

BD Pharmingen™

BrdU Flow Kit

取扱説明書

FITC BrdU Flow Kit

カタログ番号：559619 (50テスト)

カタログ番号：557891 (4×50テスト)

APC BrdU Flow Kit

カタログ番号：552598 (50テスト)

カタログ番号：557892 (4×50テスト)



Helping all people
live healthy lives

©2005 Becton, Dickinson and Company. All rights reserved.

この取扱説明書は、形式や手段(電子的、機械的、電磁的、光学的、化学的方法または手書きなど)の如何を問わず、BD Biosciencesの書面による事前の許可なく、そのいかなる部分も複製、転送、検索可能なシステムへの保存、または他言語への翻訳、コンピューター言語への翻訳を行うことを禁じます。

研究用のみ使用。診断や治療用にはご使用になれません。

この製品の購入により、製品単品、もしくは他の製品の構成部品としての再販売や譲渡などの権利は得られません。Becton, Dickinson and Companyの書面による明記された許可なしでは、許可された使用方法以外のいかなる使用も禁じます。

BD、BDロゴ、およびその他の登録商標はBecton, Dicinson and companyの所有財産です。 ©2005 BD

キット内容

カタログ番号：559619および552598の場合

(以下の試薬は4°Cで保存してください。)

- Fluorochrome-conjugated Anti-BrdU Antibody: 1バイアル
- BD Cytotfix/Cytoperm™ Buffer: 1バイアル
- BD Perm/Wash™ Buffer (10x): 2バイアル
- BD Cytoperm™ Plus Buffer: 1バイアル
- 7-AAD: 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°Cで保存してください。)

- BrdU: 5バイアル
- DNase: 5バイアル

カタログ番号：559619と552598はそれぞれ、上記の個別梱包のキットで構成されています。

目次

はじめに	5
概要: BD Pharmingen™ BrdU Flow Kit染色プロトコール	6
キット内容と保存条件	8
警告および予防対策	10
BrdUラベリング、およびBrdU Flow Kit染色プロトコール	11
A. BrdUによる細胞のラベリング	11
B. BrdU Flow Kit染色プロトコール	12
染色した細胞サンプルのフローサイトメリー解析	13
フローサイトメーターの設定に関するガイドライン	17
染色と解析のヒント	29
付録	30
参考文献	35

はじめに

細胞にBromodeoxyuridine(BrdU)を取り込ませて免疫蛍光染色を行い、フローサイトメリーで解析することによって、DNAを合成している各細胞の割合と状態を高分解能で分析することができます。この方法では、まずBrdU(DNA前駆体の一つチミンの類似物)を、細胞周期のS期(DNA合成期)に入った細胞で新たに合成されるDNAの中に取り込ませます^{1,4}。取り込まれたBrdUを特異的なanti-BrdU蛍光標識抗体によって染色します。そして、細胞に結合したBrdUをフローサイトメーターで測定します。7-amino-actinomycin D(7-AAD)などのすべてのDNAに結合する色素による染色が、このBrdUによる免疫蛍光染色と組み合わせるとよく使われます。このような組み合わせで2カラーのフローサイトメリー解析を行うことによって、細胞周期ごと(即ち7-AAD染色強度より測定されるG0/1期、S期またはG2/M期)に、活発にDNAを合成(BrdU取り込み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}。

細胞をBrdUに長時間曝露することによって、非周期細胞分画とは対照的な、活発に細胞周期を繰り返している細胞分画の同定・解析が可能です。様々な時点で細胞をBrdUでパルスラベリングすることによって、細胞周期のキネティックを測定することもできます。BrdUの取り込みを使用した研究は、様々な実験のプロトコールに利用されています。これらの研究には、*in vitro*および*in vivo*(例えば、実験動物への腹腔内注射や、飲み水への添加)ラベリングシステムが含まれます。

BD Pharmingen™ BrdU Flow Kitの特徴は、免疫蛍光BrdU染色用試薬を、別の細胞分子に特異的な他の蛍光抗体にも応用できるプロトコールと合わせて提供している点です。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、その他の蛋白)が含まれます。これらは、その発現や活性が、細胞の活性化や、細胞周期の開始・進行、または細胞死に関係しています。このような広い応用が可能となるのは、BrdU Flow Kit染色プロトコールでは、酸やエタノール、高温によるDNA変性が避けられるためです。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います⁷⁻¹¹。

BrdU Flow Kitでは、パラホルムアルデヒドで固定、サボンで浸透処理された細胞の細胞表面抗原や細胞内蛋白を認識することができる蛍光標識抗体がお使いいただけます。蛍光標識抗体との組み合わせによって、細胞のDNA合成活性(BrdU取り込みレベル)に関連する様々な表面抗原や細胞内蛋白の発現レベルを、フローサイトメリーで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分裂促進剤で刺激した後で、経時的に解析することが可能となります。これによって、DNA合成(細胞周期活性の最も主要な段階)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)についての研究が可能となります。

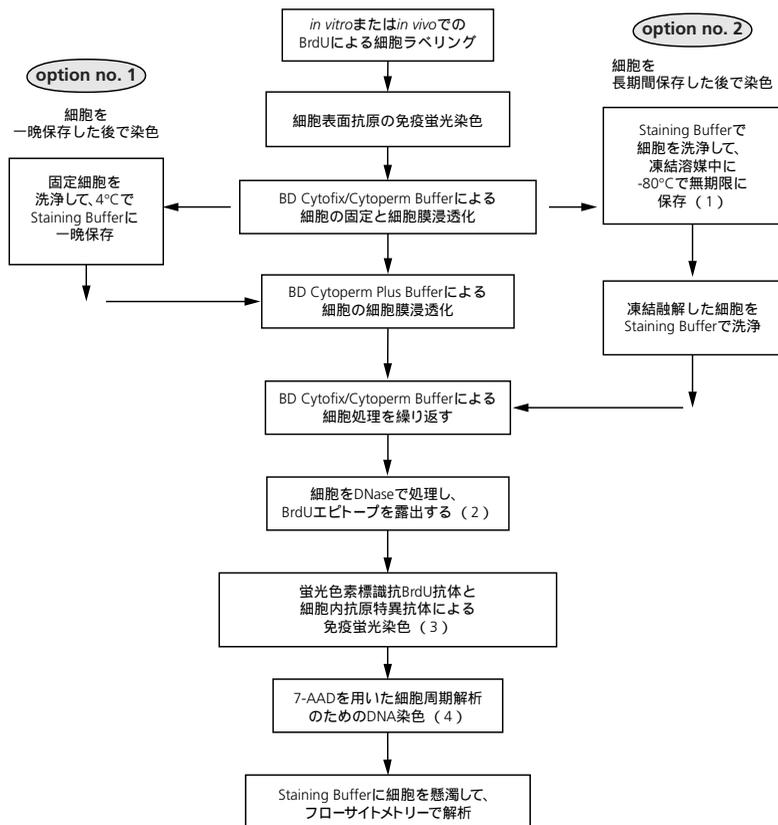
BD Pharmingen BrdU Flow Kitとフローサイトメリー用の抗体試薬を使うことによって、この種の様々な高分解能の研究が可能になります。キットには、詳細な取扱説明書とともに、染色プロトコールに必要なすべての試薬が備えられており、安定した結果を保証しています。キットに含まれる各試薬は、細胞に取り込まれたBrdUレベルや、細胞表面抗原の発現、細胞内抗原の発現などのマルチパラメータ解析に適しているかどうか十分に試験されています。BrdUの摂取は、凍結もしくはパラフィン包埋組織片でも解析が可能です。BD Pharmingen™ BrdU In-Situ Kit(カタログ番号： 550803、551321)では、組織片の2カラー解析ができる試薬を用意しています。

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

BD Pharmingen™ BrdU Flow Kit染色プロトコールでは、サンプルの取扱いについていくつかのオプションがあります。この染色プロトコールでは、免疫蛍光染色とサンプルの解析を1日で行うことができます。すべての染色手順には約3時間を要します。また、サンプルを染色前に固定して、染色まで保存しておくことも可能です。細胞活性化に必要な時間やBrdUとの反応時間、またBrdU染色前の細胞調製に必要な作業のために、サンプルを保存しておいて、染色は後で行いたい場合もあるでしょう。サンプルを染色まで短時間保存したい場合には、染色プロトコール **Option #1** に従うと、最初に固定した後、細胞を一晩保存することができます。細胞を長期間保存したい場合には、染色プロトコール **Option #2** に従うと、最初に固定した後、サンプルを無期限に凍結することができます。このようにBD Pharmingen BrdU Flow Kit染色プロトコールには、研究者の時間を節約するための各種のオプションが用意されています。

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

一日で行う染色手順



- 凍結溶媒の組成：10%dimethyl sulfoxide(DMSO)+ 90%加熱不活化ウシ胎児血清(FBS)
- 別の方法として、染色操作をDNase処理の後で停止することができます。DNase処理細胞はその後、Perm/Wash Buffer中に一晩保存して、翌日染色を継続することができます。
- 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を使用する場合には、細胞表面抗原の免疫蛍光染色を細胞内抗原の染色と同時に行うことができます。
- Total DNA含有量を染色する必要がない場合には、7-AAD染色手順を省いて、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。

