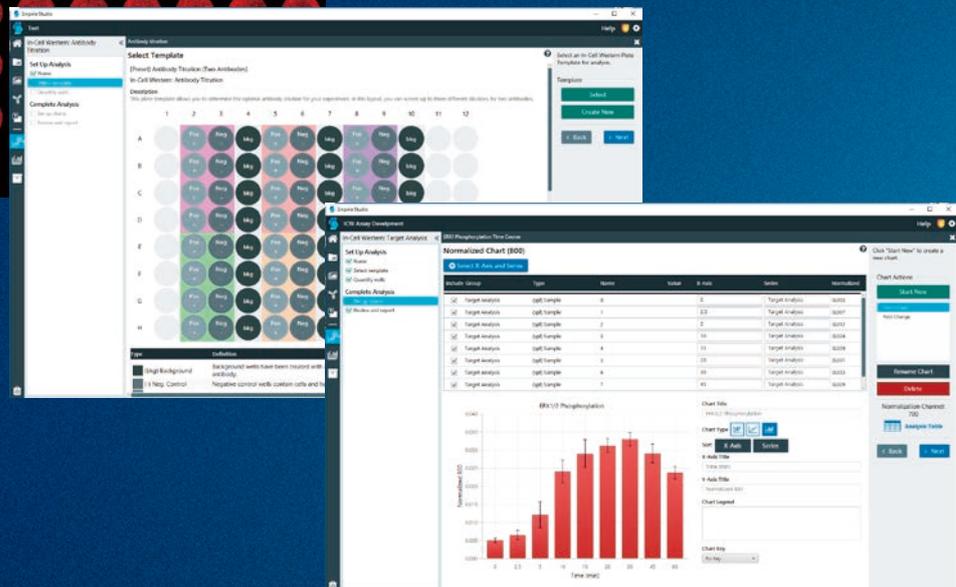
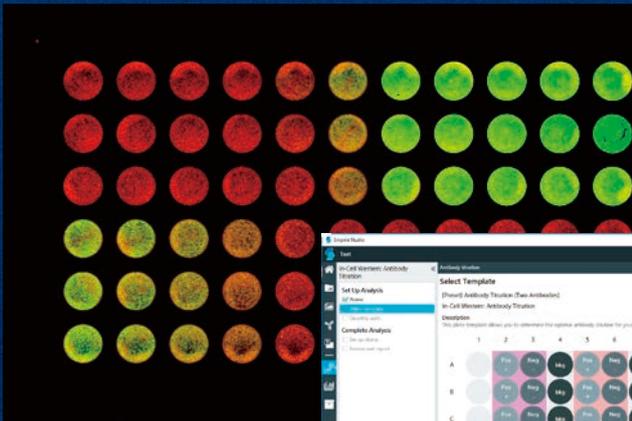


Odyssey® イメージングシステム

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



創薬研究に適したタンパク質発現解析法

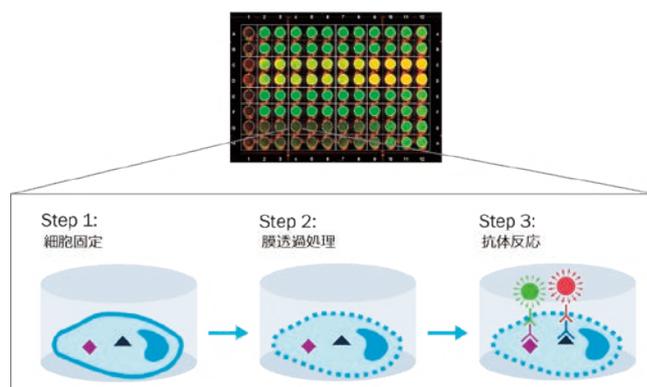
タンパク質発現解析を、もっとハイスループットに、少ない時間で！

LI-COR 社が開発した In-Cell Western™ アッセイ法は、細胞培養プレートの中で蛍光免疫染色を行い、ウェルの蛍光強度を測定することによって、目的タンパク質の発現量の比較定量を行う実験手法です。タンパク質抽出などを行わずに in situ でハイスループットな発現比較解析が可能です。

リガンド刺激や RNAi による創薬標的分子の発現変化の解析、タンパク質分解薬 / mRNA 医薬品 / 核酸医薬品 / 遺伝子治療ベクターなどの薬理機能解析、ウイルスの宿主細胞感染性の解析などに最適な実験手法です。

