

BrdU FLOW KIT

Kit Manual

BD Biosciences

Clontech
Discovery Labware
Immunocytometry Systems
Pharmingen



キット内容：

(以下の試薬は4℃で保存してください)

FITC -anti-BrdU Antibody (Kit Component. No. 23614L): 1 バイアル

Cytofix/Cytoperm Buffer (Kit Component. No. 2090KE): 1 バイアル(医薬用外劇物)

Perm/Wash Buffer (10x) (Kit Component. No. 2091KE): 2 バイアル

Cytoperm Plus Buffer (Kit Component. No. 2356KC): 1 バイアル

7-AAD (Kit Component. No. 2359KC): 1 バイアル

Kit Manual

(以下の試薬は別梱包にて発送されます。-80℃にて保存してください)

BrdU (Kit Component. No. 2420KC): 5 バイアル

DNase (Kit Component. No. 2358KC): 5 バイアル

BD Pharmingen™

BrdU FLOW KIT MANUAL

目次

Section	ページ
はじめに	1
1. 概要: BD Pharmingen BrdU Flow Kit染色プロトコール	2
2. キット内容と保存条件	4
3. BrdUラベリング、およびBrdU Flow Kit染色プロトコール	7
A. BrdUによる細胞のラベリング	7
B. BrdU Flow Kit染色プロトコール	9
4. 染色した細胞サンプルのフローサイトメトリー分析	11
5. フローサイトメーターセットアップのガイドライン	16
6. 染色と分析のヒント	23
7. 付録	25
8. 参考文献	32

はじめに

取り込まれたbromodeoxyuridine(BrdU)の免疫蛍光染色とフローサイトメトリー分析を組み合わせると、DNAを合成している各細胞の割合と特性を高分解能で分析できます。この方法では、まずBrdU(DNA前駆体の一つチミジンの類似物)を、細胞周期のS期(DNA合成期)に新たに合成されているDNAの中に取り込ませます。¹⁻⁴ 取り込まれたBrdUは特異的anti-BrdU蛍光標識抗体により染色されます。細胞に結合したBrdUレベルはフローサイトメーターにより測定できます。しばしば、このBrdUによる免疫蛍光染色には、7-amino-actinomycin D(7-AAD)の様な全DNAに結合する色素による染色が組み合わせられます。この組み合わせを利用し、2カラー染色フローサイトメトリー分析することで、細胞周期の位置(即ち7-AAD染色強度より規定されるG0/1期、S期またはG2/M期)と、活発にDNAを合成している細胞の数と特徴を解析することができます。^{5, 6}

長時間細胞をBrdUに曝露することで、非周期細胞分画と活発に細胞周期を回転させる細胞分画を同定し、分析することができます。様々な時期に細胞をBrdUでパルスラベリングすると、細胞周期の変化を測定することができます。BrdUの取り込みを使用した研究は様々な実験プロトコールに使用されてきました。そのような研究には、*in vitro*および*in vivo*(例えば実験動物に腹腔内注射したり、あるいは飲み水に加えBrdUを摂取させる)ラベリングシステムがあります。

BD Pharmingenの新しいBrdU Flow Kitの大きな特徴は、免疫蛍光BrdU染色用試薬とともにプロトコールを提供していることです。このプロトコールは別の細胞分子に特異的な他の蛍光抗体にも応用できるものです。対象となる分子には、細胞表面抗原や細胞内蛋白(例えばサイトカイン、サイクリンやその他の蛋白)が含まれます。これらはその発現や活性化が細胞の活性化や細胞周期の進行、または細胞死に関係しています。この様な広い応用が可能なのは、BrdU Flow Kit染色プロトコールには酸、エタノールの様なDNA変性剤の利用や高温によるDNA変性をさせていることによります。これらは、細胞の光散乱特性を変化させ、また蛍光抗体による細胞抗原の認識を制限してしまうからです。⁷⁻¹¹

BrdU Flow Kitでは、蛍光標識抗体は細胞表面抗原や細胞内蛋白を認識することができます。細胞はパラホルムアルデヒドで固定され、サポニンで膜浸透化されます。この試薬の組み合わせにより、フローサイトメトリーによって細胞のDNA合成活性(BrdU取り込みレベル)に関連するいろいろな表面抗原、または細胞内蛋白の発現レベルを測定することができます。例えば、BrdU Flow Kitを蛍光標識抗サイトカイン抗体と組み合わせることで、*in vitro*で休止期のリンパ細胞集団をマイトジェン刺激したあとで、経時的に分析することができます。また、DNA合成(細胞周期

活性の最も主要な相の前、合成時、合成後に発現する特定のサイトカイン(例えばT細胞増殖および分化因子であるIL-2)について研究することもできます。

BD Pharmingen BrdU Flow Kitとその他の選択されたフローサイトメトリー用試薬を使うことで、この種のような高分析能の研究が可能になります。キットには詳細な取扱説明書と染色プロトコールを実施する上で必要な全ての試薬を提供しており、安定した結果を保証しています。各コンポーネントは全て、各細胞により取り込まれたBrdUレベルや細胞表面抗原の発現、そして細胞内抗原の発現に関するマルチパラメータ分析に適しているかどうか徹底的に試験されています。

Section 1

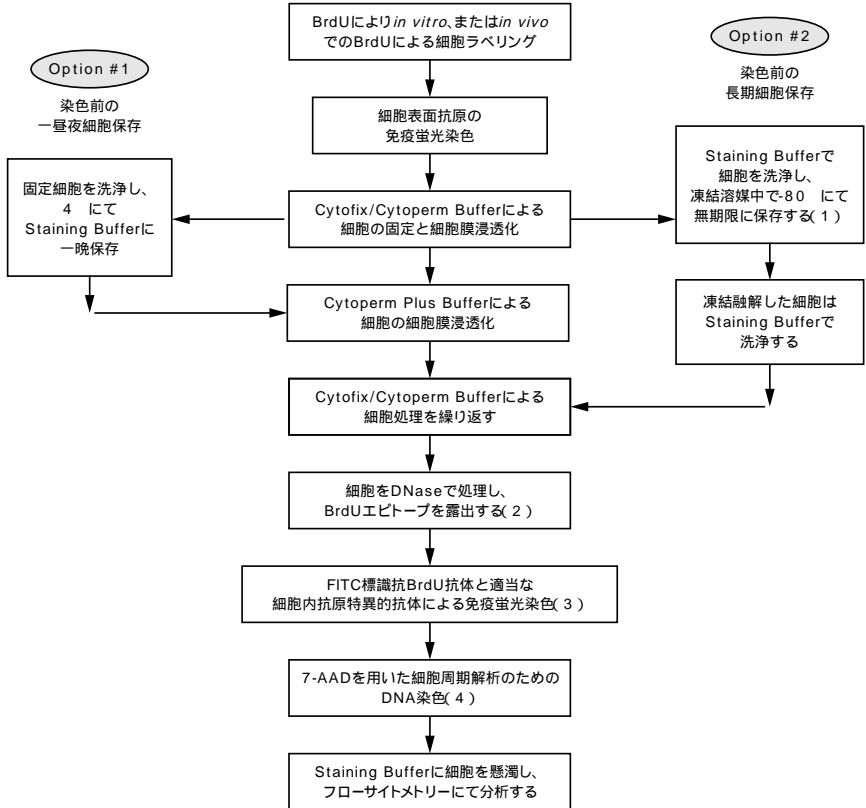
概要：BD Pharmingen BrdU Flow Kit染色プロトコール

BD Pharmingen BrdU Flow Kit染色プロトコールは、サンプル取り扱いに関していくつかのオプションを提供しています。この染色プロトコールを利用すると、1日で免疫蛍光染色しサンプルを分析することができます。全ての染色作業は1日で完了できます(およそ3時間)。また、サンプルを染色前に固定すれば、染色まで保存することもできます。細胞活性化に必要な時間やBrdUとの反応時間、BrdU染色前の細胞調整に必要な他のファクターにより、しばしばサンプルを保存したり、後で染色を行うことが望まれる場合もあるでしょう。染色前に短時間のサンプル保存をしたい場合には、染色プロトコールの **Option #1** を選択すれば最初の固定ステップ後に細胞を一晩保存することができます。より長期に細胞の保存をしたい場合には、染色プロトコール **Option #2** を選択し、最初の固定ステップの後にサンプルを無期限に凍結することもできます。BD Pharmingen BrdU Flow Kit染色プロトコールは柔軟性に富んでおり、研究者は時間が節約できる複数のオプションを利用できます。