キット内容と保存条件

表1

内容	保存条件	バイアル数
Fluorochrome- anti-BrdU Antibody	4°C	1
BD Cytofix/Cytoperm Buffer	4°C	1
BD Perm/Wash Buffer(10x)	4°C	2
BD Cytoperm Plus Buffer	4°C	1
BrdU(10 mg/mL)	-80°C	5
Dnase	-80°C	5
7-AAD	4°C	1

一部のキット試薬は濃縮保存液となっています。これらは、脱イオン水、1×Dulbecco PBS (DPBS) または BD Perm/Wash Bufferで希釈する必要があります。キット内容の取扱い、調製、保存に関する方法は以下のとおりです。

Fluorochrome-conjugated anti-BrdU antibody: このバイアルには、蛍光色素標識抗BrdU抗体の保存液が50 µL入っており、50サンプルの染色ができます(10⁶細胞/サンプル)。FITC BrdU Flow Kit(カタログ番号: 559619)にはFITC標識抗BrdU抗体の保存液が50 µL入っています。また、APC BrdU Flow Kit(カタログ番号: 552598)にはAPC標識抗BrdU抗体の保存液が50 µL入っています。使用に先立って、抗体の保存液を1×BD Perm/Wash Bufferで1:50に希釈してください。各サンプルの染色には、希釈抗体を50 µL使います。蛍光色素標識抗BrdU抗体は暗所に4°Cで保存してください。

BD Cytofix/Cytoperm™ Buffer: BD Cytofix/Cytoperm Bufferは、細胞内染色に用いるシングルステップの固定および細胞膜浸透化の試薬です。この試薬には、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が含まれます。この試薬により、細胞の形態を保ち、細胞蛋白を固定、細胞内蛋白の免疫蛍光染色のための細胞膜浸透化が行えます。25 mLボトルのBD Cytofix/Cytoperm Bufferは、調製せずにそのまま使用できます。BD Cytofix/Cytoperm Bufferは4°Cで保存してください。

BD Perm/Wash Buffer: BD Perm/Wash Bufferの濃縮保存液(10×)は25 mLボトルに入っています。BD 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。濃縮バッファの保存液は、脱イオン水で1:10に希釈してご使用ください。残った1×Perm/Wash Bufferは4°Cで保存してください。キットに入っている10×Perm/Wash Bufferボトル2本も4°Cで保存してください。

留意: 10×BD Perm/Wash Bufferには沈殿物が生じる場合があります。この沈殿物はバッファの性能には影響しません。沈殿物を取り除きたい場合には、使用に先立って10×perm/Wash Bufferをポアサイズ0.45 µmのフィルターで濾過してください。

留意: BD 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。このバッファを未固定の細胞に使用すると、細胞を損傷する場合があります。

留意: 血清の供給元はすべて米国です。

BD Cytoperm™ Plus Buffer: BD Cytoperm Plus Bufferは、BrdU Flow Kit用に特別に調製されたバッファーで、染色増強剤および第2膜浸透化試薬として使用します(100 µL/サンプル)。BD Cytoperm Plus Bufferは10 mLボトルが1本入っています。4°Cで保存してください。

留意: BD Cytoperm Plus Buffer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、細胞を損傷する場合があります。

BrdU: 各バイアルには、1×DPBSで希釈された10 mg/mLのBrdU溶液(32.5 mM)が0.5 mL入っています。BrdU溶液は、ポアサイズ0.22 µmのフィルターで滅菌されており、防腐剤は入っていません。したがって、溶液は無菌状態で取扱ってください。この保存溶液は動物への腹腔内注射、また1 mMの溶液に希釈して*in vitro*ラベリングにも使用できます。腹腔内注射による*in vivo*ラベリングについては、取扱説明書の11ページにある*in vivo*ラベリングのセクションを参照ください。*in vitro*で細胞をラベリングするには、保存溶液(10 mg/mLのBrdU溶液)31 µLを、1 mLの1×DPBSないし培養液に加えて希釈(32倍希釈)して、1 mMの溶液を作ります。この1 mMの溶液10 µLを、1 mLの培養液に加えることによって、最終濃度を10 µMにします。BrdUの分子量は307.1です。BrdU液は5本入っています。-80°Cで保存してください。

留意: BrdU溶液は、4 で最長4ヶ月間安定していることが示されており、再凍結保存も可能です。

DNase: 各バイアルには、1×DPBSに溶かした1 mg/mL DNase溶液が300 µL含まれています。10以上のサンプルを染色する場合には、DNase溶液のバイアルを1本解凍した後、700 µLの1×DPBSを加えて300 µg/mLの作業用保存溶液を作ります。

留意: DNase処理するサンプル数が10未満であれば、1 mg/mL DNase溶液を30 µL/サンプルだけ取り出し、残りの1 mg/mL DNaseは-80 で保存してください。

留意: DNase保存溶液(1 mg DNase/mL)は1回だけ再凍結できますが、再凍結を繰り返すと失活します。各細胞サンプルの処理に対して、100 µLの作業用保存溶液を使い(10⁶の細胞に対して30 µgのDNase) 37 でインキュベーションを行います。DNaseは5バイアル入っています。-80 で保存してください。

7-AAD: 7-amino-actinomycin D(7-AAD)は、フローサイトメトリー解析でのDNA染色に用いる蛍光色素です。各サンプル(10⁶細胞/サンプル)の染色には、20 µLの7-AADを使います。7-AADは1本のバイアルに入っています。暗所に4°C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×DPBS+3%胎児ウシ血清(加熱不活化)+0.09%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)(カタログ番号: 554656)が最適です(別売り)。

1×DPBSバッファーの組成(1リットル):

KCl	0.2 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
NaCl	8.0 g
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O (pH7.2~7.4)	2.16 g

警告および注意

BD Cytotfix/Cytoperm™ Bufferには4%の parahormaldehyde が含まれており有害です。

- R40: 発癌性を指摘する所見が一部あります。
- R43: 皮膚に触れると、感作を生じる場合があります。
- S2: 子供の手が届かないところに保管してください。
- S13: 食品、飲料、動物の飼料ないし飼料原料の近くには置かないでください。
- S36/37: 適切な保護衣およびグローブを着用してください。
- S46: 万一飲み込んだ場合には、直ちに医師の診断を受け、容器からラベルを提示してください。
- S52: 換気の無い室内での使用は避けてください。

BD Cytoperm™ Plus Bufferには10%のジメチルスルホキシドが含まれており有害です。

- R20/21/22: 吸引したり皮膚に触れたり飲み込むと有害です。
- S25: 目に入らないようにしてください。
- S26: 万一目に入った場合、直ちに大量の水で洗い流した後、医師の診断を受けてください。
- S28: 皮膚に付いた場合には、直ちに大量の水で洗い流してください。
- 36: 適切な衣服を着用してください。
- S60: この溶液と容器は、有害な廃棄物として処分しなければなりません。

BrdUには1%のプロクスイリジンが含まれており有害です。

- R20/21/22: 吸引したり皮膚に触れたり飲み込むと有害です。
- S9: 容器は通気性のよいところに保管してください。
- S28: 皮膚に触れた場合には、直ちに大量の水で洗い流してください。
- S36/37/39: 適切な保護衣、グローブ、および目と顔の保護具を着用してください。
- S60: この溶液と容器は、有害な廃棄物として処分しなければなりません。

蛍光色素標識抗体には0.1%未満のアジ化ナトリウムが含まれています。アジ化ナトリウムは、酸性条件下で毒性の強いアジ化水素酸を生成します。沈殿物が配管内に堆積すると爆発の可能性があるため、アジ化合物が希釈されるように大量の水を流しながら廃棄してください。

BrdUラベリング、およびBrdU Flow Kit染色プロトコール

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。BrdUの最終濃度が10 μ M 培地1 mLに対して、1mM BrdUが10 μ L)になるように調整した培地で細胞を培養すると、様々なヒトやマウスの細胞株、並びに正常細胞集団のラベリングを効果的に行うことができます^{15, 16}。また、BrdUへの細胞の曝露時間を延長することによって、活発に細胞周期を繰り返している細胞集団を同定することができます。様々な時点でBrdUに細胞を短時間反応させるパルスラベリングによって、細胞周期のキネティクスを測定することもできます。

細胞を*in vitro*でラベリングするには、細胞培地1 mLにつき10 μ LのBrdU溶液 (1 \times DPBS中に1 mMのBrdU) を直接加えます。この操作では、細胞に影響を与えるような操作(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 細胞/mLを越えないようにしてください。次に、処理した細胞を必要な時間、培養します。パルスラベリングの実験では、パルスを加える時期と長さは、試験対象となる細胞の細胞周期の開始と進行度合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、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間)です。それぞれの実験系で、各細胞株または細胞集団における最適なパルス時期とパルスラベリングの時間を測定して決める必要があります。陰性染色対照には、同じ細胞集団でBrdUラベリングしていない細胞を使います。この対照によって、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がわかります。

BrdUによるマウス細胞の*in vivo*ラベリング

*in vivo*での細胞のBrdUラベリングを行なう一般的な方法として、BrdU含有液をマウスの腹腔内に注射する方法と、マウスの飲料水にBrdUを加えて摂取させる方法があります¹⁶⁻²²。ただし、BD Biosciences Pharmingenでは、これらの方法を定期的には試験していません。