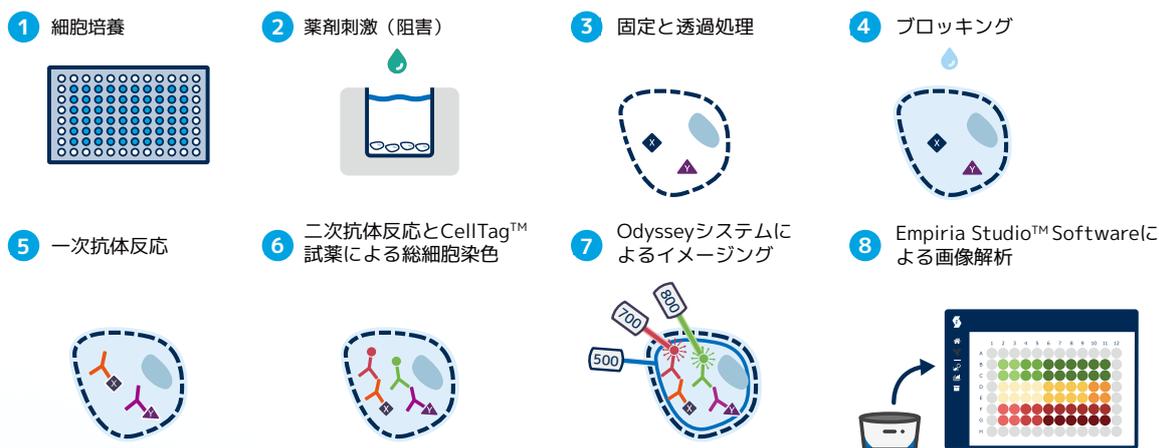
特徴と利点

- 96 ウェルあるいは 384 ウェルプレートを用いたハイスループットなタンパク質発現解析が可能
- セルベースでアッセイが可能（細胞回収、タンパク質抽出、電気泳動、転写などが不要）
- サンプル間のバラつきの少ないデータを取得可能
- シグナル伝達タンパク質のリン酸化など小さな発現差を正確に定量したい実験に最適
- サンドイッチ ELISA 法と異なり 1 つの特異抗体だけでアッセイが可能



ワークフロー

In-Cell Western アッセイの典型的なワークフロー例です。下図では 3 色法の実験の流れを示しています (Odyssey® F の 2 レーザーモデルの場合は最大 2 色になります)。



How to normalize ?

In-Cell Western アッセイで正確な発現比較解析を行うには、ウェル間での細胞数のバラつきを補正することが大切です。この補正は CellTag 試薬 (LI-COR 社) によりウェル中の全細胞を染色することにより行います。CellTag 試薬には 520 nm と 700 nm の 2 種類がございます。ターゲットタンパク質を CellTag と異なる波長の蛍光標識二次抗体を用いて染色し、Odyssey イメージャーによりマルチプレックス検出します。

リン酸化解析の場合は、トータルターゲットタンパク質 (リン酸化 + 非リン酸化) を内部標準としてノーマライゼーションを行います。

応用例

- シグナル伝達タンパク質のリン酸化解析
 - RNAi スクリーニング
 - CRISPR スクリーニング
 - ウイルスの宿主細胞感染性試験
 - 受容体のインターナリゼーション
 - メンブレントラフィッキング
 - PROTAC (タンパク質分解薬) の薬理評価
 - 遺伝子治療ベクターによるタンパク質発現修飾の評価
 - 核酸医薬品によるタンパク質発現修飾の評価
 - mRNA 医薬品によるタンパク質発現修飾の評価
 - リガンドの標的分子結合特異性解析
- など

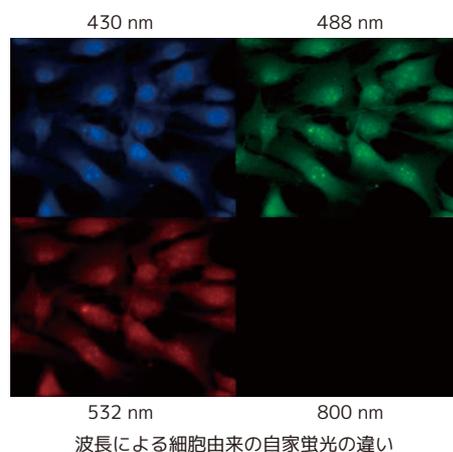
解析プラットフォーム

In-Cell Western™ アッセイでは、96/384 ウェルプレート of ウェル底面に焦点を合わせて、ウェル全域を高速かつ均一に撮影することができるスキャナータイプの蛍光イメージングシステムが求められます。

また、Red、Green、Blue (RGB) などの可視波長蛍光は、細胞に由来する自家蛍光が高く、シグナルノイズ比 (S/N 比) に優れた高感度な画像を取得するのが困難です。In-Cell Western アッセイで、微量に発現するタンパク質を高感度に検出するためには、700 nm 以上の近赤外蛍光を用いて撮影を行うことが重要です。

