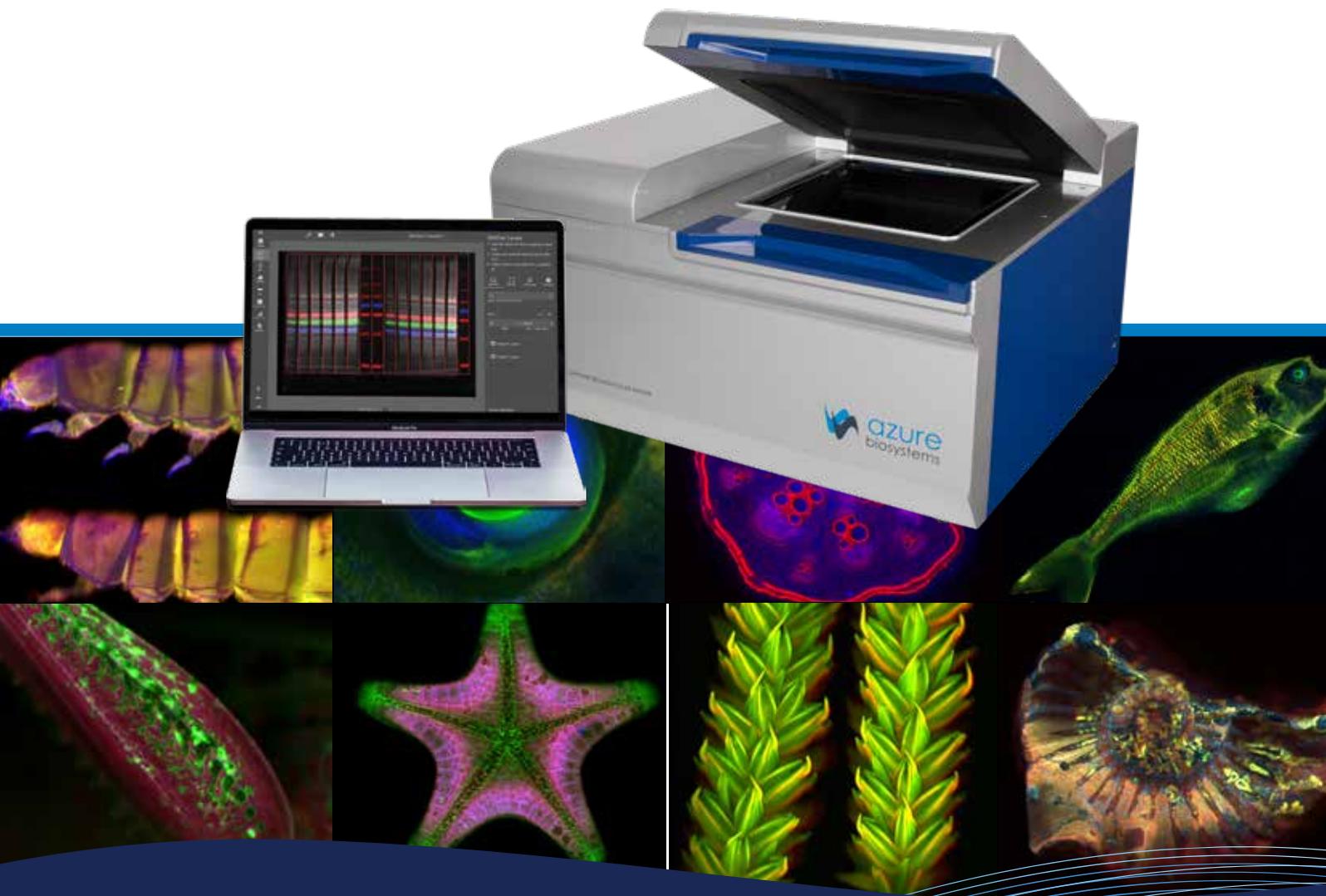


SAPPHIRE™ BIOMOLECULAR IMAGER

アプリケーション・オーバービュー

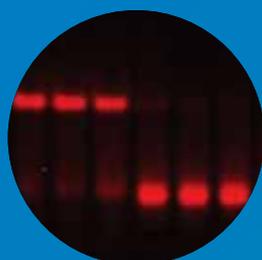


Sapphire Biomolecular Imager で何ができるか見てみましょう

ウェスタンブロット、2次元DNAゲルのサザンブロット、組織や小動物の肉眼的形態の可視化など、どのような種類のイメージングであっても、Sapphire Biomolecular ImagerはNIRおよびRGB蛍光、ケミルミネセンス、リン光イメージングにより優れた定量検出を提供します。

本書をご覧になり、Sapphireでできることのほんの一例をご覧ください。そしてSapphireをご自身で試されることをお勧めします。

2D DNA
レプリケーション
アッセイ

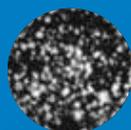
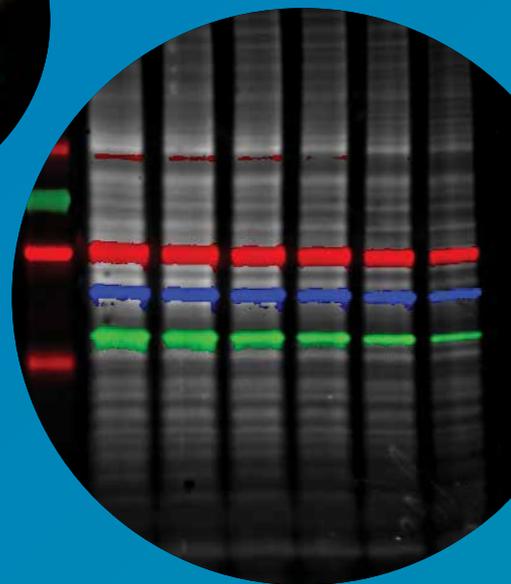


タンパク質-DNA
ゲルシフトアッセイ

ウイルス感染ゼブラフィッシュ



マルチプレックスウェスタンブロット
+ トータルタンパク質染色



細胞のクリスタル
バイオレット



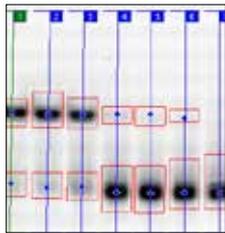
アプリケーション

■ 蛍光検出 ■ 化学発光検出 ■ りん光イメージング ■ デンシトメトリー



1. プロットイメージング パート1 -ウェスタンブロット.....4

- 最高4色の蛍光検出
- 高感度化学発光イメージング
- トータルタンパク質による標準化と最大3色の蛍光検出
- 蛍光ウェスタンブロットのコツ：ドライプロットのイメージングで感度向上



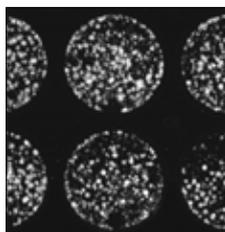
2. ゲルイメージング.....9

- ゲルシフトアッセイによるタンパク質-DNA結合の測定
- Sypro Rubyで染色した2Dタンパク質ゲルのイメージングと定量化
- 2Dゲル中の³⁵S標識タンパク質のイメージングと定量化
- クマシー染色および銀染色されたタンパク質ゲルを画像化
- EtBr染色アガロースゲルから正確なDNA定量が可能
- Midori Greenで染色したDNAアガロースゲルを画像化
- サンガーシーケンスやフットプリントのためのDNAを直接検出
- デンシトメトリー



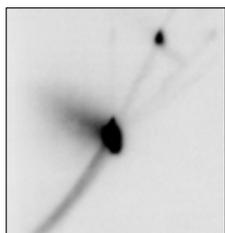
3. 組織・小動物のイメージング.....18

- 組織内のタンパク質の動きを追跡する：マウス後肢のリンパ節抗原の追跡
- 小動物組織：マウス胚
- 組織構造の情報を得る：CLARITYによる脳のホールイメージング
- 組織に局在するタンパク質の測定：胚・胎盤のバリアー透過性の研究
- ウイルス感染の追跡とウイルス量の定量（ゼブラフィッシュ）
- 解剖学的構造の可視化（ラット）
- Midori Greenで染色されたアガロースゲルのイメージング
- Xenopus oocyteを画像化し、タンパク質の局在を追跡



4. 96ウェルプレートイメージング.....26

- マルチウェルプレートの細胞を画像化する：クリスタルバイオレットを用いた細胞生存率の測定
- in cellウェスタンブロットの効率化

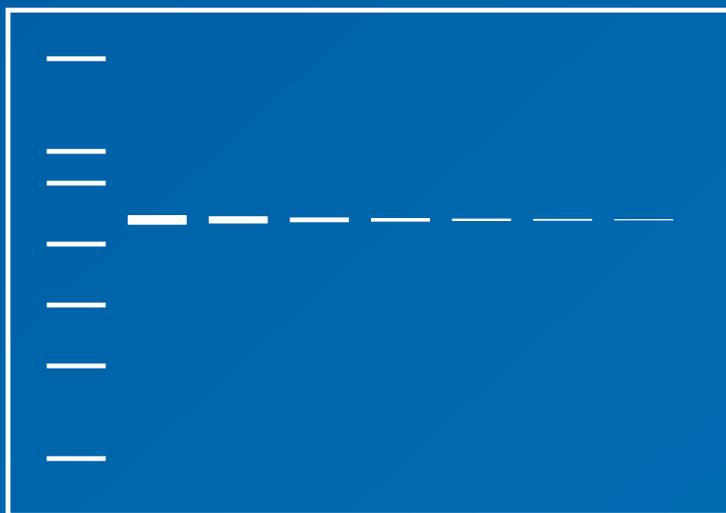


5. プロットイメージング パート2 -サザンブロット.....29

- プラスミド量測定、化学発光検出
- プラスミド量の測定、りん光イメージング
- ³²P標識プローブによる高感度・定量的なDNA検出：2次元アガロースゲル電気泳動によるDNA構造解析
- ³²P標識プローブによる高感度な定量DNA検出：軽鎖/重鎖のDNA比を測定し、抗体作製に役立てる。

1

ブロットイメージング パート 1 ウェスタンブロット



化学発光や蛍光のウェスタンブロットを高感度に検出・定量するために、Sapphireが優れている理由は何でしょうか？

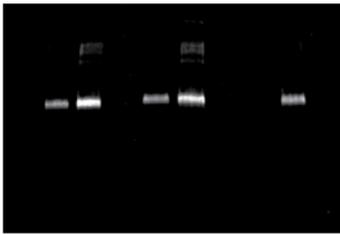
- 4つの固体レーザーで強力な励起を実現
- 独自の3つの検出器設計により、撮影の種類に応じて適切なセンサーを使用することで、性能を最大限に引き出します。
 - 高感度光電子増倍管(PMT)により、青色光の検出とりん光画像の最適化を実現
 - 高量子効率アバランシェフォトダイオード(APD)により、近赤外線(NIR)、赤外線(IR)、赤色光、緑色光のイメージングを実現
 - CCDセンサーにより、フィルムと同等の感度で化学発光イメージングが可能
- パワフルで使いやすいSapphire CaptureソフトとAzureSpotPro解析ソフト

最大4色の検出が可能な蛍光ウェスタン

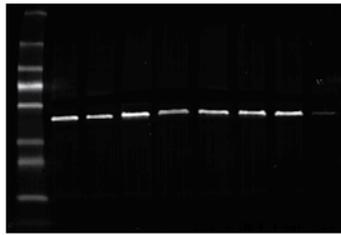
より迅速なワークフローと信頼性の高い定量を実現します。

ウェスタンブロットングは強力な技術で、タンパク質間相互作用、シグナル伝達経路、翻訳後修飾、細胞表面タンパク質、RNAi解析などの特性解析に有用です。定量的ウェスタンブロットングは、処理または条件間の有意な相対比較を行うために、タンパク質発現の変化を測定することを目的としています。

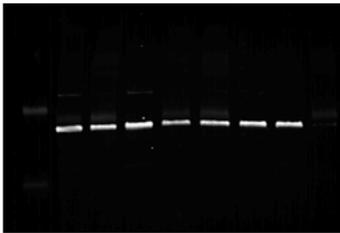
a 490 - transferrin (青)



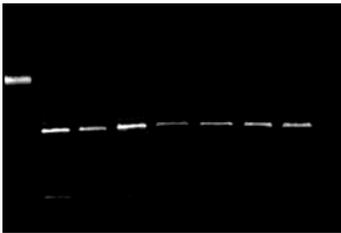
b 700 - actin (赤)



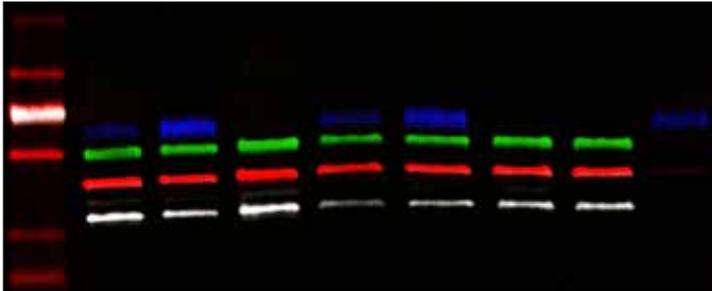
c 550 - tubulin (緑)



d 800 - GAPDH (グレー)



e



4種類の蛍光色素で標識された2次抗体を使用することで、最大4種類のタンパク質を同時に検出することができます。ここでは、transferrinを添加したHeLa細胞ライセートにおいて、抗tubulin(550nm、緑)、抗 β -actin(700nm、赤)、抗GAPDH(800nm、グレー)、抗transferrin(490nm、青)で同時に検出したウェスタンブロットのイメージング例を紹介します。4つのタンパク質がすべて高感度かつ特異的に検出され、バックグラウンドの自家蛍光やチャンネル間の漏れ込みは認められません。