方法No. 1: 腹腔内経路によるBrdU注射法

滅菌した1 \times DPBSで希釈したBrdU溶液10 mg/mLが*in vivo*用に用意されています。BrdU溶液100~200 μ L (1~2 mg) をマウスに腹腔内注射します^{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認められます。

方法No. 2: 飲料水によるBrdUの摂取

BrdU濃度が0.8 mg/mLになるように飲料水で希釈します。BrdU混合液は常に新しく調製して、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があります。14日間の連続的なBrdU摂取で、致死効果があることが報告されています²¹。長期的な研究では、BrdUを9日間連続してマウスに摂取させた後、正常な水に切り替えることで効果があったことも報告されています¹⁸。これらの動物の細胞に取り込まれたBrdUは、その後70日間以上にわたって検出されています¹⁸。

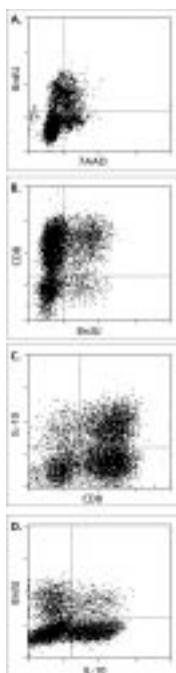
BrdU Flow Kit染色プロトコール

- 細胞表面抗原の免疫蛍光染色
 - BrdUパルス処理した細胞(10^6 の細胞/50 μ L Staining Buffer)を、フローサイトメーターの試験管に加えます。
 - Staining Buffer(BD Pharmingen™ Stain Buffer(FBS) カタログ番号: 554656)で希釈した細胞表面マーカーに特異的な蛍光標識抗体50 μ Lを、各試験管に加えて、よく混和します。
 - 細胞と抗体を15分間、氷上でインキュベーションします。
 - 試験管当たり1 mLのStaining Bufferを加えて細胞を1回洗浄し、200 ~ 300 \times gで遠心(5分間)した後、上清を除去します。
- BD Cytofix/Cytoperm Bufferによる細胞の固定と細胞膜浸透化
 - 100 μ LのBD Cytofix/Cytoperm Bufferを各チューブに加えて、細胞を懸濁します。
 - 細胞を15 ~ 30分間、室温または氷上でインキュベーションします。
 - 1 mLの1 \times BD Perm/Wash Bufferで細胞を1回洗浄し、ステップ1dと同様に遠心した後、上清を除去します。
- BD Cytoperm Plus Bufferに細胞をインキュベーション
 - 100 μ LのBD Cytoperm Plus Bufferを各チューブに加えて、細胞を懸濁します。
 - 細胞を10分間、氷上でインキュベーションします。
 - 1 mLの1 \times BD Perm/Wash Bufferで細胞を1回洗浄します(ステップ2cと同様)
- 細胞の再固定
 - 100 μ LのBD Cytofix/Cytoperm Bufferを各チューブに加えて、細胞を懸濁します。
 - 細胞を5分間、室温または氷上でインキュベーションします。
 - 1 mLの1 \times BD Perm/Wash Bufferで細胞を1回洗浄します(ステップ2cと同様)
- DNaseで細胞を処理して、取り込まれたBrdUを露出^{24, 25}
 - 希釈したDNase溶液100 μ L(DPBS溶液で300 μ g/mLに希釈)を各チューブに加えて、細胞を懸濁します(各試験管のDNaseは30 μ g)
 - 細胞を1時間、37 °Cでインキュベーションします。
 - 1 mLの1 \times BD Perm/Wash Bufferで細胞を1回洗浄します(ステップ2cと同様)
- 蛍光抗体によるBrdUと細胞内抗原の染色
 - 希釈した蛍光抗BrdU抗体および/または細胞内抗原特異抗体を含んだ50 μ LのBD Perm/Wash Bufferで細胞を懸濁します。
 - 細胞を20分間、室温でインキュベーションします。
 - 1 mLの1 \times BD Perm/Wash Bufferで細胞を1回洗浄します(ステップ2cと同様)
- 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20 μ Lの7-AAD溶液で懸濁します。
- フローサイトメトリ解析のための細胞の懸濁
 - 1 mLのStaining Bufferを各チューブに加えて、細胞を懸濁します。
 - 染色した細胞をフローサイトメーターで解析し(400細胞/秒以下で測定) マルチパラメータデータファイルを取り込みます。
留意： フローサイトメトリで解析するまで、サンプルを4 °Cで遮光すれば1晩保存することができます。

染色した細胞サンプルのフローサイトメトリー解析

以下の例に示すフローサイトメトリーのデータは、488 nmアルゴンレーザーを装備したフローサイトメーターを使って取り込まれたものです。このレーザーは、蛍光色素であるfluorescein isothiocyanate(FITC (FL1))、phycoerythrin(PE (FL2))、7-AAD(FL3) を励起するとともに、照射された細胞から前方散乱光(FSC と側方散乱光(SSC))のシグナルが発生します。アルゴンレーザーの対象域外波長によって励起される蛍光色素(例えばallophycocyanin(APC))で染色する場合には、BD FACSCalibur™など、別のレーザー光源を持ったフローサイトメーターが必要となります。マルチカラー染色のために別の蛍光色素を追加して用いる場合には、検出する蛍光シグナルのオーバーラップを補正することが重要です。一般に、DNA含有量のマーカーである7-AADからの蛍光シグナルはリニアシグナル増幅モードで取り込まれるのに対し、その他の蛍光色素からの蛍光シグナルはログモードで取り込まれます。

BD Pharmingen FITC BrdU Flow Kitプロトコールによるサンプルデータ



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、細胞周期のS期(DNA合成期)にある細胞の割合が求められる。このフローサイトメトリーのデータにQuadrant Markerを適用することによって、27%の細胞が活発にBrdUを取り込んでいることがわかる。

パネルB: APC anti-CD8 vs. FITC anti-BrdU

このデータでは、BrdUを取り込んだCD8陽性細胞の割合が24%であることがわかる。

パネルC: APC anti-CD8 vs. PE anti-IL-10

このデータから、IL-10産生のCD8陽性細胞の割合が計算できる。CD8陽性細胞の34%がIL-10を産生している。

パネルD: PE anti-IL-10 vs. FITC anti-BrdU

このデータでは、BrdUを取り込んだIL-10産生細胞の割合が38%であることがわかる。

図1. 刺激を受けたマウス細胞のDNA合成および/またはIL-10産生のマルチカラー・フローサイトメトリー解析
BALB/cマウスの脾臓細胞を*in vitro*でプライミングし、蛋白輸送阻害剤の存在下(細胞内のサイトカイン蓄積を促進するため)でPMAおよびイオノマイシンによって再刺激した。培養の最後の45分間、細胞を10 μMのBrdUでラベリングした。その後、細胞を回収して、FITC anti-BrdU(FL1)、PE anti-IL-10(FL2)、7-AAD(FL3)、APC anti-CD-8(FL4)で染色した。パネルでは、これらの細胞をフローサイトメーターで測定したデータ解析の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、染色した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。

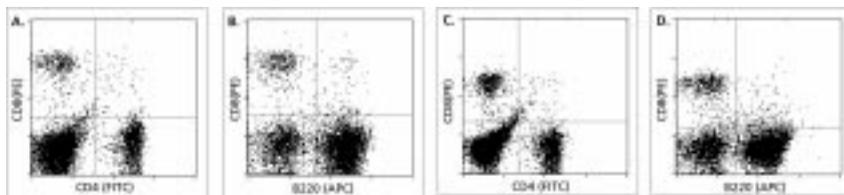


図2. BrdU Flow Kitを用いた細胞表面抗原発現の解析

従来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-CD8、APC anti-B220で染色し、BD Cytotfix/Cytoperm™ Bufferで固定した(パネルAとB)。同様のサンプルをBD Pharmingen BrdU染色プロトコールに従って処理した(パネルCと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を解析、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) およびパネルBとD: B220(APC) vs. CD8(PE) に示す。CD4、CD8、B220を発現する細胞の割合と、それぞれの平均蛍光強度(MFI)を表2にまとめた。

表2. BrdUプロトコールと従来の染色プロトコールとの比較

	%positive		MFI	
	従来の プロトコール	BrdU プロトコール	従来の プロトコール	BrdU プロトコール
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染色プロトコールと従来の染色プロトコールとの比較。BrdU染色プロトコー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るが、染色した細胞集団を区別する能力には差は認められなかった(表2)。BrdU染色プロトコールに従って染色したサンプルに見られるシグナル強度の減少が、これらのマーカー染色細胞の割合に影響することはなかった。しかし、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。