LI-COR 社の Odyssey® イメージングシステムは、これらの要求事項をハイレベルに満たすレーザースキャナータイプのイメージング装置です。In-Cell Western アッセイには、Odyssey F イメージングシステムと Odyssey M イメージングシステムが対応しています。

装置に標準付属する Empiria Studio® Software は、In-Cell Western アッセイ専用の解析モードを備え、アッセイの最適化から目的タンパク質の発現変化の数値化とグラフ化まで、皆様の実験を強力にサポートします。



イメージングシステム

	 Odyssey M (4 レーザーモデル)	 Odyssey F (4 レーザーモデル)	Odyssey F (2 レーザーモデル)
2 色 In-Cell Western アッセイ	●	●	●
3 色 In-Cell Western アッセイ	●	●	—
スキャン速度 /96 ウェルプレート	約 5 分 (2 色、解像度 100 μm)	約 4 分 (2 色、解像度 169 μm)	約 4 分 (2 色、解像度 169 μm)
スループット	プレート 4 枚	プレート 4 枚	プレート 4 枚

Odyssey F と Odyssey M には上記以外にも多くの違いがございます。詳しくは Odyssey シリーズの製品カタログをご覧ください。

? Which primary antibodies can be used ?

細胞の免疫染色でご使用いただいている一次抗体であれば使用可能です。変性条件下でないと認識できない抗体は使用できませんのでご注意ください。On-Cell Western アッセイの場合は細胞外ドメインを認識する抗体が必要です。

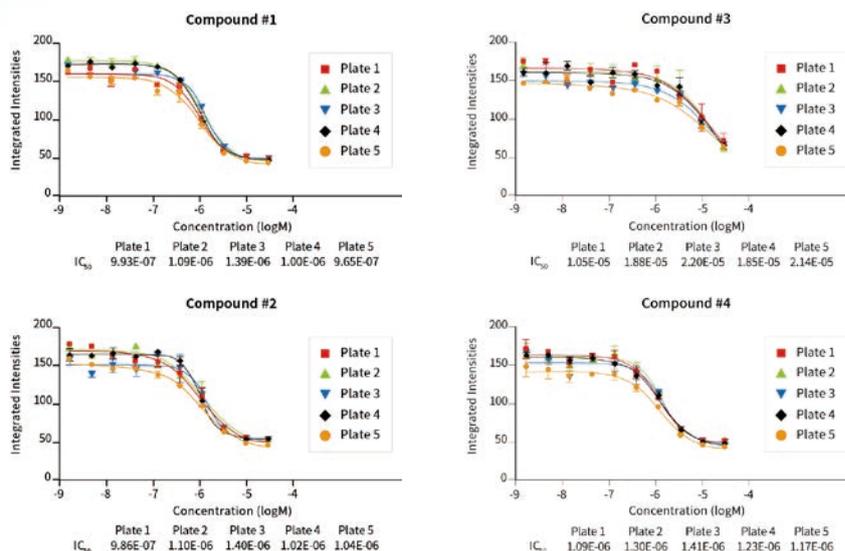
ウェスタンブロット法と異なり分子量によるタンパク質の分離を行わないので、一次抗体の特異性を事前に確認されることをお奨めいたします。

二次抗体に用いる近赤外蛍光標識二次抗体は IRDye® 標識二次抗体 (LI-COR 社) がお奨めです。

様々な動物種の IgG に対する高度吸収済の二次抗体を取り揃えています。

薬剤の薬理スクリーニング

PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) シグナル伝達系を阻害する4種類の化合物を NIH3T3 細胞に作用させ、In-Cell Western™ アッセイで Akt タンパク質リン酸化阻害の IC₅₀ を算出しました。実験は各化合物につき5プレートで実施しました。プレート間(実験間)で優れた再現性を得ることができています。



Anal Biochem. 2005 Mar 1;338(1):136-42.

