

# Annexin V アッセイ機器調整手順

## はじめに

アポトーシス細胞では細胞膜内側にあるリン脂質のホスファチジルセリン( phosphatidylserine: PS )が外側に表出し、細胞外の環境にさらされることとなります。Annexin Vは35-36 kDのCa<sup>++</sup> 依存性のリン脂質結合性タンパクでPSに高い親和性があり、PSを曝露した細胞に結合することができます。この親和性は蛍光色素標識したAnnexin V (表1参照)にも残っており、アポトーシスを起こしかけている細胞をフローサイトメーターによって感度よく検出することができます。

PSが細胞外に表出するのはアポトーシスの初期の段階です。Annexin V アッセイはDNA断片化を検出する他の方法よりも早い段階のアポトーシスを特定することができます。この早い段階ではまだ細胞膜の状態が失われていません。そこで、Annexin VアッセイではPI( propidium iodide )または、7-AAD( 7-amino-actinomycinD )などの核染色剤と同時に染色し、初期のアポトーシス細胞を特定します。これらの核染色剤は細胞膜の状態が保たれていれば、細胞膜内に入り核を染色することができません。

## アポトーシス細胞の誘導

このTechnical Protocolでは、機器調整手順の紹介のためにJurkat細胞を使用しました。

Jurkat細胞( 4-5 × 10<sup>5</sup> cells/mL RPMI )をcamptothecin 6 μM濃度の存在下で、CO<sub>2</sub>インキュベータ、37°Cで4時間培養しました。

## 試薬

### Annexin V-FITC Apoptosis Detection kit I

#### Fluorescein-conjugated Annexin V( Annexin V-FITC )

Annexin V-FITC Buffered in 50 mM Tris, pH 8.0; 80 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0.09%( w/v ) sodium azide; 0.2% BSA

4°Cで保存してください。各テストに5 μL使用します。

#### Propidium Iodide Staining Solution( PI )

Stock溶液: 50 μg/mL PBS, pH7.4

4°Cで保存してください。各テストに2 μL使用します。

#### 10X Binding Buffer

0.1 M HEPES, pH 7.4; 1.4 M NaCl; 25 mM CaCl<sub>2</sub>. 0.2 μmフィルターでろ過滅菌されています。使用前に蒸留水で10倍希釈してください。4°Cで保存してください。

1X PBS( キットには含まれません。)

参考: 蛍光色素標識Annexin Vと核染色剤の組み合わせ

蛍光色素標識 Annexin V	核染色剤
Annexin V-FITC	PIまたは7-AAD
Annexin V-PE	7-AAD
Annexin V-APC	PIまたは7-AAD
Annexin V-Cy5	PIまたは7-AAD
Annexin V-Cy5.5	PIまたは7-AAD
Annexin V-Biotine & SA-FITC	PIまたは7-AAD

**BD Biosciences**

Clontech  
Discovery Labware  
Immunocytometry Systems  
Pharmingen

## 染色

コンペンセーションの調整や結果の解釈のために表のような染色細胞を用意します。

- サンプル2、3: 機器のコンペンセーションに使用します。
- サンプル4: 陽性サンプルを染色し、アポトーシス細胞集団のAnnexin V vs PIプロット内での分布の位置を確認します。
- サンプル5: アポトーシス誘導前の、アポトーシス細胞、死細胞の割合を確認します。
- サンプル1: 染色手順のトラブルシューティングのため、用意します。

サンプル	Annexin V	PI
1 Positive Control	-	-
2 Positive Control		-
3 Positive Control	-	
4 Positive Control		
5 Negative Control		
6 Test sample		

表 Annexin Vアッセイのための推奨コントロールサンプル

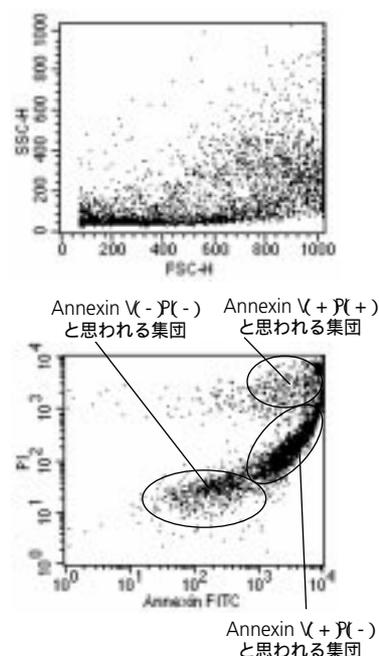
1. 冷PBSで細胞を2回洗浄し、 $\sim 1 \times 10^6$  cells/mLの細胞濃度になるように1X Binding bufferに再浮遊します。
  2. 5 mLのFalconチューブに100  $\mu$ Lの細胞浮遊液 ( $\sim 1 \times 10^5$  cells)を加えます。
  3. 表2に従い、各試験管にAnnexin V 試薬 (5  $\mu$ L)とPI (2  $\mu$ L)を加えます。
  4. 試験管を緩やかに混和し、室温、暗所で15分間インキュベーションします。
  5. 各試験管に1X Binding bufferを400  $\mu$ L加え、1時間以内にフローサイトメーターで測定します。
- 注意: このアッセイでは固定をしていません。アポトーシスは染色の間も進んでいることが考えられますので、染色後の測定までの時間管理は重要です。また、複数の実験結果の比較をする時に誘導時間とともに測定までの時間を一致させることも重要です。