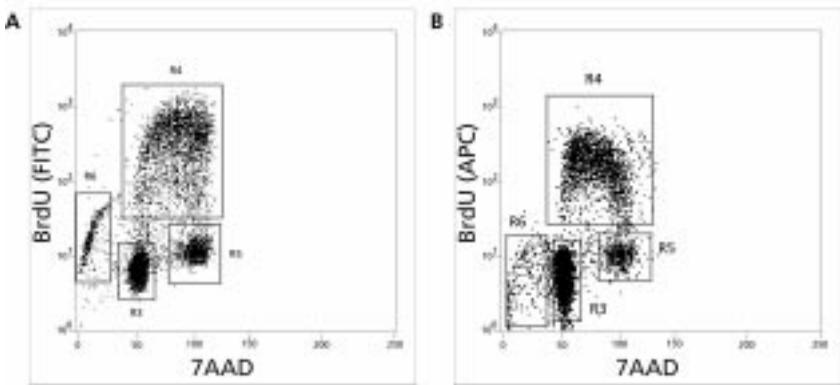


図3. BrdU取り込みとDNAを染色した細胞集団の定量的細胞周期解析のための領域ゲート

パネルA: D10.G4.1細胞でのBrdUを取り込んだ細胞(FITC anti-BrdU)とDNA含有量(7-AAD)の測定。D10.G4.1細胞を10 μ MのBrdUを入れて30分間培養した。細胞の細胞周期の時期とDNA合成活性は、Total DNAと取り込まれたBrdUの相関を解析することによって求めることができる。7-AAD vs. BrdUのドットプロットに設定した領域ゲートに示されるように、BrdU Flow Kitの試薬で染色した細胞をフローサイトメトリー解析することによって、アポトーシス細胞(Sub-G0/G1, R6として定義。細胞の5.6%)、G0/G1期(R3、38.6%)、S期(R4、38.6%)、ないしG2+M期(R5、14.4%)にある細胞、新しくDNAを合成した細胞を区別することができる^{5, 6}。7-AADのシグナルデータは、X軸に示すようにリニアモードで取り込んでいる。

パネルB: 細胞に取り込まれたBrdU(APC anti-BrdU)とTotal DNA含有量(7-AAD)の測定。H1tPBMCを、固定化した抗ヒトCD3抗体、プレート・コーティング用に10 μ g/mLのクローンHIT3a(カタログ番号: 555336)、可溶性抗ヒトCD28抗体、2 μ g/mLのクローンCD28.2(カタログ番号: 555725)、10 ng/mLの組み換え型ヒトIL-2(カタログ番号: 554603) および20 ng/mLの組み換え型ヒトIL-4(カタログ番号: 554605)で2日間刺激した。つぎに、細胞を洗浄し、組み換え型IL-2とIL-4を含んだ培地で3日間培養した。最後に、細胞を回収して、PMA(Sigma、カタログ番号: P-8139、5 ng/mL)とイオノマイシン(Sigma、カタログ番号: I-0634、500 ng/mL)で4時間再度刺激した。最後の1時間では、20 μ MのBrdUを加えた。図3Aに示す各領域ゲートでは、領域6がアポトーシス細胞(3.31%)、領域4がS期(23.5%)、領域3がG0/G1期(64.3%)、領域5がG2+M期(6.1%)の細胞。

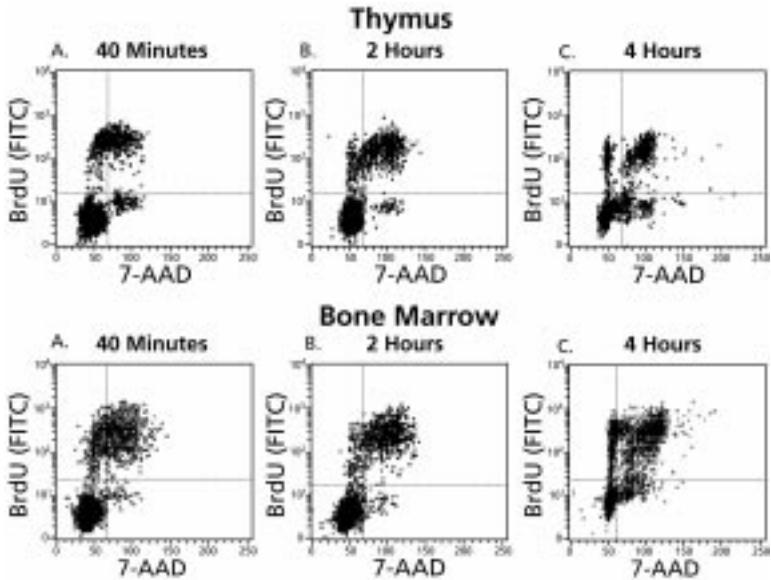
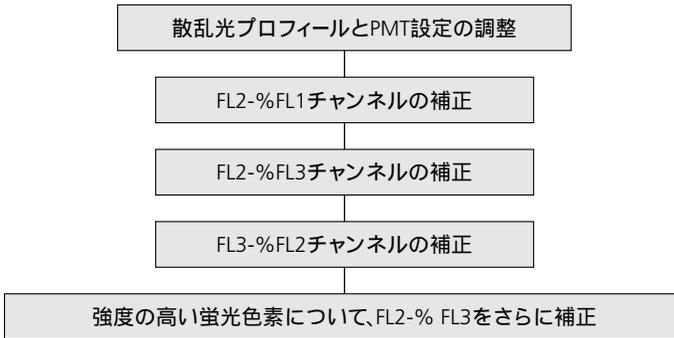


図4. マウスにおける*in vivo* BrdUパルシングのタイムコース実験

C57BL/6マウスに、BrdU 1 mgを各時間間隔で腹腔内注射した。注射後、マウスは40分後、2時間後、および4時間後に処置した。胸腺と骨髄を取り出して、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40分の染色像。特徴的なBrdU/7AADの「蹄鉄」のような蛍光染色像が見られる。パネルBは、マウスのパルス2時間の骨髄と胸腺の染色像。これも特徴的な「蹄鉄」のパターンを示す。また、BrdUを取り込んではいないがG0/G1期にある細胞(7AAD含有量が増加しないBrdU陽性細胞)も認められる。パネルCは、マウスのパルス4時間の骨髄と胸腺の染色像。この染色像では、G0/G1期のBrdU陽性細胞の集団が認められる。特徴的なBrdU/7AADの「蹄鉄」像は見られなくなっている。

フローサイトメーターの設定に関するガイドライン

サイトメーター設定のフローチャート



測定装置の設定や、補正值の調整は複雑な操作です。図5～15に、BrdU染色手順に従って染色したサンプルに必要とされる測定装置の設定例を示しています。図5～10はBD Pharmingen™ FITC BrdU Flow Kit(カタログ番号: 559619)専用のもので、図11～15はBD Pharmingen™ APC BrdU Flow Kit(カタログ番号: 552598)についてのものです。必要とされる測定装置の設定は、実験に用いる測定装置やそれぞれのサンプルによって異なります。また、蛍光標識抗体のそれぞれの組み合わせに応じて、さらに調整が必要となります。詳細については、フローサイトメトリーや、フローサイトメトリーによる細胞周期解析に関するテキストブックを参照ください^{26, 27}。

留意: フローサイトメーターおよびフローサイトメトリーの詳細については、Howard M. Shapiro著のテキストブック『Practical Flow Cytometry』(3rd Edition, Wiley-Liss, New York)を参照ください。

FITC BrdUでの測定装置の設定

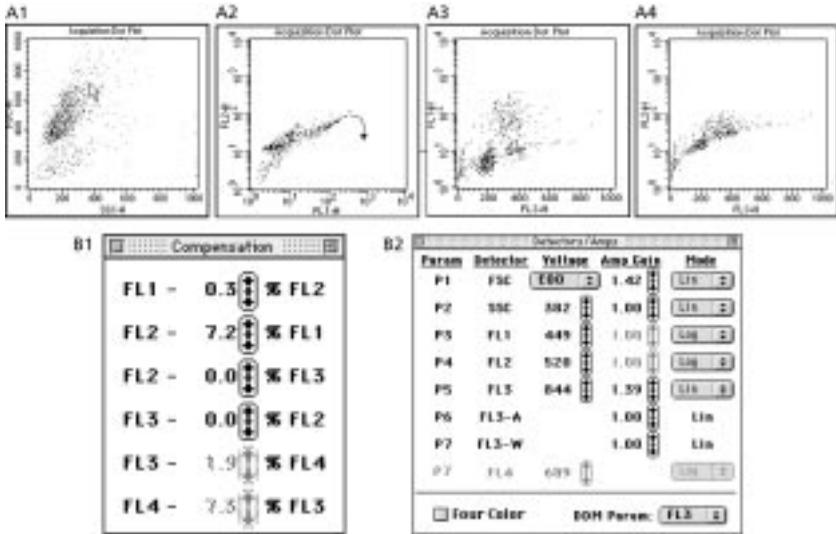


図5. FITC BrdU Flow Kitを用いた解析における測定装置の初期設定

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。細胞は、刺激の最後の45分間BrdUでパルスラベリングした。BrdU Flow Kitプロトコールに従って、細胞を回収、固定し、膜浸透化処理した後、再度固定してDNaseで処理した。つぎに、サンプルをFITC anti-BrdU(FL1) 7-ADD(FL3) さらにPE免疫グロブリン(Ig)アインタイプ・コントロール(FL2)か、PE抗マウスIL-10、もしくはPE抗マウスTNFのいずれかで染色した。サンプルはフローサイトメトリーで解析した(パネル5.A1 ~ A4)、フローサイトメーターのPMT電圧と蛍光補正に関する初期設定は、BD FACSComp™ Beadと、ソフトウェアのLyse/Washモードを用いて行った(パネル5.B1 ~ B2)、BD CellQuest™ フローサイトメトリー解析用ソフトウェアを用いてドットプロットを作製し、パネル5.A1 ~ A4に示すデータの取り込みを行った。PMT電圧は、マウスのリンパ球での典型的なSSC vs. FSC散乱光プロット(パネル5.A1)が得られるように設定した(パネル5.B2)。FL3検出器は、7-AADを用いてDNA含有量の染色を行った細胞データの取り込み・保存ができるように、リニアモードに設定した(パネル5.B2)。7-AADシグナル(FL3)の強度については、パネル5.A3に見られるように、G0/G1細胞集団(図3参照)の平均蛍光強度(MFI)が50(解像度256の場合)または200(解像度1024の場合)になるように、FL3のPMT電圧設定を調整した。免疫蛍光染色した細胞からの発光蛍光の取り込みのために、FL1とFL2の検出器はログモードに設定した。ベースラインのPMT電圧は、未染色の細胞集団の平均蛍光強度(自家蛍光)が、蛍光強度スケールの約1桁(10¹以下)に入るように調整を行った。