Section 1

概要: BrdU Flow Kit染色プロトコール

一日で行う染色手順



- (1)凍結溶媒の組成：10% dimethyl sulfoxide(DMSO)+90%加熱不活化ウシ胎児血清 (FBS)
- (2)別法として、染色操作をDNase処理ステップの後停止できる。DNase処理細胞は、この後 Perm/Wash Buffer中に一晩保存し、翌日染色を継続することができます。
- (3)パラホルムアルデヒドで固定されたエピトープを認識する抗体がある場合には、細胞表面抗原の免疫蛍光染色は細胞内抗原の染色と同時に実施できます。
- (4)全DNA含有量を染色する必要が無い場合には、7-AAD染色ステップを省き、FL3チャンネルを別のパラメータの蛍光データ測定に利用できます。

Section 2

キット内容と保存条件

表1

Component	Storage condition	# of vials
FITC -anti-BrdU Antibody	4	1
Cytofix /CytoPerm Buffer (医薬用外劇物)	4	1
Perm/Wash Buffer (10 ×)	4	2
Cytoperm Plus Buffer	4	1
BrdU 10 mg/ml	-80	5
DNase	-80	5
7-AAD	4	1

一部のキット試薬は濃縮保存液として供給され、脱イオン水、1×Dulbecco's PBS(DPBS) またはPerm/Wash Bufferにより希釈する必要があります。キット内容の取り扱い、調整および保存方法は次の通りです：

FITC-conjugated anti-BrdU antibody: このバイアルには50 μLのFITC標識抗BrdU抗体の保存液が入っており、50サンプルを染色できます(10^6 cells/sample)。使用前に、保存抗体は1×Perm/Wash Bufferにより1:50に希釈してください。サンプル毎に希釈抗体50 μLを染色に使用します。FITC-conjugated anti-BrdU antibodyは暗所、4℃で保存してください。

Cytofix/Cytoperm Buffer(医薬用外劇物): Cytofix/Cytoperm Bufferには細胞内染色のためのシングルステップの調整済み固定/細胞膜浸透化試薬が含まれています。バッファーには固定液であるパラホルムアルデヒドと界面活性剤であるサポニンの混合物が含まれています。この試薬は細胞の形態を保ちつつ、細胞蛋白を固定し、細胞膜浸透化をし、続いて、細胞内蛋白を免疫蛍光染色するための試薬です。25 mlのCytofix/Cytoperm Bufferはそのまま使用可能な形で供給されています。Cytofix/ Cytoperm Bufferは4℃で保存してください。

Perm/Wash Buffer: 各25 mlボトルにはPerm/Wash Bufferの濃縮保存液(10×)が入っています。Perm/Wash Buffer混合液には、胎児ウシ血清と可逆的細胞膜浸透化界面活性剤であるサポニンが含まれています。濃縮保存バッファーは脱イオン水で1:10に希釈し使用してください。残った1×Perm/Wash Bufferは4℃で保存してください。キットの2本の10×Perm/Wash Bufferボトルは4℃で保存してください。

留意： 10×Perm/Wash Bufferには沈殿物が存在することがあります。この沈殿物はバッファーの性能には影響しません。取り除きたい場合には、使用前に1×Perm/Wash Bufferを0.45 μmのポアサイズのフィルターで濾過し、沈殿を取り除いてください。

留意： Perm/Wash Buffer(1×)は固定した細胞サンプルにのみ使用してください。このバッファーを未固定の細胞に使用すると、細胞が損傷することがあります。

Cytoperm Plus Buffer: Cytoperm Plus BufferはBrdU Flow Kit用に特別に調合されたバッファーで、染色増強剤と第2膜浸透化試薬として使用します(100 μ L/sample)。Cytoperm Plus Buffer 10 mLボトルは4 で供給されます。4 で保存してください。

留意: Cytoperm Plus Bufferは固定細胞にのみ使用してください。このバッファーを未固定細胞に使用すると、細胞が損傷することがあります。

BrdU: 各バイアルには1 \times DPBSで希釈された10 mg/mLのBrdU液が0.5 mL入っています。BrdU液は0.22 μ mのポアサイズでフィルター滅菌されており、防腐剤は入っていないため、無菌状態で取り扱ってください。この保存溶液は腹腔内注射でき、また1 mMに希釈し*in vitro*ラベリングもできます。腹腔内注射による*in vivo*ラベリングはマニュアルの8ページの*in vivo*ラベリングのセクションに従ってください。*in vitro*で細胞をラベリングするには保存溶液(10 mg/mL BrdU溶液)31 μ Lを1 mLの1 \times DPBSか培養メディウムに加えて希釈し(32倍希釈)1 mM溶液を作成します。この1 mM溶液10 μ Lを培養メディウム各1 mLに加え、最終濃度を10 μ Mとします。BrdUの分子量は307.1です。BrdU液は不安定であり、融解すると失活するので、再凍結しないでください。BrdU液は5本入っており、ドライアイスパッケージで供給されます。-80 で保存してください。

DNase: 各バイアルには300 μ LのDNase 1 mg/mL(1 \times DPBS液)が含まれます。10以上のサンプルを染色する場合には、DNase液のバイアルを1本溶解し、700 μ Lの1 \times DPBSを加えて300 μ g/mLのWorking Stock Solutionを作ります。

留意: DNase処理するサンプルが10未満の場合、サンプル当たり30 μ LのDNase液(1 mg/mL)を採取し、残りの1 mg/mLのDNaseは-80 で保存してください。

DNase液(1 mg DNase/mL)は1回だけ再凍結できるが、再凍結を繰り返すと失活します:

各細胞サンプルの処理のためには、100 μ LのWorking Stock Solution(DNase 30 μ g/10⁶ cells)を使い、37 で反応を行います。DNaseは5 バイアル入っており、-80 で保存します。

7-AAD: 7-amino-actinomycin D(7-AAD)はフローサイトメトリー分析でのDNA染色に用いる蛍光色素です。サンプル(10^6 cells/sample)を染色するためには20 μ Lの7-AADを使用します。7-AADは1バイアル入りであり、暗所4 で保存してください。

キットに含まれていない必要な試薬

Staining Buffer: 1 \times DPBS+ 3%胎児ウシ血清(加熱不活化)+ 0.09%(w/v)アジ化ナトリウム

留意: このアプリケーションにはBD Pharmingen Stain Buffer(FBS)(Cat. No. 554656)が適当です。

1 \times DPBS緩衝液(1)の組成:

KCl	0.2g
K ₂ HPO ₄	0.2g
NaCl	8.0g
Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	2.16g
pH7.2-7.4	

Section 3

BrdUラベリング、およびBrdU Flow Kit染色プロトコール

A. BrdUによる細胞のラベリング

BrdUによる培養細胞および細胞株の*in vitro*ラベリング

*in vitro*における細胞のBrdU ラベリングについては多くのプロトコールが報告されています。¹²⁻¹⁵ 細胞培養メディウム中にBrdU最終濃度10 μ Mになるようにし(10 μ Lの1 mM BrdU/1 mL細胞培養メディウム) 細胞をインキュベーションすると広範囲のヒトおよびマウス細胞株、並びに正常細胞集団を効果的にラベリングできます。^{15, 16} BrdUへの細胞の曝露時間を伸ばすと、活発に細胞周期を回転させている細胞の集団を同定することが可能になります。様々な時点で簡単にBrdUに細胞を暴露するパルス ラベリングにより、細胞周期の変化を決定することができます。

細胞を*in vitro*でラベリングするには、注意深くBrdU液10 μ L(1 mM BrdUの1 \times DPBS溶液)を直接細胞培養メディア1 mLに加えます。このステップでは遠心分離または温度変化などによって、細胞の正常な細胞周期パターンを壊さないことが重要です。細胞培養密度は 2×10^6 Cells/mLを越えない様にしてください。続いて、処理した細胞を必要な時間インキュベーションします。パルス ラベリングの実験では、パルスを入れる時期と長さは試験対象となる細胞の細胞周期の開始と進行の速度に合わせて決めます。例えば、活発に増殖している細胞株(例えばCTLL-2細胞)をパルス ラベリングする場合に効果的なパルス時間は30~45分間(即ち、細胞が対数増殖期にある時)です。研究者は、その実験システムにおいて各細胞株または細胞集団に最適なパルス時期、およびパルス ラベリング期間を決める必要があります。BrdUでラベリングされていない同じ細胞集団が、BrdUラベル細胞の陰性細胞染色コントロールとなります。このコントロールを利用することで、抗BrdUモノクローナル抗体のバックグラウンド染色レベルを知ることができます。

BrdUによるマウス細胞の*in vivo*ラベリング

細胞の*in vivo*でのBrdUラベリングに使用される一般的な方法としては、BrdU含有液をマウスの腹腔内に注射する方法(i.p.)とマウスの飲料水にBrdUを加え摂取させる方法の2つがあります。
16-22

方法#1: 腹腔内経路によるBrdU注射法 BrdU 10 mg/mL滅菌DPBS溶液が*in vivo*用に供給されています。マウスにBrdU液100 μ L(1 mg)を腹腔内注射します。^{17, 19, 21} BrdUの取り込みは、注射後1時間以内に胸腺および骨髄に容易に認めることができます。

