

DNA フラグメンテーションアッセイ APO-BRDU™ キット・APO-DIRECT™ キット

はじめに

アポトーシス後期には、活性化したエンドヌクレアーゼによるDNAフラグメンテーション(DNAの断片化)が起こります^{6, 14}。これらヌクレアーゼは、クロマチンを約300 kbに切断した後、最終的には、50 bp程度のDNAにまで断片化します¹⁸。DNAの断片化を検出する方法として "end-labeling法"、または、"TUNEL法(terminal deoxynucleotidyltransferase dUTP nick end labeling法)"と呼ばれる、外因性TdTを触媒にした反応がよく用いられます⁵。

APO-BRDU™ アッセイでは、まずTdTの触媒により1本鎖、2本鎖DNAの3'-OH末端に対するプロモ化デオキシウリジン三リン酸 (Br-dUTP) の鋳型非依存型付加を行ないます。結合したBr-dUTPは、蛍光標識した抗BrdUモノクローナル抗体で細胞を染色した後、フローサイトメーターで検出します⁶。

APO-DIRECT™ アッセイの場合は、DNA断片をFITC標識デオキシウリジン三リン酸 (FITC-dUTP) で標識した後、直ちにフローサイトメーター解析を行なうワンステップ法です⁷。図1、2にそれぞれの原理を図解しました。

このTechnical ProtocolではBD Biosciencesによる各キットのプロトコールに、フローサイトメーターによる解析方法を加えてご紹介します。

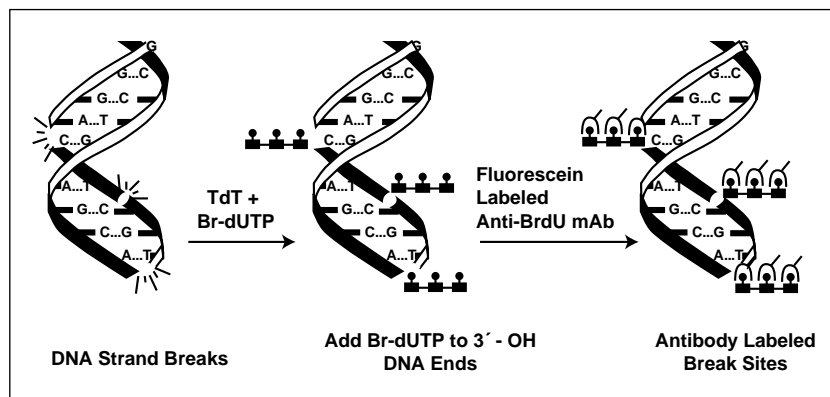


図1 APO-BRDU 蛍光標識原理

TdTは、1本鎖、2本鎖DNAの3'-OH末端に対するBr-dUTPの鋳型非依存型添加を触媒します。Br-dUTPを結合させた後、DNA切断箇所をFITC標識-抗BrdUmモノクローナル抗体により検出します。

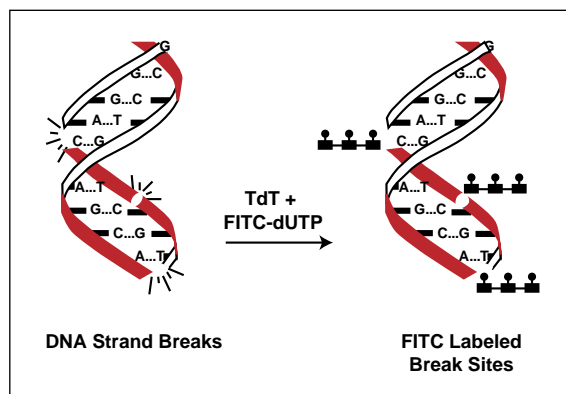


図2 APO-DIRECT 蛍光標識原理

TdTは、1本鎖、2本鎖DNAの3'-OH末端に対するFITC標識デオキシウリジン三リン酸 (FITC標識dUTP) の鋳型非依存型添加を触媒します。DNA切断箇所をFITC標識dUTPにより検出します。