蛍光イメージング 4カラーイメージング

ピクセルサイズ	100 μ m
レーザー	488 nm (transferrin) 520 nm (tubulin) 658 nm (β -actin) 784 nm (GAPDH)

文献例

Sapphireで撮影した蛍光ウェスタンブロットの例をご覧ください。

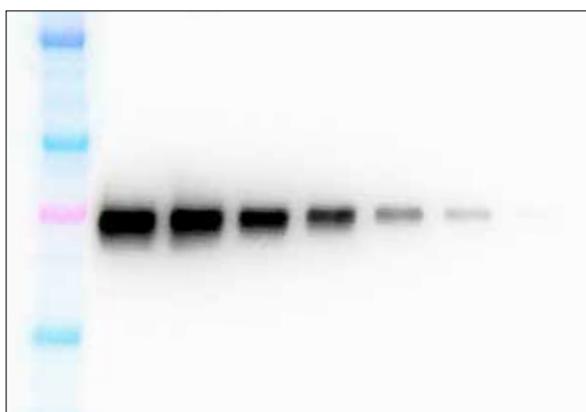
- Rut W, et al. Activity profiling and crystal structures of inhibitor-bound SARS-CoV-2 papain-like protease: A framework for anti-COVID-19 drug design. *Sci Adv.* 2020 Oct 16;6(42):eabd4596. doi: 10.1126/sciadv.abd4596. PMID: 33067239; PMCID: PMC7567588.
- Ha J, Park SB. Callyspongiolide kills cells by inducing mitochondrial dysfunction via cellular iron depletion. *Commun Biol.* 2021 Sep 23;4(1):1123. doi: 10.1038/s42003-021-02643-8. PMID: 34556786; PMCID: PMC8460830.
- Markowitsch SD, et al. Shikonin Inhibits Cell Growth of Sunitinib-Resistant Renal Cell Carcinoma by Activating the Necrosome Complex and Inhibiting the AKT/mTOR Signaling Pathway. *Cancers (Basel).* 2022 Feb 22;14(5):1114. doi: 10.3390/cancers14051114. PMID: 35267423; PMCID: PMC8909272.

高感度化学発光検出

ウェスタンブロットワークフローのオプションを最大限に活用

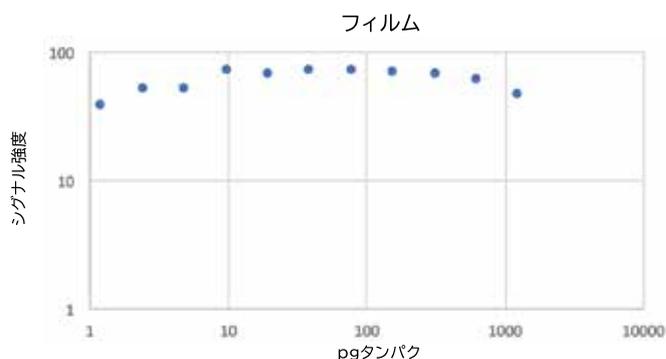
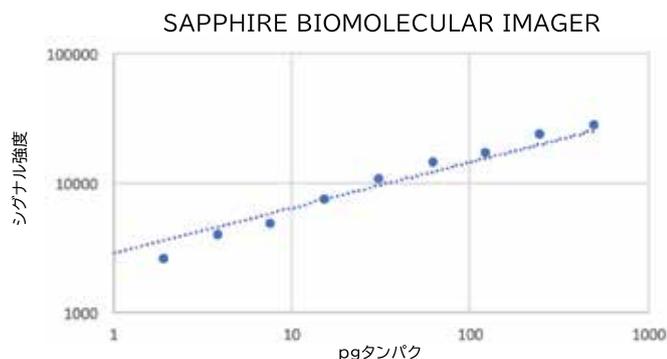
化学発光ウェスタンブロッティングは、西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)で標識した二次抗体と強化化学発光(ECL)基質との酵素反応による光子の発生を利用したものです。酵素反応によるシグナル増強は、微量のタンパク質の検出に有効です。

Sapphireに切り替えたからといって、これまで慣れ親しんできた化学発光プロトコルをすべて蛍光プロトコルに変更しなければならないわけではありません。他のスキャニングシステムと異なり、Sapphireはフィルムと同じ感度で化学発光検出が可能であり、しかもダイナミックレンジが非常に広がっています。



化学発光イメージング

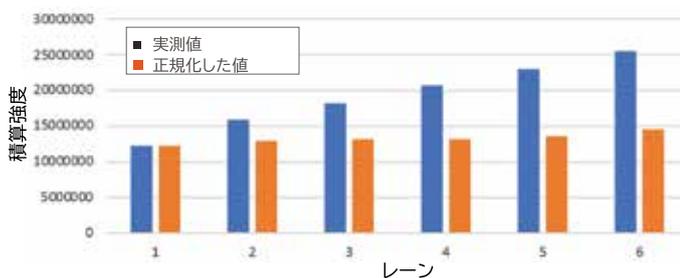
ピクセルサイズ	ビニング : 1x1 解像度 : 2688x 2200
検出器	CCDセンサー



トータルタンパク質による正規化、最大3種類のタンパク質の検出が可能

信頼できる定量的なウェスタンブロットデータを生成します。

正規化とは、レーン間やサンプル間のばらつきを補正するために、内部のローディングコントロールやトータルタンパク質染色を使用することです。何らかの正規化を行わない限り、バンド量や強度の変化がサンプルの生物学的変化によるものか、ローディングやサンプルの不一致、サンプル調製のばらつきによるものかを知ることは不可能です。この技術は、不均一なタンパク質濃度、ゲル間のローディングの不一致、ブロット間の転写のばらつきを考慮するために用いられ、ウェスタンブロット内で意味のある比較を行おうとする場合には必須となるものです。タンパク質の発現量の変化を比較するためのベースラインを得ることができます。



トータルタンパク質に対して正規化したチュープリングシグナルの定量化(オレンジ)により、TPNがローディングの違いをどのように補正できるかが示されました。

AzureRed Total Protein Stain

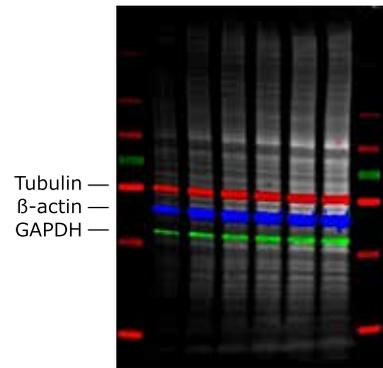
全タンパク質を簡単に染色し、最も正確なブロットの正規化を行うことができます。

▶ Azure Catalog Number AC2124



一般的な標準化手法のうち、トータルタンパク質染色は実験条件の影響を受けないため、主要ジャーナルで好んで使用されるようになってきています。トータルタンパク質の正規化のためにAzureRed Fluorescent Protein Stainと組み合わせることで、Sapphireは最大3種類のタンパク質を同時に検出し、トータルタンパク質への正規化を可能にします。

HeLa cell lysate, μg
2 4 6 8 10 12

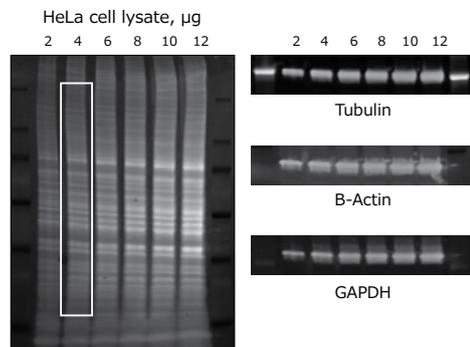


HeLa細胞ライセート量を変化させたブロットを4色で検出。Tubulinは赤、 β -actinは青、GAPDHは緑、AzureRed total proteinは白で表示されています。

蛍光イメージング 4カラーイメージング

ピクセルサイズ 100 μm

レーザー
488nm (β -actin)
520nm (total protein stain)
658nm (tubulin)
784nm (GAPDH)



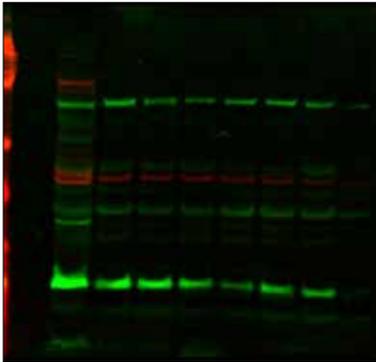
同一ブロットの個別チャンネル トータルタンパク質のシグナルを計算するには、レーン全体をボックスで囲み、通常通り、目的のシグナルをトータルタンパク質のシグナルに正規化します。

*Ghosh R, Gilda JE, Gomes AV. The necessity of and strategies for improving confidence in the accuracy of western blots. *Expert Rev Proteomics*. 2014 Oct; 11(5): 549-560. PMID: PMC4791038.

蛍光ウェスタンブロッティングのコツ

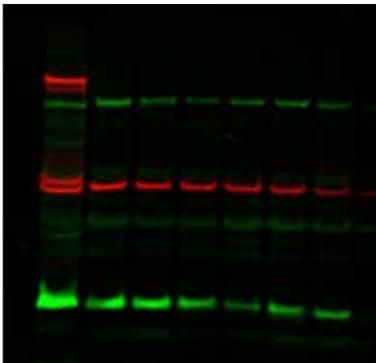
イメージング前にブロットを乾燥させることによる感度の向上

ブロットが濡れた状態や乾いた状態での撮影は、データにどのような影響を与えるのでしょうか？下のデータは、Sapphireを用いて濡れたブロットと乾燥させたブロットを撮影し、比較したものになります。濡れたブロットをスキャンしても検出可能な信号が得られますが、ブロットを乾燥させると信号強度が上がり、バックグラウンドが下がり、その結果S/N比が良くなります。水分は蛍光を減衰させるので、ブロットの異なる領域の乾燥度のわずかな違いでも、定量にばらつきが生じる可能性があります。イメージング前にブロットを乾燥させることで、感度が大幅に向上し、信頼性の高い定量データを得ることができます。



濡れた状態でのイメージング

蛍光イメージング	
ウェスタンブロット：濡れた状態	
ピクセルサイズ	100μm
レーザー	658nm, 784nm
フィルター	710BP40, 832BP37
強度	7 (658nm), 7 (784nm)

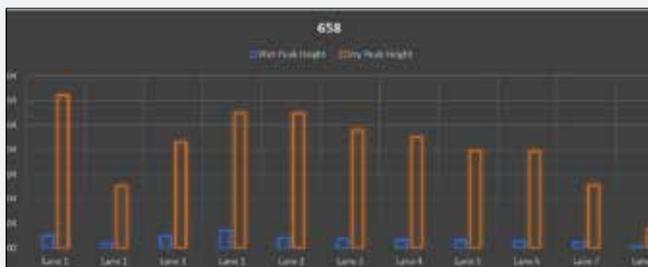


乾燥状態でのイメージング

蛍光イメージング	
ウェスタンブロット：乾燥状態	
ピクセルサイズ	100μm
レーザー	658nm, 784nm
フィルター	710BP40, 832BP37
強度	5 (658nm), 2 (784nm)

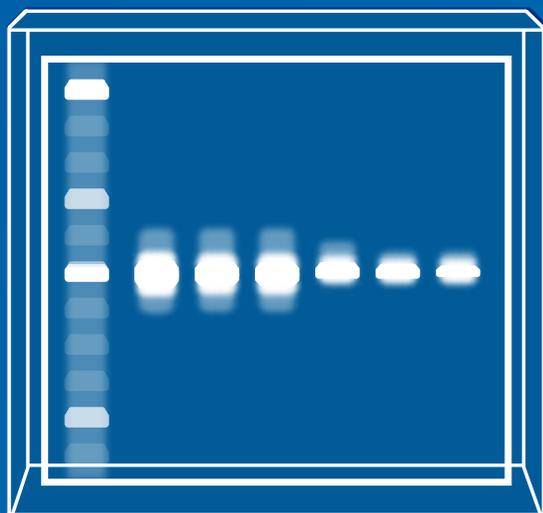
定量性比較

両方の励起波長(左:658nm、右:784nm)において、ドライブロットからのシグナル強度(オレンジ)は、ウェットブロットからのシグナル強度(青)よりはるかに高くなっています。



②

ゲルイメージング



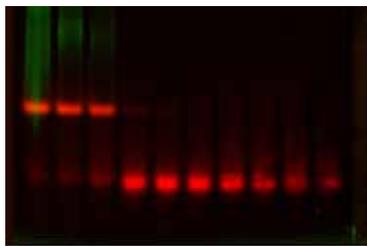
Sapphireに採用されているウェスタンブロットのイメージングに優れた3つの検出器技術は、エチジウムブロマイド(EtBr)染色DNAアガロースゲル、クーマシー染色タンパク質ゲル、さらには³²P標識DNAアクリルアミドゲルなど、さまざまなゲルを柔軟にイメージングすることが可能です。

ゲルシフトアッセイを用いたタンパク質-DNA結合の測定

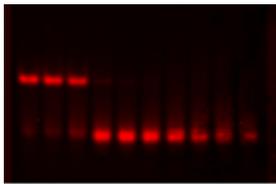
デリケートなゲルをガラスプレートに入れたまま画像化

電気泳動移動度測定法(EMSA)、別名ゲルシフトアッセイは、タンパク質-タンパク質、タンパク質-リガンド、タンパク質-DNAなど、あらゆるタイプの安定な結合反応をモニターするのに最適な方法です。タンパク質やタンパク質とDNAの複合体は、結合していないタンパク質やDNAよりも移動速度が遅く、サンプル内のバンドが「シフト」するため、配列特異的な相互作用の解析に使用することができます。