方法#2: 飲料水によるBrdUの摂取 BrdUを0.8 mg/mLになるように飲料水中に希釈します。BrdU混合液は新鮮な物を作製し、毎日交換してください。^{18, 23} BrdUの長期摂取は動物に対して有毒な作用を及ぼします。複数の研究者らが連続14日のBrdU摂取には致死作用があると報告しています。長期間の研究には、BrdUを9日連続摂取させた後に正常水に交換すると効果的であると報告されています。¹⁸ これら動物由来の細胞により取り込まれたBrdUは、その後およそ70日間検出されます。¹⁸

B. BrdU Flow Kit染色プロトコール

1. 細胞表面抗原の免疫蛍光染色
 - a. BrdUパルス処理した細胞(10^6 cells/50 μ L Staining Buffer)を6 mLラウンドチューブ(FALCON cat# 345002等)に加ええます。
 - b. 各チューブにStaining Buffer(BD Pharmingen Stain Buffer等)で希釈した細胞表面マーカー特異的な蛍光標識抗体50 μ Lを加え、良く混和します。
 - c. 細胞を抗体と15分間、氷上でインキュベーションします。
 - d. チューブ当たり1 mLのStaining Bufferを加え細胞を1回洗浄し、200-300 \times gで遠心(5分間)し、上清を除去します。

2. Cytotfix/Cytoperm Buffer (Cat. No. 2090KE) による細胞の固定と細胞膜浸透化
 - a. 各チューブに100 μ LのCytotfix/Cytoperm Bufferを加え細胞を再浮遊します。
 - b. 細胞を15 ~ 30分間室温、または氷上で反応させます。
 - c. 1 mLのPerm/Wash Bufferで細胞を1回洗浄します(ステップ1dと同様)

3. 細胞にCytoperm Plus Buffer (Cat. No. 2356KC)を加え、インキュベーションする。
 - a. 各チューブに100 μ LのCytoperm Plus Bufferを加え細胞を再浮遊します。
 - b. 細胞を10分間、氷上で反応させます。
 - c. 1 mLのPerm/Wash Bufferで細胞を1回洗浄します(ステップ1d同様)

4. 細胞の再固定
 - a. 各チューブに100 μ LのCytotfix/Cytoperm Bufferを加え細胞を再浮遊します。
 - b. 細胞を5分間室温、または氷上で反応させます。
 - c. 1 mLのPerm/Wash Bufferで細胞を1回洗浄します(ステップ1d同様)

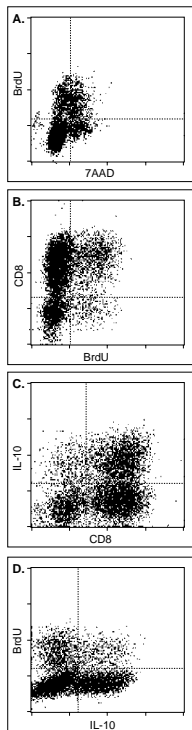
5. DNase(Cat. No. 2358KC)で細胞を処理し、取り込まれたBrdUを露出させる。^{24, 25}
- 各チューブに100 μ Lの希釈したDNase溶液(300 μ g/mL DPBS溶液)を加え細胞を再浮遊します(30 μ g DNase/tube)
 - 細胞を1時間、37 $^{\circ}$ Cでインキュベーションします。
 - 1 mLのPerm/Wash Bufferで細胞を1回洗浄します(ステップ1dと同様)
6. BrdUと細胞内抗原の蛍光抗体染色
- 希釈した蛍光標識抗BrdU抗体と細胞内抗原特異抗体を含むPerm/Wash Buffer 50 μ Lで細胞を再浮遊します。
 - 細胞を20分間、室温でインキュベーションします。
 - 1 mLのPerm/Wash Bufferで細胞を1回洗浄します(ステップ1dと同様)
7. オプション - 細胞周期解析のためのDNA染色
- 留意： DNAレベルの染色が不要な場合には、ステップ8に進んでください。
- 細胞を7-AAD液20 μ Lで再浮遊します。
8. フローサイトメトリー分析のための細胞の再浮遊
- 各チューブに1 mLのStaining Bufferを加え、細胞を希釈/再浮遊します。
 - フローサイトメトリーで染色した細胞を分析し(細胞流速は400 cells/秒を越えないようにする) マルチパラメータデータファイルを取り込みます。
- 留意： サンプルはフローサイトメトリーで分析するまで、4 $^{\circ}$ C、遮光で一晩保存することができます。

Section 4

染色した細胞サンプルのフローサイトメトリー分析

以下の例に示すフローサイトメトリーデータは、488 nmアルゴンレーザーを装備したフローサイトメトリーを使用して得られたものです。このレーザーは、蛍光色素である fluorescein isothiocyanate (FITC (FL1で測定))、phycoerythrin (FL2) および7-AAD (FL3) を励起し、同時に光が照射された細胞からは前方散乱光 (FSC) と側方散乱光 (SSC) シグナルが発生します。アルゴンレーザーの対象域外の光波長により励起される他の蛍光色素、例えばallophycocyanin (APC) を利用する場合には、追加のレーザー光源を持つBD FACSCalibur™ の様なフローサイトメーターが必要です。マルチカラー染色に使用するために様々な蛍光色素を追加する場合、発光された蛍光シグナルを検出する際に、シグナルの光のオーバーラップを、適切に蛍光コンペーションすることが重要です。DNA含有量マーカである7-AADからの蛍光シグナルは通常リニアシグナル増幅モードにて取り込まれるのに対し、その他の励起蛍光色素により発せられる蛍光シグナルは多くの場合Logモードで取り込まれます。

BD Pharmingen BrdU Flow Kitプロトコールを利用したサンプルデータ



パネルA: 7-AAD vs FITC anti-BrdU

このプロットからBrdUを取り込んだ細胞の割合または細胞周期のS (DNA合成)期にある細胞の割合を求めることができる。このフローサイトメーターのデータにQuadrant Markerを加えると、細胞の27%が活発に取り込みを行っていることがわかった。

パネルB: APC anti-CD8 vs FITC anti-BrdU

データよりBrdUを取り込んだCD8⁺細胞の割合は24%であることがわかった。

パネルC: APC anti-CD8 vs PE anti-IL-10

データよりIL-10産生CD8⁺細胞の割合を計算した結果、CD8⁺細胞の34%がIL-10を産生することがわかった。

パネルD: PE anti-IL-10 vs FITC anti-BrdU

データより、BrdUを取り込んだIL-10産生細胞の割合は38%であった。

図1. DNA合成とIL-10を産生する刺激をしたマウス細胞のマルチカラーフローサイトメトリー分析

BALB/cマウスの脾臓細胞を*in vitro*でプライムし、蛋白輸送阻害剤存在下(細胞内サイトカインの蓄積を促進するために)でPMAおよびイオノマイシンにて再刺激した。培養の最後45分間に細胞を10 μ MのBrdUにてラベリングした。続いて細胞を回収し、FITC anti-BrdU(FL1)、PE anti-IL-10(FL2)、7-AAD(FL3)およびAPC anti-CD-8(FL4)で染色した。パネルはこれら細胞をフローサイトメーターで測定したデータの2カラー染色パターンを示す。このマルチパラメータ染色法を使用すると染色された特定の細胞集団について非常に多くの情報を得ることができる。

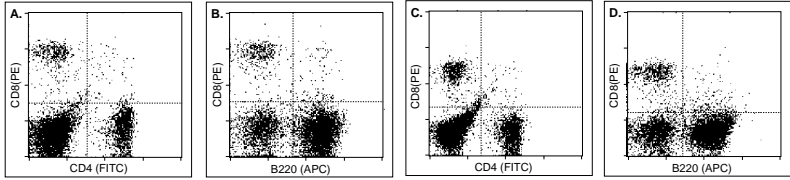


図2. BrdU Flow Kitを用いた細胞表面抗原発現の分析

通常の細胞表面抗原染色法との比較。マウス脾臓細胞を(FITC anti-CD-4、PE anti-CD-8およびAPC anti-B220)で染色し、Cyofix/Cytoperm Bufferで固定した(パネルAおよびB) 同様のサンプルをBD Pharmingen BrdU染色プロトコルに従い処理した(パネルCおよびD) これらの細胞をフローサイトメトリーで測定したデータより作製した2カラー染色パターンをパネルAとC:CD4(FITC) vs CD8(PE)に、またパネルBとD: B220(APC) vs CD8(PE)に示す。CD4、CD8またはB220を発現する細胞の割合、並びにそれぞれの平均蛍光強度(MFI)を表2にまとめた。

表2. BrdUと通常の染色プロトコルの比較

	% Positive		MFI	
	Conventional Protocol	BrdU Protocol	Conventional Protocol	BrdU Protocol
CD4+(FITC)	20.5	21.5	278	141
CD8+(PE)	8.4	9.0	649	195
B220+(APC)	62.9	60.1	261	189