キット概要

APO-BRDU™ キット、APO-DIRECT™ キットは、2カラー染色によりDNA切断部と細胞内全DNA量を標識します。その後、フローサイトメーターによりアポトーシスを起こした細胞を検出します。キット概要は表1に示しました。

APO-BRDU(BD カタログ番号: 556405)

APO-BRDU Part A	カラー・コード
Fluorescein標識抗BrdU mAb	オレンジ色
PI/RNase 染色用緩衝液	琥珀色容器
反応用緩衝液	緑色キャップ
リンス用緩衝液	赤色キャップ
洗浄用緩衝液	青色キャップ
APO-BRDU Part B	
Br-dUTP	紫色キャップ
陰性コントロール細胞	白色キャップ
陽性コントロール細胞	茶色キャップ
TdT酵素	黄色キャップ

APO-DIRECT(BD カタログ番号: 556381)

APO-BRDU Part A	カラー・コード
PI/RNase 染色用緩衝液	琥珀色容器
反応用緩衝液	緑色キャップ
リンス用緩衝液	赤色キャップ
洗浄用緩衝液	青色キャップ
APO-BRDU Part B	
FITC-dUTP	オレンジ色キャップ
陰性コントロール細胞	白色キャップ
陽性コントロール細胞	茶色キャップ
TdT酵素	黄色キャップ

表1 APO-BRDU およびAPO-DIRECT のキット構成

試薬容器は、キャップの色により識別できるようになっています。細胞浮遊液60本をテストするのに十分な試薬と、5 mLの陰性、陽性コントロール細胞(それぞれ約 1×10^6 細胞/mLを70%(v/v)エタノールに浮遊)が含まれています。コントロール細胞はヒト白血病細胞株に由来し、次ページに説明されている方法により固定されています。

APO-BRDU キットはAおよび、Bの2つのパーツから構成されています。Part Aは、受け取り後4°Cで保存してください。Part Bは、受け取り後-20°Cで保存してください。

注意および警告

- このキットの内容は研究用です。診断や治療には使用しないでください。
- 陽性および陰性コントロール細胞には、保存剤として70%(v/v)エタノール、反応用緩衝液には、カコシル酸(ジメチルアルシン酸)が緩衝液として含まれています。リンス用緩衝液、洗浄用緩衝液、Fluorescein標識抗BrdU mAb、FITC-dUTPには、0.05%(v/v)アジ化ナトリウムが保存剤として含まれています。これらの薬品は飲み込むと危険です。皮膚への接触を避け、もし触れてしまった場合はすぐに水で洗い流してください。
- TdT酵素は、50%(v/v)グリセロール溶液に溶解してありますので-20°Cで保管しても凍結することはありません。TdT酵素を暖めた後、液体が底に集まるくらいの強さで、容器を30秒間遠心してください。

キット内容に含まれていない必要な試薬および器材

- BD FACS™ フローサイトメーター
- 蒸留水
- 1%(w/v)パラホルムアルデヒド(メタノールを含まない)リン酸緩衝液(PBS)
- 70%(v/v)エタノール
- 37°C恒温槽
- 氷入りボックス
- 12×75 mmフローサイトメーター用ポリスチレン製試験管
- マイクロピペッター