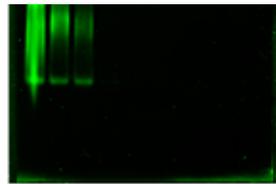
従来、EMSAは放射性同位体を用いて行われてきましたが、この技術は非危険物の蛍光色素を用いることにも適応でき、フィルムやスクリーンの露光に要する時間を短縮することで、アッセイ時間を短縮することができます。



重ね合わせ



658nm



784nm

蛍光イメージング

EMSA (ゲルシフト) - ガラス板に入れたまま撮影

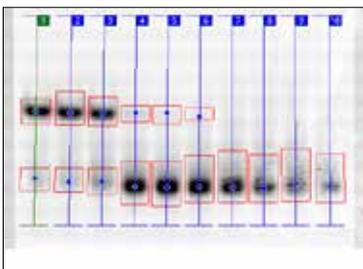
ピクセルサイズ 100µm

レーザー 658nm, 784nm

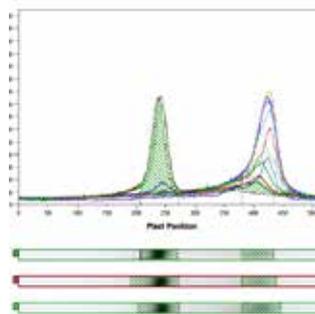
フィルター 710BP40, 832BP37

解析 AzureSpot 1Dモジュール、
正規化体積対体積

ここでは、EMSAを用いたタンパク質とDNAの結合反応をSapphireで画像化したデモの結果を紹介します(DNAは赤、タンパク質は緑で表示されます)。Sapphireに使用されている強力なレーザーは、ガラスプレート内のゲルを直接イメージングすることを可能にし、プロットティングペーパーへの移行時や乾燥中にデリケートなゲルが破損するリスクを低減します。



バンドアライメントの可視化 (658nm)



文献例

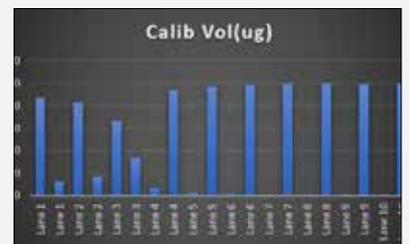
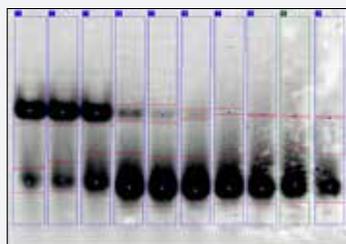
Sapphireを使用して撮影したEMSAの例をご覧ください:

H-NS Family Members MvaT and MvaU Regulate the Pseudomonas aeruginosa Type III Secretion System.

EAW McMackin, AE Marsden, and TL Yahr. *J Bacteriol.* 2019 Jun 21;201(14). pii: e00054-19.

定量

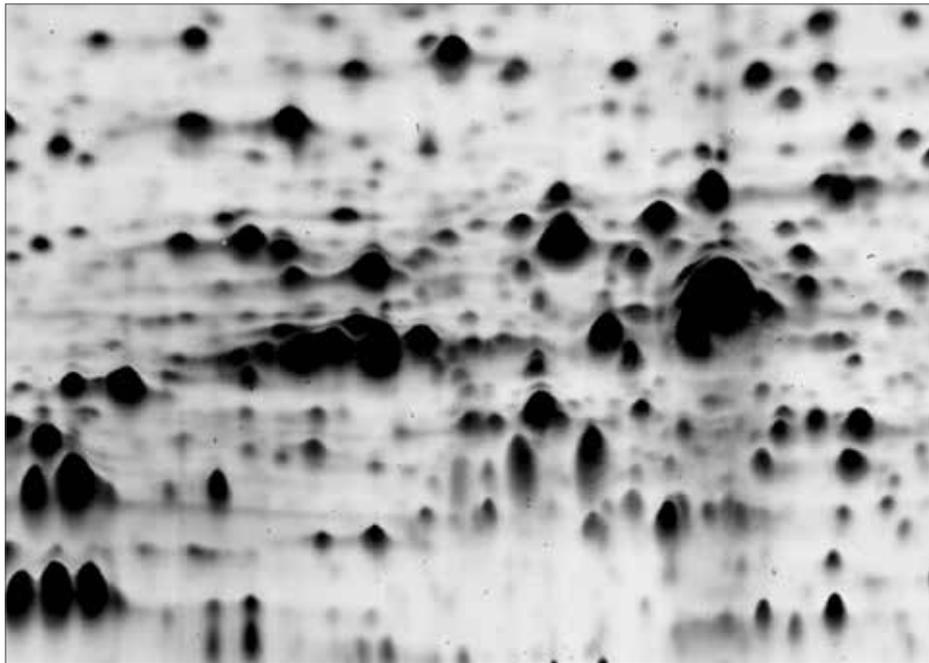
結合したDNAと結合していないDNAの測定は、AzureSpotソフトウェアで簡単に行うことができます。



Sypro Rubyで染色した2次元タンパク質ゲルのイメージングと定量化

プロテオミクス研究の解析が容易に

1次元のポリアクリルアミドゲル電気泳動はほとんどの用途に適していますが、プロテオミクスやその他の研究の多くは、共移動するタンパク質やそのアイソフォームを分離するために、もう一次元の分離を行うことが有効です。ここでは、Sypro Rubyで染色した2次元タンパク質ゲルのクローズアップを示します。50 μ mの解像度でスキャンすると、はっきりとしたスポットを簡単に見ることができ、AzureSpotソフトウェアで定量化することも可能です。

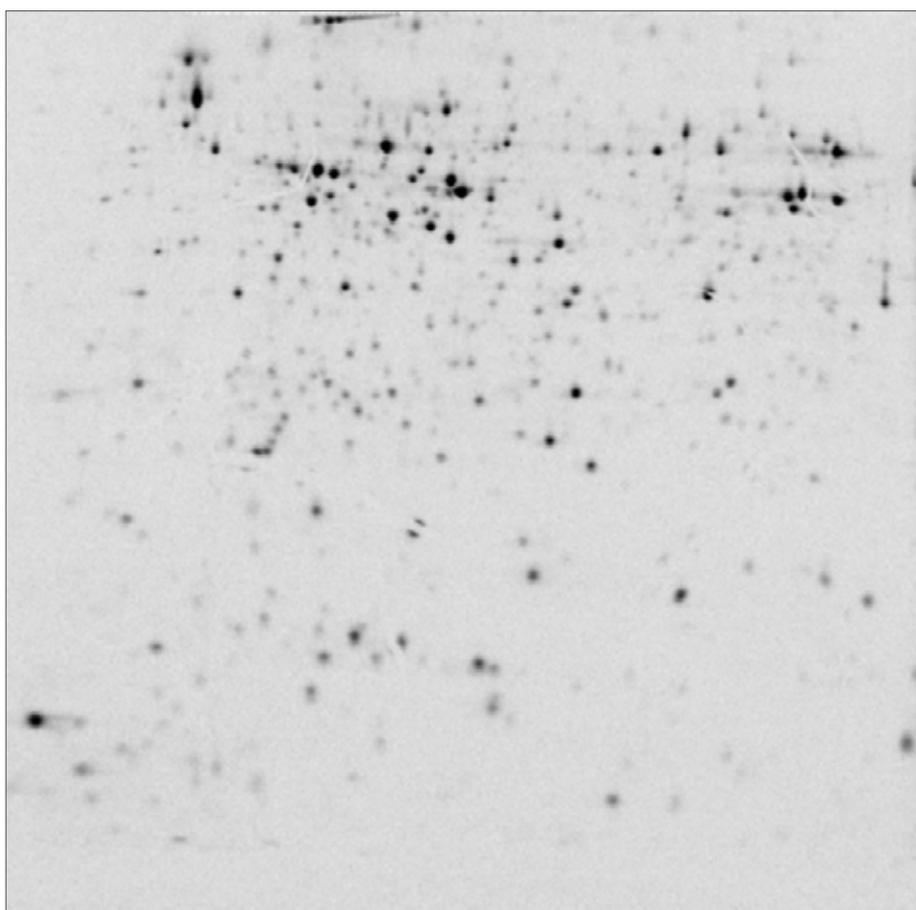


蛍光イメージング 2Dタンパク質泳動ゲル

ピクセルサイズ	50 μ m
レーザー	658nm

2次元ゲル中の³⁵S標識タンパク質のイメージングと定量化 代謝標識されたサンプルのプロテオミクス解析を実施

より高感度な検出には、³⁵S標識メチオニン存在下で培養した細胞から分離したタンパク質サンプルで2Dゲル電気泳動を実行します。放射性標識は細胞内タンパク質に取り込まれ、Sapphireのリン光イメージング機能により直接検出することができます。Sypro Ruby染色ゲルと同様に、AzureSpotソフトウェアを用いて個々のスポットを定量化することができます。

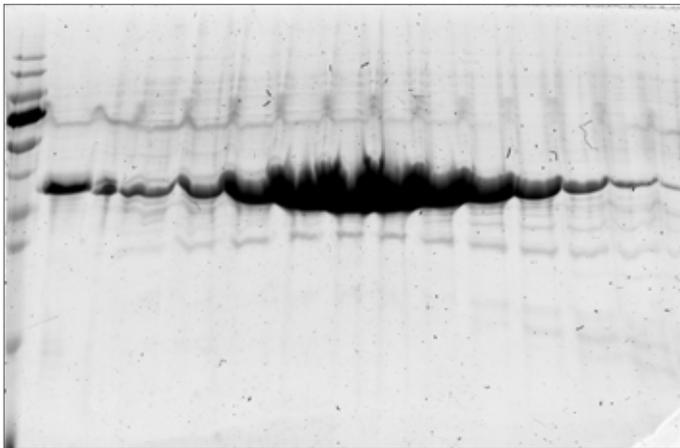


リン光イメージング
2Dタンパク泳動ゲル

ピクセルサイズ 200μm

クマシー染色・銀染色ゲルのイメージング

クマシー染色や銀染色は、ゲル内のタンパク質を検出・定量するための一般的な染色です。Sapphireは高解像度スキャンアプリケーションに十分な性能を発揮しますが、タンパク質ゲルのスキャンまたはCCDドキュメントのクイックドキュメントの両方に使用することも可能です。ここでは、クマシー染色と銀染色を施したゲルを紹介します。Sapphireは幅広い染色に対応しており、大きなスキャンベッドは複数のゲルを収容することが可能です。Sapphireでは、蛍光検出とCCDイメージングのどちらの検出方法がお客様のアッセイに最も適しているかを選択することができます。



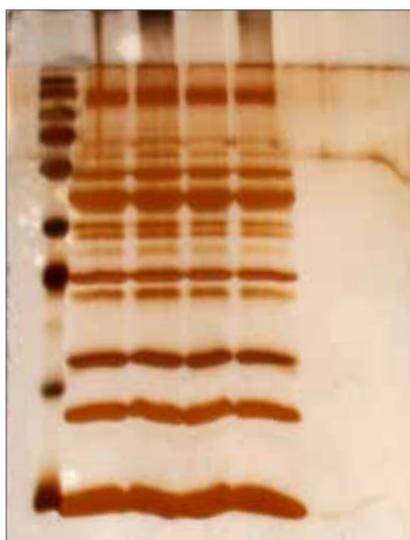
クマシー染色タンパク泳動ゲル

NIR蛍光イメージング

クマシー染色ゲル

ピクセルサイズ	100μm
---------	-------

レーザー	658nm
------	-------



銀染色タンパク泳動ゲル

CCDイメージング

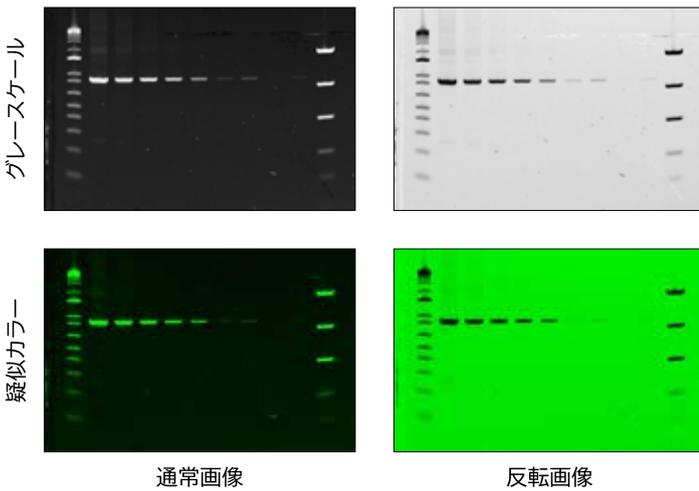
銀染色ゲル

ピクセルサイズ	ビニング : 1x1
---------	------------

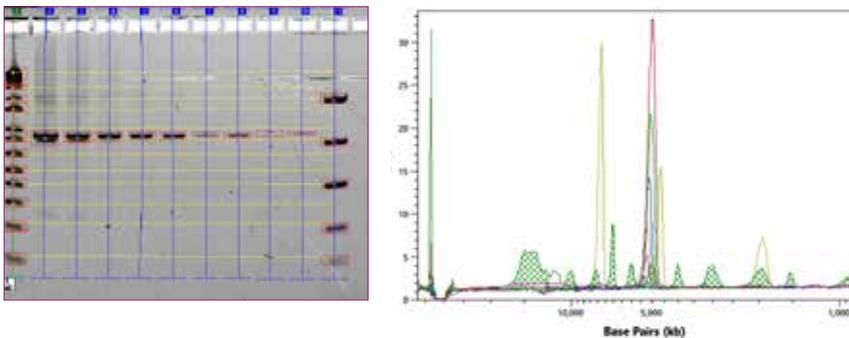
	解像度 : 2688x2200
--	-----------------

EtBr染色したアガロースゲルから正確なDNAの定量が可能

DNAアガロースゲル電気泳動は、分子量に応じてDNAを分離するために使用される最も基本的で広く普及している分子生物学的手法の1つです。Sapphireは、EtBrを含む一般的なDNA染料の蛍光特性を利用して、アガロースゲルを簡単に画像化し、有害なUV光を使用せずに染色したゲルの正確なDNA定量を可能にします。