表2. 図2のまとめ

細胞表面抗原発現の検出に関するBrdU染色プロトコルと通常の染色プロトコルの比較。BrdU染色プロトコルを用いて染色した場合、何れのマーカーについてもシグナル強度の減少が認められたが、染色された細胞集団を区別する能力に差は認められなかった(表2)。BrdU染色プロトコルを用い染色されたサンプルに見られるシグナル強度の減少は、これらマーカーについて、染色細胞の割合に不利な影響が及ぶことはなかったが、発現レベルが低い表面抗原を検出する場合にはBrdU染色法の影響が出る可能性がある。

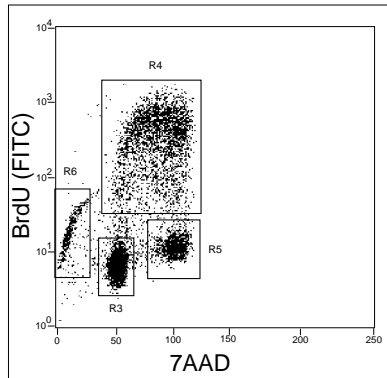


図3. BrdU取り込みと全DNAレベルを染色した細胞集団の定量的細胞周期分析のためのゲート設定

D10.G4.1細胞中のBrdU取り込み細胞(FITC anti-BrdUによる)と全DNA含有量(7-AADによる)の測定。細胞培養最後の30分間、D10.G4.1細胞を10 μ M BrdUと共に培養した。細胞の細胞周期上の位置とDNA合成活性は、得られた全DNAレベルと取り込まれたBrdUレベルを解析することで決めることができる。7-AAD vs BrdUのドットプロットに当てはめられた領域ゲートに示される様に、BrdU Flow Kitで供給された試薬を用い染色した細胞をフローサイトメトリー分析することで、アポトーシス細胞のサブセット(Sub-G0/G1、R6として規定され、細胞の5.6%)を区別し、または細胞周期のG0/G1(R3、38.6%)、S(R4、38.6%)またはG2+M(R5、14.4%)期にある細胞やDNAを合成したばかりの細胞を区別することができる。^{5, 6} 7-AADシグナルデータはx軸のようになりニアモードで取り込む。

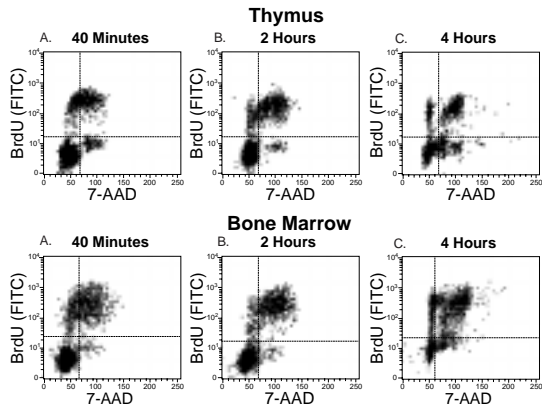


図4. マウスにおける*in vivo* BrdU パルシングのタイムコース

C57BL/6マウスにBrdU 1 mgを各時間間隔で腹腔内注射した。マウスは40分、2時間、4時間後に処置した。胸腺と骨髄を取り出し、BrdUと7AADで染色した。パネルAはマウス胸腺と骨髄のBrdUパルス後40分のデータである。特徴的なBrdU/7AADの"蹄鉄"のような蛍光染色プロフィールである。パネルBはマウスをパルスして2時間後の骨髄と胸腺の染色パターンである。これも特徴的な"蹄鉄"のパターンである。加えて言えば、BrdUを取り込み、G0/G1ではない細胞(7AAD含有量の少ないBrdU positive細胞)が明白である。パネルCはマウスをパルスして4時間後の骨髄と胸腺の染色パターンである。このプロフィールではG0/G1期にBrdU positive細胞の集団が見られる。特徴的なBrdU/7AADの"蹄鉄"のパターンではない。

Section 5

フローサイトメーターセットアップのガイドライン

サイトメーターセットアップのフローチャート

散乱光プロフィールとPMT設定

FL2-%FL1 コンペンセーション

FL2-%FL3 コンペンセーション

FL3-%FL2 コンペンセーション

強度の高い蛍光色素について更にFL2-%FL3 コンペンセーションを行う

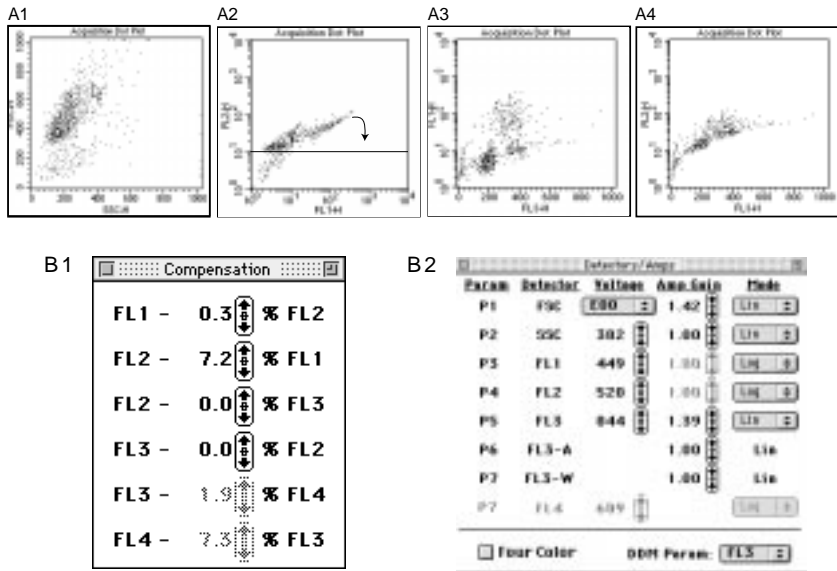


図5. BrdU Flow Kitを用いた解析の最初の機器設定

マウスT細胞を*in vitro*でプライムし、蛋白輸送阻害剤存在下でPMAとイオノマイシンで再活性化した。細胞を、刺激の最後の45分間BrdUでパルスラベリングした。BrdU Flow Kitプロトコールに従い、細胞を回収し、固定し、膜浸透化処理してから再度固定し、DNaseで処理した。サンプルをFITC anti-BrdU(FL1)および7-ADD(FL3)そしてPE 免疫グロブリン(Ig)アイソタイプコントロール(FL2)、PE anti-IL-10あるいはPE anti-TNF- α のいずれかで染色した。サンプルをパネル5.A1~A4の様にフローサイトメトリーで分析した。

最初のフローサイトメトリーPMT voltage と蛍光コンペーンションの設定は、BD FACSCompピースとソフトウェアを用い、Lyse/Washモードで行った(パネル5.B1~B2)。BD CellQuestフローサイトメトリー分析用ソフトウェアを用い、ドットプロットを作製し、パネル5.A1~A4に示す様にデータ取り込みを行った。PMT voltageはマウスリンパ細胞について典型的なFSC vs SSC散乱光プロット(パネル5.A1)が得られる様に設定した(パネル5.B2)。FL3検出器は、7-AADを用いたDNA含有量が染色された細胞のデータを取り込めるようにリニアモードに設定した(パネル5.B2)。7-AADシグナル(FL3)の強度は、パネル5.A3に見られる様にFL3PMT voltageをG0/G1集団(図3参照)の平均蛍光強度(MFI)が50(解像度256)または200(解像度1024)になるように調整した。免疫蛍光染色した細胞の蛍光色素の発光の取り込みのために、FL1とFL2検出器はLogモードに設定した。ベースラインのPMT voltageは、未染色の細胞集団(自家蛍光)の平均蛍光強度が蛍光強度スケールの約1桁(10¹程度)内に納まるように調整した。