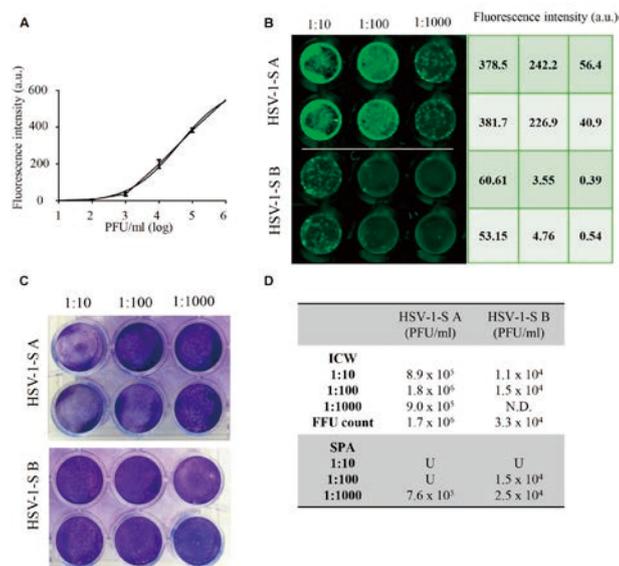
ウイルスの宿主細胞感染性試験

Vero 細胞に1型単純ヘルペスウイルスを感染させ、In-Cell Western アッセイでウイルスタンパク質を定量することで、宿主細胞に対するウイルス感染性を試験しました。

- A) 既知のPFUのウイルス溶液を感染させたときのIn-Cell Westernアッセイの蛍光強度。ブランクアッセイ法と相関があることがわかる。
- B) 2種類の未知PFUのウイルス溶液のIn-Cell Westernアッセイの結果。
- C) Bと同じウイルス溶液のブランクアッセイ画像
- D) In-Cell Westernアッセイとブランクアッセイの比較。
U=Uncountable、N.D.=Non-Detectable

In-Cell Westernアッセイ法は、ブランクアッセイ法と異なり客観的な定量データを96ウェルプレートを用いてハイスループットに取得することができます。

また、宿主細胞へのウイルス感染を検出する手法のため、ブランクアッセイ法よりも短期に測定ができ、細胞溶解を起こさないウイルスと宿主細胞の組み合わせにもご利用いただけます。



Front Microbiol. 2017 Jun 14;8:1085.

? Suspension cells can be used ?

In-Cell Western アッセイは、接着細胞だけでなく浮遊細胞にも応用できます。

無血清培地に懸濁した浮遊細胞を播種したプレートを約30分間静置することで、浮遊細胞はウェル底面に沈み緩やかに接着します。アッセイ中の溶液の交換やウォッシュを、マルチチャンネルピペットのチップ先端をウェル内壁につけてゆっくり行うことで、問題なくアッセイができることがわかっています。

詳細のプロトコルについては弊社までお問い合わせください。

RNAi スクリーニング

384 ウェルプレートを用いた In-Cell Western™ アッセイにより、リボソームタンパク質 S6 に対する siRNA のスクリーニングを行った。

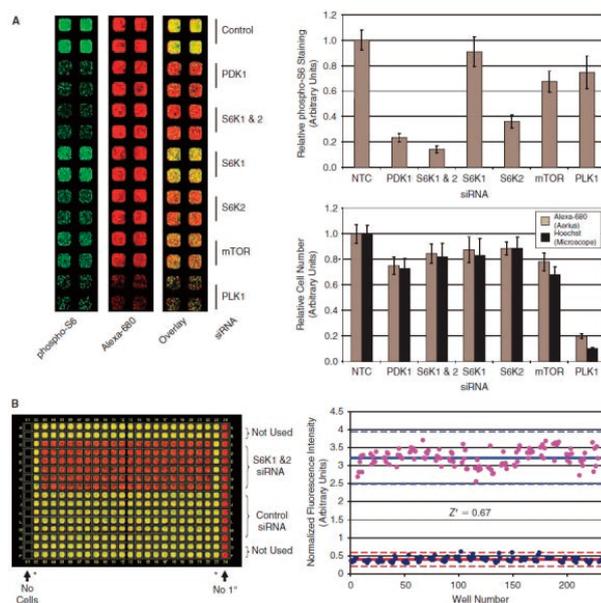
A) 右図 A の左は In-Cell Western アッセイの画像例。

リン酸化 S6 タンパク質を 800 nm チャンネル (緑) で、内部標準として総細胞数を Alexa 680 (赤) で検出し、様々なタンパク質に対する siRNA の効果を見た。グラフの上は内部標準でノーマライズしたリン酸化 S6 の発現量の比較。グラフ下は Alexa 680 による総タンパク質染色の妥当性を Hoechst 染色のデータにより検証した結果。

B) 右図 B の左は 384 ウェルプレートの全体像を示す。

右のグラフはアッセイ系の精度を示す Z' ファクターの計算結果。マゼンダ色のドットがリン酸化 S6 のシグナル、紺色のドットが総細胞数のシグナル。どちらの Z' ファクターも 0.5 以上であり、本アッセイが優れた精度を持つことがわかる。