染色手順

APO-BRDU™ 染色手順

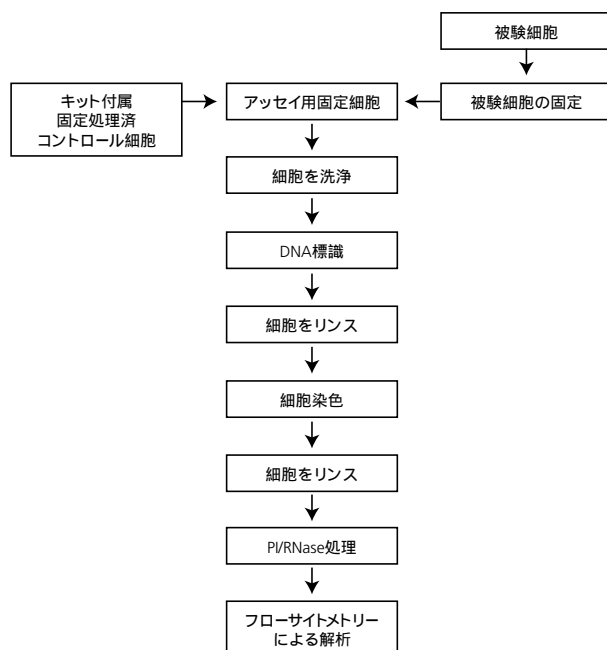


図3 APO-BRDU アポトーシス・アッセイ染色手順

パラホルムアルデヒドによる細胞固定は、APO-BRDU アッセイにおいては欠かせない手順です。推奨される固定方法は以下の通りです。由来細胞、培養環境等、様々な要因が解析結果に影響を及ぼす可能性があります。下記に示された固定方法はあくまでもガイドラインです。キットに含まれているコントロール細胞と同様の結果を得るには追加手順が必要な場合もあります。キットに添付されている陽性、陰性コントロール細胞はすでに固定されています。

1. $1 \sim 2 \times 10^6$ 個の細胞を0.5 mLのPBSに浮遊させます。
2. 細胞浮遊液を1% (w/v)パラホルムアルデヒドPBS溶液5 mLに加え、氷上に15分間放置します。
3. 細胞を5分間、 $300 \times g$ で遠心した後、上清を捨てます。
4. 5 mLのPBSで細胞を洗浄し、再び遠心して細胞をペレットにします。この操作を再度繰り返してください。
5. 細胞を0.5 mLのPBSに再浮遊させます。
6. 5.で浮遊させた細胞を5 mLの氷冷した70% (v/v)エタノールに加えて、氷上、または、冷凍庫で最低30分間、放置してください(留意事項参照)

留意：細胞の凝集を防ぐために、5の細胞浮遊液はエタノールに加えた後、すぐにボルテックスしてください。

留意：細胞によっては70% (v/v)エタノールに浮遊させた細胞をアポトーシス検出のために染色する前に -20°C で少なくとも12～18時間放置した場合に良い結果が得られることがあります。細胞は、 -20°C で数ヶ月、保存することが可能です。

以下のプロトコールは、APO-BRDU キットに添付されている陽性、陰性コントロール細胞の測定方法です。ご使用になる被験細胞のアポトーシス測定は同じプロトコールに従ってください。

1. 陽性(茶色キャップ) 陰性(白色キャップ)コントロール細胞の入ったバイアルを軽く振り、細胞を浮遊させてください。1 mLのコントロール細胞浮遊液(約 1×10^6 細胞/mL)を12x75 mmフローサイトメーター用試験管に分注します。コントロール細胞浮遊液を5分間、300xgで遠心分離した後、70%(v/v)エタノールを吸引除去します。このとき、細胞ペレットに触れないように注意してください。
2. 各試験管のコントロール細胞をそれぞれ1 mLの洗浄用緩衝液(青色キャップ)で再浮遊させます。上記ステップ1と同様に遠心分離した後、上清を吸引除去します。
3. 再度、細胞を洗浄します(ステップ2の繰り返し)
4. 細胞ペレットを50 μ LのDNA標識液(下記参照)で浮遊させます。
5. 再浮遊させた細胞を37°C恒温槽で60分インキュベーションします。15分毎に、試験管を振って細胞を浮遊させます。

DNA標識液(APO-BRDU)	1アッセイ	5アッセイ	10アッセイ
反作用緩衝液(緑色キャップ)	10.00 μ L	50.00 μ L	100.00 μ L
TdT酵素(黄色キャップ)	0.75 μ L	3.75 μ L	7.50 μ L
Br-dUTR(紫色キャップ)	8.00 μ L	40.00 μ L	80.00 μ L
蒸留水	32.25 μ L	161.25 μ L	322.50 μ L
合計容量	51.00 μ L	255.00 μ L	510.00 μ L

