1枚のスライドの1部分の画像だけ

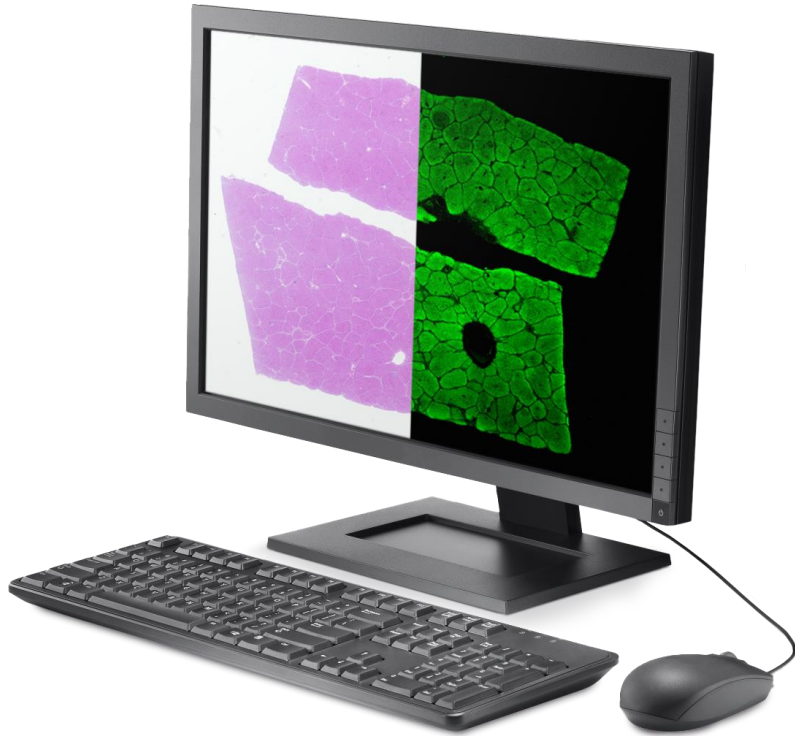
しかし・・・

- 何枚もの連続切片スライドを見て局在を確かめないといけない・・・
- 1視野で観れるのは切片の一部分だけ・・・
- 絵になるベストな1枚を探したい・・・

時間がかかる



スライドスキャナー



Pros

- ハイスループット
- 高解像度
- 共焦点可能なモデルあり
- バーコードリーダー
- 機能に優れた画像解析ソフトウェア

Cons

- 1画像のファイルサイズが大きい (> 1.0 GB*)
- 明視野は撮影スピードが速いが蛍光は時間がかかる
- 顕微鏡スライドを撮影するだけの専用機である
- 近赤外蛍光不可

Odyssey M

Odysseyによるスライドスキャンの利点

- ハイスピード画像取得（1.5 分/チャンネル*）
- 局在確認に十分な解像度（5 μm ）
- 小さいファイルサイズ（25 MB*）
- H&E画像と蛍光画像を同じ解像度で撮影
→容易な重ね合わせが可能
- 厚い切片（>6 μm ）を撮影可能**

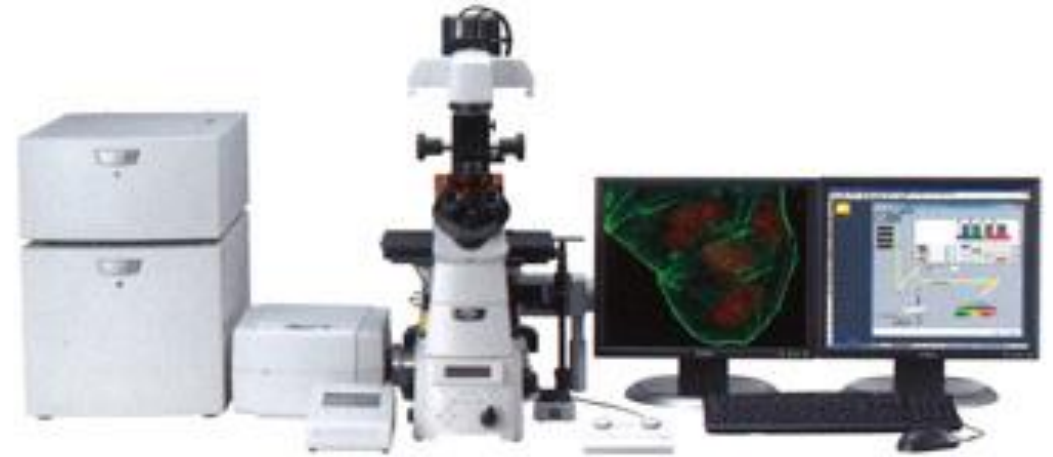
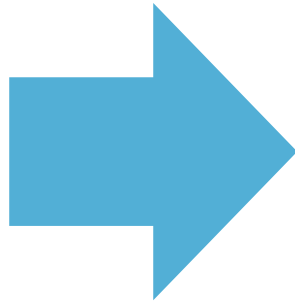


*Based upon a 15x15 mm region of interest
** Thickest tissue would be ~1.5 mm

Odyssey Mは . . .

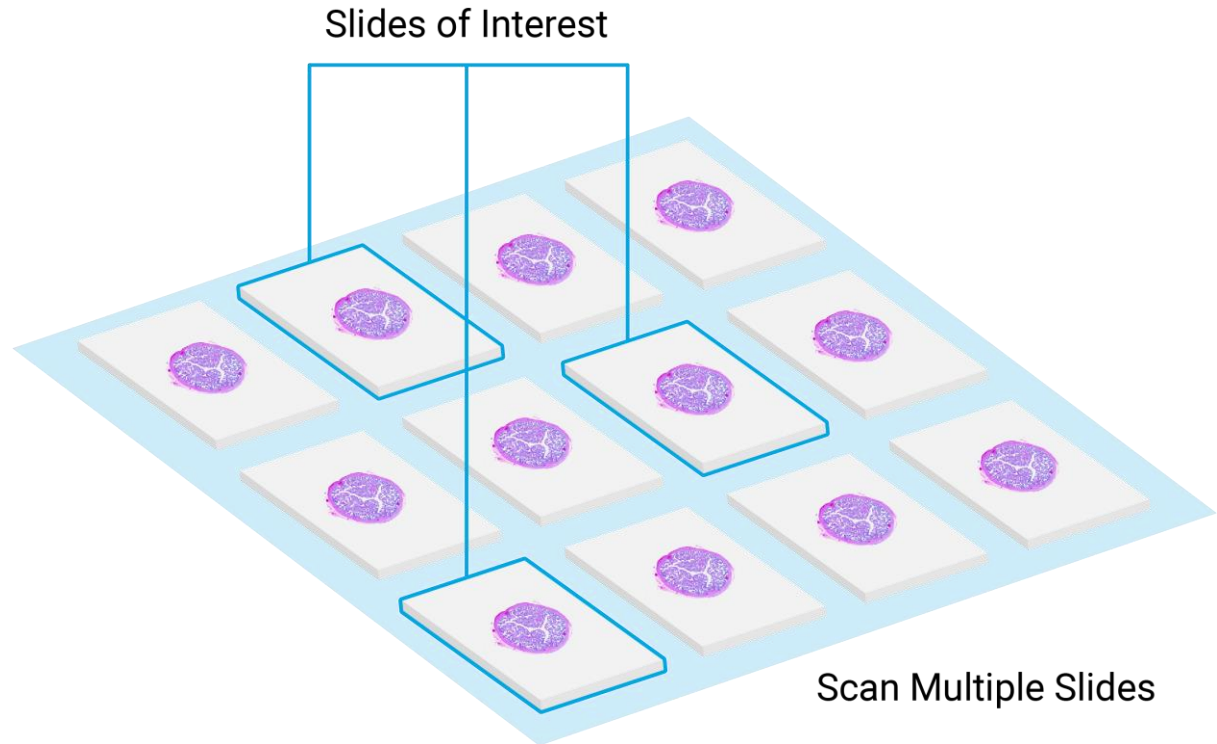


最大12枚のスライドをFast Scan可能



蛍光顕微鏡（共焦点レーザー顕微鏡）の撮影に持っていくスライドを
Odyssey Mを用いてトリアージ

Whole Slide Triage Imaging



組織切片全体（Whole Slide）を最低限の解像度で、ファーストスキャンして、蛍光顕微鏡観察を行うスライドをスクリーニングする

スキャンに要する時間の比較

		スライドスキャナー	Odyssey M
画像取得にかかる時間	H&E 染色	2.5 分	1.5 分
	蛍光2色	8 分	2.0 分
	1スライドあたりの 合計スキャン時間	10.5 分	4.5 分
	24 スライド (H&E + 蛍光2色)		
	25スライドの 合計スキャン時間	4.2 時間	1.8 時間