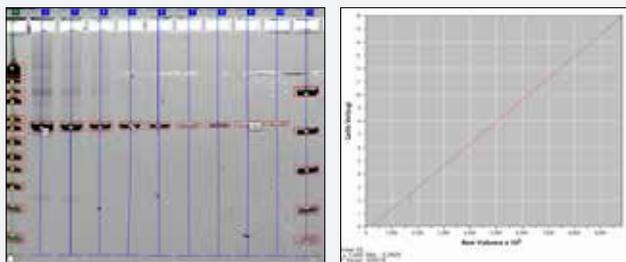
蛍光イメージング EtBr染色DNAアガロースゲル	
ピクセルサイズ	100µm
レーザー	520nm
フィルター	565BP24
解析	AzureSpot 1D Gel/Western Blot量的キャリブレーション、AzureSpotツールボックスのパーセンテージ



定量比較

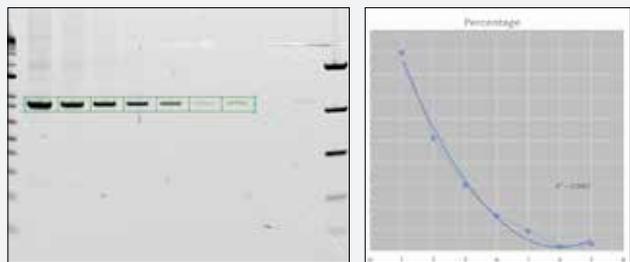
AzureSpotソフトウェアには、定量のための様々なツールが付属しています。Quantity CalibrationとToolbox Percentageの両機能により、正確な定量を行うことができます。

Quantity Calibration



$R^2 = 0.9978$

Toolbox Percentage

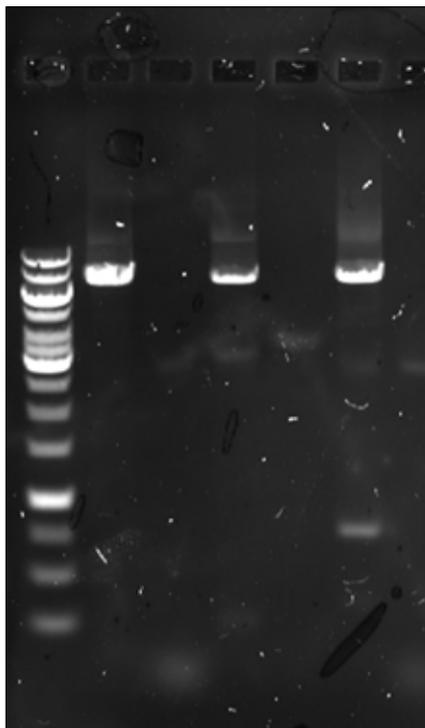


$R^2 = 0.9907$

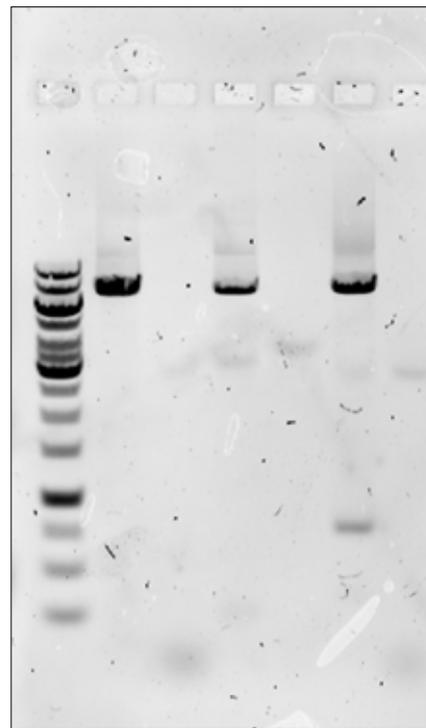
Midori Greenで染色したDNAアガロースゲルの画像化

様々な色素を可視化できるSapphireは、EtBr染色したDNAアガロースゲルのみならず、様々な染色サンプルを記録・定量することが可能です。ここでは、Midori Greenで染色したDNAゲルの例を示します。

Midori Green染色DNAアガロースゲル



通常画像



反転画像

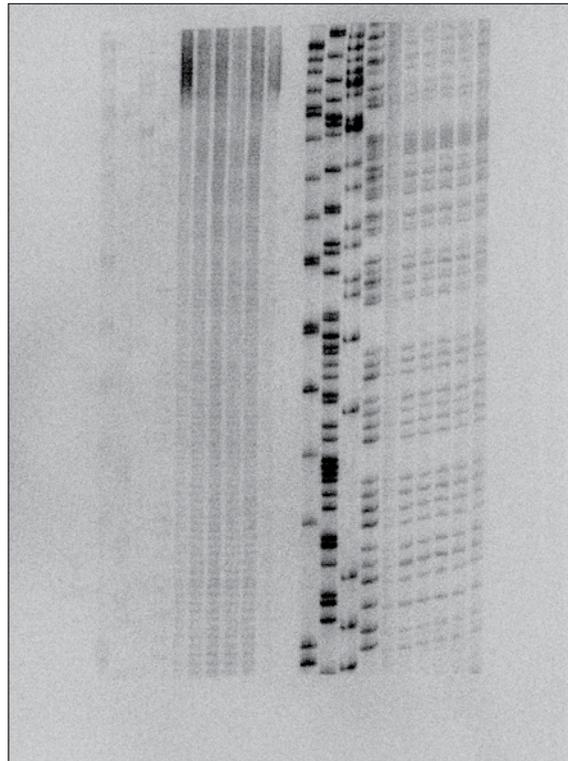
RGB蛍光イメージング Midori Green染色DNAゲル

ピクセルサイズ 100 μ m

レーザー 520nm

サンガーシーケンス・フットプリント用DNAを直接検出

次世代シーケンサーの出現はDNA配列情報の取得方法を大きく変えましたが、DNAフットプリンティング、転写開始の研究、突然変異解析など、DNAシーケンサーゲル電気泳動を実行する必要がある重要なアプリケーションもまだいくつかあります。蛍光色素や ^{32}P を使用している場合でも、Sapphireはゲルを画像化し、解析をサポートすることができます。



りん光イメージング

DNAゲル

ピクセルサイズ	200 μm
レーザー	658nm
フィルター	390BP40

文献例

DNAの構造がウイルスの組み込みにどのように影響するかを研究するためにSapphireがどのように使用されているかをご覧ください。:

Nucleosome DNA unwrapping does not affect prototype foamy virus integration efficiency or site selection.

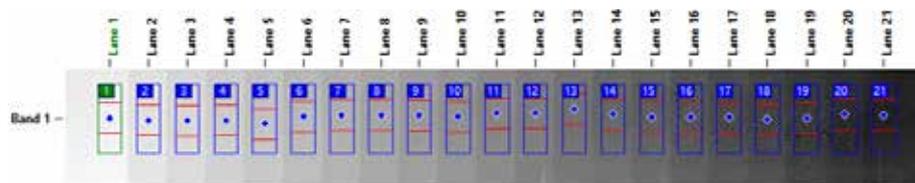
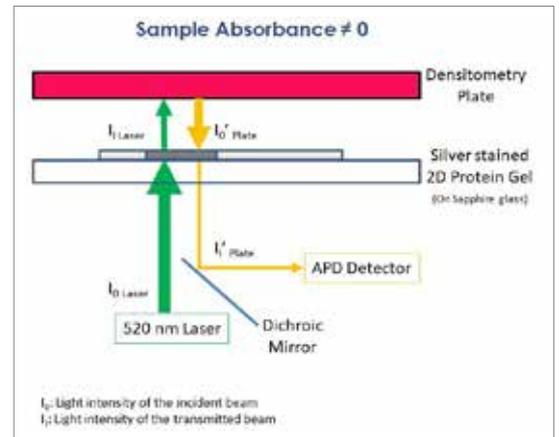
Randi M. Mackler, et al. *PLoS One*. 2019 Mar 13;14(3):e0212764.

デンシトメトリー

デンシトメトリーは、ゲル電気泳動で分離され、比色色素で染色されたタンパク質を定量し、同定するための強力な技術です。校正された標準物質を用いて可視のゲルシグナルを定量することにより、ロードされたタンパク質の量を計算することができます。しかし、正確な定量を行うためには、高解像度の画像、直線的なシグナルの検出、均一な照明が必要です。

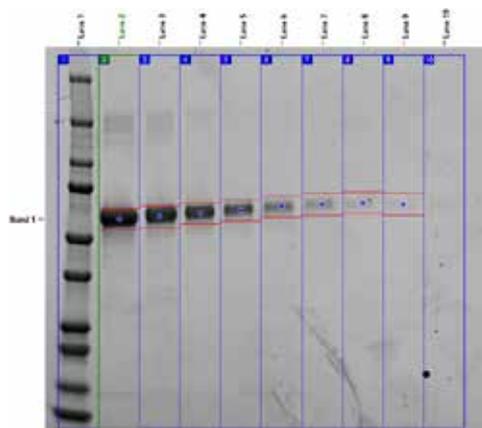
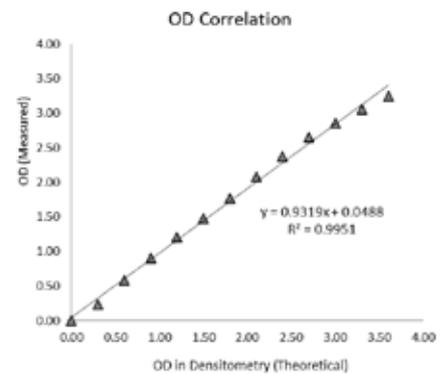
Azure DensitoMetricsパッケージと組み合わせることにより Sapphire biomolecular Imagerは、10ミクロンまでの画像解像度、3.6 ODの範囲でのシグナル直線性、および均一なフラットベッドレーザースキャナーを提供します。

さらに、最大25x25cmのイメージングエリアと焦点面を調整できるため、さまざまなサイズや厚さのゲルに対応します。デンシトメトリー分析では、クマシーブルーなどの比色色素や様々な銀染色を使用しますが、これらはSapphire biomolecular Imagerのグリーンチャンネル(520nmレーザー; 565/24nmエミッションフィルター)で効果的に捕捉されます。

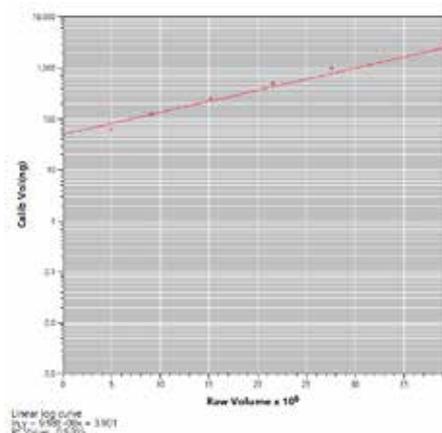


AzureSpot Analysis Softwareで解析した21-Step TabletとODの散布図

Step OD = 0.30 → 理論値 OD_{Densit} = 0.60
 測定:
 $T_{0.60} = 8,763,452 / 33,632,900 = 0.26$
 $OD_{0.60} = -\text{Log} (8,763,452 / 33,362,900) = 0.58$



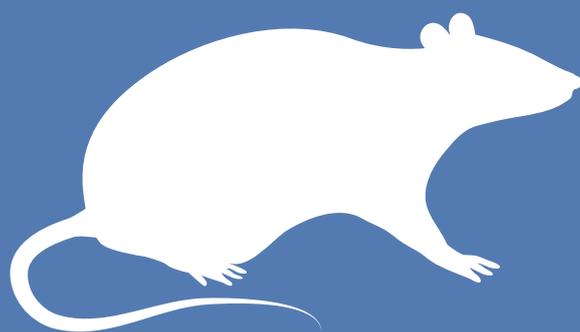
1D SDS-PAGEのクマシーブルー染色
 BSAの2pgから始まる2倍希釈。520nmのレーザーチャンネルで強度L1。



クマシーブルー染色ゲルの線形-対数散布図
 (左の画像)

③

組織・小動物イメージング



10 μ mの分解能と25cm×25cmのスキャンベッドにより、ブロットのスキャンから組織やマウス、ラット、小型植物、ゼブラフィッシュなどの小動物モデルのスキャンまで対応可能です。解剖学的構造、形態学、タンパク質の局在などを素早く捉え、定量化することができます。

