



Empiria Studio v3.0

C-Digit

定量ウェスタン解析ガイド

20240209

LI-COR®

目次

1. 始めに	2
1.1. Data Folder の作成	2
1.2. Empiria Studio への解析画像の取り込み	3
1.3. Project の作成	4
2. 定量解析	5
3. サポート情報	18

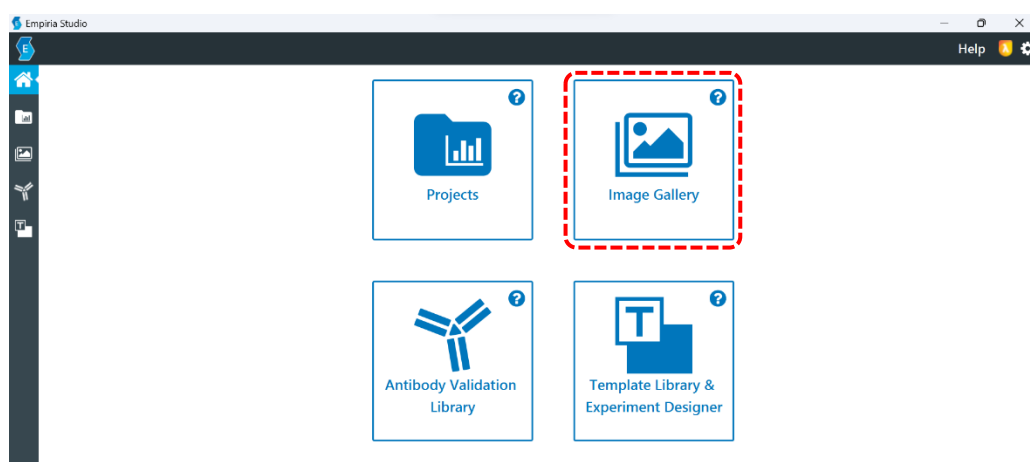
1. 始めに

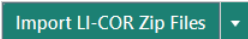
1.1. Data Folderの作成

Empiria Studioをインストール後、始めて使用する際には「**Data Folder**」を作成する必要があります。「**Data Folder**」とは、解析に使用した画像データ、解析データ、ソフトの設定情報など、すべてのインターナルデータが保存されるフォルダーを指します。「**Data Folder**」の作成先は、Network Drive以外を指定してください。また、作成後は下記にご注意ください。

- Data Folderの内容の削除・編集、新しいファイルの追加は行わないでください。
- Empiria StudioからData Folderへデータの転送は行わないでください。

1.2. Empiria Studioへの解析画像の取り込み



- ① **Image Gallery**ボタン  を押します。
- ② 画面左上の**Import LI-COR Zip Files**ボタン  横の  を押します。

表示されたドロップダウンメニューから画像の取り込み方法を選択します。

I. Import LI-COR Zip Files

LI-COR Acquisition SoftwareあるいはImage Studio SoftwareからLI-COR zip file形式でエクスポートした画像を取り込むことができます。

解析する画像を選択し、**Import**ボタンを押します。

II. Import from LI-COR Acquisition

LI-COR Acquisition Software (LAS) から画像を直接取り込むことができます。

表示されたData Folder一覧から使用しているData Folderを選択し、**Select**ボタンを押します。

表示された画像一覧から解析する画像を選択し、**Import**ボタンを押します。

使用しているData Folderが見つからない場合は、Show Folder For後にAll Usersが選択されていることを確認してください。選択されていない場合は  から選択してください。この方法でも使用しているData Folderが見つからない場合は、**Add New Data Folder**ボタンから、Data Folderとして指定したフォルダーをマニュアルで選択してください。

III. Import from Image Studio

Image Studio Softwareから画像を直接取り込むことができます。

画面上段の**Work Areas**横の  を押し、Image Studioで使用しているWork Areaを選択してください。

表示された画像一覧から解析する画像を選択し、**Select**ボタンを押します。

- ③ 画像一覧に、解析する画像が加わります。
- ④ 解析前に、画像編集(明るさ・コントラスト/回転/切り抜き/Align Channels)の必要がある場合は、**Edit Acquisition**ボタン  から編集を行ってください。編集方法は、別冊 C-Digit クイックガイド (LI-COR Acquisition Software v2.0)_**Image Gallery** (p. 8) をご覧ください。

※ **Image Gallery**は、画像取り込み以外の機能について、LI-COR Acquisition Softwareの**Image Gallery**と同じです。

1.3. Projectの作成

① **Home Page**  ボタンを押し、ホーム画面に戻ります。

② **Projects**ボタン  を押します。

③ 次に、画面左上の**Create New Project**ボタン  を押します。

④ プロジェクト名を入力し、**Start**ボタンを押します

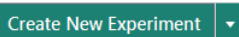
※ 同じプロジェクトを使用して解析を行う場合は、次回から③～④の操作を行う必要はありません。

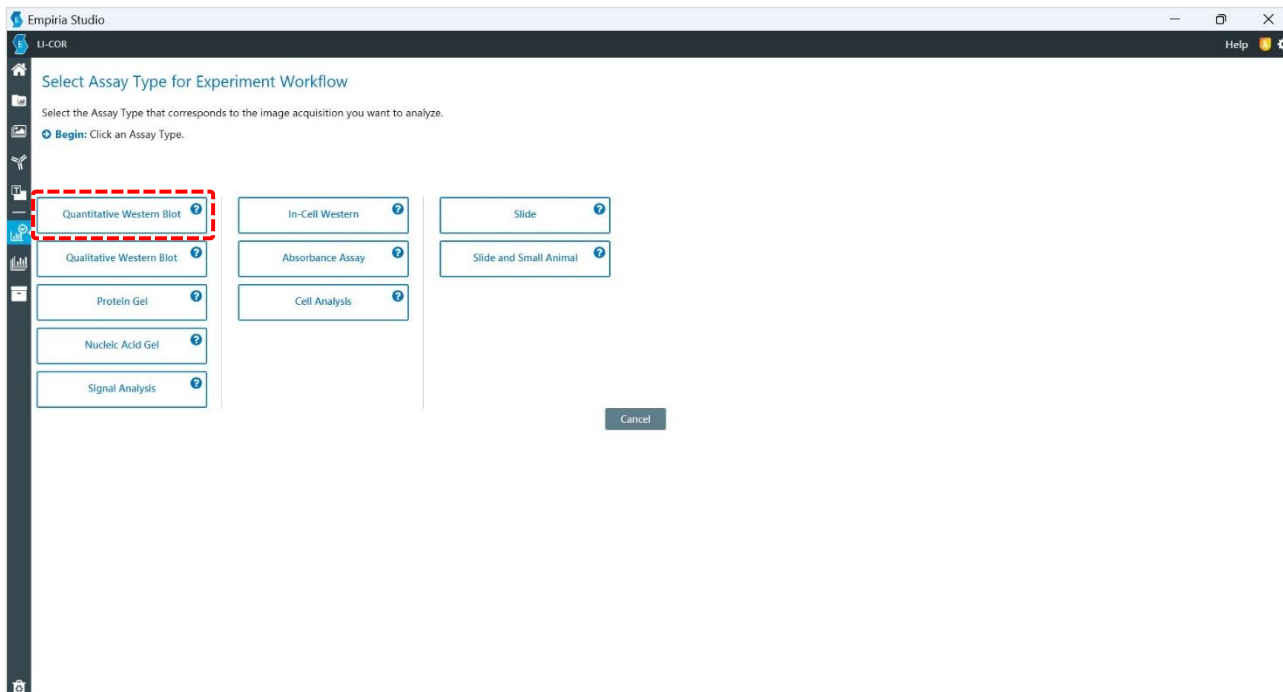
Projectsボタンを押すと表示されるプロジェクト一覧から作成したプロジェクトを選択して使用してください。