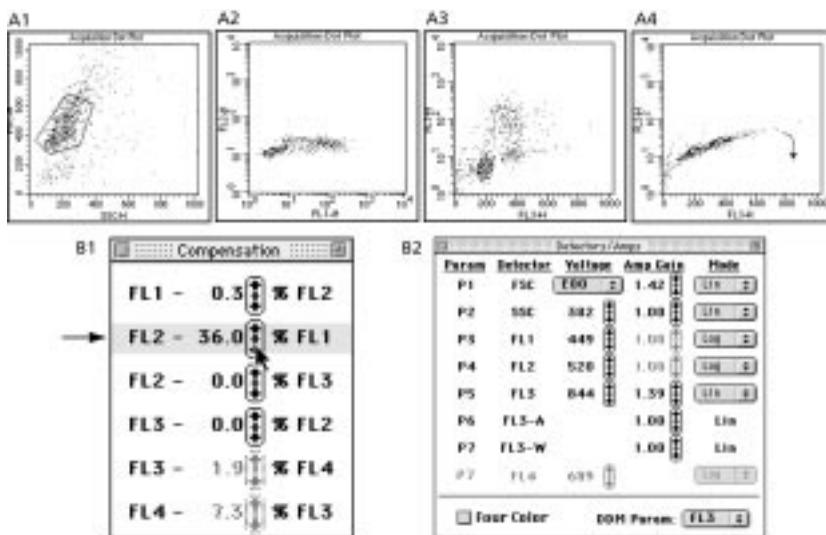


図6. FITC(FL1)の蛍光補正

この図は、目的とする細胞集団(この場合はリンパ球)の散乱光の特性に基づいて、集団の周りに領域ゲートを設定し(パネル6.A1)、そのゲートを他の解析プロットにも使用した(パネル6.A2~A4)。この図はまた、FITC anti-BrdU+細胞による蛍光のオーバーラップ(FL1)を解消するために、FL2-%FL1補正設定値を調整(図5で説明)した後のサンプルの結果を示す。FL2-%FL1補正值を上げて各細胞の平均FL2蛍光強度を合わせることによって、パネル6.A2に見られるように、全体の細胞集団がX軸に平行に置かれた。

留意: PE Igアインタイプ・コントロールで染色しているため、このサンプルのPE(FL2)蛍光は低い。

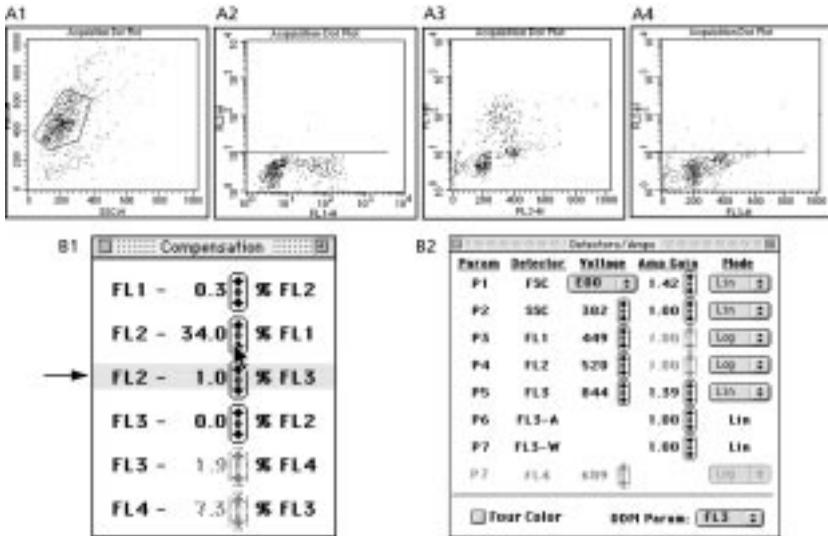


図7. 7-ADD(FL3)の蛍光補正

この図は、7-ADD+細胞による蛍光のオーバーラップ(FL3)を解消するために、FL2-%FL3補正設定値を調整(図5で説明)した後のサンプルの結果を示す。この補正により、パネル7.A2に見られるように、細胞集団のFL2強度が1桁(MFI ≤ 10)に納まっている。FL2-%FL3の補正設定は非常に感度が高く、マイナーチェンジのみ必要とされる。

留意: PE Igアインタイプ・コントロールで染色しているため、このサンプルのPE(FL2)蛍光は低い。

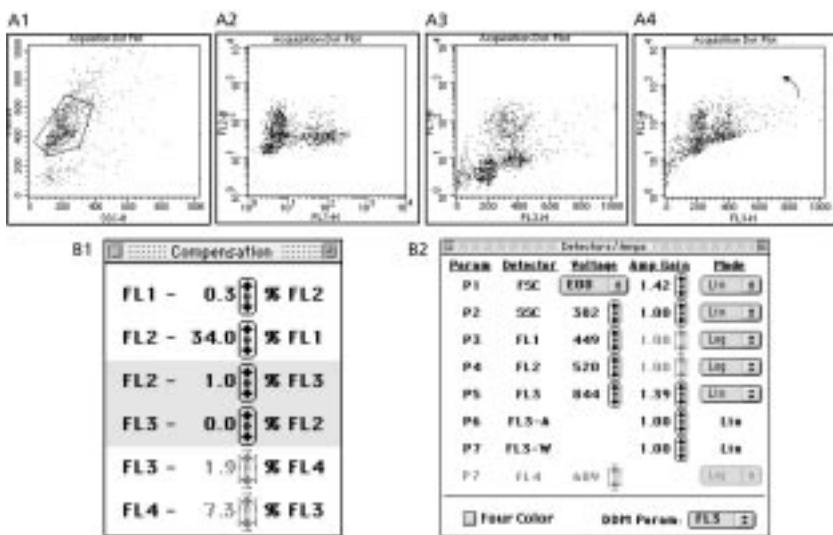


図8. PE (FL2) 蛍光の補正が不十分な場合の影響

この図は、PE anti-IL-10、FITC anti-BrdU、7-AADによる免疫蛍光染色を示す(細胞は図5で説明のように染色)。PE Igアインタイプ・コントロールに対するPMT電圧と補正設定が、PE anti-IL-10で染色したサイトカイン産生細胞の補正には不適當であったことを示す(パネル8.A1~A4)

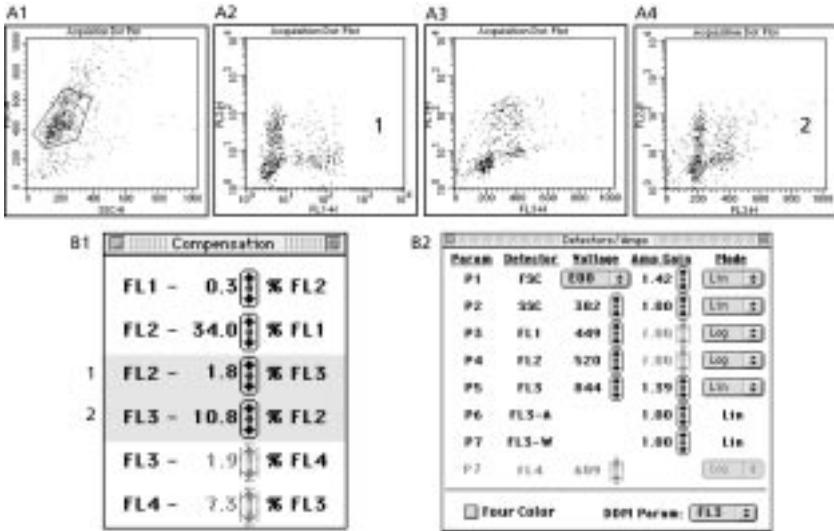


図9. PE(FL2)の蛍光補正の修正

この図は、FL2-%FL3(1)とFL3-%FL2(2)の蛍光補正後に、PE抗マウスIL-10で染色した図8の細胞を示す。FL2-%FL3の蛍光補正値を上げて、7-AAD(FL3)による蛍光のオーバーラップを補正することによって、細胞集団全体の平均FL2蛍光強度が減少した(1)。この調整によって、IL-10の細胞集団のFL2強度が1桁(MFI ≤ 10)に納まった。また、FL3-%FL2の蛍光補正値を上げることによって(図8.B1とパネル9.B1参照)図8.A4(2)に見られるPE anti-IL-10(FL2)の蛍光のオーバーラップが補正された。