アッセイに必要なDNA標識液の量は、1アッセイに要する試薬量にアッセイ数を単純に掛けることにより算出できます。アッセイ時に必要量だけ作成してください。4°C保存したDNA標識液は、24時間以内に使用してください。

留意：コントロール細胞のDNA標識は、室温で一晩、反応させて行なうことも可能です。キットに含まれているコントロール細胞以外の細胞では37°Cで反応時間を延長、または短縮するなど、その細胞に適した条件に調整してください。

6. インキュベーション後、各試験管に1 mLのリンス用緩衝液(赤色キャップ)を加えます。5分間、300xgで遠心分離した後、上清を吸引除去してください。
7. ステップ6を繰り返します。
8. 細胞ペレットを100 μ Lの抗体溶液(下記参照)で再浮遊させます。

抗体溶液	1アッセイ	5アッセイ	10アッセイ
Fluorescein標識抗-BrdU(オレンジ色キャップ)	5.00 μ L	25.00 μ L	50.00 μ L
リンス用緩衝液(赤色キャップ)	95.00 μ L	475.00 μ L	950.00 μ L
合計容量	100.00 μ L	500.00 μ L	1000.00 μ L

9. 細胞とFluorescein標識抗-BrdU抗体溶液を暗所で30分間、室温で反応させます。
10. 0.5 mLのPI/RNase A溶液(琥珀色キャップ)を100 μ Lの抗体染色液の入った各試験管に加えます。
留意：細胞密度が低い場合は、PI/RNase A溶液の量を0.3 mLにしてください。
11. 室温、暗所で30分間インキュベーションします。
12. フローサイトメーターによる解析を行いません。最良の結果を得るために、染色後、3時間以内に解析をしてください。一晩放置したサンプルは、細胞分解を始める可能性があります。

APO-DIRECT™ 染色手順

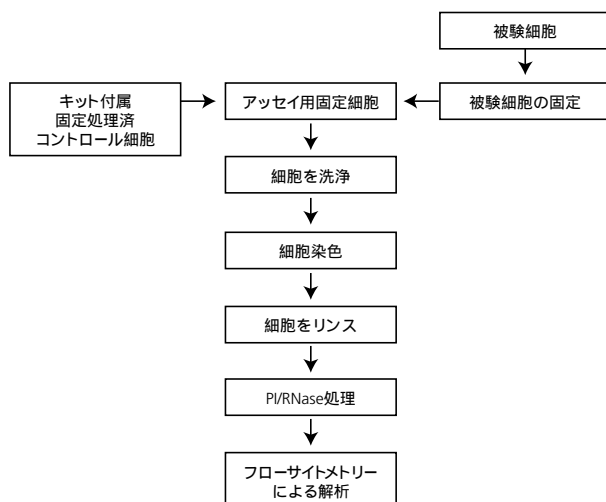


図4 APO-DIRECT アポトーシス・アッセイ染色手順

APO-BRDU™ 染色手順のStep7まで、同様に染色します。Step4で加えるDNA標識液は下記を参照してください。

DNA標識液(APO-DIRECT)	1アッセイ	6アッセイ	12アッセイ
反作用緩衝液(緑色キャップ)	10.00 µL	60.00 µL	120.00 µL
TdT酵素(黄色キャップ)	0.75 µL	4.50 µL	9.00 µL
FITC-dUTR(オレンジ色キャップ)	8.00 µL	48.00 µL	96.00 µL
蒸留水	32.00 µL	192.00 µL	384.00 µL
合計容量	50.75 µL	305.50 µL	609.00 µL

アッセイに必要なDNA標識液の量は、1アッセイに要する試薬量にアッセイ数を単純に掛けることにより算出できます。アッセイ時に必要量だけ作成してください。4℃保存したDNA標識液は、24時間以内に使用してください。

Step7以降は次の手順で染色します。

8. 0.5 mLのPI/RNase A溶液(琥珀色キャップ)で細胞ペレットを再浮遊させます。
留意：細胞密度が低い場合は、PI/RNase A溶液の量を0.3 mLにしてください。
9. 室温、暗所で30分インキュベーションします。
10. フローサイトメーターによる解析を行いません。
11. 最良の結果を得るために、染色後、3時間以内に解析をしてください。一晩放置したサンプルは、細胞分解してしまう可能性があります。