※ Z' ファクターは $0.5 < Z' < 1$ が適正とされます。

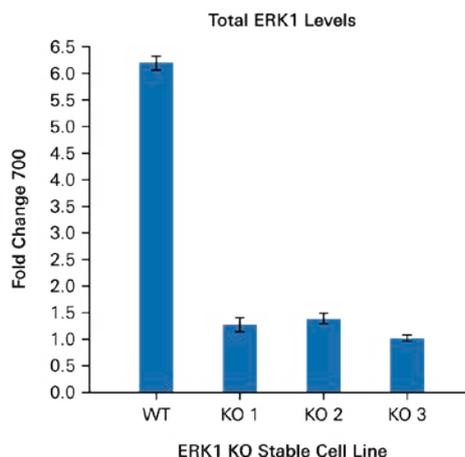
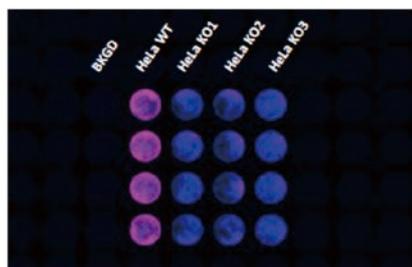


Assay Drug Dev Technol. 2010 Apr;8(2):186-99.

CRISPR/Cas9 による遺伝子ノックアウトの検証

In-Cell Western アッセイは、CRISPR/Cas9 などの遺伝子編集によるノックアウトの確認にも使用することができます。

下の例では、ERK タンパク質のノックアウトを IRDye® 680RD 標識二次抗体を用いて検出し (赤)、CellTag™ 520 (青) で染色した総細胞シグナルの後に (青) ノーマライゼーションしました。



LI-COR Internal Data



Which type of plate can be used ?

In-Cell Western アッセイには、平底クリアボトムの黒色プレートをお使いください。白色プレートはお使いいただくことができないので注意が必要です。

推奨製品は下記です。

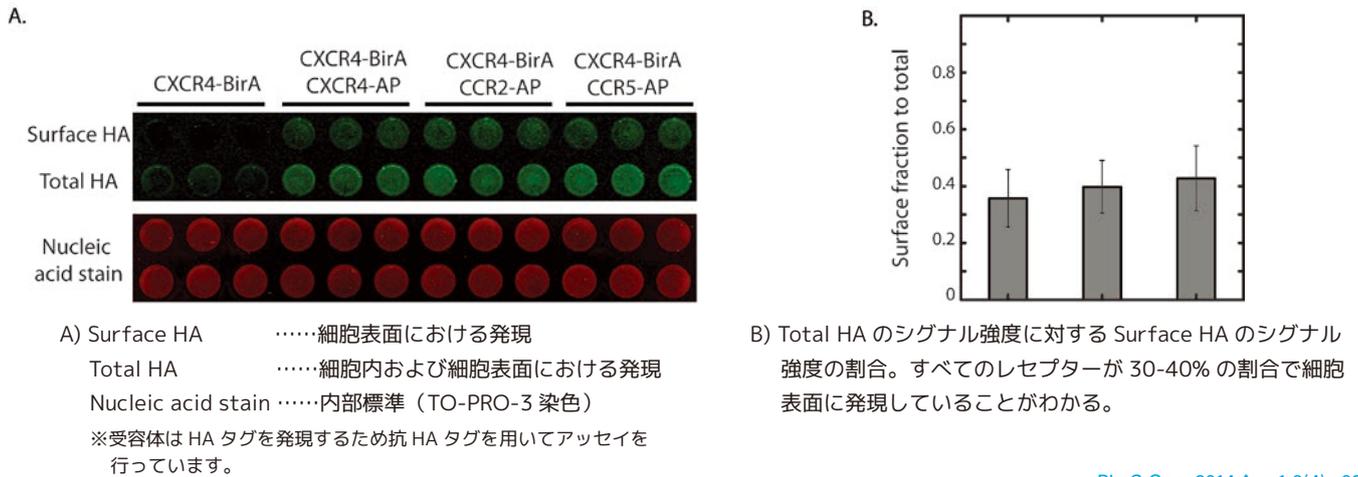
- LI-COR 96 ウェル ICW プレート (8 枚入 : 926-19156、32 枚入 : 926-19157)
- グライナー CELLSTAR, μ Clear, 96 ウェル, マイクロプレート (32 枚入 : 655090)

膜タンパク質のインターナリゼーション試験

In-Cell Western™ アッセイは細胞内タンパク質と細胞膜タンパク質のどちらも検出できるのに対し、On-Cell Western アッセイは細胞膜表面のタンパク質だけを検出します。