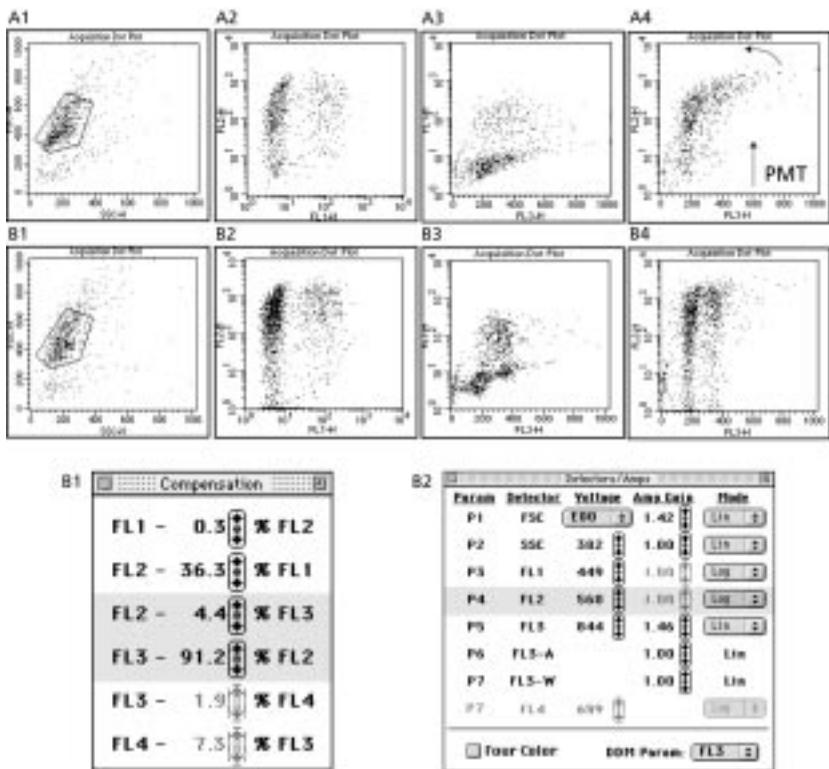


図10. PE(FL2)の蛍光強度の違いに対する補正の必要性

この図は、図5で説明した細胞と同様に、FITC anti-BrdU、7-AAD、PE anti-TNFで染色した細胞を示す。パネル10.A2～A4は、PE anti-IL-10で染色したサンプル(図9参照)に対する設定値を用いて解析したPE anti-TNF抗体の染色像を示す。TNF陽性細胞集団のFL2シグナルの強度は、PE抗マウスIL-10で染色した集団のシグナル強度に比べてはるかに強くなっている(パネル図9.A2およびパネル10.A2)。これらのデータは、異なる蛍光色素標識抗体で染色したサンプルでは、蛍光強度が変化するので補正設定値を調整する必要があることを示す。PE(FL2)シグナル強度が増加すると、TNF陽性細胞の蛍光のオーバーラップが大きくなるため、細胞集団の染色像の特徴が失われる(パネル10.A2～A4)。このサンプルのPE(FL2)の蛍光がログモードで取り込まれ、7-AAD(EL3)の蛍光がリニアモードで取り込まれていることから、TNF陽性細胞に関連した蛍光のオーバーラップの増加は、補正値の調整だけでは取り除けない。このサンプルでの蛍光オーバーラップの補正には2種類の調整が必要となる。まず、FL2のPMT電圧を上げて、FL2蛍光のオーバーラップを補正する。つぎに、EL3-%FL2とFL2-%FL3の設定値に対して、図7～9での説明と同様な調整を行う。修正後の設定値で得られたデータを、パネル10.B2～B4に示す。

留意: PMT電圧を変更した場合には、FL2-%FL1とFL1-%FL2の補正設定値を微調整する必要がある。

APC BrdU Instrument Set up

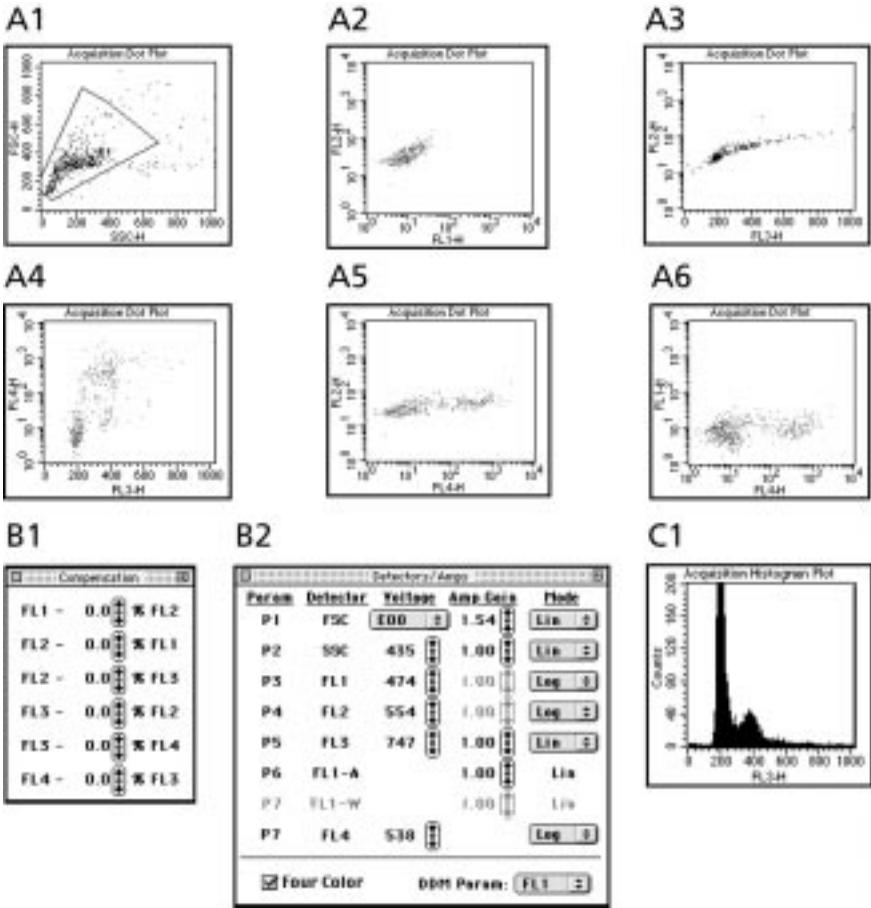


図11. 測定装置の初期設定

細胞をanti-BrdU APCで染色した場合、初期設定は、図5に示したFITC anti-BrdU標識の場合と非常によく似ている。ここに示す細胞は、FITCとPEのアイソタイプ・コントロール、および7-AADとAPC anti-BrdUのアイソタイプ・コントロールで染色している。この場合における重要な違いは、APC anti-BrdUが別のレーザーで検出されている点である。図11.A1では、目的の細胞集団の周りにゲート設定した典型的なSSC vs. FSC散乱光プロットを示す。FL3の検出器は、7-AADで染色した細胞のDNA含有量に関するデータを取り込むため、リニアモードに設定されている。FL3の調整については、図7で詳細に説明し、ここでは図11.B2に示す。図11.A4とA6に示すように、FL4電圧を上げることで、BrdU-細胞集団が蛍光強度の1桁以内に納まっている。図11.C1と11.A4に示すように、G0/G1細胞集団を、256リニアスケールの場合50、1024スケールの場合200に設定するように、FL3 PMT (7AADヒストグラム) を上げている。

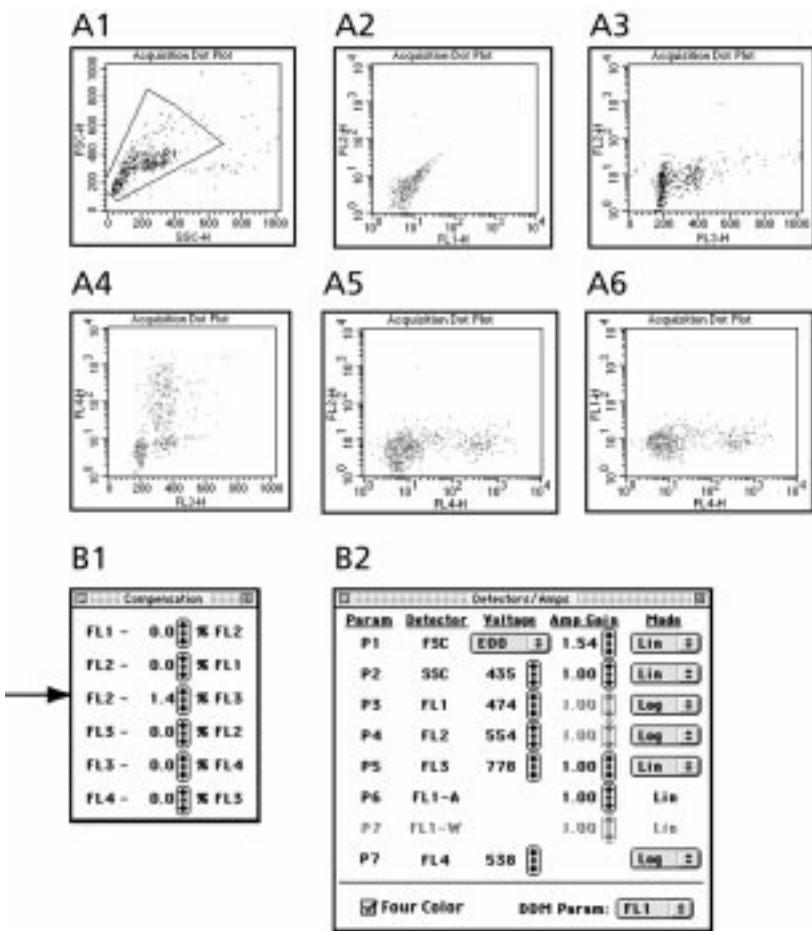


図12. PE標識の蛍光補正

FL3とFL4のPMT電圧の設定後、蛍光補正の調整を行なう。まず、FL2で測定されるPE標識からのシグナルが、FL4にわずかに漏れ込んでいる場合がある。FL4-%FL2については、直接的な蛍光補正ができない。これを調整するにはFL2-%FL3を利用する。この補正ツールでは、電圧を下げることなく、FL2シグナルを下げるができる。ここでも、FITCとPEアイソタイプ・コントロールを用いている。この例では、FL2-%FL3の蛍光補正を1.4に上げることによって、図11.A2、A3、A5と12.A2、A3、A5のFL2を比較して示されるように、7-AADによる蛍光のオーバーラップが解消されている。