小動物の組織内を移動するタンパク質を追跡

マウス後肢におけるリンパ節抗原の追跡

Sapphireは、ゲルやプロット以外にもイメージングに有効です。蛍光、化学発光、りん光検出を利用して、小動物モデル全体をイメージングすることができます。ここでは、蛍光標識した抗原をマウスの後肢に皮下注射し、安楽死させ、膝窩リンパ節と坐骨リンパ節からの蛍光を測定しました。

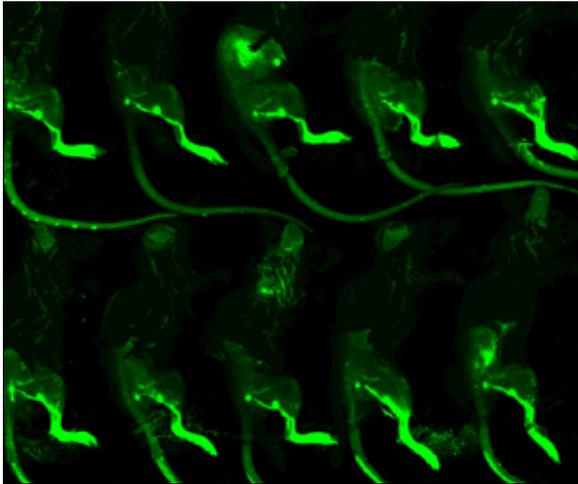
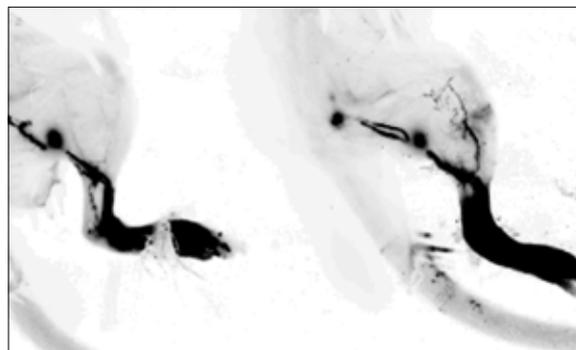


Image multiple animals/samples

蛍光イメージング

マウスの後肢

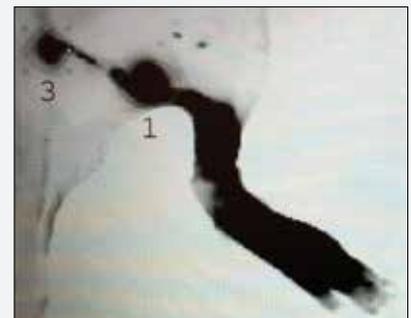
ピクセルサイズ	100µm
レーザー	658nm, 784nm
フィルター	710BP40, 832BP37
解析	AzureSpot 1Dモジュール、 正規化体積 vs. 体積



反転画像

定量

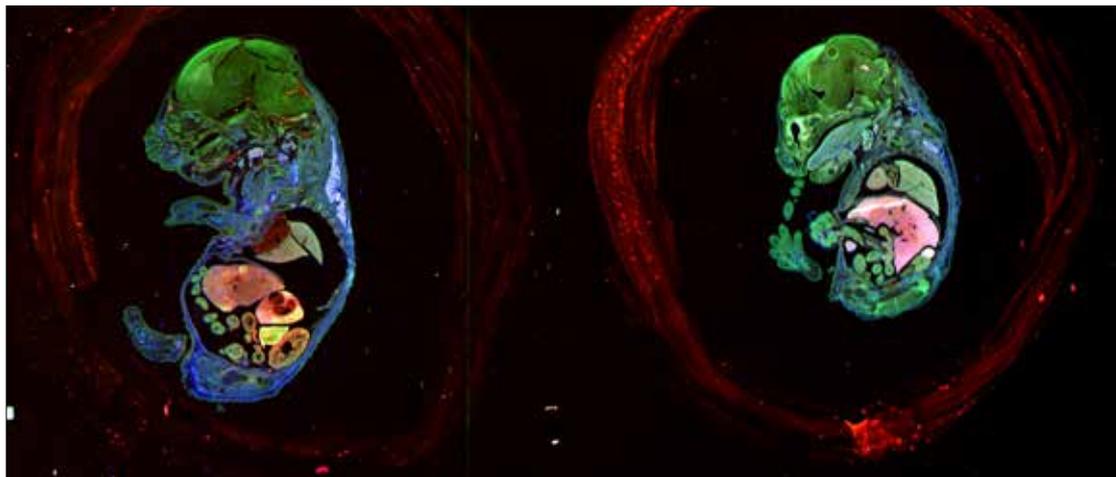
番号のついた緑色の円は、測定すべき信号のある領域を示しています。



小動物組織

マウス胚

ここでは解像度10 μ mで、488nm、520nm、784nmの光源を用いたマルチプレックス画像です。下の2枚はマウス胚の画像で、背骨や脂肪組織などの複雑な構造の詳細を確認できます。



蛍光イメージング

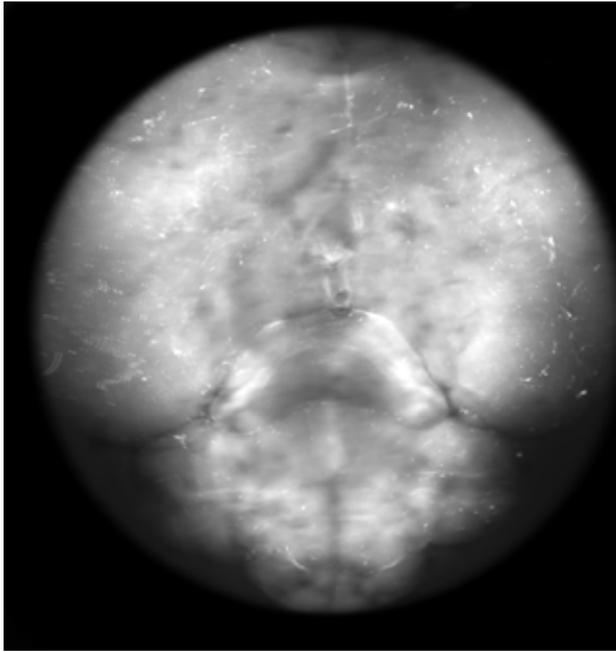
マウス胚

ピクセルサイズ	10 μ m
レーザー	488nm, 520nm, 784nm
フィルター	TBD
解析	TBD

組織構造の情報を得る

CLARITYを用いた脳のホールイメージング

脳の形態や神経結合の研究は、脳組織を透明にして蛍光などのイメージングを可能にする手法であるCLARITYの開発により、大きく前進しました。Sapphireは10 μ mの分解能を持ち、CLARITYで調製した小動物モデルの脳を画像化することができます。

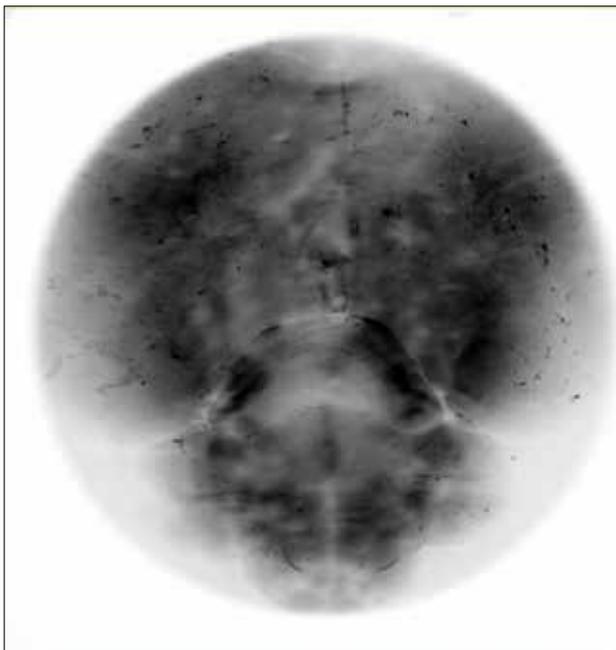


通常イメージ

蛍光イメージング

CLARITY処理したマウス脳

ピクセルサイズ	10 μ m
レーザー	488nm
フィルター	518P22
強度	10
スキャン速度	Highest



反転イメージ

CLARITYとは？

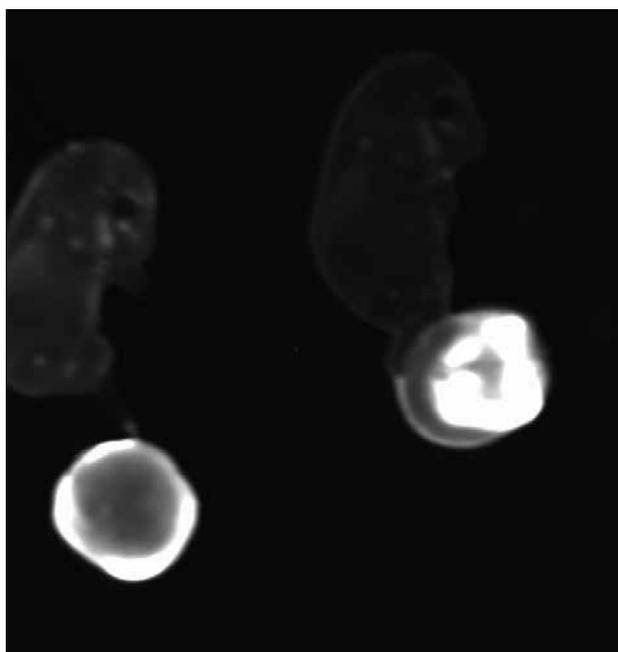
神経科学者が脳全体のイメージをより良く描くために開発されたCLARITY技術は、大きな脳構造の中でタンパク質やDNAといった生物学的に重要な分子を保存しながら、脳組織を光学的に透明化する方法です。化石化と同じような方法で、脂質二重層はより頑丈でありながら多孔性の透明なハイドロゲルのメッシュに置き換えられます。脳の奥深くにある標識された高分子を画像化することができるようになりました。柔軟で強力な集光力を持つSapphireを使えば、小動物モデルから調製したCLARITYの脳を広視野でイメージングすることが可能です。

組織に局在するタンパク質の測定

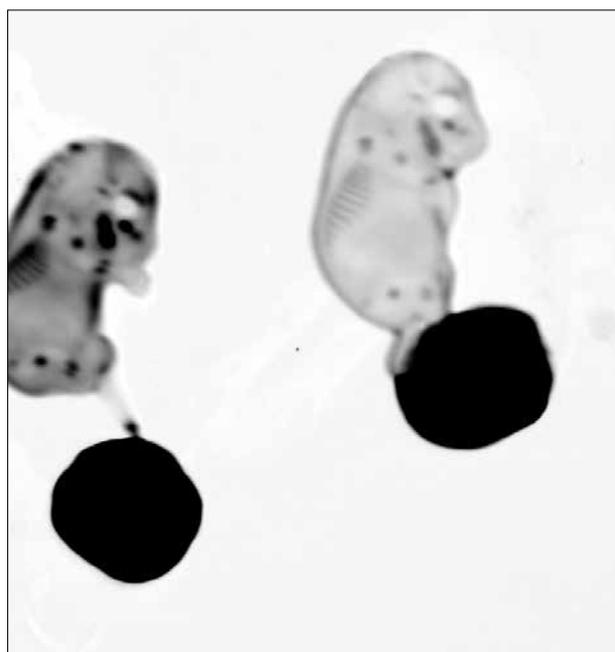
胚・胎盤のバリア透過性の研究

異なる組織におけるタンパク質の分布を追跡する別の例として、胎盤バリアを通過できない抗体と結合したIR色素の投与(右側の胚)と、胎盤バリアを通過できる抗体との結合(左側の胚)を示す画像を紹介します。

カメラとフィルターのセットアップではなく、Sapphireでイメージングすることにより、遠位組織全体のタンパク質の局在を素早く観察し、タンパク質の相対的分布を簡単に定量化することができます。



通常イメージ



反転イメージ

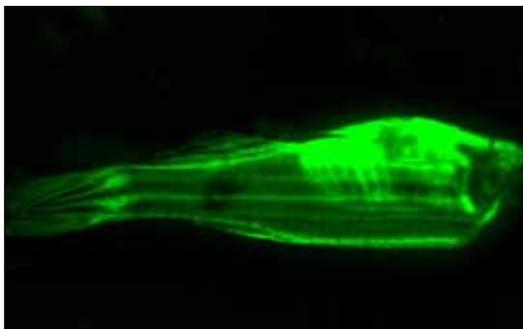
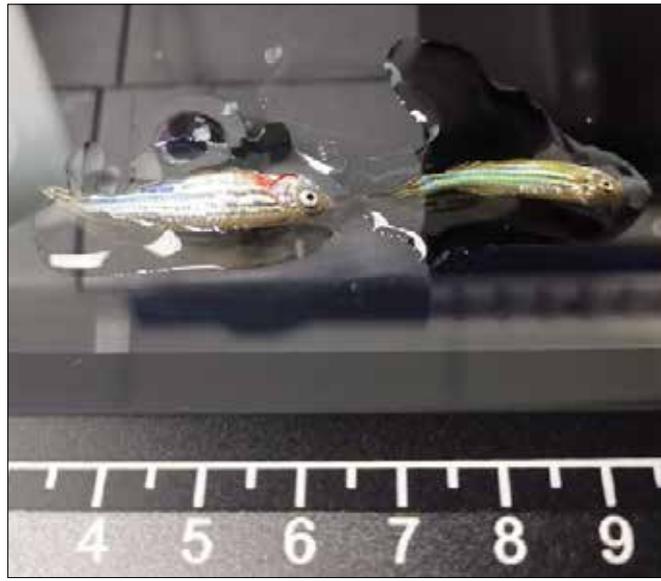
蛍光イメージング