※ プロジェクト内でバンドの数値化からグラフ作成まで行うことができます。プロジェクト名には、個人名以外にも実験プロジェクト名や研究室名などがおすすめです。

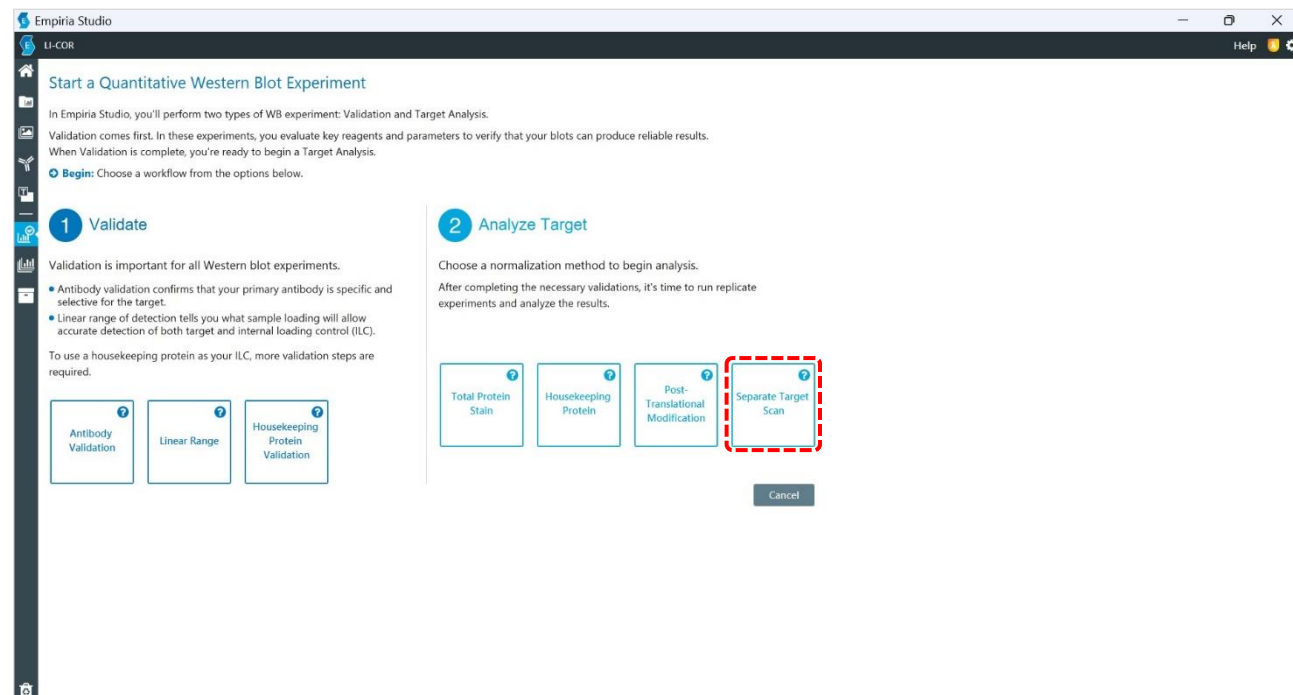
※ 必要に応じて、プロジェクト名以外の項目も入力してください。記載した項目は解析最後に表示される**Review and report**に反映されます。

2. 定量解析

- ① プロジェクトを開いたら、画面左上の**Create New Experiments**ボタン  を押します。
- ② **Select Assay Type for Experiment Workflow** 画面が表示されたら、**Quantitative Western Blot**ボタン  をします。

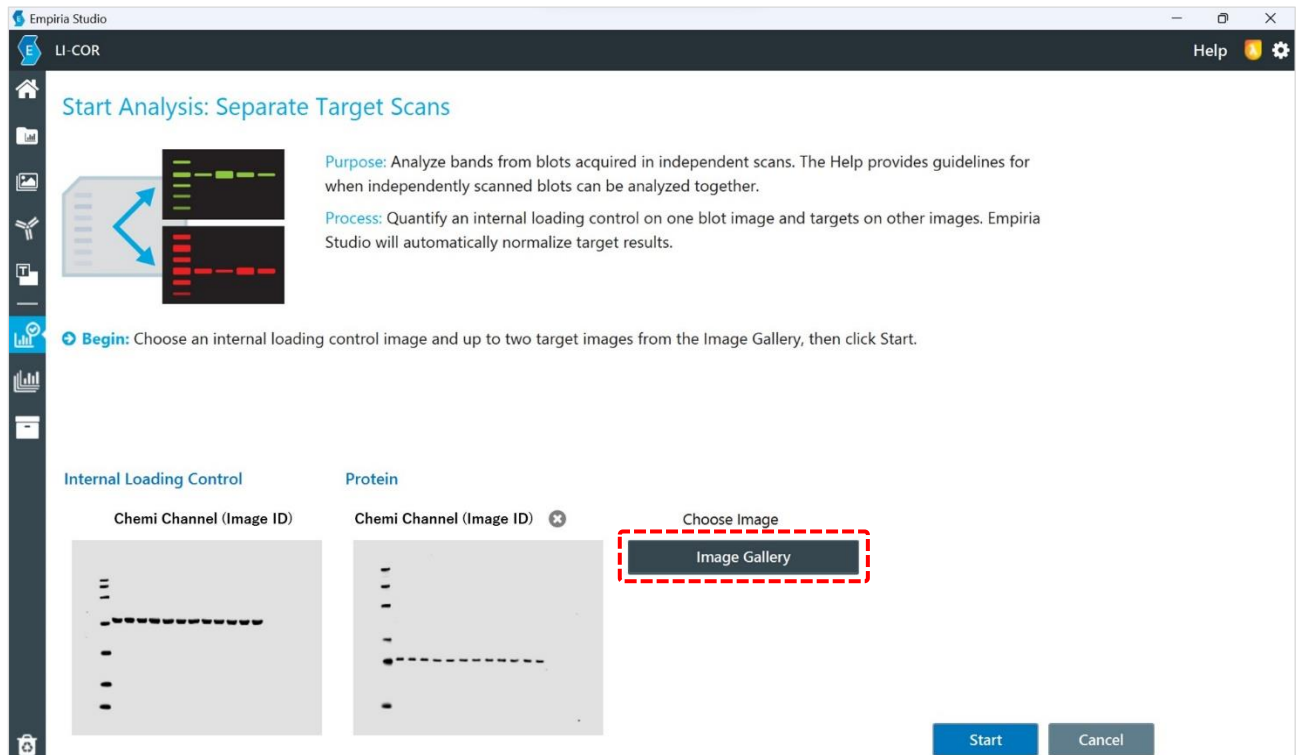


- ③ **Start a Quantitative Western Blot Experiment** 画面が表示されたら、**Separate Target Scan** ボタン  を選択します。