この2つのアッセイ法を組み合わせることで、受容体やイオンチャンネル/トランスポーターなどの細胞膜タンパク質のインターナリゼーションやメンブレントラフィッキングをハイスループットに試験することができます。

下図では3種類のケモカイン受容体（CXCR-4、CCR2、CCR5）の細胞表面および細胞質における発現をみています。

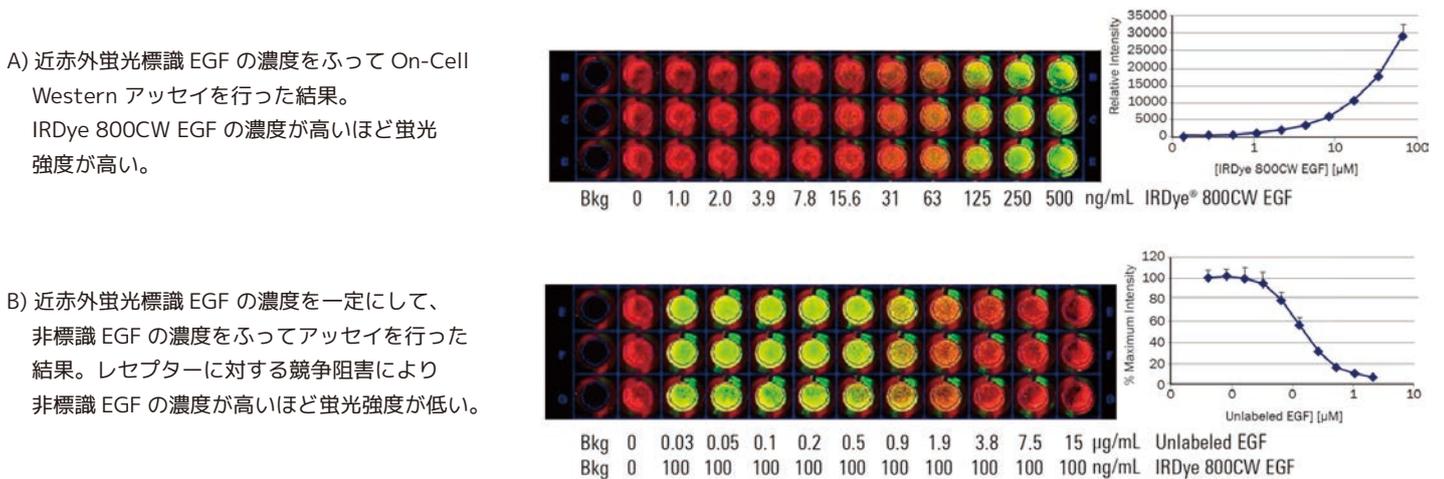


PLoS One. 2014 Apr 1;9(4):e93646.

蛍光標識薬剤の標的分子結合特異性試験

蛍光ラベルしたリガンドの標的分子への結合特異性を On-Cell Western アッセイ法でテストしました。

下図の例では IRDye® 800CW で近赤外蛍光標識した EGF の EGFR に対する結合特異性を競合アッセイにより試験しています。



What is On-Cell Western assay ?

On-Cell Western アッセイは細胞表面タンパク質だけを定量するための In-Cell Western アッセイの変法です。

In-Cell Western アッセイと異なり膜透過処理のステップを行わないことで、細胞内タンパク質を染色せずに細胞膜タンパク質だけを定量します。このとき一次抗体は細胞外ドメインをエピトープとする抗体を使用します。

また、近赤外蛍光標識したリガンド（抗体など）の標的タンパク質への結合特異性を試験することも可能です。

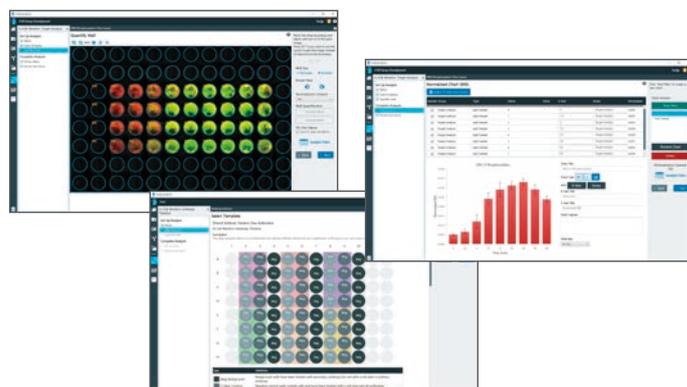
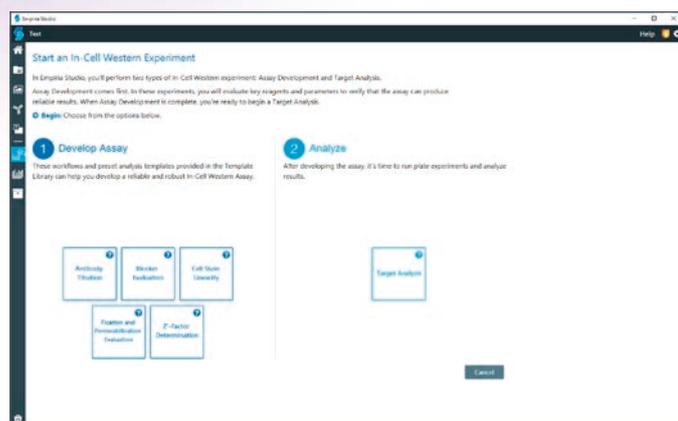
Empiria Studio® Software