蛍光標識抗体

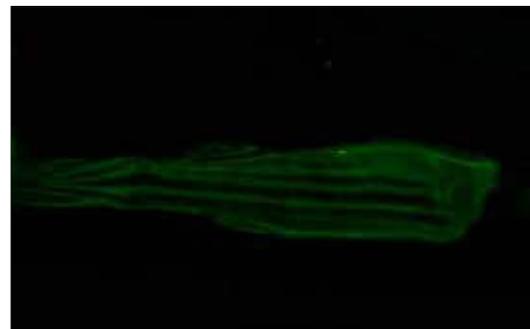
ピクセルサイズ	50 μ m
レーザー	784nm
フィルター	832BP37
強度	10
スキャン速度	Highest

ウイルス感染の追跡とウイルス量の定量

Sapphireは、タンパク質以外の局在も追跡することが可能です。ここでは、FITCで標識したウイルスをゼブラフィッシュに感染させ、それを直接Sapphire上に置いてイメージングしています。



FITC標識ウイルス感染



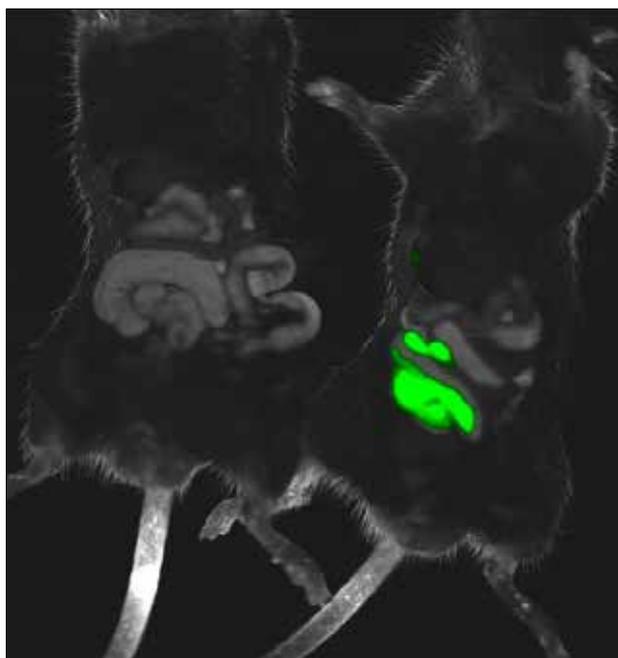
FITC標識ウイルス非感染

蛍光イメージング ゼブラフィッシュへのウイルス感染

ピクセルサイズ	10 μ m
レーザー	488nm
強度	10

解剖学的構造の可視化

Sapphireの大きなスキャンベッドは、今日の研究室で最も一般的に使用されている小動物モデルの多くに対応することができます。ここでは、ラットの染色された腸の可視化を示しています。



蛍光イメージング

蛍光標識抗体

ピクセルサイズ	50µm
レーザー	784nm
フィルター	832BP37
強度	10
スキャン速度	Highest

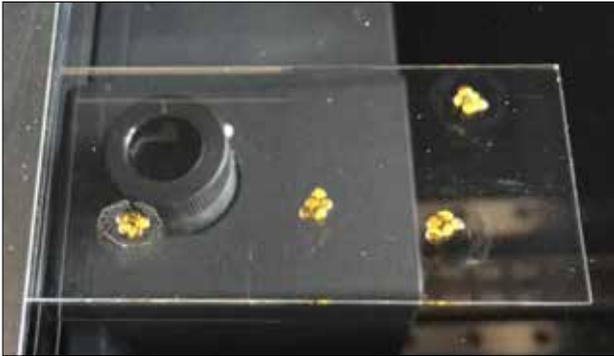
公表されたプロトコール

Sapphireは植物を含む様々な組織の可視化を可能にします。:

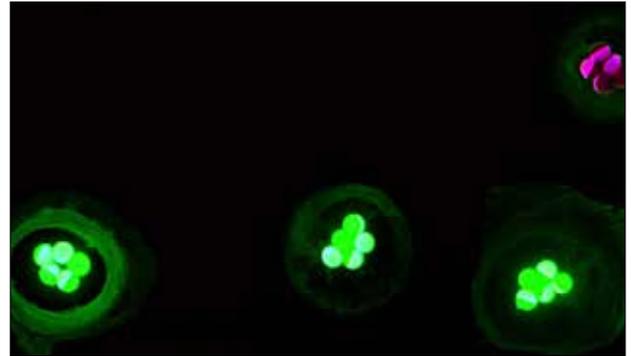
- **Detecting Rapid Changes in Carbon Transport and Partitioning with Carbon-11 (11C).**
Benjamin A. Babst, Richard Ferrieri, and Michael Schueller. *Methods Mol Biol.* 2019;2014:163-176.

Xenopus卵母細胞を画像化し、タンパク質の局在を追跡する

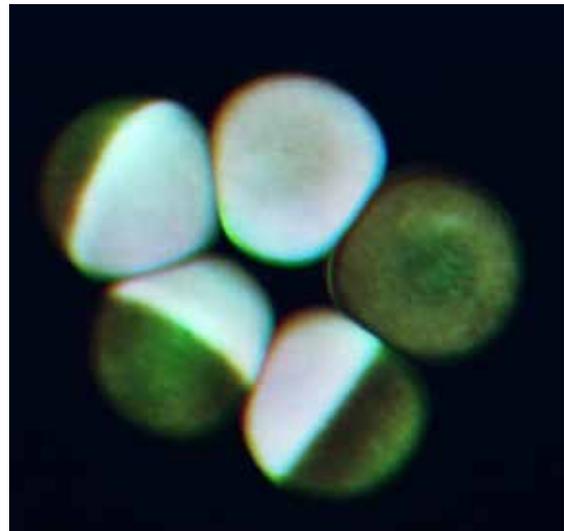
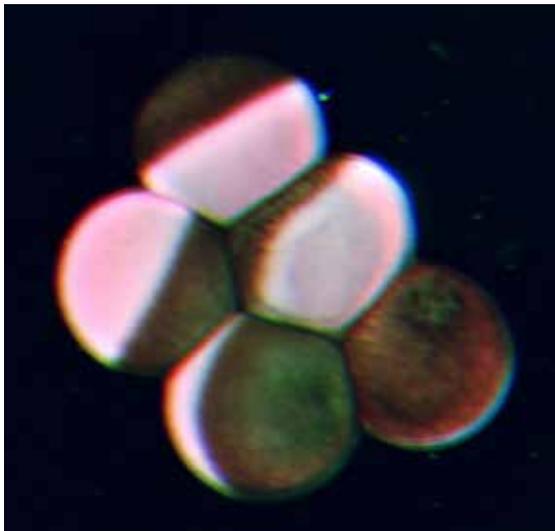
Sapphireの10 μ mの解像度は、Xenopusの卵母細胞や胚のようなサンプルのイメージングを容易にします。ここでは、スライドに載せた卵母細胞をスキャンベッドに直に置いて撮影しています。蛍光標識されたタンパク質のサンプルでは、卵母細胞の特定部位への局在を容易に観察することができます。



スキャナー上の卵母細胞



スキャナー上の卵母細胞

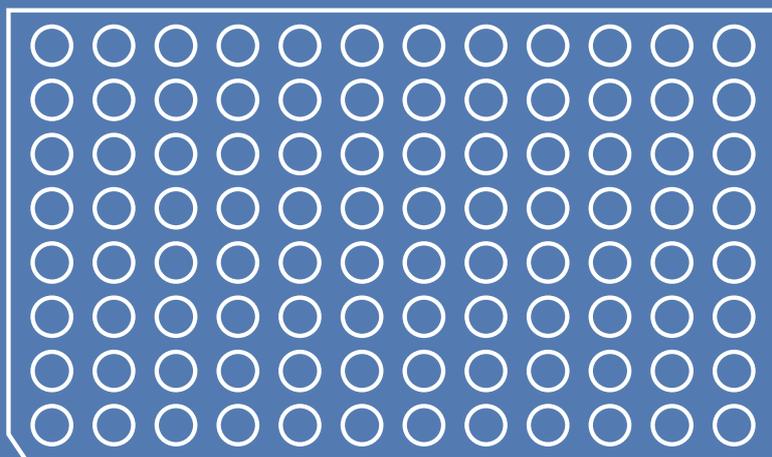


蛍光イメージング 蛍光標識タンパク質

ピクセルサイズ	10 μ m
レーザー	488nm, 520nm, 658nm, 784nm

④

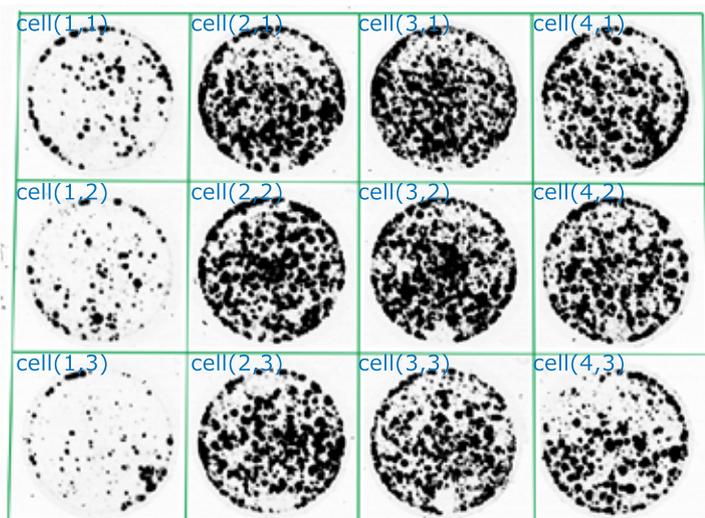
96ウェルプレートイメージング



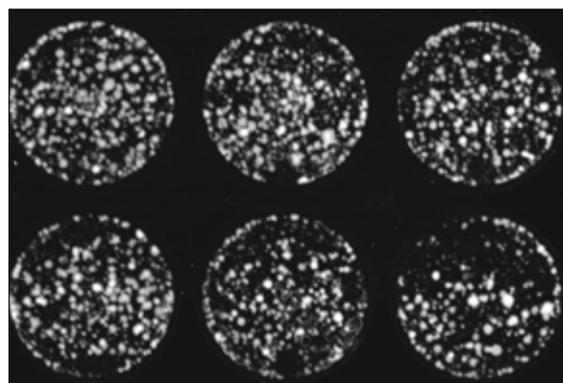
Sapphireの10 μ mの解像度は、マルチウェルプレート内の細胞のイメージングと定量化を可能にします。蛍光検出を利用して、様々な定量的セルベースアッセイを行うことができます。

マルチウェルプレートの細胞を可視化する クリスタルバイオレットを用いた細胞生存率の測定

クリスタルバイオレットは、付着細胞の細胞生存率を測定するために使用されます。アッセイ中、死んだ細胞は洗い流され、残った細胞は595nmで吸収されるクリスタルバイオレット色素で可視化されます。Sapphireは、一度に複数のマルチウェルプレートのイメージングと定量を可能にし、各ウェルの吸光度を簡単に測定することができます。



通常画像



反転画像

Name	Volume	Background	Background Level	Background Type	Average Intensity
1 cell(1, 1)	4.24E+06	2.54E+06	38.06	Local Average	101.52
1 cell(1, 2)	2.91E+06	2.61E+06	38.33	Local Average	81.16
1 cell(1, 3)	2.59E+06	2.50E+06	36.66	Local Average	74.72
1 cell(2, 1)	2.25E+07	2.63E+06	38.92	Local Average	372.07
1 cell(2, 2)	2.34E+07	2.67E+06	39.37	Local Average	385.47
1 cell(2, 3)	2.14E+07	2.68E+06	39.25	Local Average	353.36
1 cell(3, 1)	2.00E+07	2.63E+06	38.95	Local Average	334.77
1 cell(3, 2)	2.56E+07	2.76E+06	40.38	Local Average	415.12
1 cell(3, 3)	1.77E+07	2.75E+06	40.2	Local Average	298.88
1 cell(4, 1)	2.28E+07	2.57E+06	38.09	Local Average	375.39
1 cell(4, 2)	2.23E+07	2.63E+06	38.53	Local Average	364.32
1 cell(4, 3)	1.73E+07	2.57E+06	37.31	Local Average	288.56