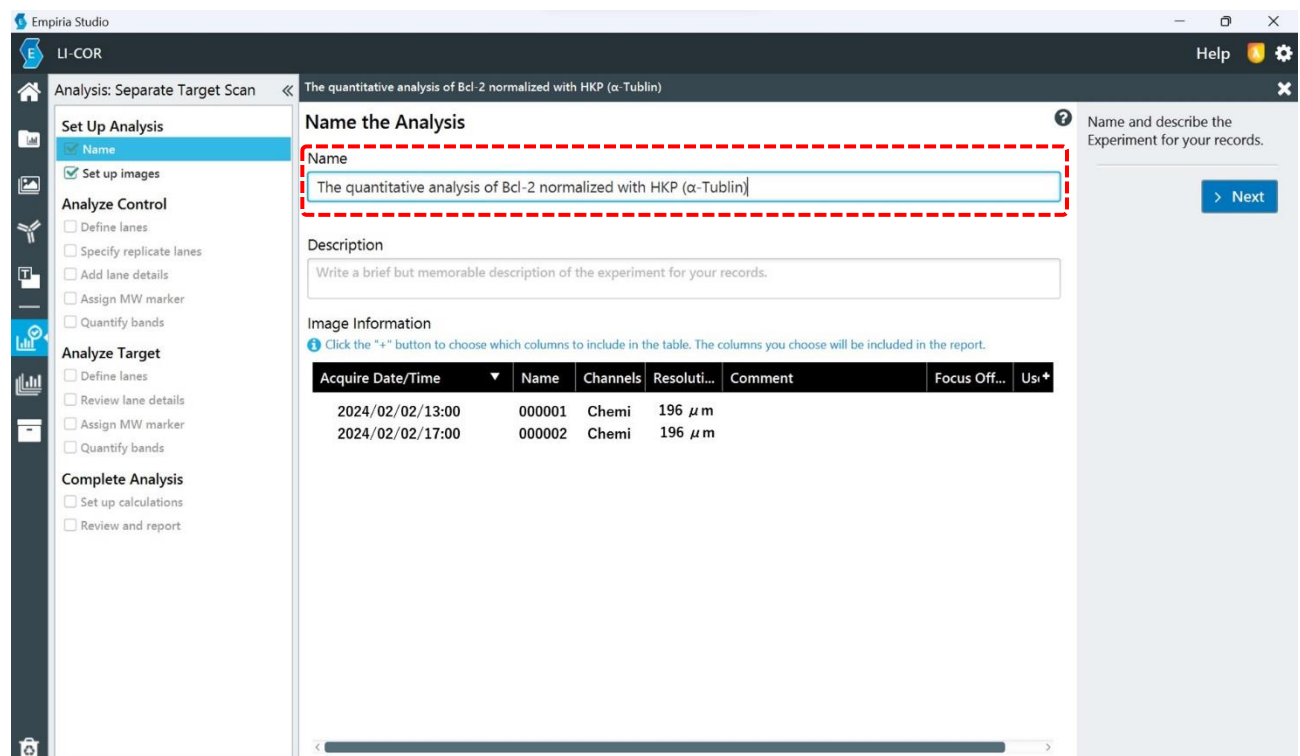


※ C-DiGitで検出した画像を使用する際は、内部標準タンパク質（ハウスキーピングタンパク質など）とターゲットタンパク質のバンドが同じ画像にある場合を除いて、**Separate Target Scan**ボタン以外は使用できません。

- ④ **Image Gallery**ボタン  を押して、ソフトウェアの“Internal Loading Control”に内部標準バンドの画像を取り込みます。同じく、“Protein”にターゲットタンパク質の画像を取り込みます。ターゲットタンパク質画像は、最大3枚取り込むことが可能です。最後に**Start**ボタンを押します。



- ⑤ **Name the Analysis** 画面が表示されます。実験名を入力し、**Next**ボタンを押してください。



- ⑥ **Set Up Images** 画面が表示されます。**Internal Loading Control**欄に内部標準として使用したタンパク質名、**Protein**欄にターゲットタンパク質名を入力します。1枚のプロット中で、複数のターゲットタンパク質を解析する（多量体など1レーンに複数ターゲットバンドがある）場合は、**+**を押してください。最大4つのターゲットバンドを同時に解析できます。

Empiria Studio v3.0 C-DiGit 画像解析ガイド

LI-COR

The quantitative analysis of Bcl-2 normalized with HKP (α-Tubulin)

Help

Set Up Images

Internal Loading Control 49%

Protein 49%

chemi images

chemi images

Type	Channel	Protein	Comment
Internal Loading Control	Chemi	内部標準タンパク質名	
Protein	Chemi	ターゲットタンパク質名	

Enter a name for proteins in this Experiment.

Additional protein names can be entered for a channel if the "+" button is available.

< Back

> Next

⑦ **Define Lanes** 画面が表示されます。

Internal Loading Control（内部標準タンパク質のバンド）画像のレーン検出を行います。

レーン検出する前に、まずは、表示画像を見やすくするため、**歯車マーク**  を押し、明るさ・コントラストを調整してください。プロットの端がわかるように明るさ・コントラストを調整しておく、と、解析エリアを指定する際にプロットの位置を確認でき便利です。

レーン検出には、**Auto**モードと**Manual**モードがあります。

Autoモードでは、LI-COR社が開発したAdaptive Lane Finding機能を使って、レーンを自動で認識・検出します。また、**Manual**モードでは、レーンの数と解析エリアの範囲をマニュアルで設定します。ご使用の際は、まずは**Auto**モードをお試しください。**Auto**モードがうまく機能しない場合、**Manual**モードを使用して、任意の解析エリアをマニュアルで指定してください。

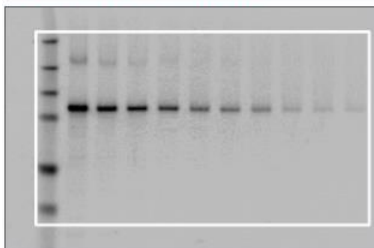
Auto (デフォルト設定)

- I. **Auto**ボタン  を押してください。
- II. 解析エリア（プロット全体）をドラッグして指定します。

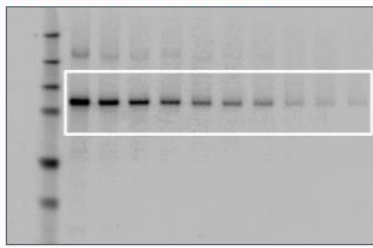
ポイント！

解析エリアを指定する時は、画面上に表示されている全てのレーンが含まれるようにプロット全体を囲いましょう。必要のないレーンは、⑨のAdd Lane Details画面で解析対象から外すことができます。