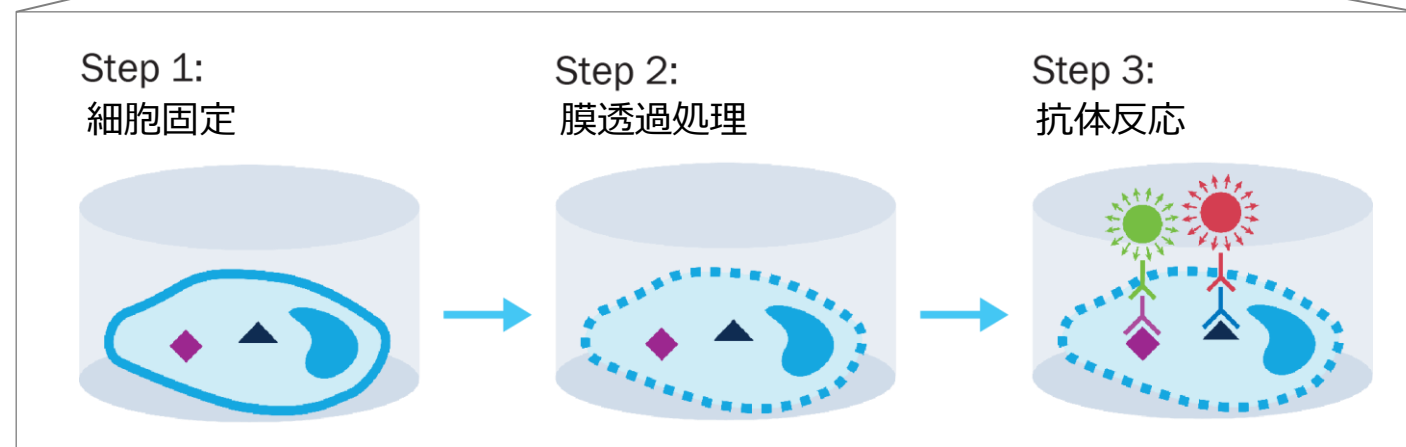
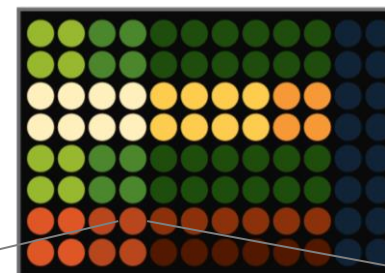
データ容量の比較

		スライドスキャナー	Odyssey M	
データ容量	H&E 染色	2000 MB	25 MB	
	蛍光2色	4000 MB	50 MB	
	1スライドあたりの 合計データ容量	6000 MB	75 MB	
	25 スライド (H&E + 蛍光2色)			
	25スライドの 合計データ容量	150 GB	1.88 GB	

In-Cell Western™ アッセイ

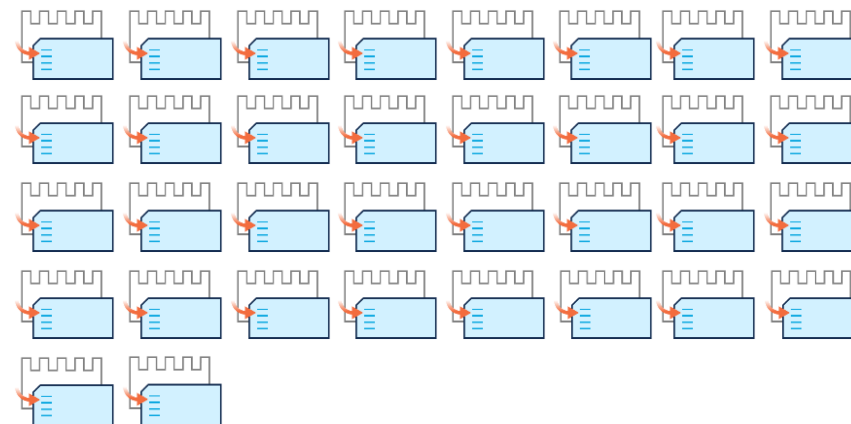
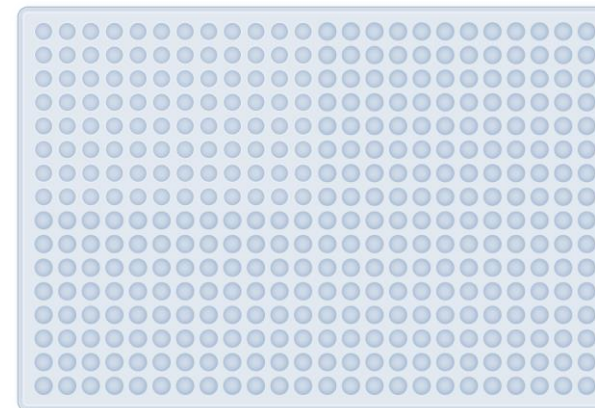
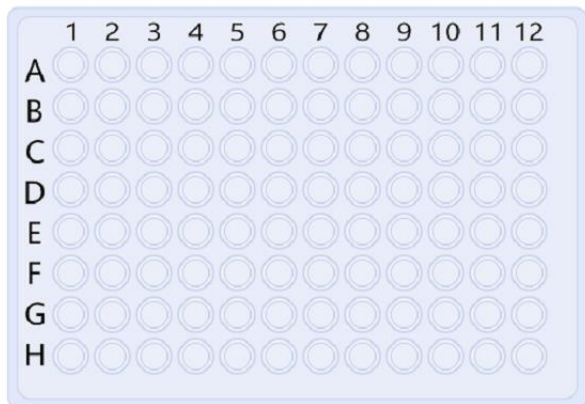
- セルベースのハイスループットなタンパク質発現解析法
- タンパク質の抽出と可溶化を行わずNativeな状態のままサンプル間の発現比較を行うことができる。

96ウェルプレート



それぞれのウェルで蛍光免疫染色を行い、
ウェル全体の蛍光強度を数値化して比較する

ハイスループットなアッセイが可能



セルベースのアッセイ法

細胞の回収・洗浄・タンパク質抽出・電気泳動・転写が不要なので手間と時間を減らすことが可能

In-Cell Western Assay: <5 hours, 96+ Samples



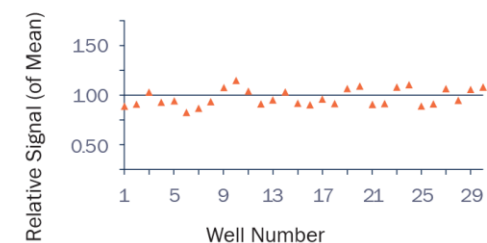
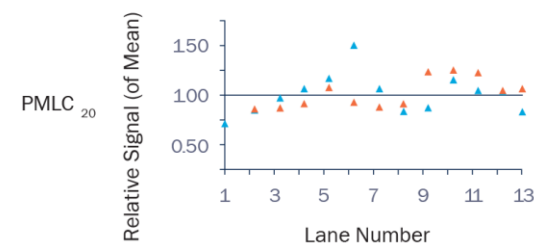
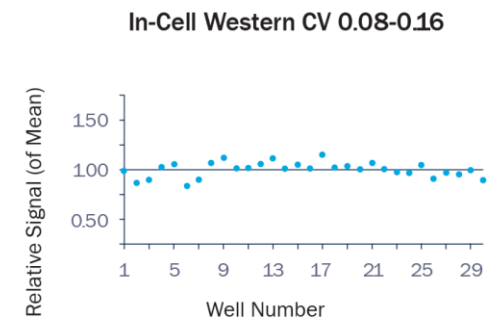
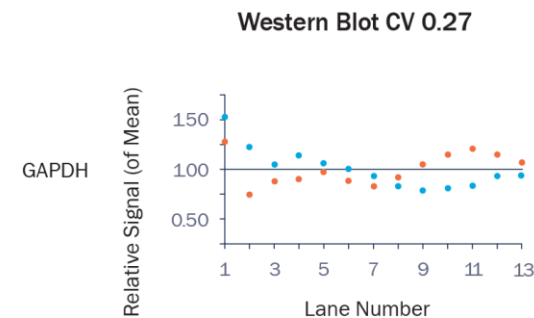
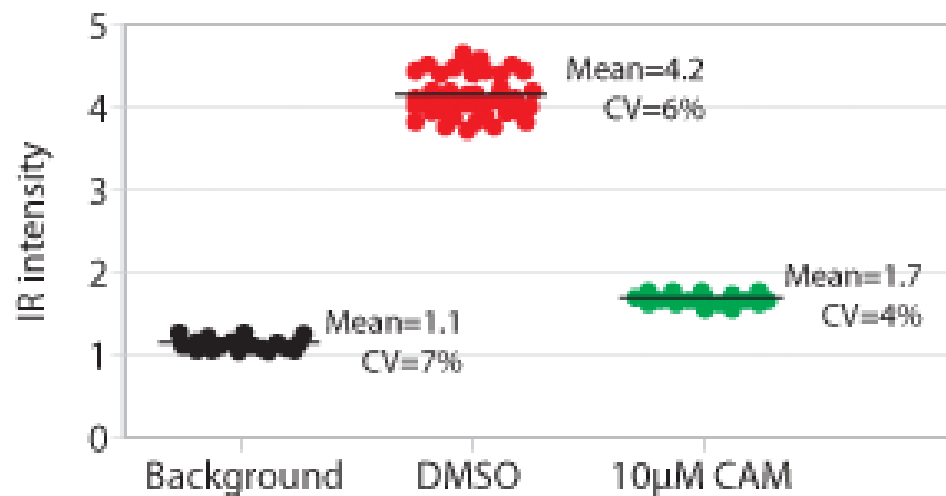
Fix cells Antibody incubations