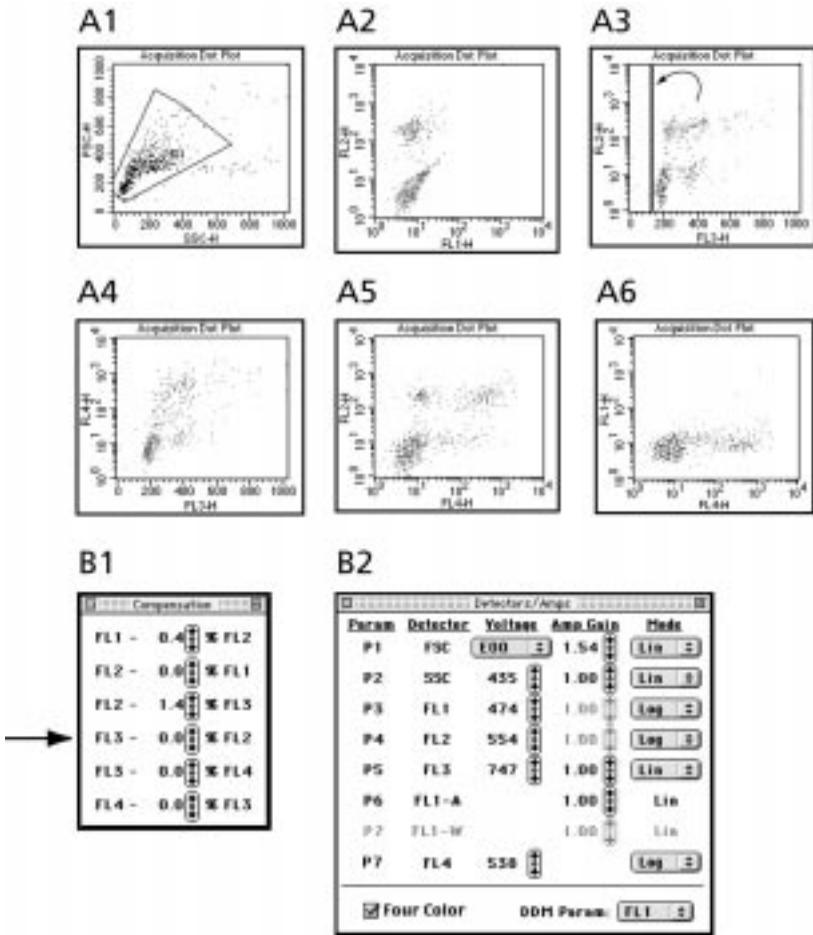


図13. PE (FL2) 陽性細胞集団を見る場合の蛍光補正不足の識別

PE (FL2) 陽性細胞集団を解析する場合、FL2とFL3の間の補正の調整が必要となる。この図は、PE anti-Ter-119 (カタログ番号: 553673) 7AAD、APC anti-BrdU、FITCアイソタイプ・コントロールで陽性に染色された細胞を示す。細胞がPEで明るく染色される場合に起こる蛍光のオーバーラップを解消するには、PE陽性細胞集団がY軸上で平行な陰性細胞集団の上に重なるように、FL3-%FL2を調整する必要がある。これは、BrdU/7AADの特徴の「蹄鉄」のような染色像を保持するために必要である。これらの調整の結果については、図14に示す。

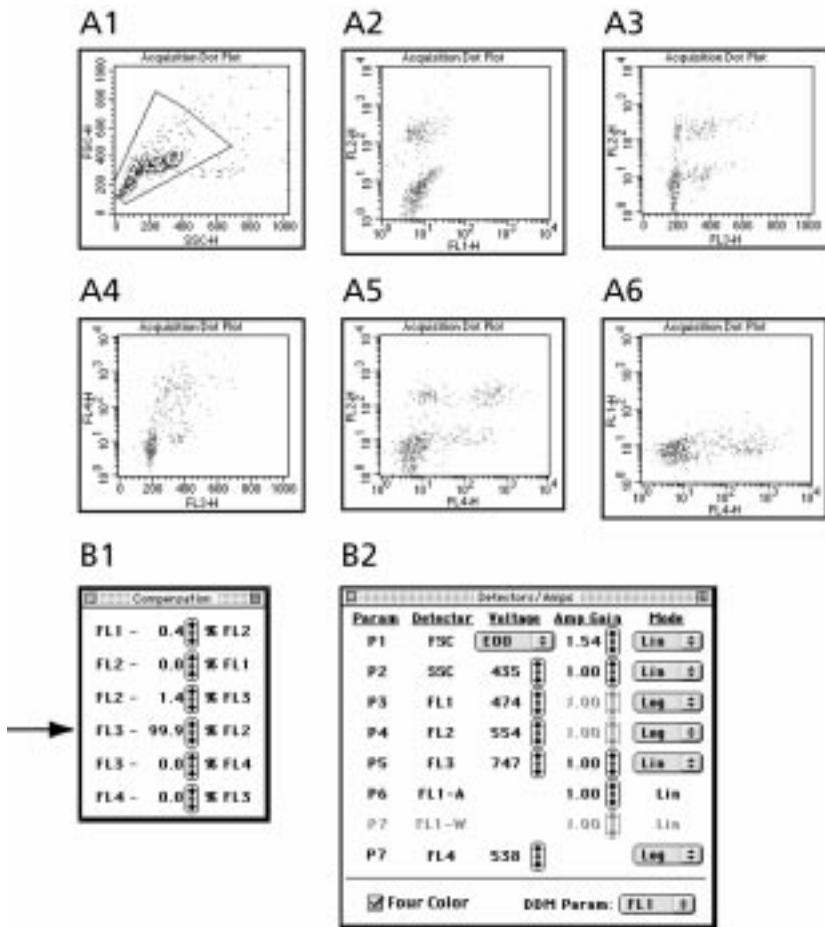


図14. PE (FL2) の蛍光補正修正後

図14.A3と13.A3の比較から見られるように、FL3-%FL2補正を調整することによって、PE陽性細胞集団がPE陰性細胞集団の上に重なっている。この結果、G0/G1期、S期、G2/M期の細胞集団が、APC anti-BrdU、7AADプロット、FL3 vs. FL4(図14.A4)で明瞭に示されている。