## 測定

1. 2カラーのFACSCompを実施します。  
他の蛍光標識Annexin V試薬を使用する場合は、標識に合わせて3カラー、または4カラーのFACSCompを実施してください。

2. サンプル4を流します。FACSComp直後の機器設定でサンプルを流すと、図1のように細胞集団が現れます。

Annexin Vアッセイは親和性によりAnnexin VとPSを結合させるアッセイですから、蛍光標識モノクロナル抗体による染色に比べて、非特異染色が強くなります。この図では、Annexin Vの蛍光は $10^4$ からはみ出しているように見えますが、PIの蛍光は $10^4$ 以内に収まっています。しかし、ここでAnnexin Vの蛍光のみを下げると2つの蛍光のバランスが悪くなり、この後コンペンセーション補正ができなくなります。

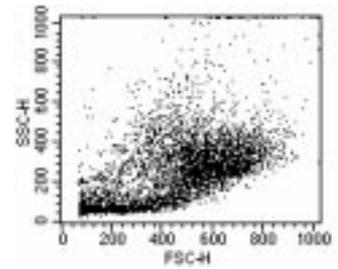


FCS voltage: E00, amp gain: 2.00; SSC voltage: 403;  
FL1 voltage: 687; FL2 voltage: 721  
FL1-%FL2: 0.6; FL2-%FL1: 34.7

図1. FACSComp直後の機器設定での細胞集団分布

3. プロットを見ながら、細胞集団がプロット内に現れる様にFSCおよびSSCを調整します( 図2 )

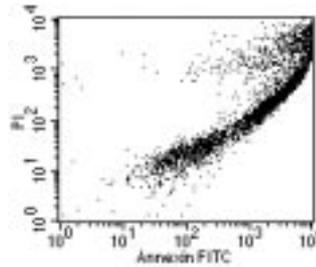
細胞の大きさの情報であるFSCを適切に調整し、データを取ることは、後の解析において重要です。



FCS voltage: E00, amp gain: 1.00; SSC voltage: 403;

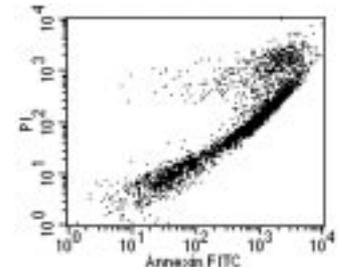
図2. FSC、SSC調整後

4. プロットを見ながら、FL1、FL2を調整します。図3、4のように両方のVoltageを同じ様に下げていき、細胞集団が $10^4$ スケール内に収まるようにします。



FL1 voltage: 630; FL2 voltage: 670

図3. FL1、FL2調整後-1

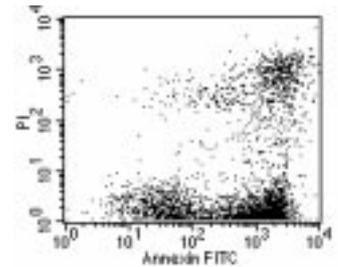


FL1 voltage: 550; FL2 voltage: 590

図4. FL1、FL2調整後-2

5. 引き続きサンプル4を流しながら、Annexin V(-)PI(-)細胞集団、Annexin V(+ )PI(-)細胞集団、Annexin V(+ )PI(+ )細胞集団がそれぞれ、定義される場所に分布するようにコンペーンセーションを調整します( 図5 )

6. 必要であれば、FL1 PMT Voltageを少し下げます。下げた場合、5の要領でコンペーンセーションを調整します。



FL1 voltage: 550; FL2 voltage: 590  
FL1-%FL2: 0.6; FL2-%FL1: 48.6

図5. コンペーンセーションを調整後

7. サンプル2、3を流し、改めてコンペーンセーション調整をします( 図6、7 )

このデータでは、図5の調整後、コンペーンセーション値を変えていません。

8. サンプル5を流し、アポトーシス非誘導のAnnexin V、PIの蛍光レベルを確認します( 図8 )