Western Blotting: 7 hours, 10-24 Samples



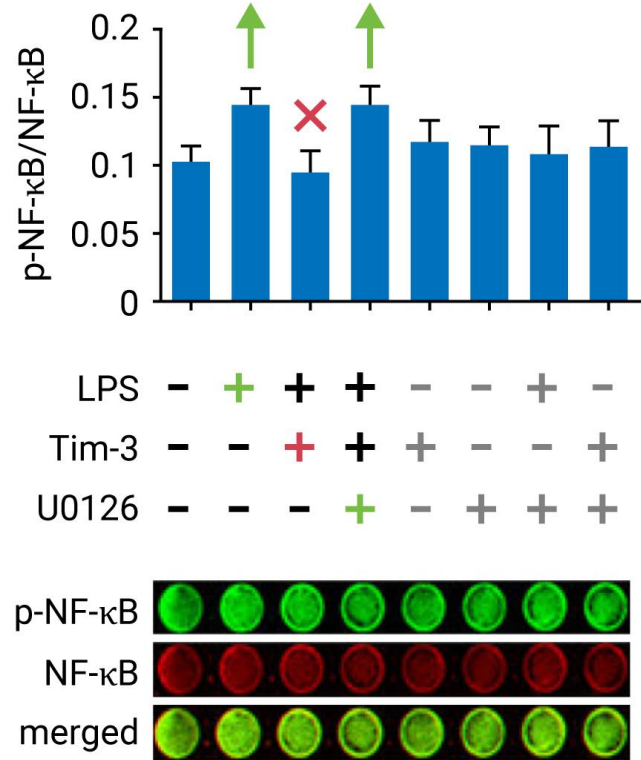
Lyse Cells Transfer lysates (fractionate) SDS-PAGE Membrane, transfer, blocking, antibody incubations

バラつきの少ないデータ



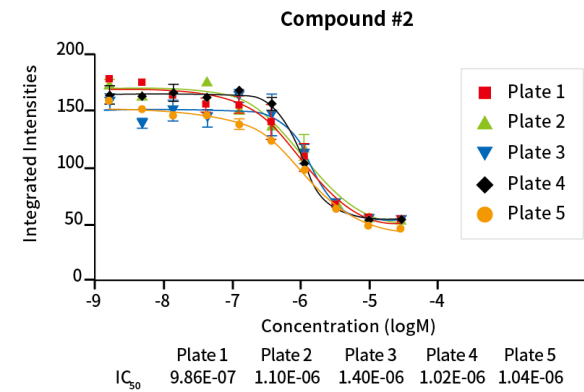
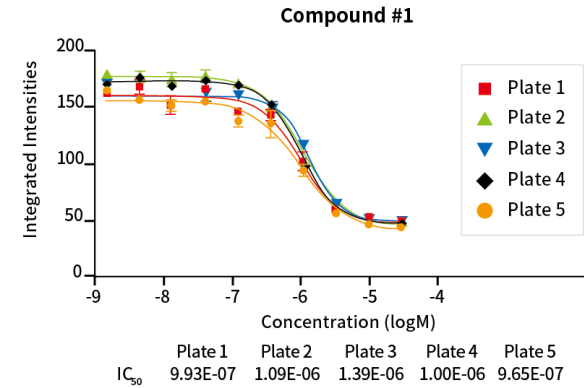
リン酸化レベルの変化など微妙な発現差を正確に定量

5%のリン酸化レベルの違いを定量



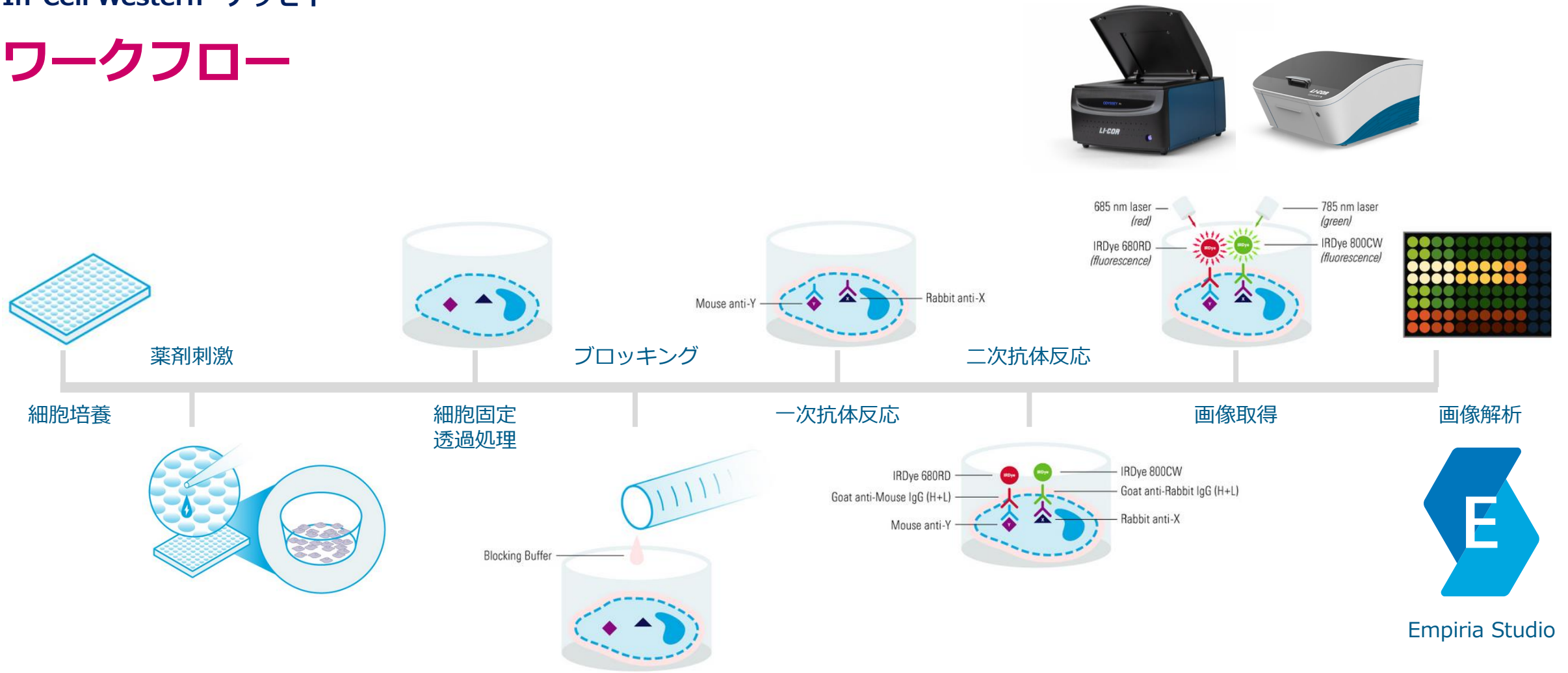
[Sci Rep. 2015; 5: 9013.](https://doi.org/10.1038/srep09013)

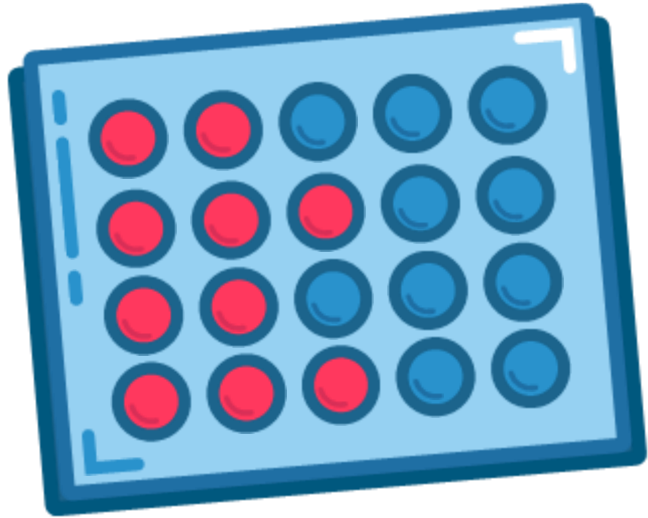
プレート間でも優れた再現性



[Anal Biochem. 2005 Mar 1;338\(1\):136-42.](https://doi.org/10.1007/s00438-005-0136-4)