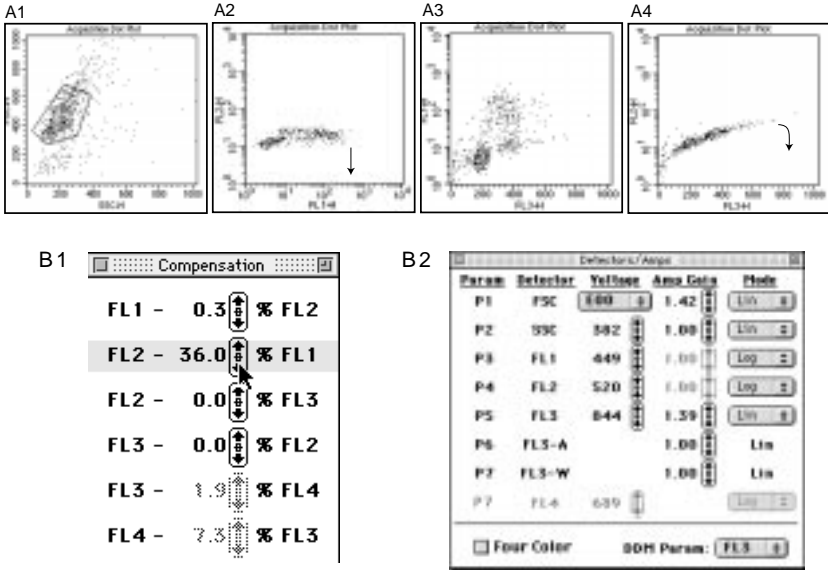


図6. FITC (FL1) 発光コンペーンション

この図では、リージョンはまずその散乱光特性に基づき解析対象となる細胞集団周囲に設定され(パネル6.A1)そして他の分析プロットにはこのリージョンがゲートとして使われている(パネル6.A2~A4)。この図はさらに、図5の状態からFL2 - %FL1コンペーンションを調整してFITC anti-BrdU⁺細胞(FL1)によるスペクトルのオーバーラップを補正した結果を示している。²⁶ FL2 - %FL1コンペーンションの増加は各細胞の平均FL2蛍光強度を同じにするため、パネル6.A2に示すように細胞集団全体がx軸に対し平行になる。

留意: このサンプルは、PE Igアイソタイプコントロールによる染色のためFL2 蛍光強度は低い。

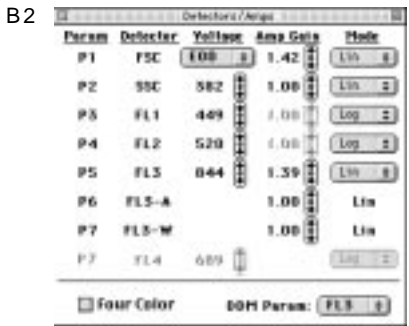
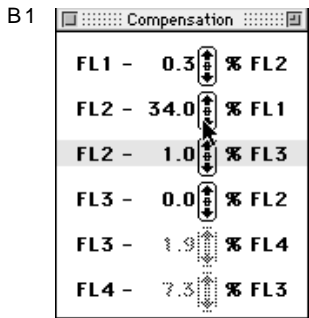
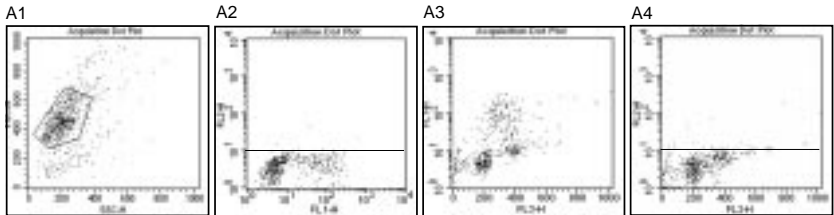


図7. 7-AAD(FL3)蛍光のコンペンセーション

この図は図5の状態からFL2 - %FL3コンペンセーションを調整し、7-AAD陽性細胞(FL3)によるスペクトルのオーバーラップを補正した結果を示している。この調整により、パネル7.A4に示すように細胞集団のFL2蛍光強度は1桁 MFI 10 台に納まった。FL2 - %FL3コンペンセーションの設定は非常に微妙であり、少しずつ調整した方がよい。

留意: このサンプルは、PE Igアイソタイプコントロールによる染色のためFL2蛍光強度は低い。

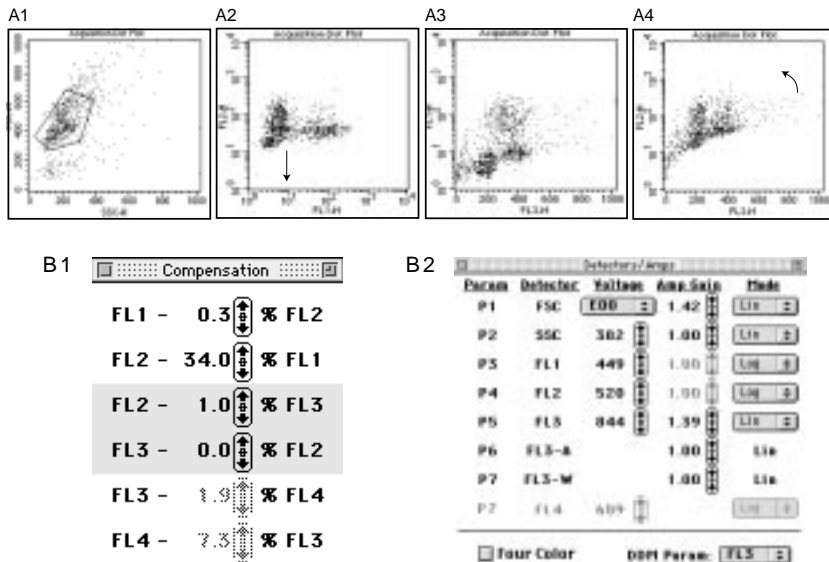


図8. PE (FL2) 蛍光のコンペンセーションが不十分な場合の影響

この図は、PE anti-IL-10、FITC anti-BrdUおよび7-AAD(細胞は図5記載の様に染色)による免疫蛍光染色を示す。PE Igアイソタイプコントロールを使って設定した PMT voltageとコンペンセーション設定は、PE anti-IL-10で染色されたサイトカイン産生細胞を補正するには不適當であることが判明した(パネル8.A1 ~ A4)。

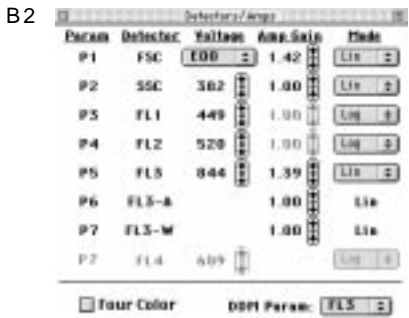
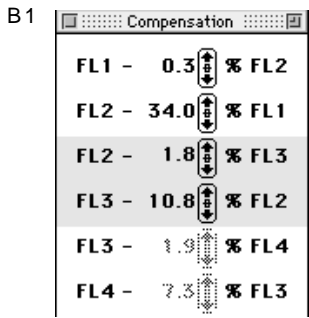
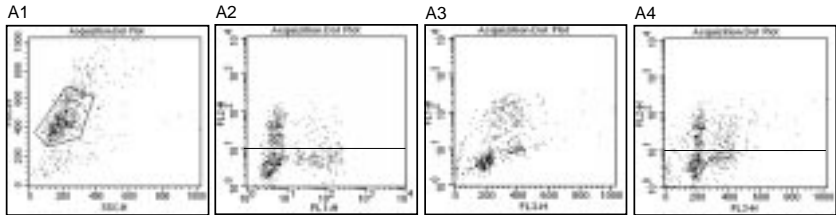


図9. PE(FL2)蛍光のコンペンセーションの補正

この図は、FL2 - %FL3コンペンセーションおよびFL3 - %FL2コンペンセーションした後のPE anti-IL-10で染色された図8の細胞を示している。FL2 - %FL3コンペンセーションの数値の増加は7-AAD(FL3)によるスペクトルのオーバーラップを補正し、その結果細胞集団全体の平均FL2蛍光強度は減少する。この調整により、IL-10⁺細胞集団のFL2強度は約1桁台(MFI 10)に納まるようになる。図8.A4に見られるように、PE anti-IL-10(FL2)によるスペクトルのオーバーラップを補正するために、FL3 - %FL2コンペンセーションの数値も同時に上げた(図8.B1とパネル9.B1参照)