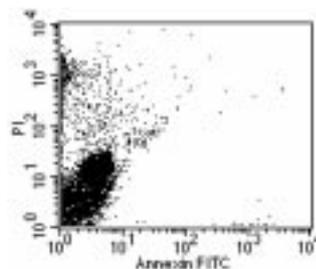


図6. FL1-%FL2調整

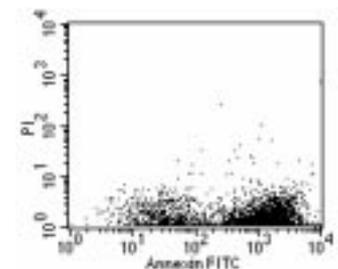


図7. FL2-%FL1調整

9. サンプル1を流し、アポトーシスを誘導した細胞のFL1、FL2の自家蛍光レベルが低いことを確認します( 図9 )

このサンプルはAnnexin V FITCの非特異性を反映しているものではないので、Negative Controlとして考えることはできません。

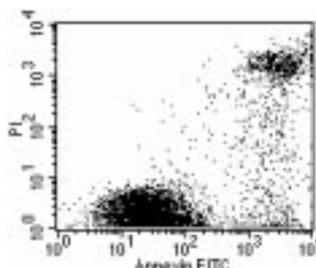


図8. アポトーシス非誘導細胞のAnnexin V、PI染色レベル

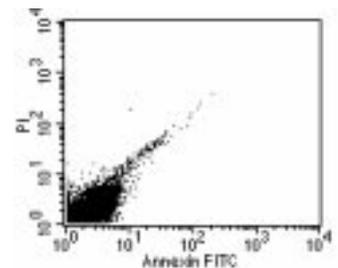


図9. アポトーシス誘導細胞の自家蛍光レベル

10. テストサンプルを測定します。

解析

サンプル1はAnnexin V-FITCの非特異性を反映しているものではないので、Negative Controlとして考えることはできません。サンプル5もアポトーシス誘導をしていないサンプルですから、Negative Controlとして考えることはできません。これらはあくまでも目安とし、テストサンプルの細胞集団の分布のパターンで解析をしてください(図10)。

Annexin V アッセイでは、アポトーシスによる細胞死であるか、またはネクローシスによる細胞死かを区別することはできません。Annexin V、PI(または7-AAD)は、どちらの細胞死が起きてても結合します。これらの区別は、アポトーシス誘導薬剤の濃度レベルを変化させたり、誘導時間を変化させて、推測してください。

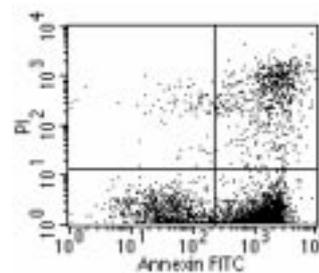


図10. 4分画蛍光マーカーの設定

関連製品リスト

製品名	フォーマット	サイズ	カタログ番号
Recombinant Annexin V	Unlabeled	0.1 mg	556416
Annexin V-Biotine	Biotine	200 tests	556417
Annexin V-Biotine	Biotine	100 tests	556418
Annexin V-FITC	FITC	200 tests	556419
Annexin V-FITC	FITC	100 tests	556420
Annexin V-PE	PE	200 tests	556421
Annexin V-PE	PE	100 tests	556422
Annexin V-APC	APC	200 tests	550475
Annexin V-APC	APC	100 tests	550474
Annexin V-Cy5	Cy5	200 tests	559934
Annexin V-Cy5	Cy5	100 tests	559933
Annexin V-Cy5.5	Cy5.5	200 tests	559936
Annexin V-Cy5.5	Cy5.5	100 tests	559935
Annexin V Binding Buffer, 10X concentrate	Buffer	50 mL	556454
Propidium Iodide Staining Solution	Solution	2.0 mL	556463
Via-Probe™( 7-AAD ) Staining Solution	Solution	100 tests	555816
Streptavidin-FITC( SAv-FITC )	FITC	0.5 mg	554060
Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I	Kit	100 tests	556547
Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit II	Kit	100 tests	556570
Annexin V-PE Apoptosis Detection Kit I	Kit	100 tests	559763



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  
 ホームページアドレス: www.bdj.co.jp  
 製造元  
**BD Biosciences**

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 ):  
 Tel 03-5805-9960

輸入元



**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  
 アセント神田ビル  
 TEL: 03-5256-5311 FAX: 03-5256-5370  
 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: 06-6206-7934  
 ホームページアドレス:  
<http://www.fujisawa.co.jp/reagent/>