ワークフロー

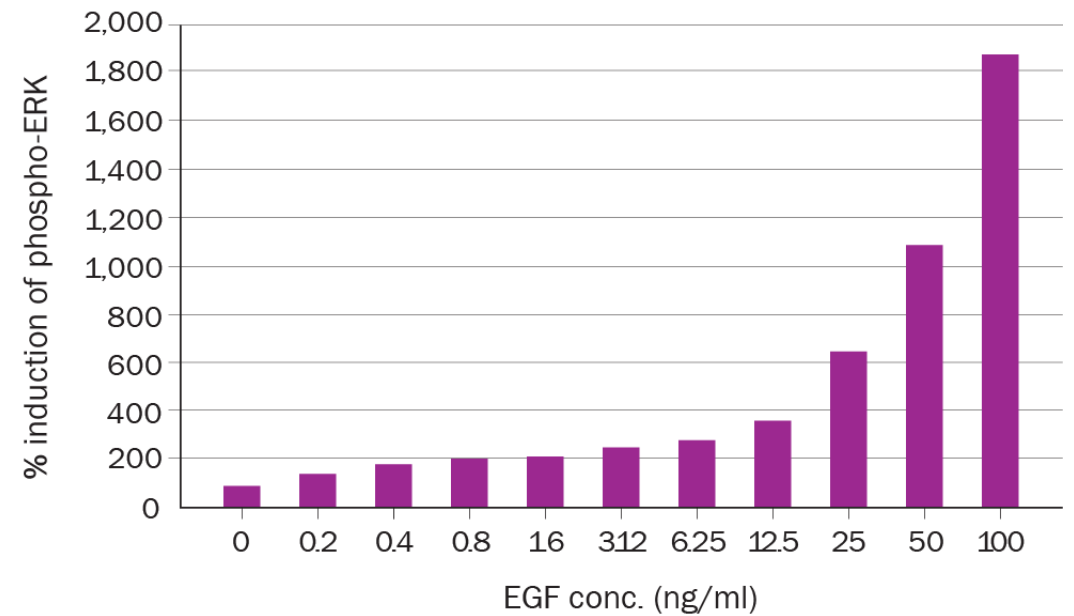
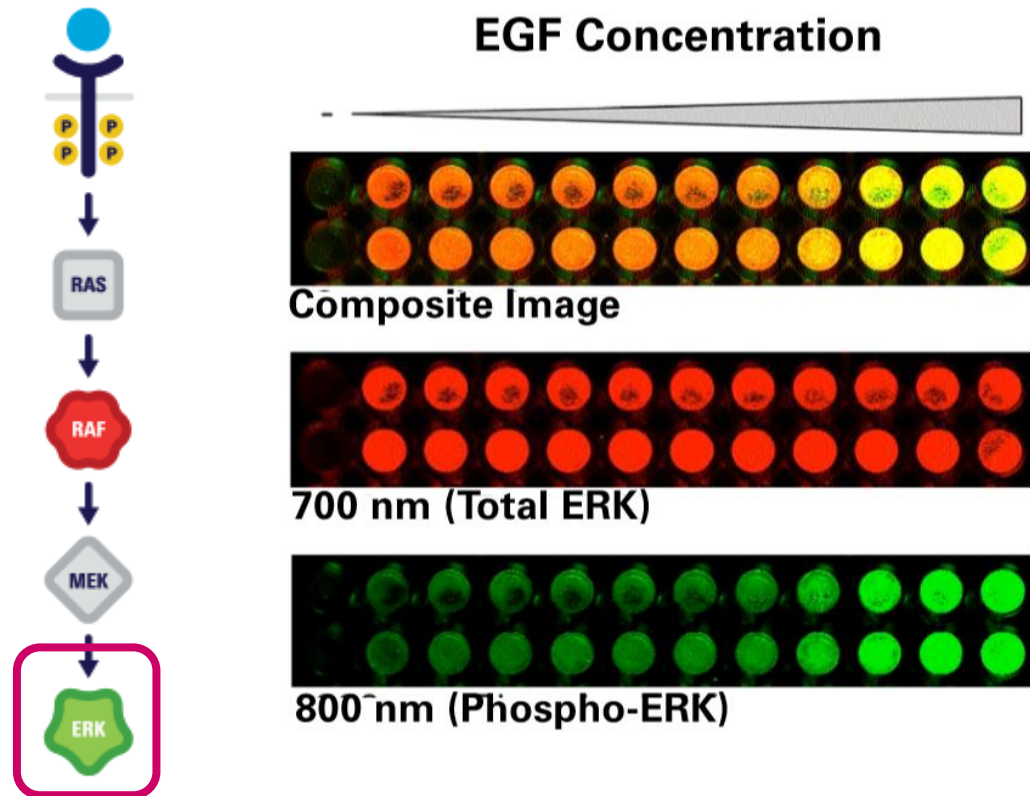




Research Example

Example ①

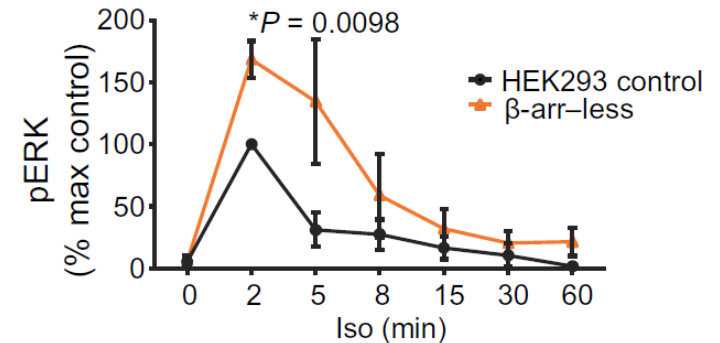
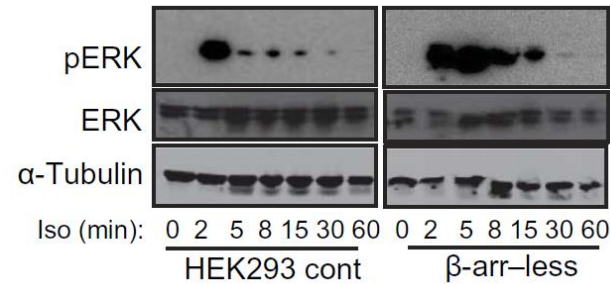
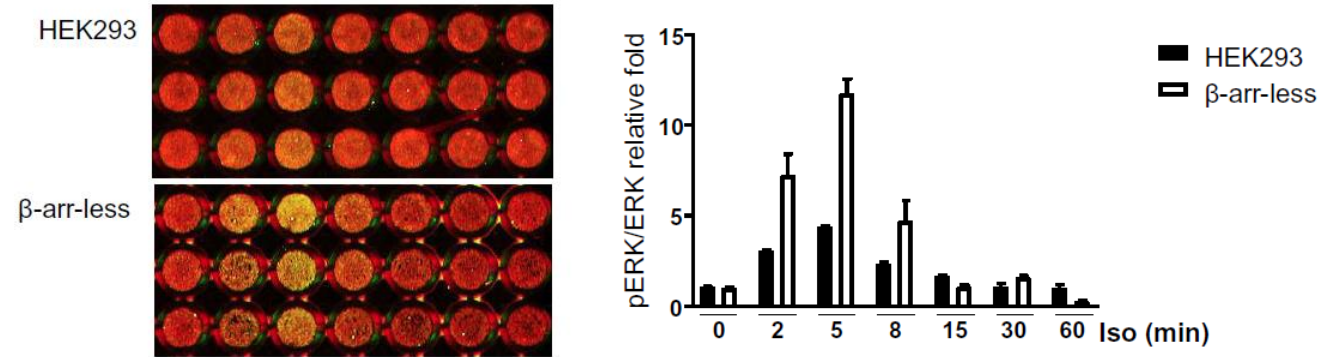
EGFによるシグナル伝達系の活性化



Example ③

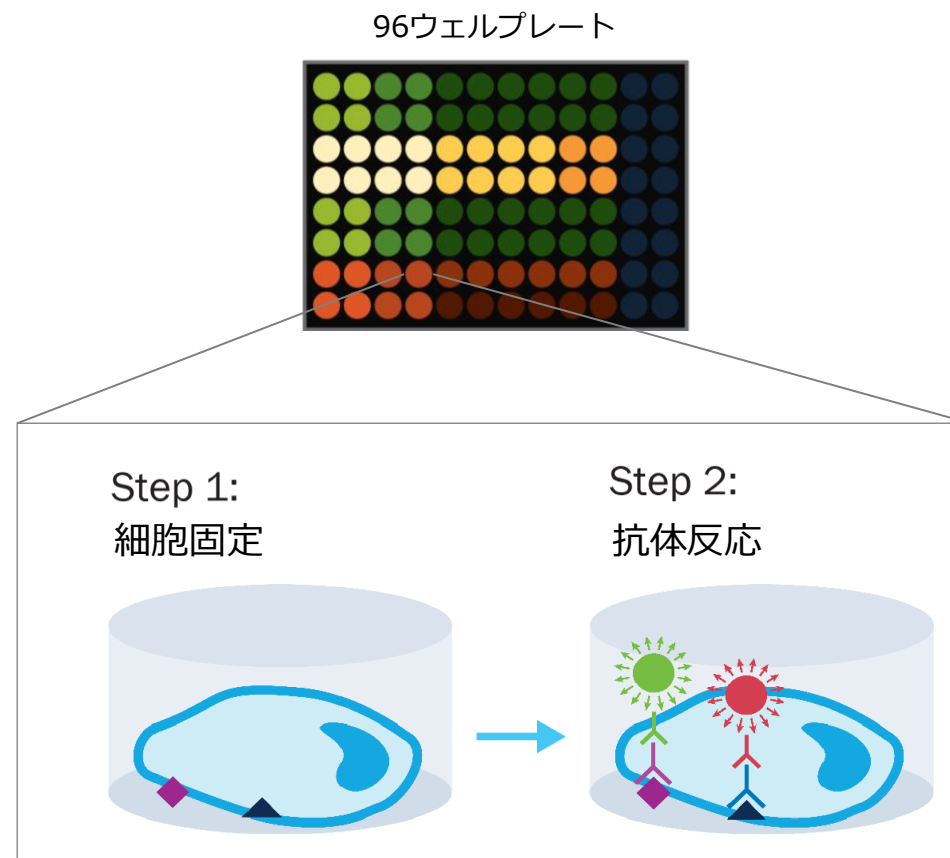
TALEN + siRNAによる β -arrestinのノックダウンアッセイ

- TALEN と siRNA により β -arrestin 1/2 をノックダウンし、ERKタンパク質リン酸化をIn-Cell Westernアッセイとウェスタンブロットで測定
 - HEK293細胞株
 - リガンド刺激 (10 μ M Isoproterenol) 後のERKリン酸化レベルの経時的変化をIn-Cell Western アッセイで測定
 - ➡ノックダウン細胞ではリン酸化が亢進
 - ウェスタンブロットでも同様の結果を確認