Odyssey® イメージングシステムに標準付属する Empiria Studio Software には、In-Cell Western アッセイ (On-Cell Western アッセイ) のために最適化された専用の解析プログラムが搭載されています。

Empiria Studio を用いることで、単にウェルの蛍光強度を数値化するだけでなく、実験群間の発現差異のグラフ化まで、ワンフローで行うことができます。ノーマライゼーション計算、平均値、SD、CV%の算出まで自動で行うことができ、解析の時間を大幅に短縮します。

数値化のプロセスは客観性を担保できるように設計されており、解析者間によるデータのばらつきを最小限に抑えることが可能です。

また、アッセイの最適化を行うためのプログラムも搭載されており、充実したアッセイガイドブックと合わせて使用することで、In-Cell Western アッセイが初めての方でもスムーズにアッセイ系の構築を行っていただけます。



高品質な試薬消耗品



	<p>CellTag™ 総細胞染色試薬</p>	<p>総細胞数でウェル間のノーマライゼーションを行うための総細胞染色蛍光試薬です。二次抗体インキュベーション時に一緒に加えて染色します。700 nm チャンネル用の CellTag 700 と 520 nm チャンネル用の CellTag 520 の 2 種類がございます (520 は Odyssey F 4 レーザーモデルと Odyssey M のみ使用可能)。</p>
	<p>IRDye® 近赤外蛍光標識二次抗体</p>	<p>細胞やプレートの自家蛍光が少なく高感度にイメージングが可能な近赤外波長の蛍光標識二次抗体です。波長は 800 nm 用 800 CW と 700 nm 用の 680RD の 2 種。それぞれ、Rabbit、Mouse、Rat、Goat、Chicken、Gunia Pig、Human の IgG に対する抗体がラインナップされています。免疫動物種は Goat あるいは Donkey です。種間交差が高度に吸収されているので安心してマルチプレックス検出を行っていただけます。</p>
	<p>Intercept® ブロッキングバッファー</p>	<p>IRDye 標識二次抗体との組み合わせに最適化されたブロッキングバッファーです。プロテインフリータイプとプロテイン含有タイプの 2 種類がございます。それぞれに TBS ベースと PBS ベースがあります。1 本 500 mL 入りです。1 本、3 本、10 本、25 本、50 本の単位でご購入いただけます。</p>
	<p>ICW 96 ウェルプレート</p>	<p>In-Cell Western アッセイに適したクリアボトム平底ブラックプレートです。8 枚パックと 32 枚パックがございます。</p>
	<p>In-Cell Western アッセイキット</p>	<p>CellTag 総細胞染色蛍光試薬、IRDye 標識二次抗体、Intercept® ブロッキングバッファーがセットになった ICW アッセイ用キットです。CellTag 700 を使用したキットと CellTag 520 を使用するキットがあり、それぞれ二次抗体の種類の違いにより 2 種類がラインナップされています。</p>

豊富な論文実績

Odyssey® イメージャーを用いた多くの In-Cell Western™ アッセイの論文が既に発表され、創薬研究、シグナル伝達研究、疾患医学を中心に、世界中の一線級の研究者に使われています。論文例は下記の URL から検索できます。