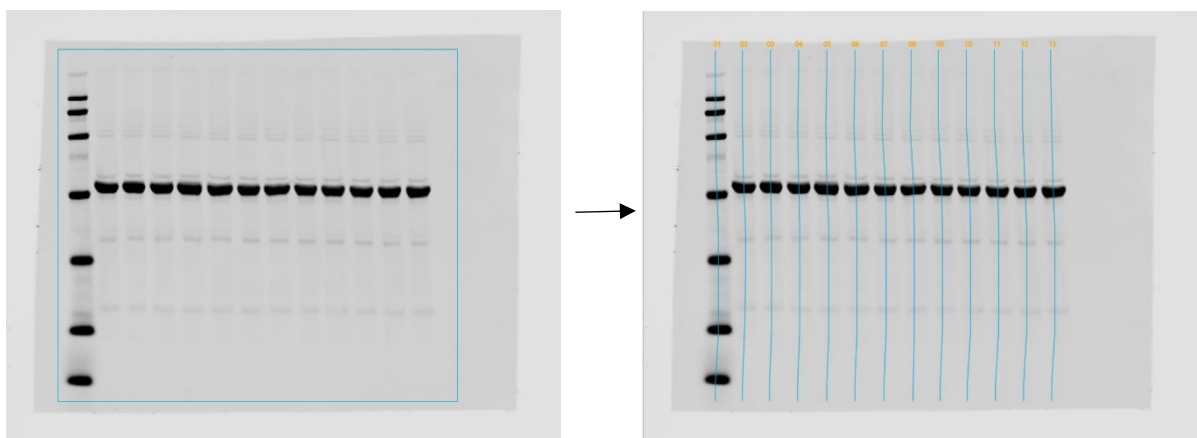
✓ **Correct Placement**



✗ **Incorrect Placement**

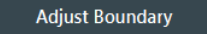


- III. 解析エリアを指定後、マウスから指をはなすと検出されたレーンが青線で自動的に表示されます。

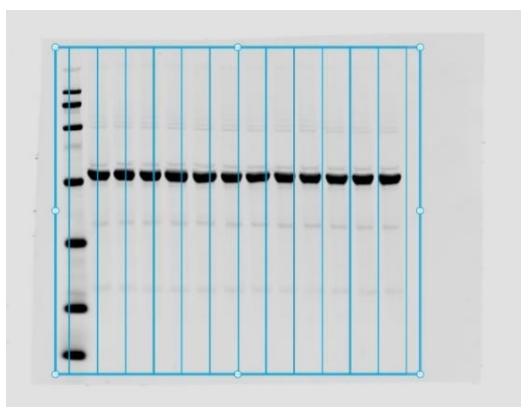


Manual

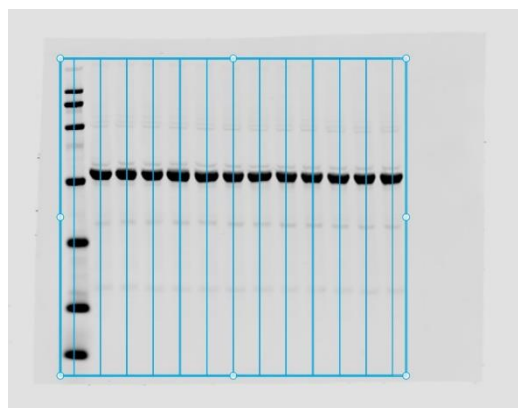
- I. **Manual**ボタン  を押してください。
- II. Autoモードと同様に、解析エリアをドラックして指定します。
- III. 解析エリアを指定後、マウスから指をはなすと検出されたレーンが青線で自動的に表示されます。**Number of Lanes**を  を使って実験に使用した実際のレーン数を指定してください。
- IV. 次に、青線が各レーンの中央にくるように調整します。

まずは、**Adjust Boundary**ボタン  を押して、解析エリア全体の位置とサイズを調整することで、青線が画像上の各レーンの中央を通るように調整します。

エリア全体を動かす際は、カーソルを  内に合わせ、矢印マークから手のマークに変わってからマウスでドラッグします。また、 のサイズ調整を行う際は、カーソルを  の四隅あるいは四辺にある○印の上に合わせ、矢印マークから両矢印マークに変わってからドラッグします。最後に**Done**ボタンを押してください。



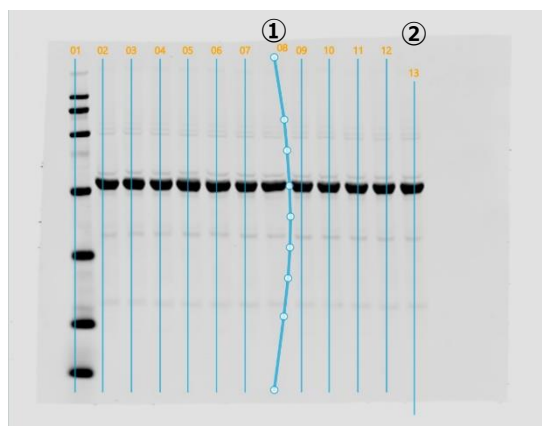
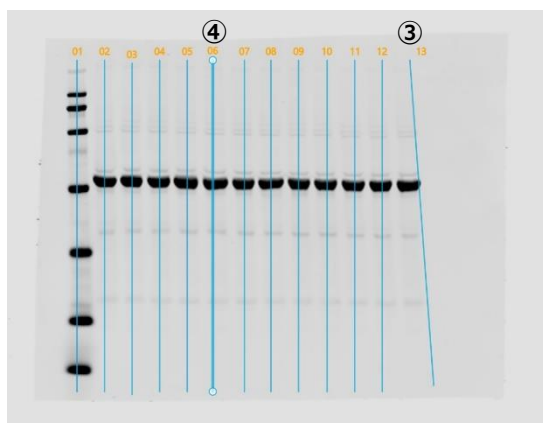
調整前



調整後

さらに、レーンごとに個別に微調整が必要な際は、それぞれの青線をクリックし選択してからドラッグすることで、自由に移動が可能です。

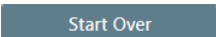
また、レーンが歪んでいる場合は“変曲点”を追加することで修正できます。青線を選択し、変曲点を作りたいポイントで**Altキーを押しながら左クリック**すると変曲点を作ることができます。変曲点にカーソルを合わせてからドラッグすると青線を自由に曲げることができます。



微調整例：

- ①：X軸方向に移動して調整する、②：斜めに調整する、③：曲線に調整する、④：Y軸方向に移動して調整する

操作を間違えた際には、 をクリックするとひとつ前の操作に戻ることができます。

最初の状態に戻りたい場合には**Start Over**ボタン  をクリックしてください。

レーン番号の表示位置を変えたい時は、**Lane Labels**から行うことができます。

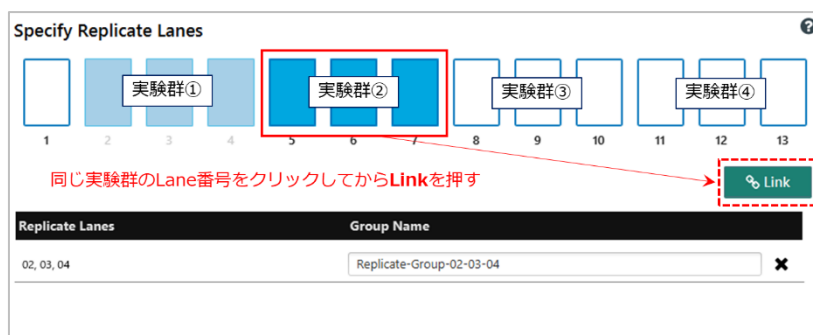
最後に**Next**ボタンを押します。

⑧ **Specify Replicate Lanes** 画面が表示されます。

ここでは、同じ実験群に属するレーンの情報をひとつにまとめます。このことにより、同じ実験群に属するターゲットタンパク質のバンドシグナルの平均値、標準偏差、%CV値を自動で計算することができます。計算結果は、**Quantify Bands**画面と**Set Up calculations**画面の  **Analysis Table** ボタン、あるいは、**Review and Report** 画面で確認できます。

同じ実験群に属するレーン番号の  をクリックして選択します。選択されるとBox全体が水色  になります。その後、**Link**ボタン  を押してください。

次に、Group Name欄に実験群の名前を入力します。



The screenshot shows the 'Specify Replicate Lanes' interface. At the top, there are 13 lane boxes numbered 1 to 13. Boxes 2, 3, and 4 are grouped under '実験群①'. Boxes 5, 6, and 7 are grouped under '実験群②' and are highlighted with a red border. Boxes 8, 9, and 10 are grouped under '実験群③'. Boxes 11, 12, and 13 are grouped under '実験群④'. Below the lane boxes, a red arrow points from the text '同じ実験群のLane番号をクリックしてからLinkを押す' to a green 'Link' button. At the bottom, there is a table with two columns: 'Replicate Lanes' and 'Group Name'. The 'Replicate Lanes' column contains '02, 03, 04'. The 'Group Name' column contains 'Replicate-Group-02-03-04' and has a close button (X) to its right.