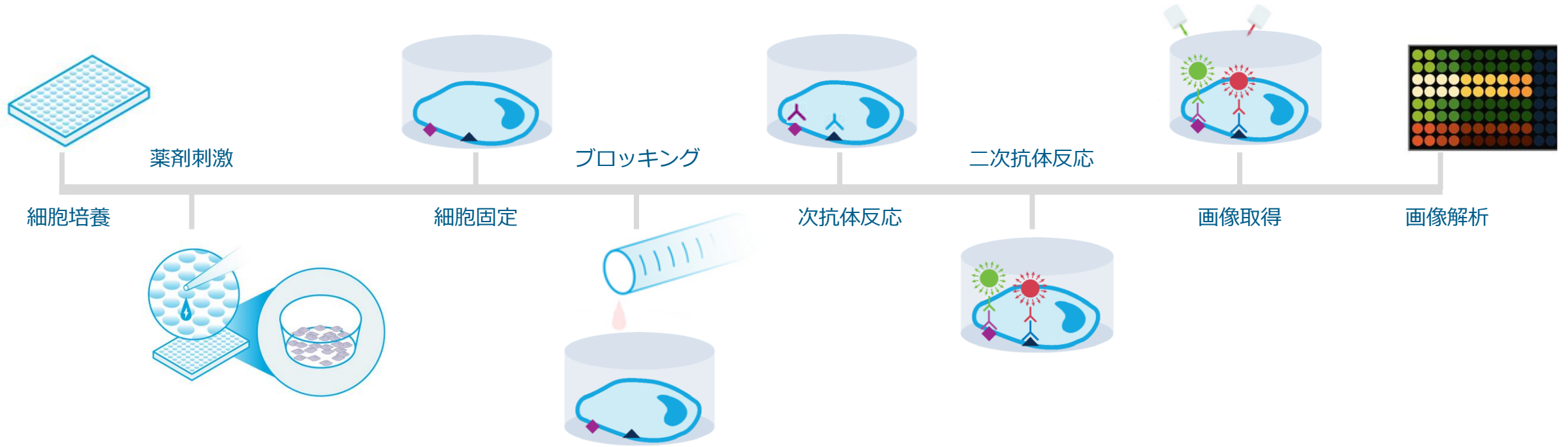
On-Cell Western アッセイ

- In-Cell Western™ Assayの変法
- 膜透過処理を行わずに細胞膜タンパク質だけを検出
- 細胞膜タンパク質の立体構造を維持したまま解析が可能



それぞれのウェルで蛍光免疫染色を行い、
ウェル全体の蛍光強度を数値化して比較する

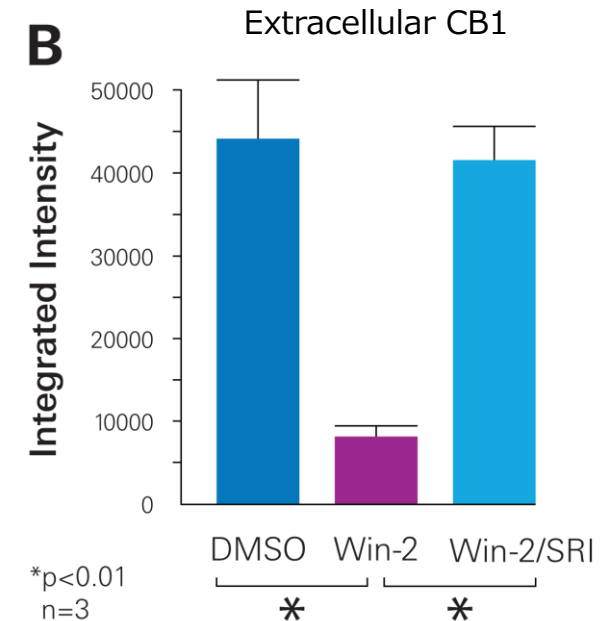
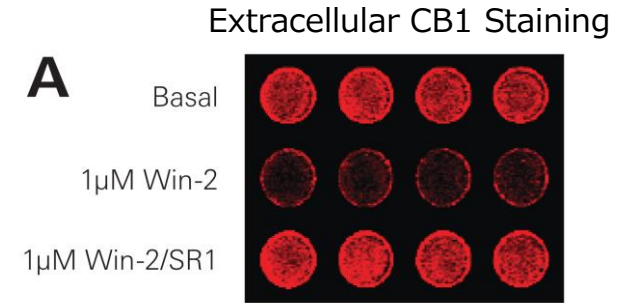
ワークフロー



Example 2

On-Cell Western アッセイによるGPCR Internalizationの測定

- Win2 (アゴニスト) によるCanniboid Receptor 1 (CB1) のインタナリゼーションをOn-Cell Western法で測定
- Win2刺激により細胞表面のCB1染色強度が減少、SR1 (アンタゴニスト) によりCB1が細胞膜にリクルートメントされる。
- 受容体のインターナリゼーションを定量的に測定することが可能



本日の内容

- 定量ウェスタンブロットの最新の論文投稿規定
- 蛍光法ウェスタンと化学発光法ウェスタンの違いについて
- Odysseyシリーズの特徴
- Odyssey Mのアプリケーション例
(In-Cell Western、組織切片イメージングなど)
- 最新の定量解析ソフトウェア