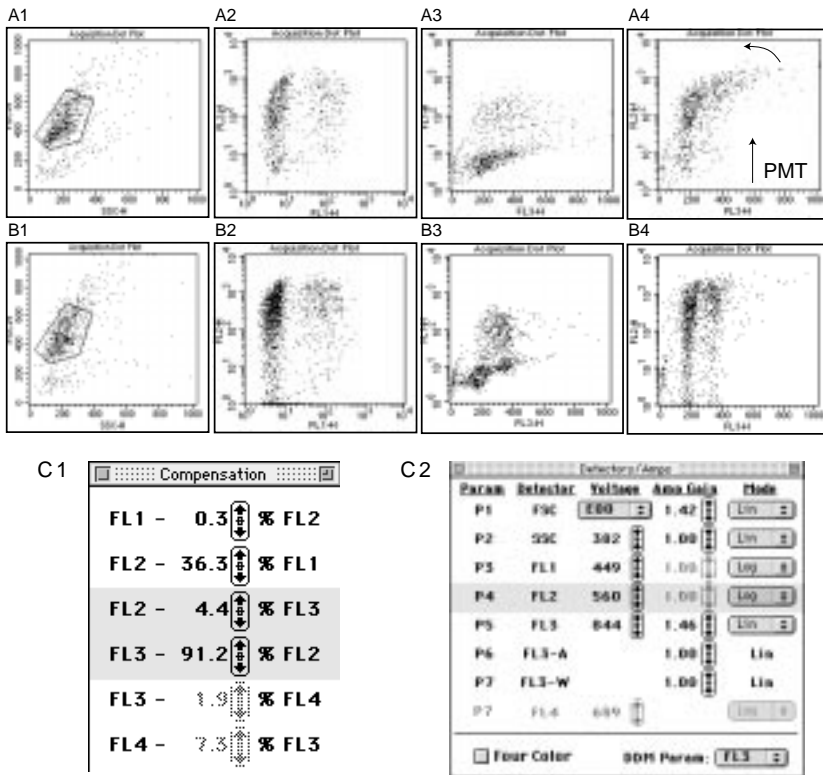


図10. PE (FL2) 蛍光強度の違いによるコンペンスーションの必要性

この図は、図5記載の細胞と同じでFITC anti-BrdUと7-AADに加え、PE anti-TNF- α により染色したものを示す。パネル10.A2 ~ A4は、PE anti-IL-10で染色したサンプル(図9参照)による設定により分析したPE anti-TNF- α 抗体の染色像を示す。TNF- α ⁺集団のFL2シグナルの強度は、PE anti-IL-10で染色された集団のシグナル強度よりもはるかに強い(パネル図9.A2とパネル10.A2) これらのデータは、サンプルを染色する蛍光色素標識抗体が異なる場合、蛍光強度に差があるためにコンペンスーションを調整する必要があることを示している。

PE (FL2) シグナル強度が増加するとTNF- α ⁺細胞のスペクトルオーバーラップが強められるため、細胞集団の染色プロファイルの特性が失われる(パネル10.A2 ~ A4) このサンプルのPE (FL2) 発光はLogモードで取り込まれ、7-AAD (FL3) 発光はリニアモードで集められることから、TNF- α ⁺細胞に関連したスペクトルのオーバーラップの増加はコンペンスーションの調整だけで取り除くことはできない。このサンプルに関連

したスペクトルのオーバーラップの補正には2種類の調整が必要である。まず第1はFL2 PMT voltageの値を上げて、FL2スペクトル オーバーラップを効果的に補正する。続いて図7～9記載の様にFL3 - %FL2とFL2 - %FL3についても再調整を行った。パネル10.B2～B4は、インストール セットアップを修正して得られたデータを示している。

留意： FL2 PMT voltageを変更した後はFL2 - %FL1およびFL1 - %FL2コンペーションを更に微調整する必要があります。

留意： 装置のセットアップと補正值の調整は複雑な作業です。図5～10の情報はBrdU染色法を利用し染色されたサンプルに必要な装置のセットアップの例を示すものです。必要とされる装置の調節は装置間で異なり、また実験に使用するサンプルによっても異なると考えられ、また異なる蛍光標識抗体の組み合わせについては更に別の調整が必要になることもあります。さらに詳しい情報が必要な場合には、フローサイトメトリーまたはフローサイトメトリーを利用した細胞周期分析に関するテキストブックを参照してください。^{26, 27}

留意： 本手順図9まではFACScomp Lyse/Washモード設定から開始し、蛍光PMT Voltageを変更していません。この場合、記載されたコンペーション設定のみで調整を行うことも可能です。しかし、蛍光PMT Voltageを変更した場合、関連するすべてのコンペーション設定を確認する必要があります。

Section 6

染色と分析のヒント

1. 蛍光色素の選択：

BD Pharmingen BrdU Flow Kit染色法は、多くのBrdU染色法および細胞内染色プロトコールに比べマルチカラー免疫蛍光染色に適していますが、細胞表面抗原の蛍光染色パターンは蛍光シグナル強度の違いにより影響を受けることがあります。このシステムではPE標識抗体で標識された細胞から発せられる蛍光シグナルは最も強く影響を受けますが、APC標識抗体により発せられる蛍光シグナルはあまり影響を受けません。この影響を避ける、あるいは最小化するためには、発現レベルが低い染色マーカーの場合には、最も高い輝度のシグナルを発する蛍光色素が結合した蛍光抗体を使用する必要があります。

2. 抗体クローンまたは試薬の選択:

BD Pharmingen BrdU Flow Kitの染色手順では、固定剤としてパラホルムアルデヒドを使っています。パラホルムアルデヒドを固定に使用すると抗原上のエピトープが変化し、固定後一部の抗体による認識が阻害されることがあります。この方法を用いて蛋白を染色する場合に使用する抗体試薬は、パラホルムアルデヒド固定されたエピトープに結合できることが重要です。その他の固定剤(例えばエタノール)と共に使用可能な試薬がBD Pharmingen BrdU Flow Kit染色法で使用できないこともあります。付録にはBrdU Flow Kit染色法に適用できる各種細胞内抗原に特異的な試薬のリストがあります。

3. FACSCalibur装置を用いたダブレット除去と4カラー分析:

FACSCalibur™ フローサイトメーターは、4パラメータ(FL1、FL2、FL3、FL4)を利用して4種類の蛍光色素(蛍光抗体や核酸色素)を励起し、発せられる蛍光を測定する4カラー分析が可能です。蛍光強度のデータをHeightとともにArea、Widthからも得ることでダブレット除去が可能になります。4つのパラメータ全てを核染色または蛍光抗体染色の検出に使用した場合は、ダブレット除去機能を利用できません。

Section 7

付録

細胞内サイトカインフローサイトメトリー関連試薬

蛍光色素標識抗サイトカイン/ケモカイン抗体

留意： 細胞内サイトカインフローサイトメトリーへの利用に便利な、100テストサイズのPE-標識抗ヒトサイトカインおよびケモカイン抗体が新たに発売されました。固定、膜浸透化処理細胞の免疫蛍光染色に最適に力価調整されています(20 µL/test)。この新しいフォーマットは安定した染色結果を保証し、アッセイ開発時間の短縮に役立つでしょう。

Specificity	Clone	Isotype	New Cat. No.	Old Cat. No.	Format	Size
Human Cytokines and Chemokines						
IL-1 α	364-3B3-14	Mouse IgG1	554560	18934A	FITC	0.1 mg
			554561	18935A	PE	0.1 mg
IL-2	MQ1-17H12	Rat IgG2a	554565	18954A	FITC	0.1 mg
			554566	18955A	PE	0.1 mg
			559334	18955X	PE	100 Tests
			554567	18959A	APC	0.1 mg
IL-3	BVD3-1F9	Rat IgG1	554676	20575A	PE	0.1 mg
IL-4	MP4-25D2	Rat IgG1	554484	18504A	FITC	0.1 mg
			554485	18505A	PE	0.1 mg
			554486	18509A	APC	0.1 mg
IL-4	8D4-8	Mouse IgG1	554516	18655A	PE	0.1 mg
			559333	18655X	PE	100 Tests
IL-5	TRFK5	Rat IgG1	554395	18055A	PE	0.1 mg
			559335	18055X	PE	100 Tests
			554396	18059A	APC	0.1 mg
IL-5	JES1-39D10	Rat IgG2a	554489	18515A	PE	0.1 mg
			559332	18515X	PE	100 Tests
IL-6	MQ2-13A5	Rat IgG1	554544	18874A	FITC	0.1 mg
			554545	18875A	PE	0.1 mg
IL-6	MQ2-6A3	Rat IgG2a	554696	20654A	FITC	0.1 mg
			554697	20655A	PE	0.1 mg
			559331	20655X	PE	100 Tests

Specificity	Clone	Isotype	New Cat. No.	Old Cat. No.	Format	Size
Human Cytokines and Chemokines (Continued)						
IL-8	G265-8	Mouse IgG2b	554719	20794A	FITC	0.1 mg
			554720	20795A	PE	0.1 mg
			559336	20795X	PE	100 Tests
IL-10	JES3-9D7	Rat IgG1	554498	18555A	PE	0.1 mg
			559337	18555X	PE	100 Tests
IL-10	JES3-19F1	Rat IgG2a	554706	20705A	PE	0.1 mg
			559330	20705X	PE	100 Tests
			554707	20709A	APC	0.1 mg
IL-12 (p40/p70)	C11.5.14	Mouse IgG1	554574	18994A	FITC	0.1 mg
			554575	18995A	PE	0.1 mg
			559329	18995X	PE	100 Tests
			554576	18999A	APC	0.1 mg
IL-12 (p70)	20C2	Rat IgG1	557020	23275A	PE	0.1 mg
			559325	23275X	PE	100 Tests
IL-13	JES10-5A2	Rat IgG1	554571	18965A	PE	0.1 mg
			559328	18965X	PE	100 Tests
IL-16	14.1	Mouse IgG2a	554736	20985A	PE	0.1 mg
GM-CSF	BVD2-21C11	Rat IgG2a	554506	18594A	FITC	0.1 mg
			554507	18595A	PE	0.1 mg
GRO	10G4	Mouse IgG1	555042	23125A	PE	0.1 mg
IFN- γ	B27	Mouse IgG1	554700	20664A	FITC	0.1 mg
			554701	20665A	PE	0.1 mg
			559327	20665X	PE	100 Tests
			554702	20669A	APC	0.1 mg
IFN- γ	4S.B3	Mouse IgG1	554551	18904A	FITC	0.1 mg
			554552	18905A	PE	0.1 mg
			559326	18905X	PE	100 Tests
IP-10	6D4/D6/G2	Mouse IgG2a	555049	23175A	PE	0.1 mg
MCP-1	5D3-F7	Mouse IgG1	554665	20524A	FITC	0.1 mg
			554666	20525A	PE	0.1 mg
			559324	20525X	PE	100 Tests
MCP-3	9H11	Mouse IgG1	555033	23025A	PE	0.1 mg
MIG	B8-11	Mouse IgG1	555039	23105A	PE	0.1 mg