最後に**Next**ボタンを押します。

- ⑨ **Add Lane Details** 画面が表示されます。それぞれのレーンの情報（属性）を入力します。

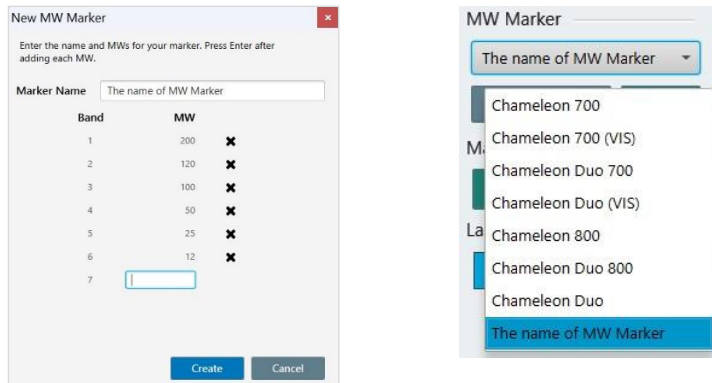
Lane Name	Type	Treatment	Unit
01: Lane01	MW Marker	0	%
Rep-Grp-02-03-04			
02: Lane02	Sample	0	%
03: Lane03			
04: Lane04			
Rep-Grp-05-06-07			
05: Lane05	Sample	33	%
06: Lane06			
07: Lane07			

- **Name** : 必要に応じて、各レーンの名称を入力します。
※実験群名は⑧のSpecify Replicate Lanesで入力済です。
- **Type** : ドロップダウンメニューから、Sample/ MW Marker/ Negative /Positive /Not usedのいずれかを選んでください。
 - **Sample**: 解析したいサンプルをロードしたレーン
 - **MW Maker**: 分子量マーカーをロードしたレーン
※ここで指定すると、ターゲットタンパク質の分子量を自動で計算します。
 - **Negative/Positive**: 陰性コントロールもしくは陽性コントロールをロードしたレーン
 - **Not used**: 解析に使用しないレーン（Linkしないレーンがある場合のみ選択可能）
- **Value Label** : ドロップダウンメニューからAmount /Concentration /Dose /Treatmentのいずれかを選んでください。希望する項目がない場合は、**New Value Label** から、新しい項目を追加できます。次に、選択した項目が表示された欄に、薬剤処理条件など実験条件を入力します。必要に応じて、**Autofill**ボタン  をご使用ください。**Autofill**ボタンを押し、希釈倍率（上段）あるいは同条件（下段）を指定すると、自動で計算し、数値が書き込まれます。
- **Unit Label** : 単位を選びます。ドロップダウンメニューから、μg/ pg/ ng/ μlのいずれかを選んでください。
New Unit Label から新しい単位も追加できます。

⑩ «MW Makerを指定したレーンがある場合»

Assign MW maker 画面が表示されます。分子量マーカー情報を設定します。

まず始めに、マーカー情報を登録する必要があります。**New**ボタン **New** を押し、分子量マーカー名と分子量情報を記入します。分子量情報は、大きい方から順に入れていきます。**Enter**ボタンを押すと次の分子量を入力できます。間違えた際は、**MW**欄横の「x」をクリックすると入力情報を消すことができます。すべてのマーカーの情報が入力し終わったら、**Create**ボタンを押します。**MW Maker**下の  を押した際に表示されるドロップダウンメニューに登録した分子量マーカー名があれば登録完了です。使用する際は、選択し青くハイライトさせてから使用してください。



The New MW Marker dialog box shows a table for entering marker information:

Band	MW	
1	200	x
2	120	x
3	100	x
4	50	x
5	25	x
6	12	x
7		

The MW Marker dropdown menu shows the following options:

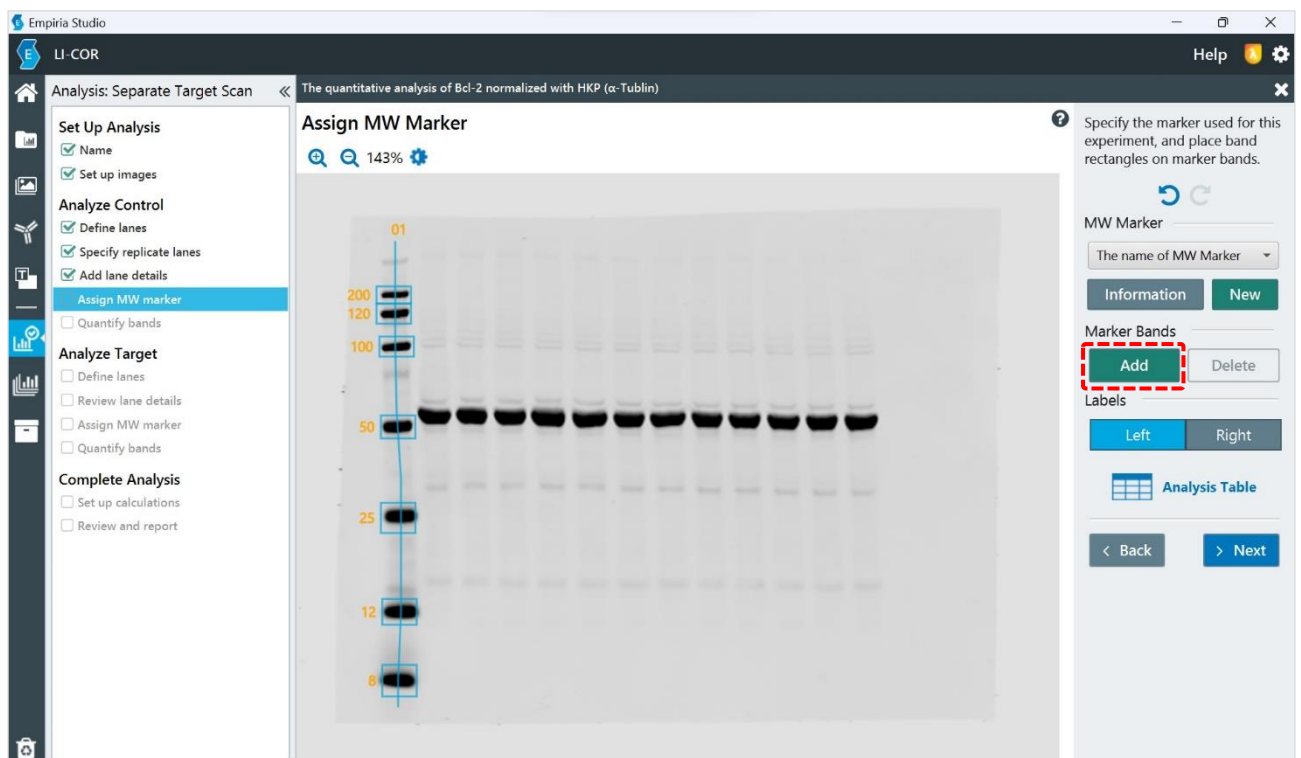
- The name of MW Marker
- Chameleon 700
- Chameleon 700 (VIS)
- Chameleon Duo 700
- Chameleon Duo (VIS)
- Chameleon 800
- Chameleon Duo 800
- Chameleon Duo
- The name of MW Marker