Selected Publications

- Hoshino, A., Costa-Silva, B., Shen, TL. et al. [Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis](#). Nature 527, 329–335 (2015).
- Ruas, Margarida et al. [TPC1 Has Two Variant Isoforms, and Their Removal Has Different Effects on Endo-Lysosomal Functions Compared to Loss of TPC2](#) Mol Cell Biol 10.1128/MCB.00113-14
- Bugaj, L. J. et al. [Cancer mutations and targeted drugs can disrupt dynamic signal encoding by the Ras-Erk pathway](#) 10.1126/science.aao3048
- Acquaviva, Jaime et al. [mTOR Inhibition Potentiates HSP90 Inhibitor Activity via Cessation of HSP Synthesis](#) Mol Cancer Res 10.1158/1541-7786.MCR-13-0605
- Gstrein, Thomas et al. [Mutations in Vps15 perturb neuronal migration in mice and are associated with neurodevelopmental disease in humans](#) Nat Neurosci 10.1038/s41593-017-0053-5
- Tomas, Alejandra et al. [WASH and Tsg101/ALIX-dependent diversion of stress-internalized EGFR from the canonical endocytic pathway](#) Nat Commun 10.1038/ncomms8324
- Bonnefond, Amélie et al. [Rare MTNR1B variants impairing melatonin receptor 1B function contribute to type 2 diabetes](#) Nat Genet 10.1038/ng.1053
- Cohen, Dena E. et al. [Sirt1 mediates neuroprotection from mutant huntingtin by activation of TORC1 and CREB transcriptional pathway](#) Nat Med 10.1038/nm.2559
- Elkabets, Moshe et al. [mTORC1 Inhibition Is Required for Sensitivity to PI3K p110 \$\alpha\$ Inhibitors in PIK3CA-Mutant Breast Cancer](#) SciTransl Med 10.1126/scitranslmed.3005747
- Whittaker, Steven R. et al. [A genome-scale RNA interference screen implicates NF1 loss in resistance to RAF inhibition](#) Cancer Discov 10.1158/2159-8290.CD-12-0470
- Llopis-Hernández, Virginia et al. [Material-driven fibronectin assembly for high-efficiency presentation of growth factors](#) 10.1126/sciadv.1600188
- Hanks, Brent A. et al. [Type III TGF- \$\beta\$ receptor downregulation generates an immunotolerant tumor microenvironment](#) J Clin Invest 10.1172/JCI65745
- Spangler, Jamie B. et al. [Combination antibody treatment down-regulates epidermal growth factor receptor by inhibiting endosomal recycling](#) PNAS 10.1073/pnas.0913476107
- Lay, Kenneth et al. [FOXC1 maintains the hair follicle stem cell niche and governs stem cell quiescence to preserve long-term tissue-regenerating potential](#) Proc Natl Acad Sci USA 10.1073/pnas.1601569113
- Mohamed, Ahmed A. et al. [Identification of a Small Molecule That Selectively Inhibits ERG-Positive Cancer Cell Growth](#) Cancer Res 10.1158/0008-5472.CAN-17-2949
- Asahchop, Eugene L. et al. [HIV-associated sensory polyneuropathy and neuronal injury are associated with miRNA-455-3p induction](#) JCI Insight 10.1172/jci.insight.122450
- Tanis, Sabine E. J. et al. [Splicing and Chromatin Factors Jointly Regulate Epidermal Differentiation Cell](#) Rep 10.1016/j.celrep.2018.10.017
- Sinha, Ranjeet K. et al. [PAR1 biased signaling is required for activated protein C in vivo benefits in sepsis and stroke](#) 10.1182/blood-2017-10-810895
- Wilson, Frederick H. et al. [A Functional Landscape of Resistance to ALK Inhibition in Lung Cancer](#) Cancer Cell 10.1016/j.ccell.2015.02.005
- Etheridge, Ronald D. et al. [The Toxoplasma pseudokinase ROP5 forms complexes with ROP18 and ROP17 kinases that synergize to control acute virulence in mice Cell](#) Host Microbe 10.1016/j.chom.2014.04.002
- Wall, Mark J. et al. [The Temporal Dynamics of Arc Expression Regulate Cognitive Flexibility](#) Neuron 10.1016/j.neuron.2018.05.012
- Vanhoutte, Davy et al. [Thrombospondin expression in myofibers stabilizes muscle membranes](#) eLife 10.7554/eLife.17589
- Whittaker, Steven R. et al. [A genome-scale RNA interference screen implicates NF1 loss in resistance to RAF inhibition](#) Cancer Discov 10.1158/2159-8290.CD-12-0470

 LICORbio™ <https://www.licor.com/bio>

代理店

※ 本製品は試験研究用です。医療や診断目的にはご使用いただけません。
※ 価格、外観、仕様などは、予告なしに変更することがあります。
※ それぞれの商標や登録商標、製品名は各社の所有する名称です。

輸入元



本社 〒135-0014 東京都江東区石島 2-14
Imas Riverside 4F
Tel. (03)6458-6696 Fax. (03)-6458-6697
西日本営業所 〒532-0003
大阪市淀川区宮原5-1-3 NLC新大阪アースビル403
Tel. (06)6394-1300 Fax. (06)6394-8851
Web Site : www.scrum-net.co.jp

LC20240930