蛍光イメージング

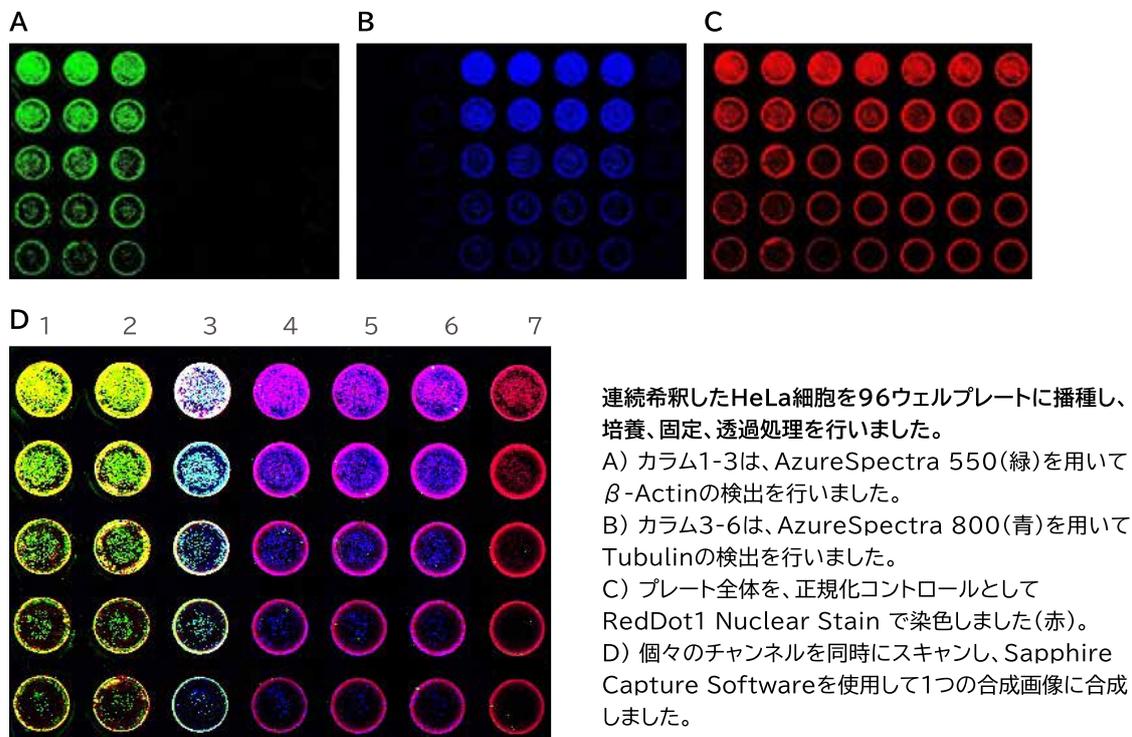
クリスタルバイオレット付着細胞生存率測定法

ピクセルサイズ	100μm
レーザー	658nm
フィルター	710BP40
強度	5
解析	AzureSpot解析ツールボックス、グリッドシェイプ

in-cellウェスタンブロットティングの効率化

ELISAの再現性、スピード、スループットで細胞内タンパク質を正確に定量します。

ウェスタンブロットティングは何十年も前から研究室のスタンダードとなっていますが、Sapphireの高い性能は、この技術が導入された当時には想像もできなかったような、時間と労力を節約したウェスタンブロットティングの拡張を可能にします。このような拡張のひとつにプレートで培養した細胞を固定し、透過処理した後、*in situ*で抗体でプロービングするin-cellウェスタンブロットティングがあります。その結果、細胞がプレート内にある間に細胞内タンパク質の発現を正確に測定することができ、1枚のプレートで複数の刺激、エンドポイント、目的のタンパク質、複製を評価するハイスループットな方法を提供することができます。NIR 抗体とSapphireを使用することにより、ウェル内での多重解析の可能性も生まれ、スループットがさらに向上します。

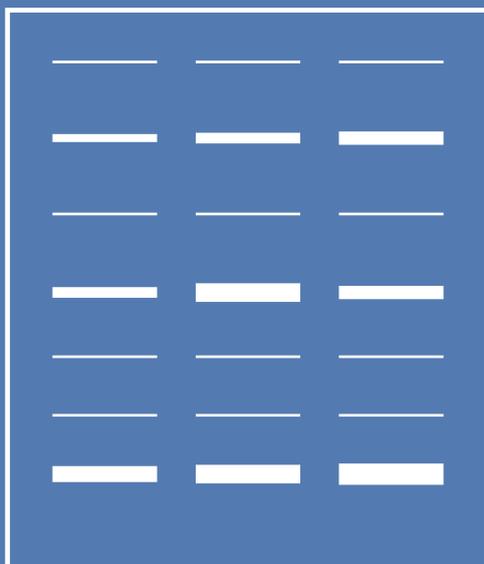


蛍光イメージング in-cellウェスタンブロットティング

ピクセルサイズ	100μm
レーザー	520nm, 784nm
解析	AzureSpot Analysis

⑤

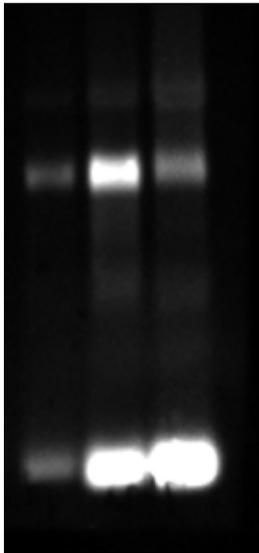
ブロットイメージング パート2 サザンブロット



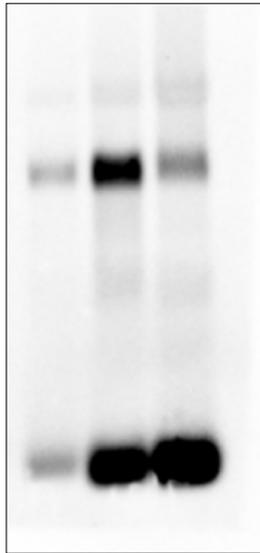
放射性物質で標識された分子、蛍光で標識された分子、さらに化学発光で標識された分子をイメージングすることができるため、Sapphireはサザンブロットの検出技術の数々に応用することが可能です。

プラスミドの存在量測定 蛍光イメージングと化学発光の併用

サザンブロットングは、特定のDNA配列を検出するのに優れた方法であるとともに、DNA量の定量的な情報を得ることも可能です。本研究では、³²P標識プローブと化学発光検出システムを用いて、同一プラスミドの検出についての直線性を比較した結果を示します。両者とも同程度の感度を示し、プラスミド存在量の測定に使用可能でした-R² = 0.9742(³²P); R² = 0.9599(化学発光)。



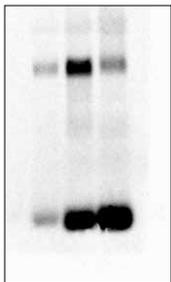
通常画像



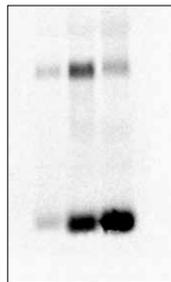
反転画像

化学発光 サザンプロット

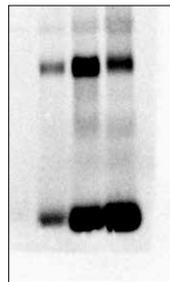
露光時間	90秒 (シングルモード)
ビニング	3×3
ゲイン	3
解析	AzureSpot Analysis Toolbox



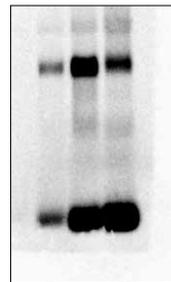
10秒



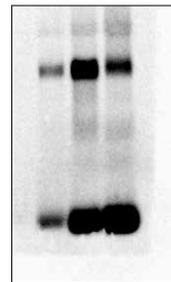
20秒



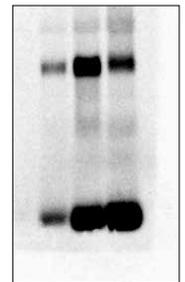
30秒



40秒



50秒



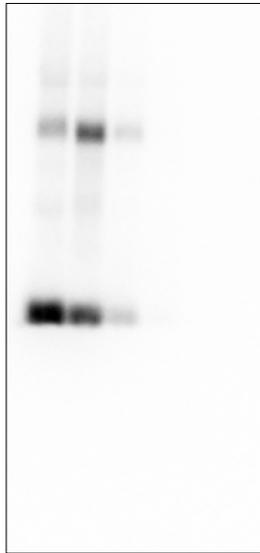
60秒

化学発光 サザンプロット

露光時間	90秒 (シングルモード)
ビニング	3×3
ゲイン	3
解析	AzureSpot Analysis Toolbox



通常画像



反転画像

りん光イメージング

³²P標識プローブによるサザンブロット

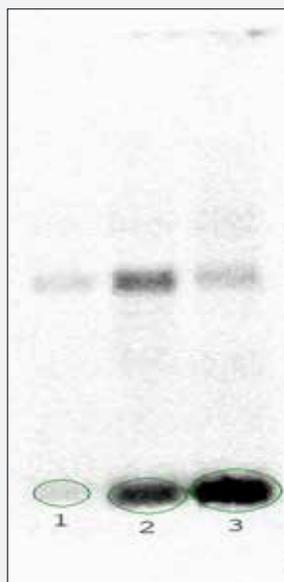
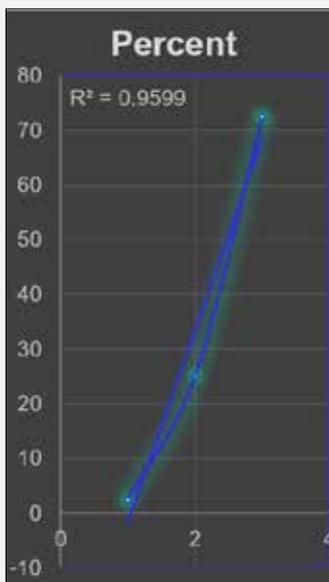
ピクセルサイズ 200μm

強度 5

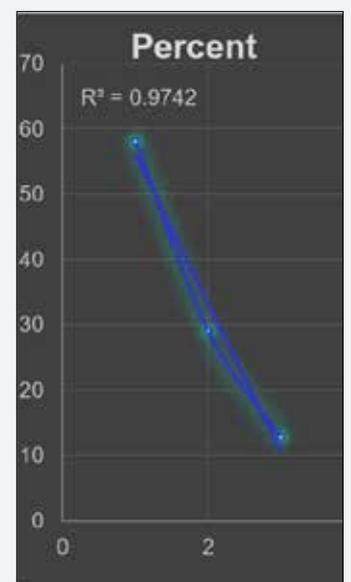
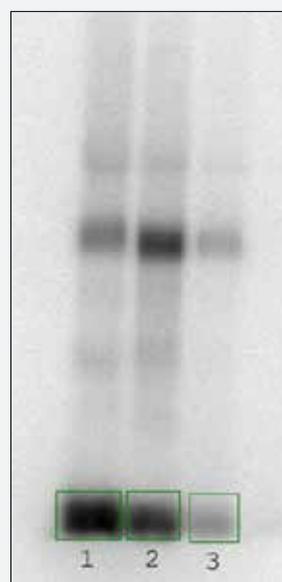
解析 AzureSpot Analysis Toolbox

定量比較

化学発光

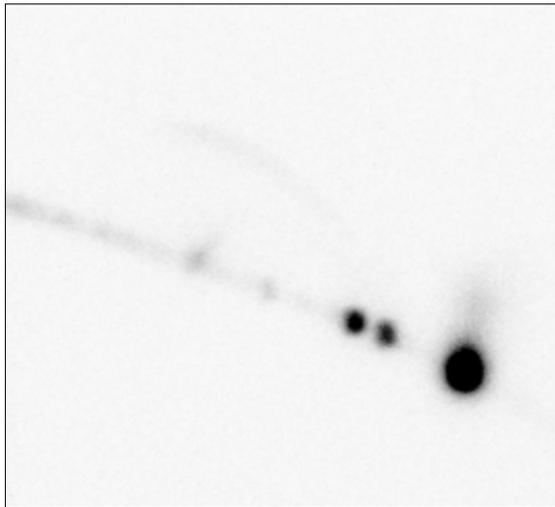


りん光イメージング



32P標識プローブによる高感度・定量的なDNA検出 2次元アガロースゲル電気泳動によるDNA構造解析

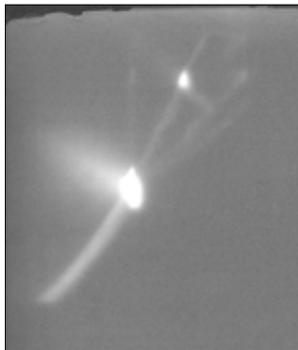
2次元アガロースゲル電気泳動は、複製や組換え時のDNA構造を理解するために不可欠な技術であり、バブル、フォーク、単純Y、ダブルYを区別することができます。これらの構造はゲル上にロードされた全DNAのごく一部に過ぎないため、高感度での検出が必須となります。ここでは、2次元アガロースゲルの32P標識プローブを用いたサザンブロットングによる検出と定量を示します。



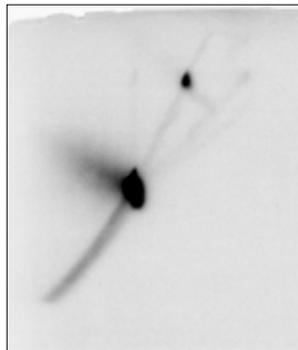
りん光イメージング

32P標識プローブによるサザンブロット

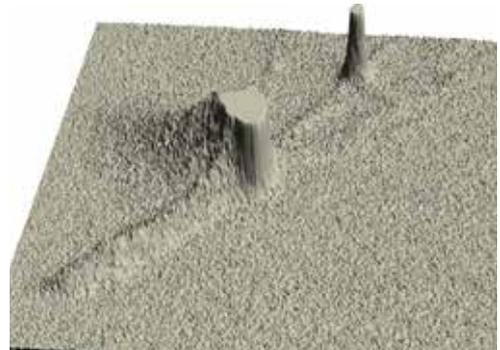
ピクセルサイズ	50μm
スキャン速度	Highest
強度	5
フォーカス位置	5
品質	1
解析	AzureSpot Analysis Toolbox