次にマーカーバンドを検出していきます。

Add Bandボタンを押したのち、画像上の分子量マーカーバンド上で左クリックし、検出を行います。検出が完了したら、**Done**ボタンを押します。

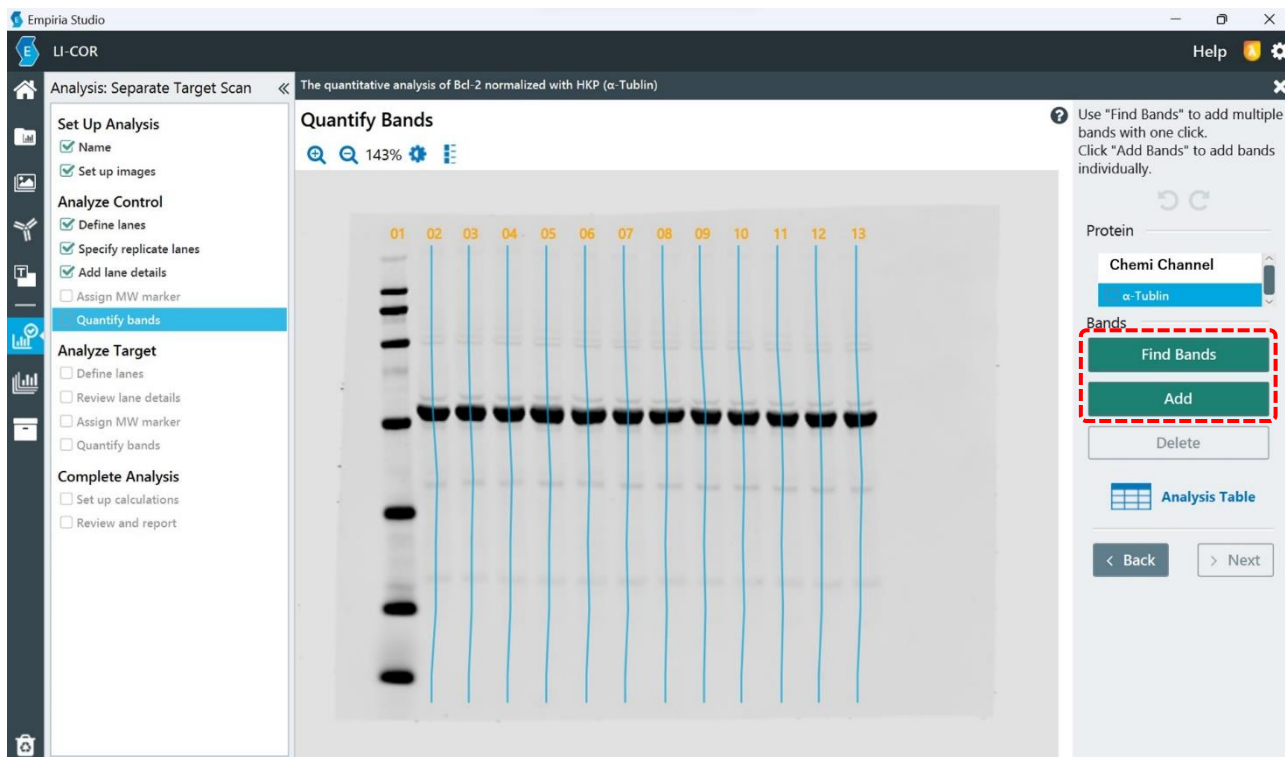
バンド検出中に、検出エリアを選択し間違えた時は、**Delete**ボタンを押す、もしくは、 を押すことで、ひとつ前の操作に戻ることができます。

最後に**Next**ボタンを押します。



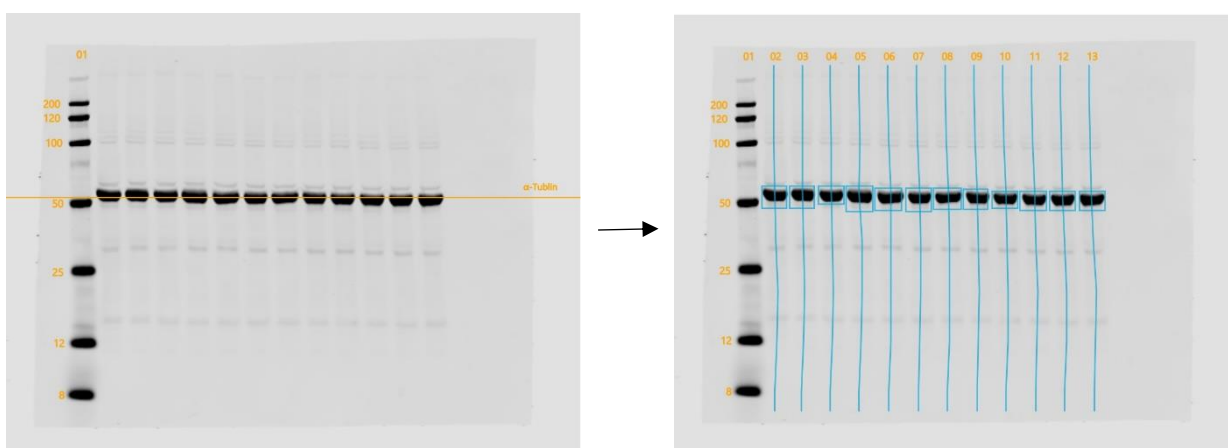
The main window displays the 'Assign MW Marker' step. The left sidebar shows the 'Analysis: Separate Target Scan' workflow with 'Assign MW marker' selected. The central area shows a gel image with bands labeled 200, 120, 100, 50, 25, 12, and 8. The right sidebar contains the 'MW Marker' settings, including a dropdown menu for 'The name of MW Marker', 'Information' and 'New' buttons, and a 'Marker Bands' section with an 'Add' button (highlighted with a red dashed box) and a 'Delete' button. Below these are 'Left' and 'Right' buttons, an 'Analysis Table' button, and 'Back' and 'Next' buttons.

- ⑪ **Quantify Bands** 画面が表示されます。ここでは内部標準タンパク質のバンド検出を行います。
バンド検出は、**Find Bands**ボタンもしくは**Add**ボタンで行います。



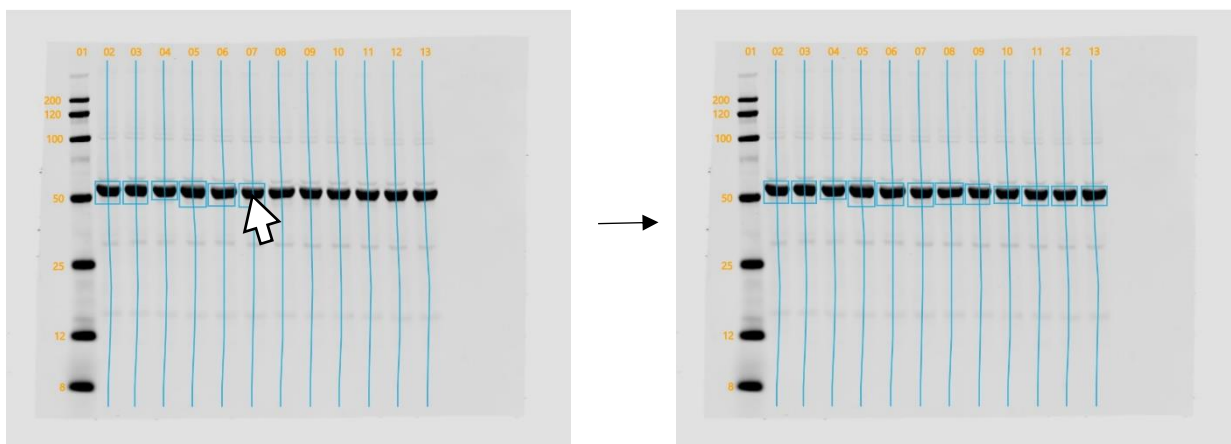
Find Bands

水平方向に同じ位置にあるバンド（近似した分子量のサンプル）をまとめて検出できます。**Find Bands**ボタンをクリックすると画像上にオレンジの水平線が表示されます。カーソルを上下に動かしてバンドを検出したいラインに合わせてクリックすると各レーンのバンドが自動的に検出されます。



Add

個々のバンドの上でクリックすることでバンドを1つ1つ検出することができます。**Add**ボタンをクリックしたのちに、それぞれのバンドの中央で左クリックしてください。全てのバンドを検出し終わりましたら、**Done**ボタンを押します。