Specificity	Clone	Isotype	New Cat. No.	Old Cat. No.	Format	Size
Human Cytokines and Chemokines (Continued)						
MIP-1 α	11A3	Mouse IgG2a	554729	20954A	FITC	0.1 mg
			554730	20955A	PE	0.1 mg
			559323	20955X	PE	100 Tests
RANTES	2D5	Mouse IgG1	554732	20975A	PE	0.1 mg
			559322	20975X	PE	100 Tests
Thioredoxin	2G11/TRX	Mouse IgG1	559968	23714A	FITC	0.1 mg
TNF- α	MAb11	Mouse IgG1	554512	18644A	FITC	0.1 mg
			554513	18645A	PE	0.1 mg
			559321	18645X	PE	100 Tests
			554514	18649A	APC	0.1 mg
TNF- β	359-81-11	Mouse IgG1	554556	18915A	PE	0.1 mg

Specificity	Clone	Isotype	New Cat. No.	Old Cat. No.	Format	Size
Mouse Cytokines and Chemokines						
IL-1 α	ALF-161	Hamster IgG	559810	23405A	PE	0.1 mg
IL-2	JES6-5H4	Rat IgG2b	554427	18174A	FITC	0.1 mg
			554428	18175A	PE	0.1 mg
			554429	18179A	APC	0.1 mg
IL-2	S4B6	Rat IgG2a	554377	18004A	FITC	0.1 mg
			554378	18005A	PE	0.1 mg
IL-3	MP2-8F8	Rat IgG1	554383	18015A	PE	0.1 mg
IL-4	BVD4-1D11	Rat IgG2b	554388	18034A	FITC	0.1 mg
			554389	18035A	PE	0.1 mg
IL-4	11B11	Rat IgG1	554435	18195A	PE	0.1 mg
			554436	18199A	APC	0.1 mg
IL-5	TRFK5	Rat IgG1	554395	18055A	PE	0.1 mg
			554396	18059A	APC	0.1 mg
IL-6	MP5-20F3	Rat IgG1	554401	18075A	PE	0.1 mg
IL-10	JES5-16E3	Rat IgG2b	554466	18434A	FITC	0.1 mg
			554467	18435A	PE	0.1 mg
			554468	18439A	APC	0.1 mg
IL-12 (p40/p70)	C15.6	Rat IgG1	554479	18495A	PE	0.1 mg
			554480	18499A	APC	0.1 mg

Specificity	Clone	Isotype	New Cat. No.	Old Cat. No.	Format	Size
Mouse Cytokines and Chemokines (Continued)						
IL-17	TC11-18H10	Rat IgG1	559502	23295A	PE	0.1 mg
GM-CSF	MP1-22E9	Rat IgG2a	554405	18094A	FITC	0.1 mg
			554406	18095A	PE	0.1 mg
IFN- γ	XMG1.2	Rat IgG1	554411	18114A	FITC	0.1 mg
			554412	18115A	PE	0.1 mg
			554413	18119A	APC	0.1 mg
MCP-1	2H5	Hamster IgG	554443	18245A	PE	0.1 mg
TNF- α	MP6-XT22	Rat IgG1	554418	18134A	FITC	0.1 mg
			554419	18135A	PE	0.1 mg
			554420	18139A	APC	0.1 mg
TNF- α	TN3-19.12	Hamster IgG	559503	23355A	PE	0.1 mg

Specificity	Clone	Isotype	New Cat. No.	Old Cat. No.	Format	Size
Rat Cytokines and Chemokines						
IL-4	OX-81	Mouse IgG1		24055A	PE	0.1 mg
IL-10	A5-4	Mouse IgG2b	555088	24095A	PE	0.1 mg
IFN- γ	DB-1	Mouse IgG1	559498	20444X	FITC	100 Tests
			559499	20445X	PE	100 Tests
GM-CSF	B61-5	Mouse IgG1	555092	24135A	PE	0.1 mg
MCP-1	2H5	Hamster IgG	554443	18245A	PE	0.1 mg
TNF- α	TN3-19.12	Hamster IgG	559503	23355A	PE	0.1 mg

Pig Cytokines and Chemokines

IFN- γ	P2G10	Mouse IgG1	559812	20455A	PE	0.1 mg
---------------	-------	------------	--------	--------	----	--------

Recombinant proteins useful as specificity controls for intracellular cytokine flow cytometry

Specificity	New Cat. No.	Old Cat. No.	Format	Size
Human				
IL-1 α	554601	19601V	Standard	5 μ g
IL-2	554603	19621T	Standard	10 μ g
IL-3	554604	19631T	Standard	10 μ g
IL-4	554605	19641V	Standard	5 μ g
IL-5	554606	19651V	Standard	5 μ g
IL-6	554607	19661T	Standard	10 μ g
IL-8	554609	19681P	Standard	20 μ g

Specificity	New Cat. No.	Old Cat. No.	Format	Size
Human (Continued)				
IL-10	554611	19701V	Standard	5 µg
IL-13	554614	19731V	Standard	5 µg
IL-16	554637	19991V	Standard	5 µg
GM-CSF	550068	19741T	Standard	10 µg
MIP-1 α	554622	19801T	Standard	10 µg
TNF- α	554618	19761T	Standard	10 µg
TNF- β	554619	19771T	Standard	10 µg

Specificity	New Cat. No.	Old Cat. No.	Format	Size
Mouse				
IL-2	550069	19211P	Standard	20µg
L-3	554579	19221T	Standard	10 µg
IL-4	550067	19231T	Standard	10 µg
IL-5	554581	19241V	Standard	5 µg
IL-6	554582	19251V	Standard	5 µg
IL-10	550070	19281T	Standard	10 µg
GM-CSF	554586	19291T	Standard	10 µg
MCP-1	554590	19341V	Standard	5 µg
TNF- α	554589	19321T	Standard	10 µg

Rat				
IL-4	555107	25011V	Standard	5 µg
IL-10	555113	25071V	Standard	5 µg
GM-CSF	555111	25051V	Standard	5 µg
MCP-1	555110	25041V	Standard	5 µg

Intracellular Cytokine-Positive Control Cells		New Cat. No.	Old Cat. No.
Description	Cytokines Expressed		
Human			
HiCK 1	Positive for IL-2, IFN- γ , TNF- α	555061	23261Z
HiCK 2	Positive for IL-3, IL-4, IL-10, IL-13, GM-CSF	555062	23262Z
HiCK 3	Positive for IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF- α	555063	23263Z
HiCK 4	Positive for IL-8, GRO, IP-10, MCP-1, MCP-3, MIG, MIP-1 α ,	555064	23264Z

Intracellular Cytokine-Positive Control Cells

Description Cytokines Expressed New Cat. No. Old Cat. No.