次世代定量ウェスタンブロット解析ソフトウェア



Empiria Studio™ Software

トップジャーナルが求める 定量ウェスタンブロットデータ解析



リニアレンジの検証



適切な統計解析



抗体反応性と特異性の検証



不適切な画像加工の禁止と
生画像の保持



適切なノーマライゼーション法の
選択と検証



実験法、画像解析法の詳述



適切な反復実験法

Empiria Studio™ ソフトウェア

- 最新の論文投稿規定に準拠した高品質な定量ウェスタンブロットデータを得るために、トップジャーナルとコラボレーションして作られた唯一のソフトウェア





シグナル検出方法



イメージング



アッセイ
バリデーション



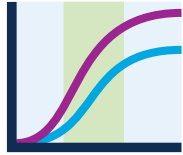
データ解析



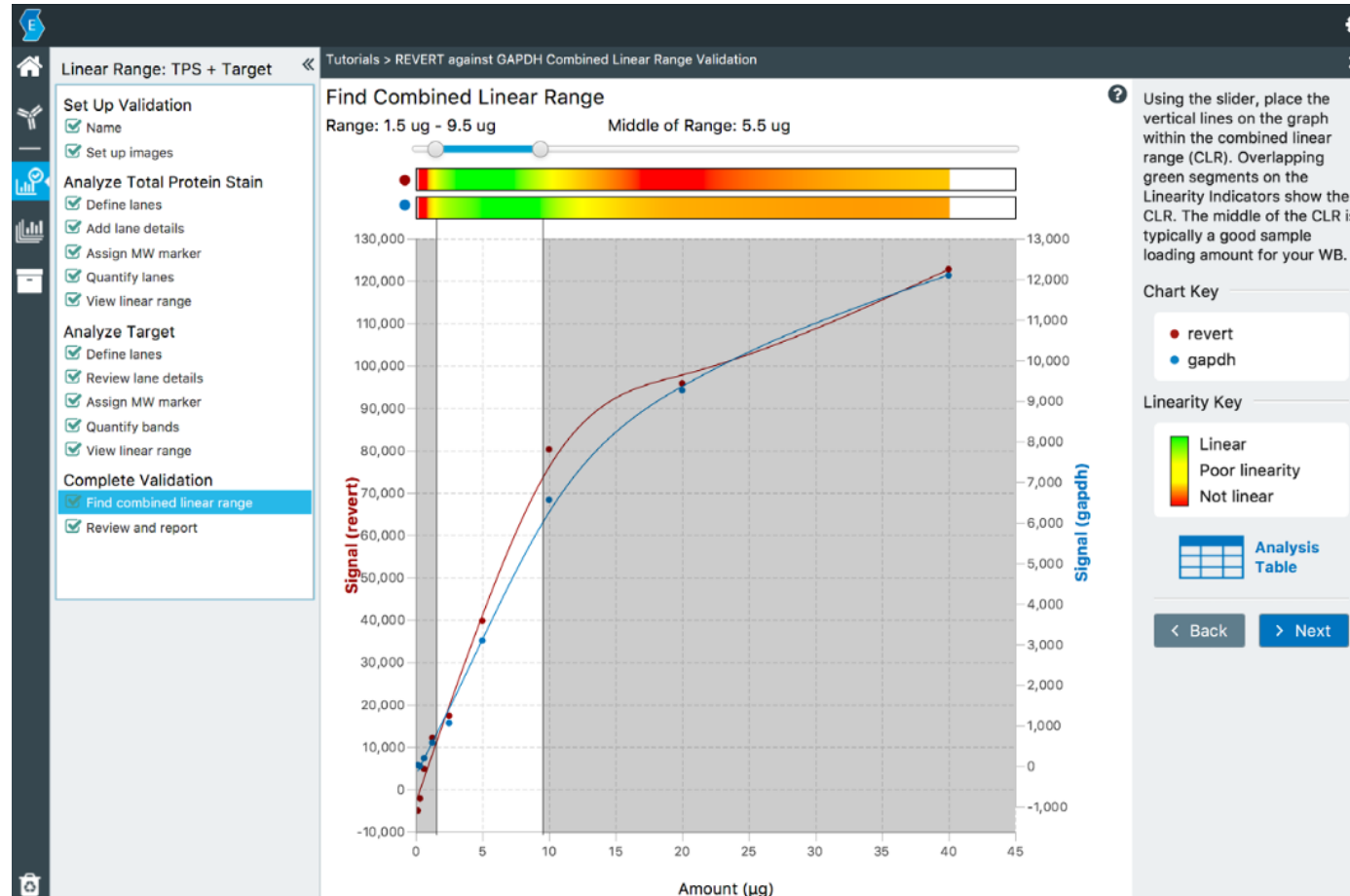
×

LI-COR®

テクニカルサポート



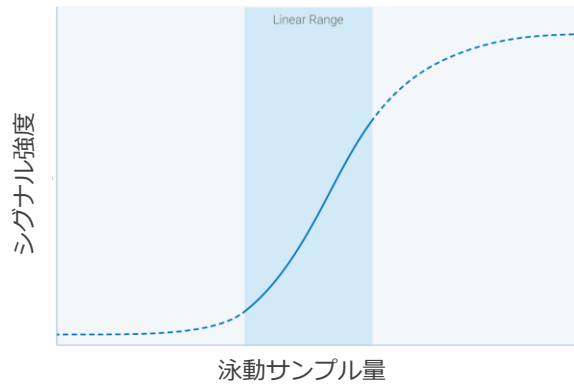
Combined Linear Range Determination (直線性のあるサンプルロード量の決定)



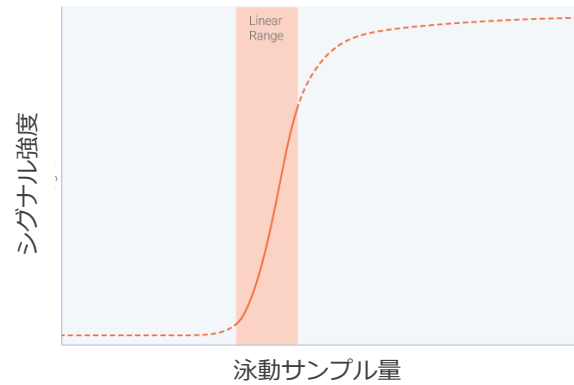


Combined Linear Range ?

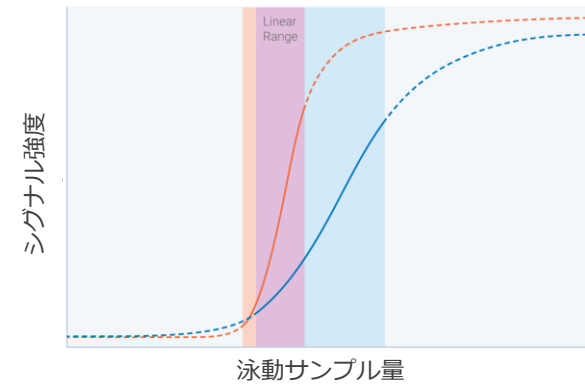
ターゲット・タンパク質



ローディングコントロール



重ね合わせ



ターゲット・タンパク質とローディングコントロールの両方で
直線性を確保できる濃度域が定量範囲となる

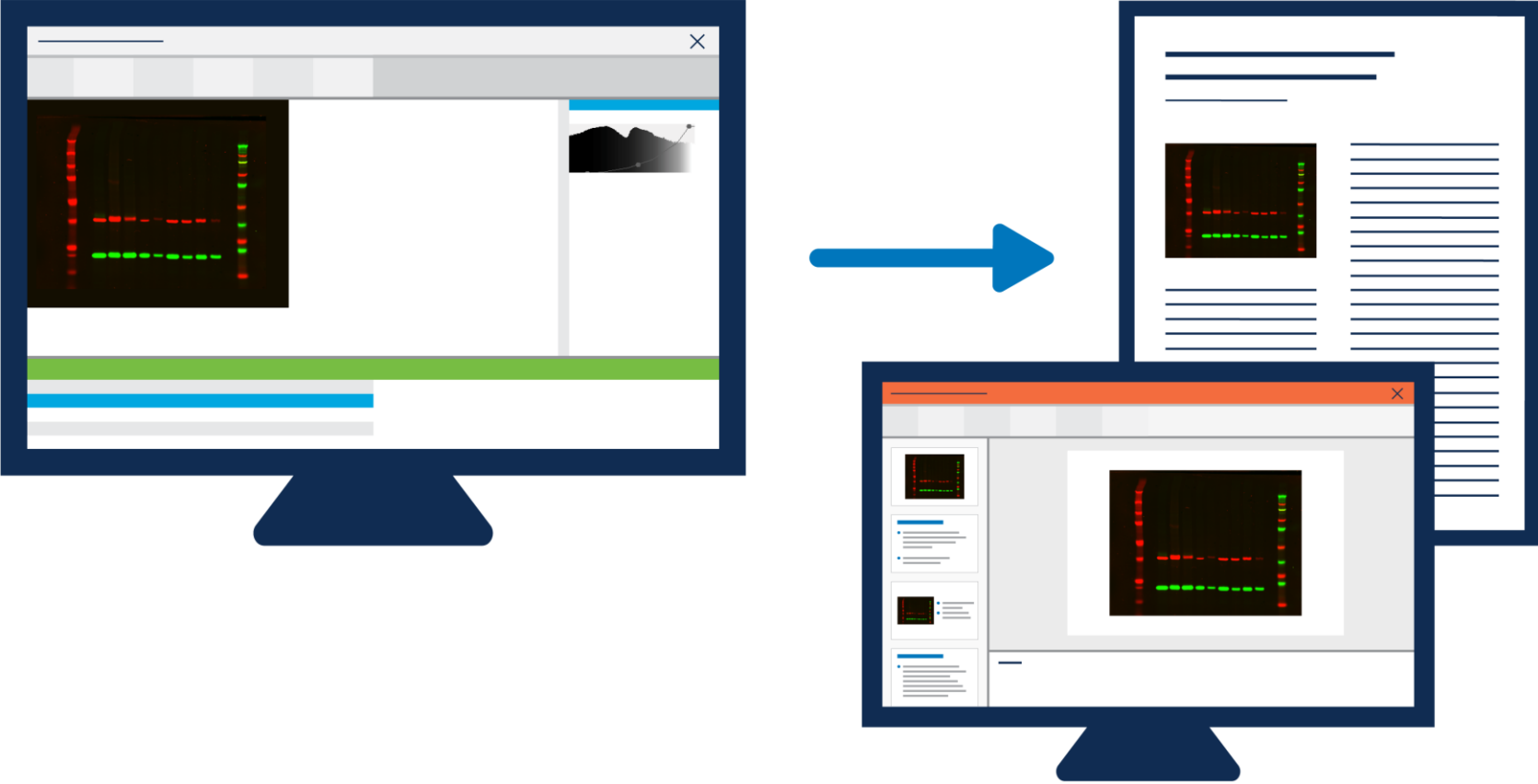
REVERT™ 520/700による総タンパク質補正

- ✓ 抗体結合を妨げない染色法
- ✓ アミノ酸組成に依存しない染色法
- ✓ 脱色可能
- ✓ 総タンパク質補正 + 2ターゲット定量が可能
- ✓ 従来のゲルを使用可能



- REVERT 700 総タンパク質染色試薬
- REVERT 700 洗浄液
- REVERT 700 脱色液

Import into Reports Easily





シグナル検出方法



イメージング



アッセイ
バリデーション



データ解析

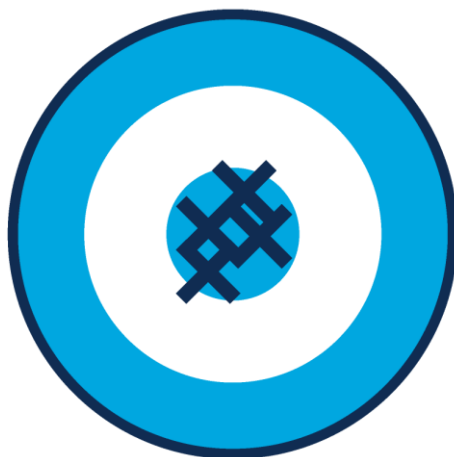
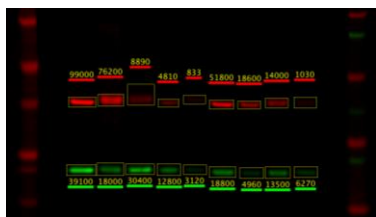
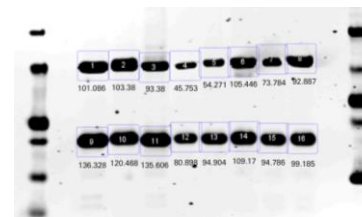
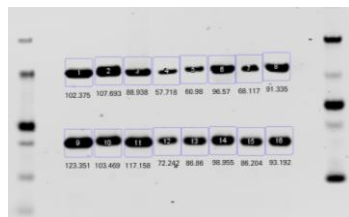