バンドボックス の位置調整

I. 歯車マーク  から、画像の明るさ・コントラストを調整します。

注意: ディスプレイ設定が最適ではない状態でBand Boxの位置をマニュアルで調整することは避けましょう。

II. Band Boxを上下に移動したい時は、Boxをクリックしてから、カーソルをBox中央に合わせ、手のマークに変わった状態でドラッグしてください。Boxの傾きを調整したい時は、Boxをクリックしてから、Box上の  にカーソルを合わせ、手のマークに変わった状態でドラッグしてください。Boxのサイズを調整したい時は、Boxをクリックしてから、カーソルを四辺の  に合わせ、両矢印に変わった状態でドラッグしてください。調整中に、ひとつ前の作業に戻りたいときは  ボタン、一つ先に進みたいときは  ボタンを押してください。

III. Band Box自体を削除したい場合は、**Delete**ボタンを押してください。

最後に、**Next**ボタンを押します。

⑫ **Define Lanes** 画面が表示されます。

Target（ターゲットタンパク質のバンド）画像のレーン検出を行います。

青線が各レーンの中央にきているか確認します。

青線が各レーンの中央にきていない場合は、**Adjust Boundary** ボタン  を使用して、位置の調整を行います。

Adjust Boundary ボタンを押すと、青色の  が表示されます。

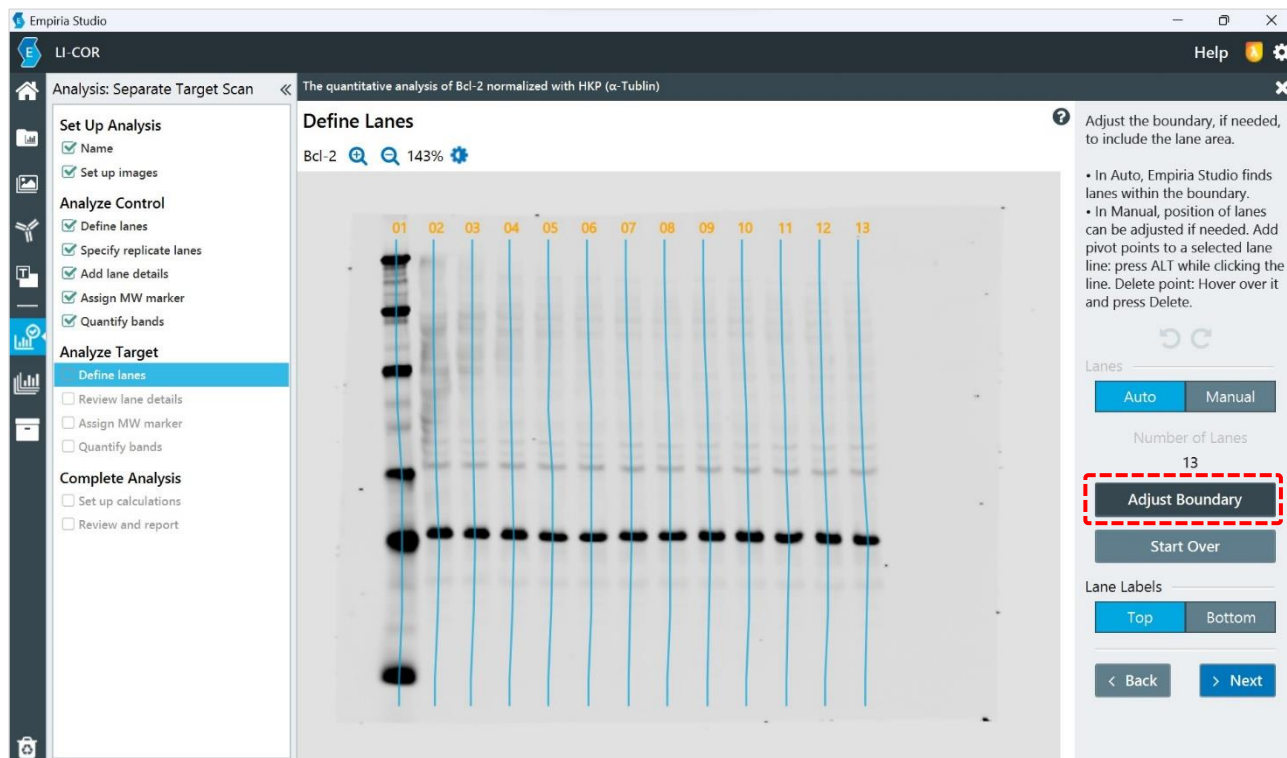
 中央にカーソルを合わせ、手のマークになってからドラックすると  全体の位置を調整できます。
カーソルを  の四隅あるいは四辺にある  印の上に合わせ、両矢印のマークになってからドラックすると  の大きさを調整できます。

プロット画像全体が  の中に入るように調整してから、**Done** ボタンを押してください。

ひとつ前の状態に戻りたい時は  マークを、ひとつ後の状態に戻りたい時は  マークを押してください。
始めの状態に戻りたい時は、**Start Over** ボタン  を押してください。

レーン検出のモードを **Manual** に選択している場合は、必要に応じて、さらに微調整してください。微調整の方法は、p.9をご覧ください。

最後に、**Next** ボタンを押して次に進んでください。



- ⑬ **Review Lane Details** 画面が表示されます。各レーンの情報を確認し、**Next** ボタンを押して、次の画面に進んでください。

- ⑭ «MW Makerを指定したレーンがある場合»

Assign MW maker 画面が表示されます。分子量マーカ情報を設定します。

まず始めに、**MW Marker**下の  を押し、表示されたドロップダウンメニューから、使用した分子量マーカ名を選択します。使用した分子量マーカの登録が終わってない場合は、p.12⑩を参照して登録してください。

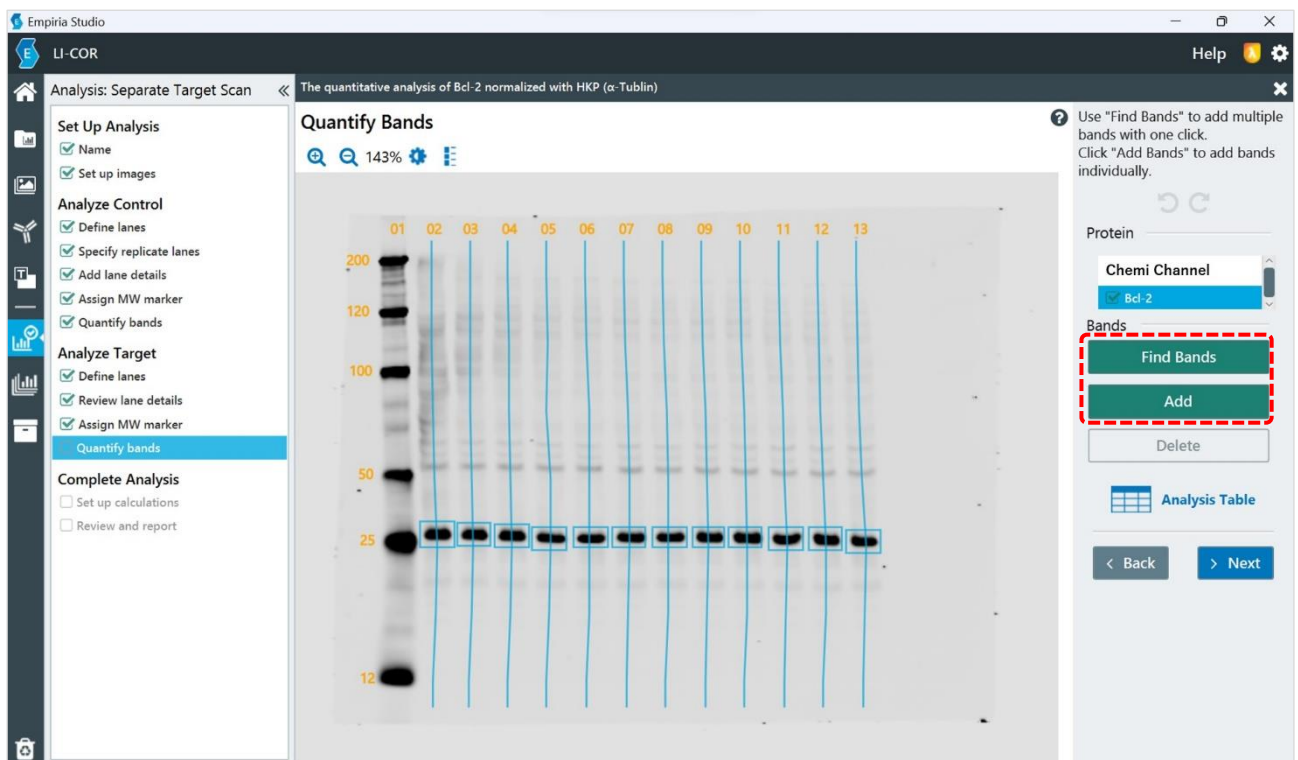
Add Bandボタンを押したのち、画像上の分子量マーカバンド上で左クリックし、検出を行います。検出が完了したら、**Done**ボタンを押します。