フローサイトメトリーによる解析

このアッセイには、488 nmアルゴン・レーザーを光源とするフローサイトメーターを使用します。細胞内全DNA染色に使用するPropidium iodide(PI) およびアポトーシス細胞を染色するFluoresceinの2種の蛍光色素を検出します。488 nmで励起するとPIは623 nm、Fluoresceinは520 nmで発光します。

プロットの作成

陽性コントロール細胞を使った場合、通常得られる解析方法が図5に示されています。ゲーティングのための、FSC vs SSC、およびFL3 Width vs FL3 Areaプロットを作成し、アポトーシス解析のためのFL3 Area vs FL1プロットを作成します。FL3 Width vs FL3 AreaとFL3 Area vs FL1プロットには、後に作成するリージョンR1を適用し、Multicolor Gatingをクリックしておきます。このようにすると、図5-2、5-3のようにGateされた細胞だけが色付きドット(ここではグレーに対して黒いドット)になり、調整しやすくなります。PIはFL2、FL3どちらでも検出できますが、FL3で検出するとコンペーンション調整が必要ないので便利です。FL3はLINモードで検出するように機器調製ウィンドウを設定します。FL1はLOGモードにします。

機器調整

BD FACSCComp™ を実施した後、FSC、SSCを調整し図5-1のように細胞集団をプロット内に収め、細胞を囲むようにリージョン(R1)を設定します(図5-1)。FL3-H PMT Voltageを調整しG0/G1期の細胞集団がFL3 Areaの約200 chに来るように調整します(図5-2、5-3の点線を参考にしてください)。FL3 WidthのAmp Gainは細胞集団が見やすいように3.00-5.00にします(図5-2)。FL1-HのPMT voltageを下げ、図5-3のようにFluorescein-BrdUモノクローナル抗体陽性の細胞群(上のリージョン)と陰性のリージョン(下のリージョン)に分かれるようにします。

解析の時は、図5-2に凝集細胞を取り除くようにリージョン(R2)を設定し、ロジカルゲート(R1 and R2)を作成し図5-3に適用して、Fluorescein-BrdUモノクローナル抗体陽性、陰性細胞群のパーセンテージを求めます。

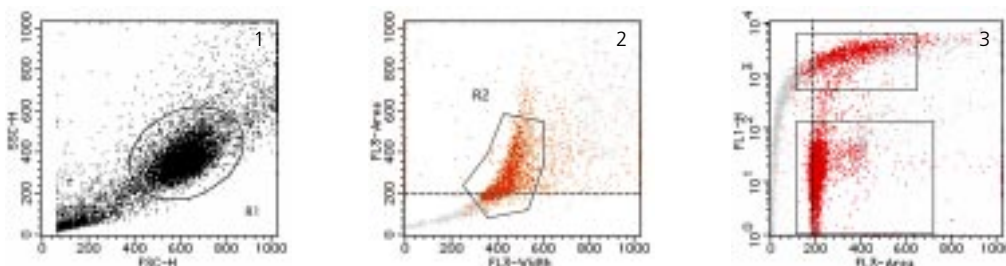


図5 BD FACSCaliburにおけるセットアップ

図5-3において上のリージョンはFluorescein-BrdUモノクローナル抗体により蛍光発色している陽性細胞、下のリージョンは発色していない陰性細胞を示している。