×

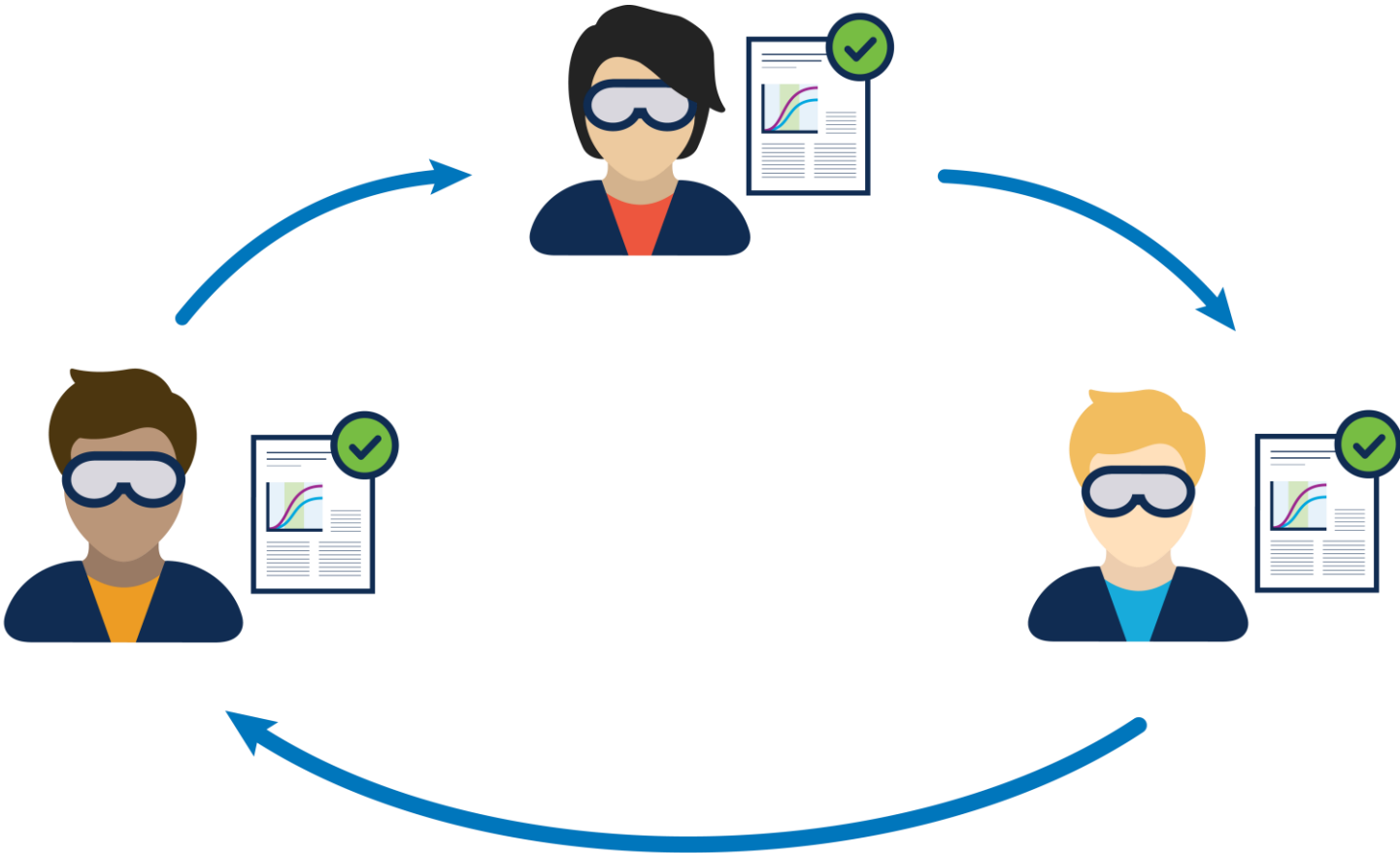
LI-COR

テクニカルサポート

実験間や解析者間のエラーを減らすには？

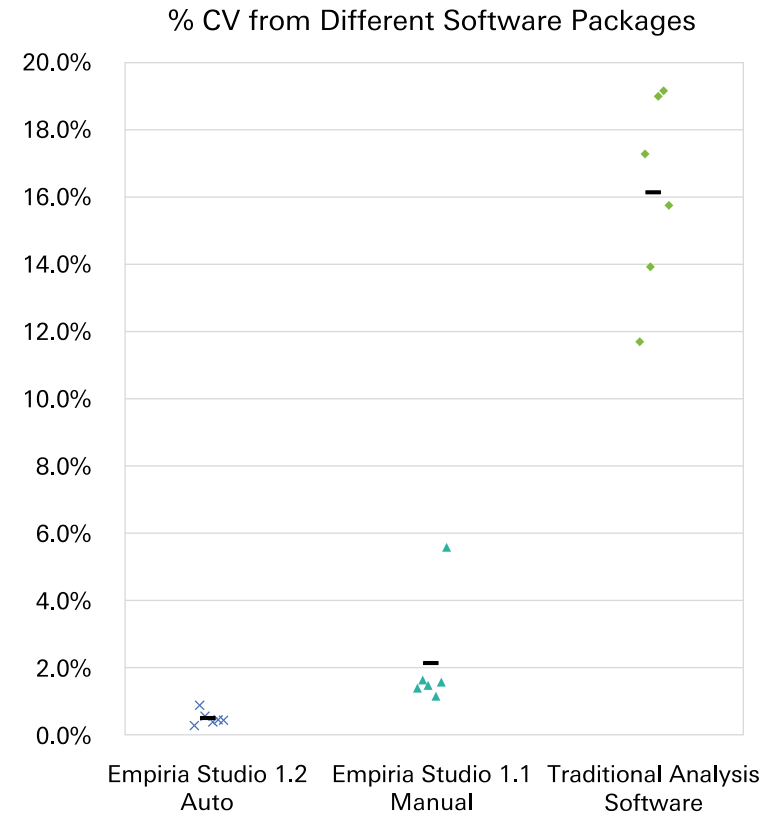
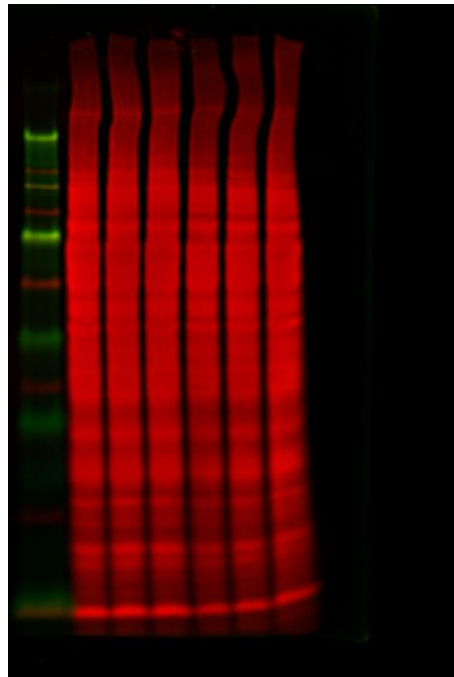