バンド検出中に、検出エリアを選択し間違えた時は、**Delete**ボタンを押す、もしくは、 を押すことで、ひとつ前の操作に戻ることができます。

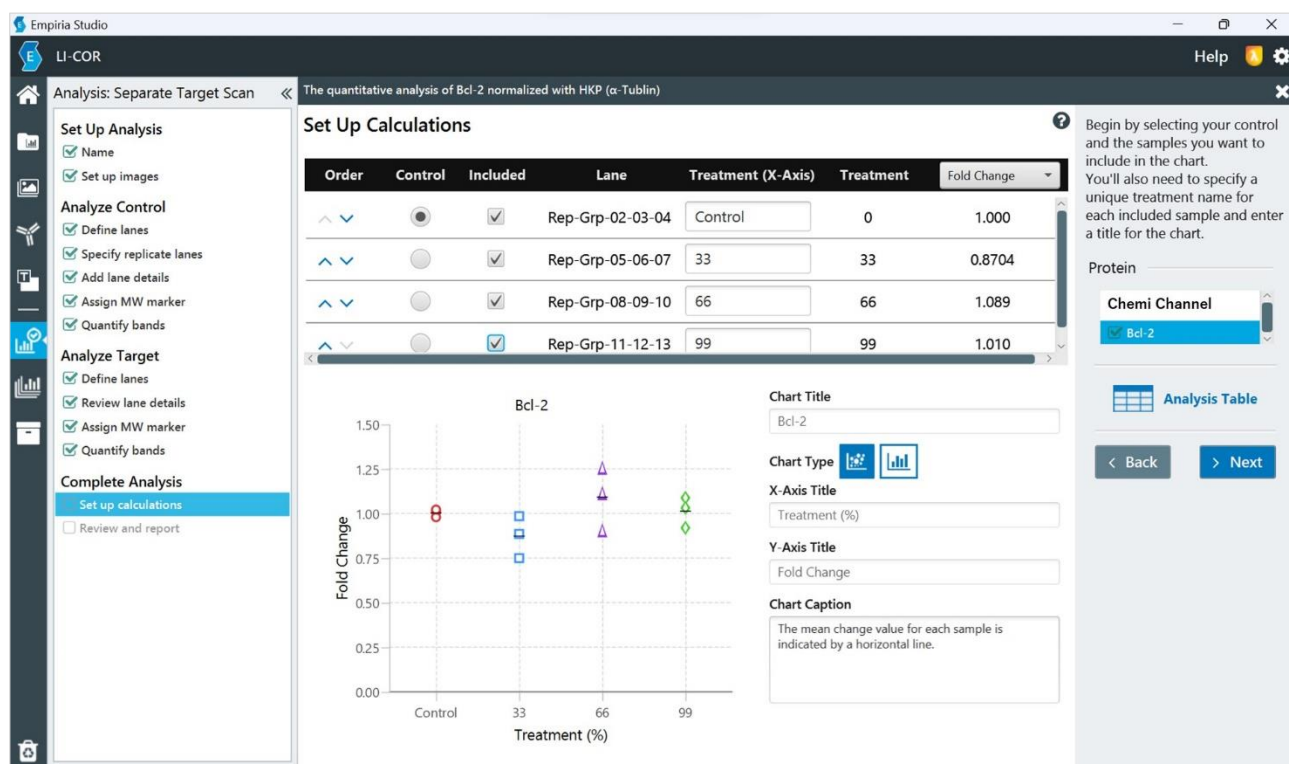
最後に**Next**ボタンを押します。

- ⑮ **Quantify Bands** 画面が表示されます。ここではターゲットタンパク質のバンド検出を行います。

バンド検出は、内部標準タンパク質のバンド検出と同様に、**Find Bands** ボタンもしくは **Add** ボタンで行います。詳細方法は p. 13~14 の⑪をご覧ください。最後に **Next** ボタンを押します。



- ⑩ **Set UP Calculations** 画面が表示されます。ここでは、実験条件によるサンプルへの影響を Fold Change もしくは % Change で表示できます。また、エクスポートするグラフデータの作成条件（表示するデータの選択/グラフ名/X・Y軸の名称など）を設定できます。



- **Order:** をクリックすることで実験群の順番を入れ替えることができます。
- **Control:** コントロールに使用したレーンもしくは実験群にチェックを入れてください。
- **Included:** グラフに含めるデータにチェックを入れてください。
- **Lane:** ⑥で指定した実験群名が表示されます。
- **Treatment (X-Axis Label):** X軸に表記させたい名称もしくは数値を入力してください。
- **Amount /Concentration /Dose /Treatment /その他:** ⑦で指定した実験条件が表示されます。
- **Fold Change:** グラフにはシグナル強度の変化率が表示されます。その表示方法を選択してください。
 - Fold Change: コントロール群を1としたときの各実験群の発現倍率による表示
 - % Change: コントロール群に対する増減パーセンテージによる表示
- **Chart Title:** グラフ名を入力してください。
- **Chart Type:** グラフの種類を散布図 (Scatter) と棒グラフ (Bar) から選択してください。
- **X/Y-Axis Title:** X/Y軸の名称を入力します。

⑰ **Review and Report** 画面が表示されます。

これまでの解析の流れをレポート形式で確認することができます。

解析データはData Folderに自動的に保存されます。

PDF形式で、解析レポートをエクスポートするためには、画面右上の**Export**下の  から**PDF Report**を選択し、保存してください。

他のPCでも、Empiria Studioをインストールすることで、同じ状態で解析データの閲覧・再解析・編集を行うことができます。この機能は、研究室内や共同研究者間での情報共有に便利です。他のPCで閲覧・再解析・編集を行う場合は、画面右上の**Export**下の  から**Experiment File**を選択し、データをエクスポートしてください。

エクスポートした解析データは、**Project**のホーム画面、左上にある**Create New Experiment**ボタン（p.3参照）横の  から、**Import Experimental File**、該当するExperiment File名の順で選択いただくことで、インポートできます。

解析に使用した全ての画像をまとめてエクスポートするためには、画面右上の**Export**下の  から**All Report Images**を選択し、保存してください。

グラフや表データを個々に保存するためには、 ボタンから保存してください。

解析エリアを示す青線を画像上から消したい時は、 ボタンを押してください。

解析のやり直しを行う場合は、画面左の解析項目をクリックすることで、該当の解析項目に戻ることができます。

Rate Experiment では、☆の数をつけることで解析結果に評価を付けることができます。

最後に **Done** ボタンをクリックします。

同じプロジェクト内で解析したデータの一覧表のページが表示され終了します。

3. サポート情報

クイックガイド

英語版の取扱説明書をご覧ください。

[Empiria Studio® Software Quick Start Guide](#)