Mouse

MiCK 1	Positive for IL-2, IFN- γ , TNF- α	554652	20131Z
MiCK 2	Positive for IL-3, IL-4, IL-10, GM-CSF, TCA3	554653	20132Z
MiCK 3	Positive for IL-1 α , IL-6, IL-12, MCP-1, TNF- α	554654	20133Z

Rat

RiCK 2	Positive for IL-4, IL-10, GM-CSF, IFN- γ , TNF- α	555094	24142Z
--------	---	--------	--------

Specificity Clone New Cat. No. Old Cat. No. Format Size

Isotype Controls

Mouse IgG1	MOPC-21	554679	20604A	FITC	0.1 mg
		554680	20605A	PE	0.1 mg
		559320	20605X	PE	100 Tests
		554681	20609A	APC	0.1 mg
Mouse IgG2a	G155-178	554647	20074A	FITC	0.1 mg
		554648	20075A	PE	0.1 mg
		559319	20075X	PE	100 Tests
Mouse IgG2b	27-35	555057	23244A	FITC	0.1 mg
		555058	23245A	PE	0.1 mg
Rat IgG1	R3-34	554684	20614A	FITC	0.1 mg
		554685	20615A	PE	0.1 mg
		559318	20615X	PE	100 Tests
		554686	20619A	APC	0.1 mg
Rat IgG2a	R35-95	554688	20624A	FITC	0.1 mg
		554689	20625A	PE	0.1 mg
		559317	20625X	PE	100 Tests
		554690	20629A	APC	0.1 mg
Rat IgG2b	A95-1	556923	20184A	FITC	0.1 mg
		556925	20185A	PE	0.1 mg
		556924	20189A	APC	0.1 mg
Hamster IgG	G235-2356	554710	20724A	FITC	0.1 mg
		554711	20725A	PE	0.1 mg

Intracellular Cytokine Flow Cytometry Kits and Reagents
Description

	New Cat. No.	Old Cat. No.
Kits		
Cytofix/Cytoperm Kit	554714	2075KK
Cytofix/Cytoperm Plus (with Golgi Stop)	554715	2076KK
Cytofix/Cytoperm Plus (with GolgiPlug)	555028	2300KK
Human Intracellular Cytokine Staining Starter Kit 559302	2040KK	
Mouse Intracellular Cytokine Staining Starter Kit 559311	2041KK	
BrdU Flow Kit (FITC)	559619	2354KK

Description	New Cat. No.	Old Cat. No.	Size
Reagents/Buffers			
Cytofix/Cytoperm Buffer	554722	2090KZ	125 mLs
Perm/Wash Buffer (10X)	554723	2091KZ	100 mLs
GolgiStop (containing monensin)	554724	2092KZ	0.7 mL
GolgiPlug (containing brefeldin A)	555029	2301KZ	1.0 mL
Cytofix Buffer	554655	2014KZ	100 mLs
Pharmingen Stain Buffer (FBS) 554656	20151E	500 mLs	
Pharmingen Stain Buffer (BSA) 554657	20161E	500 mLs	

Section 8

参考文献

1. Sasaki, K., T. Murakami and M. Takahashi. 1989. Flow cytometric analysis of cell proliferation kinetics using the anti-BrdUrd antibody. *Gan To Kagaku Ryoho*. 16:2338-2344.
2. Miltenburger, H. G., G. Sachse and M. Schliermann. 1987. S-phase cell detection with a monoclonal antibody. *Dev. Biol. Stand.* 66:91-99.
3. Vanderlaan, M. and C. B. Thomas. 1985. Characterization of monoclonal antibodies to bromodeoxyuridine. *Cytometry*. 6:501-505.
4. Gratzner, H. G. and R. C. Leif. 1981. An immunofluorescence method for monitoring DNA synthesis by flow cytometry. *Cytometry*. 1:385-393.
5. Lacombe, F., F. Belloc, P. Bernard, M. R. Boisseau. 1988. Evaluation of four methods of DNA distribution data analysis based on bromodeoxyuridine/DNA bivariate data. *Cytometry*. 9:245-253.
6. ean, P. N., F. Dolbeare, H. Gratzner, G. C. Rice and J. W. Gray. 1984. Cell-cycle analysis using a monoclonal antibody to BrdUrd. *Cell Tissue Kinet.* 17:427-436.
7. Toba, K., E. F. Winton and R. A. Bray. 1992. Improved staining method for the simultaneous flow cytofluorometric analysis of DNA content, S-phase fraction, and surface phenotype using single laser instrumentation. *Cytometry*. 13:60-67.
8. Sasaki, K., S. Adachi, T. Yamamoto, T. Murakami, K. Tanaka and M. Takahashi. 1988. Effects of denaturation with HCl on the immunological staining of bromodeoxyuridine incorporated into DNA. *Cytometry*. 9:93-96.
9. Lakhnjal, S., N. J. Gonchoroff, J. A. Katzmman and B. S. Handwerger. 1987. A flow cytofluorometric double staining technique for simultaneous determination of human mononuclear cell surface phenotype and cell cycle phase. *J. Immunol. Meth.* 96:35-40.
10. Houck, D. W. and M. R. Loken. 1985. Simultaneous analysis of cell surface antigens, bromodeoxyuridine incorporation and DNA content. *Cytometry*. 6:531-538.
11. Moran, R., Z. Darzynkiewicz, L. Staiano-Coico and M. R. Melamed. 1985. Detection of 5-bromodeoxyuridine (BrdUrd) incorporation by monoclonal antibodies: role of the DNA denaturation step. *J. Histochem. Cytochem.* 33:821-827.
12. Holm, M., M. Thomsen, M. Høyer and P. Hokland. 1998. Optimization of a flow cytometric method for the simultaneous measurement of cell surface antigen, DNA content, and in vitro BrdUrd incorporation into normal and malignant hematopoietic cells. *Cytometry*. 32:28-36.
13. Mehta, B. A. and V. C. Maino. 1997. Simultaneous detection of DNA synthesis and cytokine production in staphylococcal enterotoxin B activated CD4⁺ T lymphocytes by flow cytometry. *J. Immunol. Meth.* 208:49-59.
14. Endl, E., P. Steinbach, R. Knübel and F. Hofstätter. 1997. Analysis of cell cycle-related Ki-67 and p120 expression by flow cytometric BrdUrd-Hoechst/7AAD and immunolabeling technique. *Cytometry*. 29:233-241.
15. Dolbeare, F., H. Gratzner, M. G. Pallavicini and J. W. Gray. 1983. Flow cytometric measurement of total DNA content and incorporated bromodeoxyuridine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80:5573-5577.

16. Penit, C. 1986. *in vivo* thymocyte maturation. BrdU labeling of cycling thymocytes and phenotypic analysis of their progeny support the single lineage model. *J. Immunol.* 137:2115-2121.
17. Thoman, M. L. 1997. Early steps in T cell development are affected by aging. *Cell. Immunol.* 178:117-123.
18. Tough, D. F., and J. Sprent. 1994. Turnover of naive- and memory-phenotype T cells. *J. Exp. Med.* 179:1127-1135.
19. von Boehmer, H., and K. Hafen. 1993. The life span of naive alpha/beta T cells in secondary lymphoid organs. *J. Exp. Med.* 177:891-896.
20. Schitteck, B., K. Rajewsky and I. Forster. 1991. Dividing cells in bone marrow and spleen incorporate bromodeoxyuridine with high efficiency. *Eur. J. Immunol.* 21:235-238.
21. Rocha, B., C. Penit, C. Baron, F. Vasseur, N. Dautigny, and A. A. Freitas. 1990. Accumulation of bromodeoxyuridine-labeled cells in central and peripheral lymphoid organs: minimal estimates of production and turnover rates of mature lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 20:1697-1708.
22. Westermann, J., S. Ronneberg, F. J. Fritz and R. Pabst. 1989. Proliferation of lymphocyte subsets in the adult rat: a comparison of different lymphoid organs. *Eur. J. Immunol.* 19:1087-1093.
23. Robey, E., D. Chang, A. Itano, D. Cado, H. Alexander, D. Lans, G. Weinmaster, and P. Salmon. 1996. An activated form of Notch influences the choice between CD4 and CD8 T cell lineages. *Cell.* 87:483-492.
24. Carayon, P. and A. Bord. 1992. Identification of DNA-replicating lymphocyte subsets using a new method to label the bromo-deoxyuridine incorporated into the DNA. *J. Immunol. Meth.* 147:225-230.
25. Gonchoroff, N. J., J. A. Katzmann, R. M. Currie, E. L. Evans, D. W. Houck, B. C. Kline, P. R. Greipp and M. R. Loken. 1986. S-phase detection with an antibody to bromodeoxyuridine. Role of DNase pretreatment. *J. Immunol. Meth.* 93:97-101.
26. Shapiro, H. M., *Practical Flow Cytometry*, 3rd Edition, Wiley-Liss, New York.
27. Gray, J. W. and Z. Darzynkiewicz, Eds., *Techniques in Cell Cycle Analysis*, Humana Press, Clifton, New Jersey.

Notes

Notes



輸入元

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

製造元

BD Pharmingen

お問い合わせは下記までご連絡ください。

製造関連・資料請求

(お客様情報センター) : ☎ 0120-8555-90

Fax : 024-593-5761

機器・メンテナンス

(Life Science Support) : ☎ 0120-7752-77

アプリケーション

(技術研修室ホットライン) : 03-5805-9960

販売元



藤沢薬品工業株式会社

藤沢薬品工業株式会社 医療関連事業部 東日本営業所

〒101-0043 東京都千代田区神田富山町10-2 アセンド神田ビル

TEL: 03-5256-5311 FAX: 03-5256-5370

藤沢薬品工業株式会社 医療関連事業部 西日本営業所

〒541-8514 大阪府大阪市中央区道修町3-4-7

TEL: 06-6206-7890 FAX: 03-6206-7934

ホームページアドレス: <http://www.fujisawa.co.jp/reagent/>

64-035-01

RO-0111-000.5-540