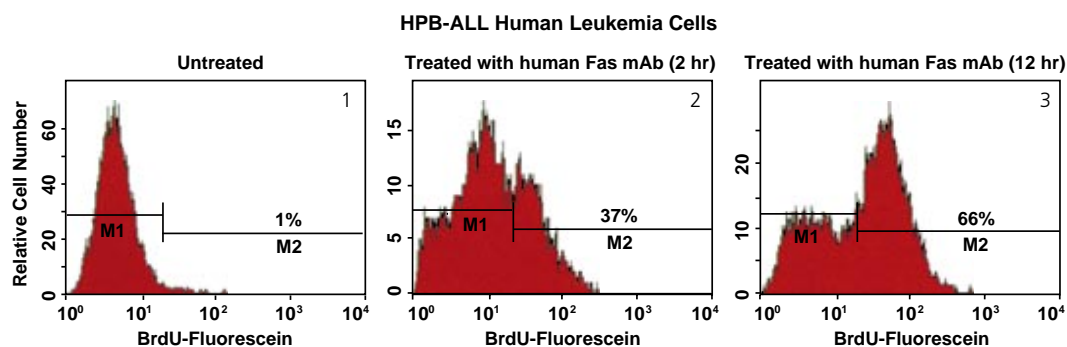


図6 APO-BRDU™ を用いたHPB-ALLヒト白血病細胞のフローサイトメトリーによる解析

HPB-ALLヒト白血病細胞について未処理(1)、抗ヒトFasモノクローナル抗体、クローンDX2(カタログNo.33450D) およびプロテインGにより処理して2時間後(2)、抗ヒトFasモノクローナル抗体、クローンDX2(カタログNo.33450D) およびプロテインGにより処理して12時間後(3)、細胞を固定し、TdT酵素の存在下、Br-dUTPとインキュベーションし、露出したDNAの3'-OH末端にBr-dUTPを結合させた。Br-dUTPの結合箇所は、Fluoresceinで標識した抗BrdUモノクローナル抗体により検出。アポトーシスが起きていない細胞(M1領域)では露出した3'-OH末端がなくBr-dUTPの結合が見られないため、アポトーシス細胞(M2領域)に比べ非常に弱い蛍光発光しか検出されない。DX2によるFasを介したアポトーシスの誘導では、細胞処理後2時間、12時間で抗BrdU-Fluorescein mAb(M2領域)で染色される細胞数が増加した。M1、M2領域は、各々アポトーシス細胞とそうでない細胞の境界を示している。

テクニカルTipsとFAQ

1. 接着細胞を使用する場合、接着している細胞より培養液中に浮遊している細胞の方がアポトーシスが起きていることが多いため、接着細胞をトリプシン処理する前に細胞が浮遊している培養液をアッセイ用に回収しておいてください。
2. このアッセイにおいて、固定剤(例: パラホルムアルデヒド)により細胞を固定させることは重要です。細胞内に存在する化学的に固定されていない小さな断片化したDNAは、細胞を洗浄するときに損失する可能性があります。各測定に最適な固定法、浸透法を採用してください。
3. 次の手順に従い、APO-BRDU™またはAPO-DIRECT™ サンプルからサイトスピン、または、遠心分離細胞スライドを作成することが出来ます。Fluorescein標識抗BrdU抗体による染色後、PI/RNase Aで処理する前の細胞を1滴スライド上に滴下します。軽く遠心してから蛍光顕微鏡で観察します。
4. APO-BRDU キットにおいて、Fluorescein染色の蛍光強度が弱く観察されるとき、50 µLのDNA標識液のインキュベーション時間を延長してみてください。DNA標識に37°Cで4時間のインキュベーション時間を要するものもあります。APO-DIRECT キットにおいても、FITC染色の蛍光強度が弱く観察されるとき、DNA標識液のインキュベーション時間を延長してみてください。
5. DNA細胞周期のデータを必要としない場合は、サンプルにPI/RNase A溶液を加える必要はありません。




日本ベクトン・ディッキンソン株式会社

東京都港区赤坂8-5-26 赤坂DSビル 〒107-0052

www.bd.com/jp/

お客様情報センター


製品関連・資料請求／納期・在庫

 0120-8555-90

Fax: 024-593-5761

BD Biosciencesに関する技術的、学術的なお問い合わせ先
アプリケーションホットライン **Tel: 03-5805-9960**
技術研修室 **E-Mail: tech_cell@bd.com**

機器修理・メンテナンス  0120-7099-12

試薬カスタマーサポート  0120-4890-77
E-Mail: tech_cell@bd.com