通常画像



反転画像



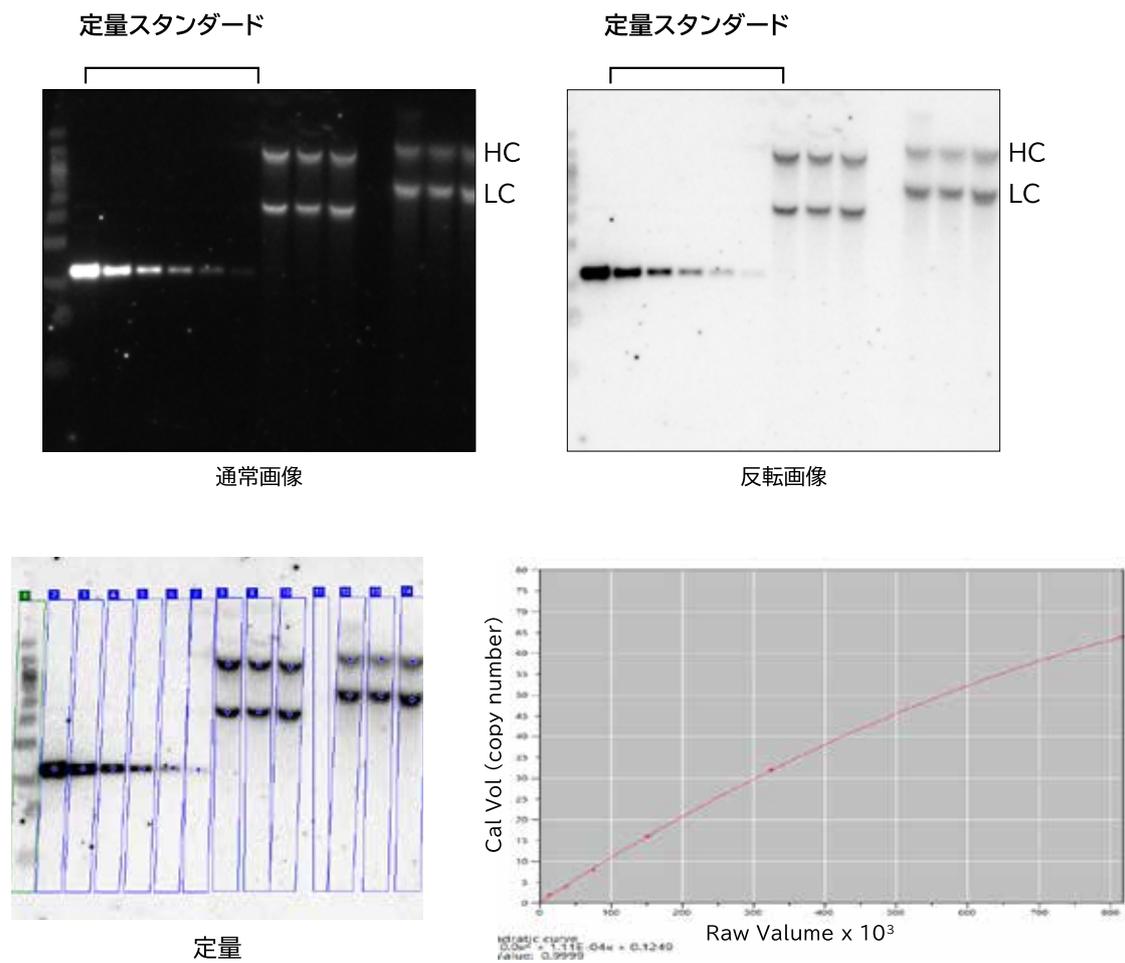
りん光イメージング

32P標識プローブによるサザンブロット

ピクセルサイズ	200μm
強度	5
解析	AzureSpot Analysis Toolbox, 3D Viewer

32P標識プローブによる高感度・定量的なDNA検出 組換え抗体～発現における軽鎖/重鎖のDNA比を測定する

リコンビナント抗体作製において、軽鎖(LC)DNAと重鎖(HC)DNAの比率を測定することが一般的なステップとなっています。このアプリケーションでは、Sapphireが、量の校正のためにDNA標準と一緒に目的の試料を検出するために使用されました。Sapphireによって生成された画像は、線形($R^2=0.99$)であるだけでなく、2コピーまで検出できる高感度なデータを示しています。

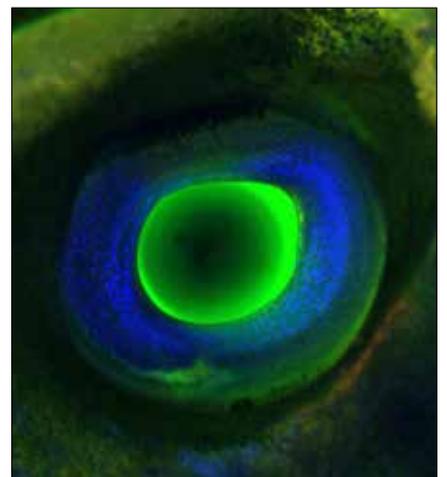
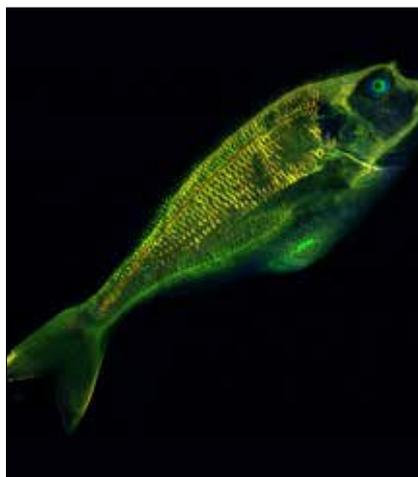
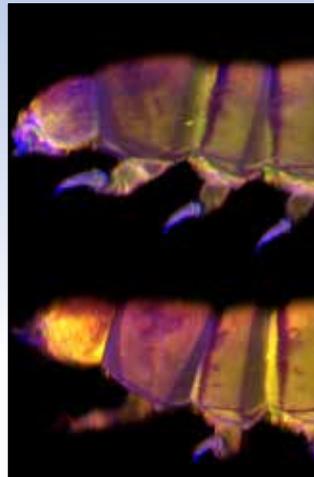
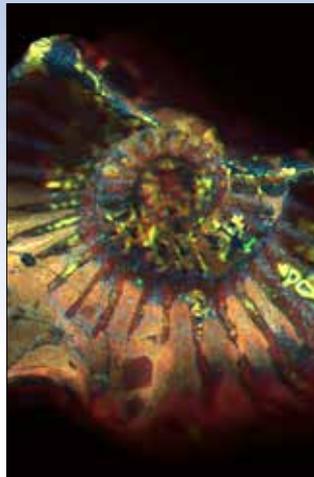
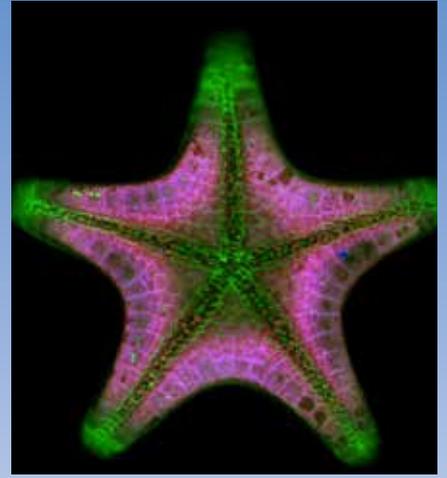
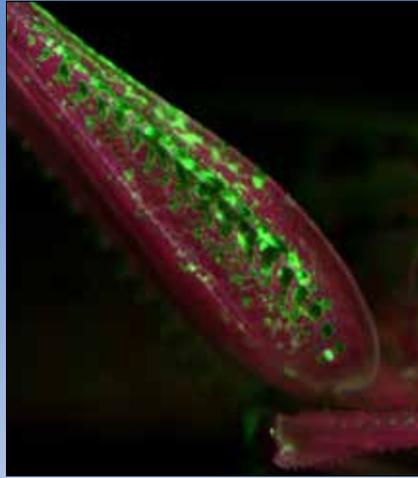
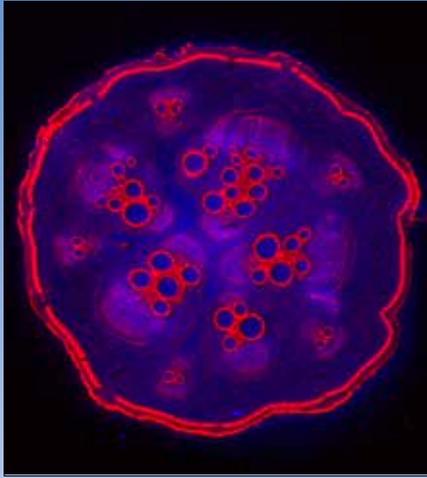


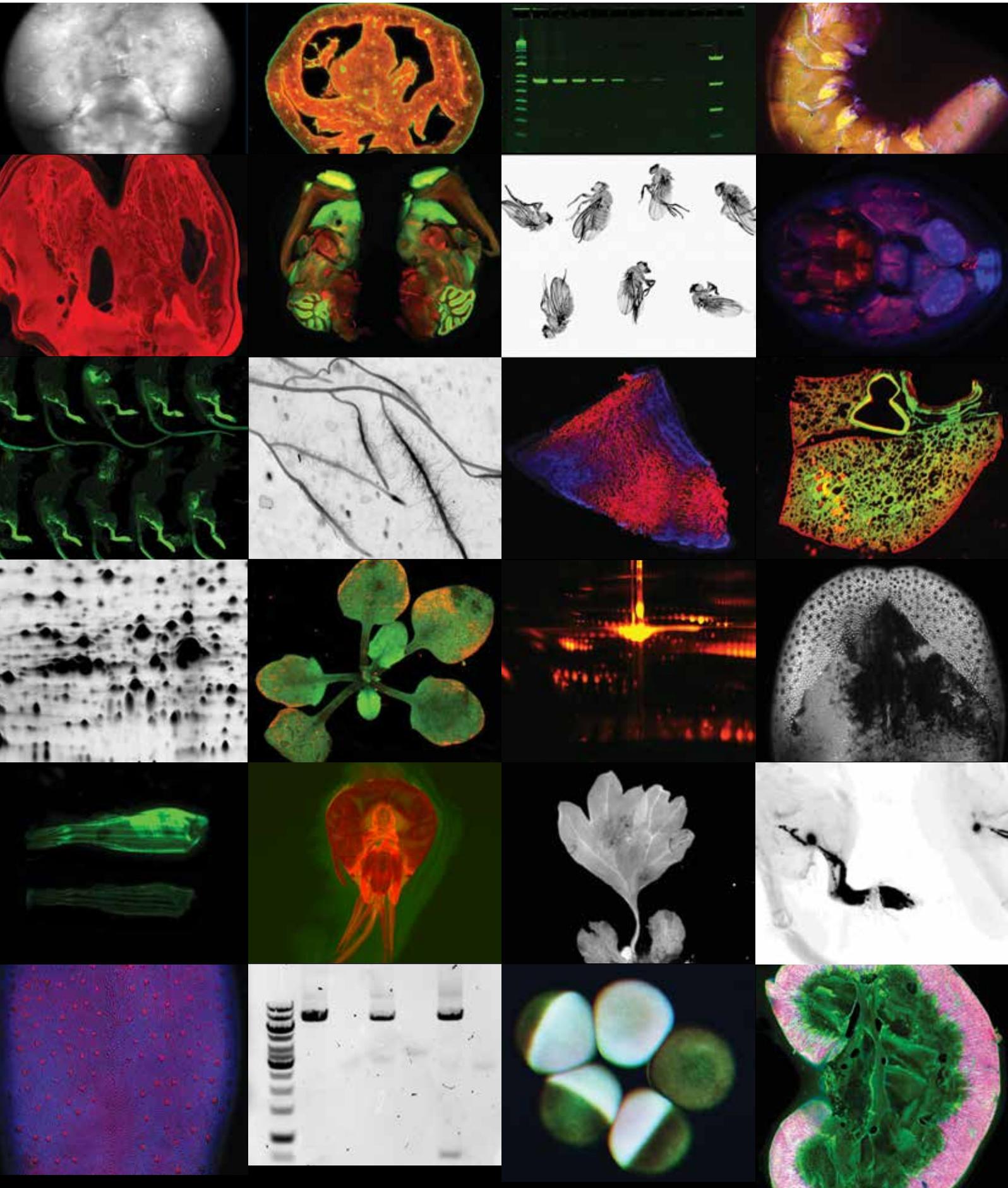
りん光イメージング 32P標識プローブによるサザンブロット

露光時間	1日
ピクセルサイズ	50 μ m
強度	3
解析	AzureSpot 1D module Graph calibration volume

さまざまな画像取り込み

記録管理、定量、目視検査など、サンプルのスキャンや画像化が簡単に行えます。





Sapphire Biomolecular Imager

一台で様々な役割

次世代のレーザースキャニングシステムであるSapphire Biomolecular Imagerは、今日の要求の厳しいラボに比類のない柔軟性と性能を提供します。

現在市販されているどの装置よりも多くのイメージングモダリティを持つSapphireは、4つの固体レーザーと特許出願中の3検出器システムにより、驚くほど幅広いアプリケーションに対応します。また、直感的で使いやすいソフトウェアにより、すべてのユーザーがスムーズな画像取得と解析を体験できます。

- マルチプレックス蛍光検出の改良(近赤外および可視)
- フィルムを超える化学発光イメージング
- 低検出限界(フェムトグラム)に対する高感度化
- 広いリニアダイナミックレンジで正確な定量を実現
- 直観的に操作できるコントロールソフトで使いやすさを追求



◆お願いおよび注意事項◆

- 使用範囲 記載の商品は全て、「研究用器材・機器」です。人や動物の医療用としては使用しないよう、十分ご注意ください。