画像解析のバラつきを最小化



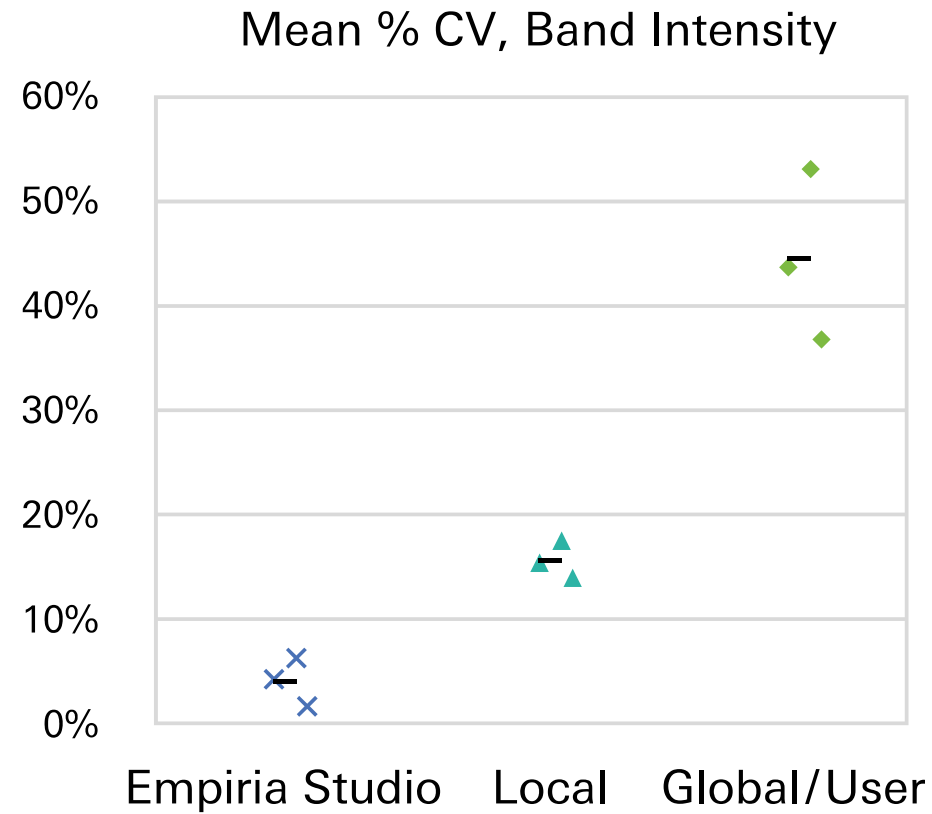
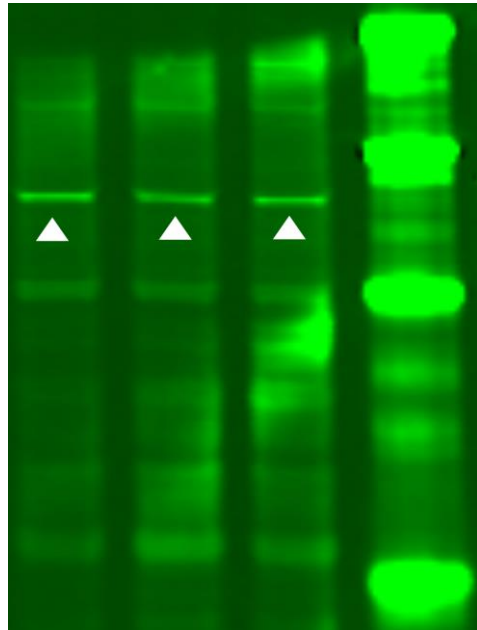
解析者間で差のないレーン検出

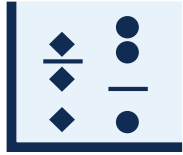
- Adaptive Lane Finding process (ALF)



解析者間で差のないバックグラウンド補正

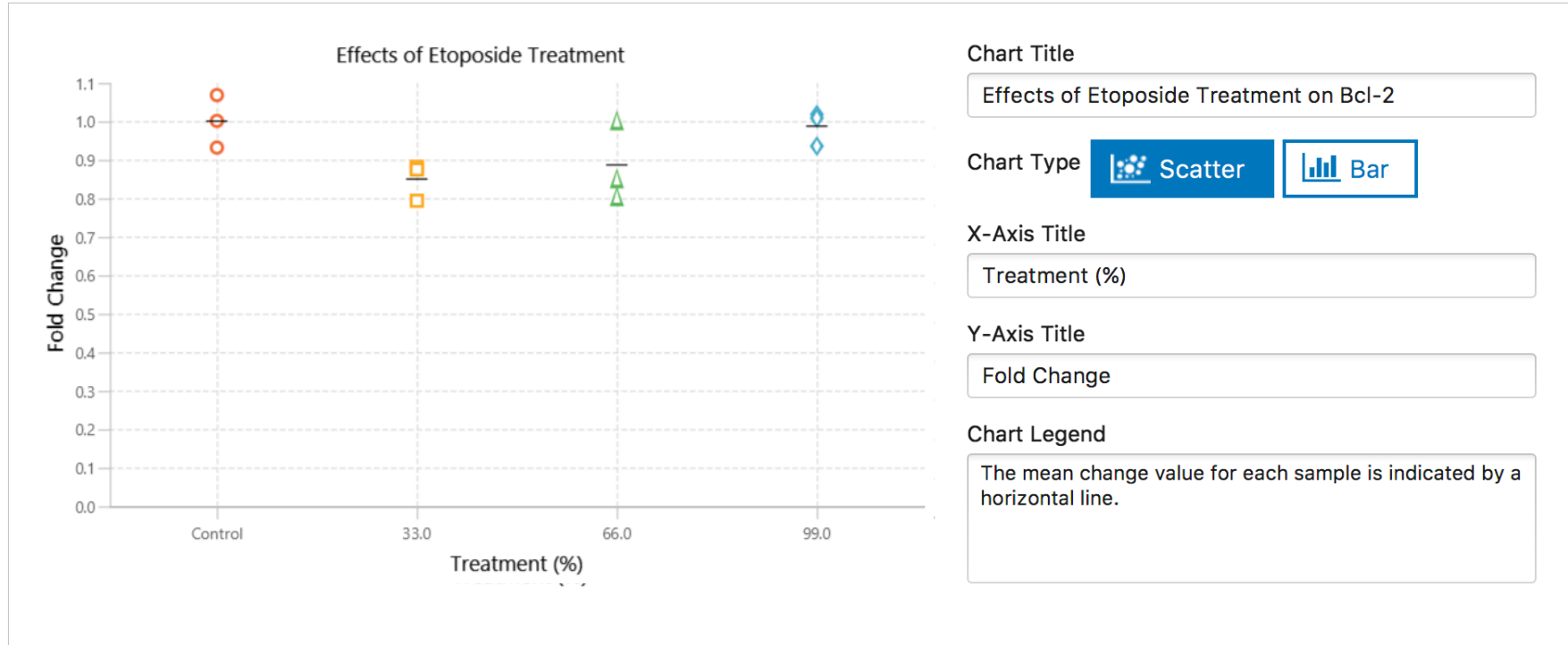
- Adaptive Background Subtraction (ABS)



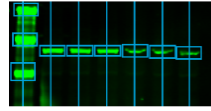


Automated Calculation & Graphing

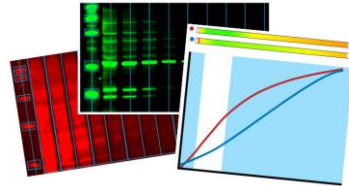
(自動ノーマライゼーション計算と自動グラフ化)



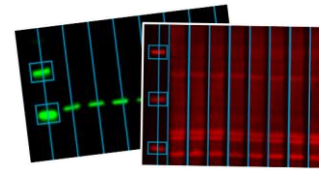
信頼性の高い高品質なデータを短時間で取得



抗体バリデーション



直線性バリデーション



発現差異解析



+60 minutes



CONFIDENCE



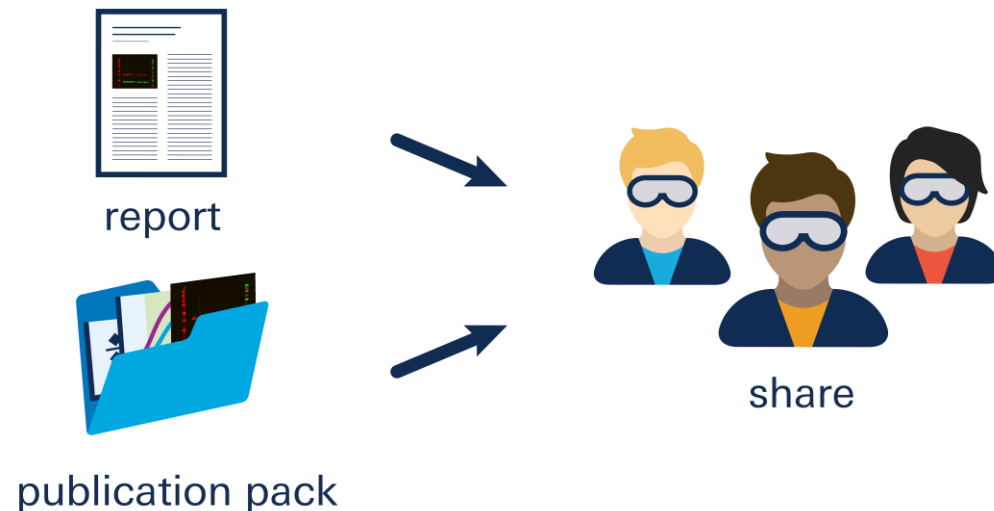
15 minutes



Data Export & Sharing

(データのエクスポートと共有)

- Publication Pack (シングルファイル) のエクスポート
- PDFレポートのエクスポート
- 画像と数値データのエクスポート
- 解析過程と生画像を含めたすべてのExperimental Dataを
学生↔先生間、部下↔上司間、研究者間で簡単に受け渡し



LI-COR® ソリューション

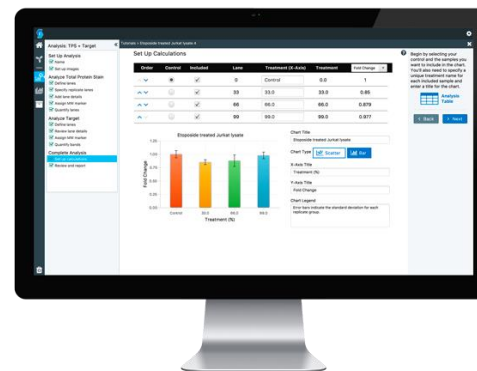
- 蛍光ウェスタンブロットとIn-Cell Western™ アッセイのパイオニア
- 約20年の経験に基づくアッセイプロトコルとサポートの提供
- 豊富な論文使用実績



イメージングシステム



アッセイプロトコル



ソフトウェア



試薬

Questions ?