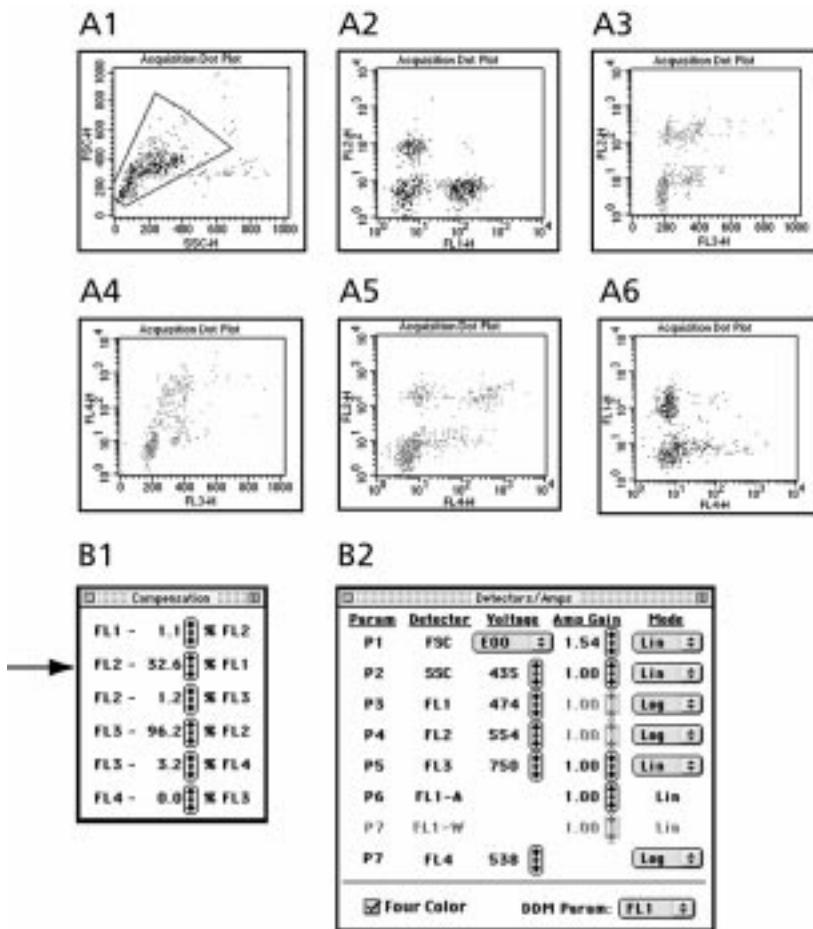


図15. FITC (FL2) の蛍光補正修正後

この図では、細胞がFITC anti-CD11b(カタログ番号: 557396)、PE anti-Ter-11(カタログ番号: 553673)、7AAD、APC anti-BrdUで染色されている。ここでは、FITCのオーバーラップをFL2から取り除く必要がある。FL2-%FL1補正を調整することによって、PE陽性細胞集団がPE陰性細胞集団に重なる。この補正は、FITC vs. PEの蛍光補正の基本で、それ以外の調整は必要ない。これまでの操作ですべてのパネルが補正され、取り込みが可能である。異なるPE抗体は他の抗体に比べて明るいため、FL2-%FL3とFL3-%FL2については、測定中さらに調整が必要となる場合がある。また、7AADのFL3シグナルがリニアモードで取り込まれることから、G0/G1蛍光像を「50」または「200」に維持するために、測定中に微調整が必要になることもある。FL3のPMTを増減した場合には、FL2-%FL3の補正を調整する必要がある。PE vs. 7AADの補正に関する詳細については、この説明書でのFITC補正のセクションを参照。

染色と解析のヒント

蛍光色素の選択

多くのBrdU染色法や細胞内染色プロトコールに比べて、BD Pharmingen BrdU Flow Kit染色法はマルチカラー免疫蛍光染色に適していますが、細胞表面抗原の免疫蛍光染色像は蛍光シグナル強度の違いによって影響を受ける場合があります。このシステムでは、APC標識抗体による蛍光シグナルがあまり影響を受けないのに対し、PE標識抗体で標識された細胞の蛍光シグナルは強く影響されます。この影響を解消もしくは最小限に抑えるために、低いレベルで発現したマーカーを染色する際には最大輝度のシグナルを発する蛍光色素を結合させた蛍光抗体を用いる必要があります。

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用いています。パラホルムアルデヒドを固定に使用すると、抗原のエピトープが変化し、固定後、抗体による認識が阻害される場合があります。この方法で蛋白の染色に用いる抗体試薬は、パラホルムアルデヒドで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)に対応した試薬は、BD Pharmingen BrdU Flow Kit染色法には使えない場合があります。BD Pharmingen™ 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については、付録のリストにまとめてあります。

FACSCaliburでのダブルレット除去と4カラー解析

FACSCalibur™ フローサイトメーターでは、4パラメータ FL1、FL2、FL3、FL4 を用いて、4種類の蛍光色素(蛍光抗体や核酸色素)の蛍光を励起・測定する4カラー解析が可能です。3チャンネルの蛍光データを取り込むことによって、ダブルレットの除去機能を利用することもできます。色素/蛍光抗体染色の検出に4つのパラメータすべてを使う場合には、ダブルレットの除去機能は使えません。

細胞切片でのBrdU解析

BD Pharmingen™ BrdU In-situ Detection Kit(カタログ番号: 551321、550803)は、凍結切片、ホルマリン固定のパラフィン包埋切片、およびスライド上の培養細胞または分離細胞で、BrdUの免疫組織化学染色を行なうためのものです。当社の抗BrdUモノクローナル抗体は、バックグラウンドを最小限に抑えながら目的物を特異的に染色できるように改良がなされています。BrdUに対するマウス抗体の直接ビオチン化により、種特異的な二次抗体が不要となり、マウス組織を含むすべての種に使用できます。BD Pharmingen™ BrdU In-situ Detection Kitには、抗原体の露出、組織形態の維持、BrdUを使用しながら他の表面抗原との同時染色ができるなど、特別にデザインされた当社のBD Retrieval A抗原回収溶液が含まれています。この特別な試薬によって、組織の微小環境での表現型が定義された細胞の増殖状態を研究することができます。パラフィン包埋や凍結切片、培養細胞などでのBrdU染色、また他の抗原と並行して行なうBrdU染色に関する総合的なプロトコールと、すべての重要な試薬を合わせて提供することによって、一貫性のある結果が保証されています。キットには、基準として用いる対照スライドが入っています。

付録

細胞内サイトカインのフローサイトメトリー用試薬

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のフローサイトメトリー解析用に、100テスト分のPE標識抗ヒト・サイトカインおよびケモカイン抗体を用意しています。この新しい試薬では、固定および膜浸透化処理細胞の免疫蛍光染色(20 µL/テスト)が最適となるように予め力価設定されており、安定した染色結果が保証されるとともに、測定の準備時間を短縮することができます。

Description	Clone	Isotype	Format	Size	Cat. No.
Human Cytokines and Chemokines					
IL-1α	364-3B3-14	Mouse IgG1, κ	PE	0.1 mg	554561
IL-2	MQ1-17H12	Rat IgG _{2a}	FITC	0.1 mg	554565
			PE	0.1 mg	554566
			PE	100 Tests	559334
			APC	0.1 mg	551383
IL-3	BVD3-1F9	Rat IgG ₁	PE	0.1 mg	554676
IL-4	MP4-25D2	Rat IgG ₁	FITC	0.1 mg	554484
			PE	0.1 mg	554485
			APC	0.1 mg	554486
			Alexa Fluor® 488	100 Tests	557727
			Alexa Fluor® 647	100 Tests	557738
IL-4	8D4-8	Mouse IgG ₁	PE	0.1 mg	554516
			PE	100 Tests	559333
IL-5	TRFK5	Rat IgG ₁	PE	0.1 mg	554395
			APC	0.1 mg	554396
IL-5	JES1-39D10	Rat IgG _{2a}	PE	0.1 mg	554489
			PE	100 Tests	559332
IL-6	MQ2-13A5	Rat IgG ₁	FITC	0.1 mg	554544
			PE	0.1 mg	554545
IL-6	MQ2-6A3	Rat IgG _{2a}	FITC	0.1 mg	554696
			PE	0.1 mg	554697
			PE	100 Tests	559331
GM-CSF	BVD2-21C11	Rat IgG _{2a}	PE	0.1 mg	554507
GRO	10G4.1	Mouse IgG ₁ , κ	PE	0.1 mg	555042
IFN-γ	B27	Mouse IgG ₁	FITC	0.1 mg	554700
			PE	0.1 mg	554701
			PE	100 Tests	559327
			APC	0.1 mg	554702
			Alexa Fluor® 488	100 Tests	557718
			Alexa Fluor® 647	100 Tests	557729
IFN-γ	4S.B3	Mouse IgG ₁ , κ	FITC	0.1 mg	554551
			PE	0.1 mg	554552
			PE	100 Tests	559326
IL-8	G265-8	Mouse IgG _{2b}	FITC	0.1 mg	554719
			PE	0.1 mg	554720
IL-10	JES3-9D7	Rat IgG ₁	PE	0.1 mg	554498
			PE	100 Tests	559337

Alexa Fluor® is a registered trademark of Molecular Probes, Inc., Eugene, Or.

Description	Clone	Isotype	Format	Size	Cat. No.
Human Cytokines and Chemokines (Continued)					
IL-10	JES3-19F1	Rat IgG _{2a}	PE	0.1 mg	554706
			PE	100 Tests	559330
			APC	0.1 mg	554707
IL-12 (p40/p70)	C11.5	Mouse IgG ₁	FITC	0.1 mg	554574
			PE	0.1 mg	554575
			PE	100 Tests	559329
			APC	0.1 mg	554576
IL-12 (p70)	20C2	Rat IgG ₁ , κ	PE	0.1 mg	557020
			PE	100 Tests	559325
IL-13	JES10-5A2	Rat IgG ₁	PE	0.1 mg	554571
			PE	100 Tests	559328
IL-16	14.1	Mouse IgG _{2a} , κ	PE	0.1 mg	554736
IP-10	6D4/D6/G2	Mouse IgG _{2a} , κ	PE	0.1 mg	555049
MCP-1	5D3-F7	Mouse IgG ₁	PE	0.1 mg	554666
			PE	100 Tests	559324
MCP-3	9H11	Mouse IgG ₁	PE	0.1 mg	555033
MIG	B8-11	Mouse IgG ₁ , κ	PE	0.1 mg	555039
MIP-1	11A3	Mouse IgG _{2a} , κ	PE	0.1 mg	554730
RANTES	2D5	Mouse IgG ₁	PE	0.1 mg	554732
			PE	100 Tests	559322
Thioredoxin	2G11/TRX	Mouse IgG ₁	FITC	0.1 mg	559968
TNF	MAb11	Mouse IgG ₁	FITC	0.1 mg	554512
			PE	0.1 mg	554513
			PE	100 Tests	559321
			APC	0.1 mg	554514
LT-α (TNF-β)	359-81-11	Mouse IgG ₁	PE	0.1 mg	554556
Mouse Cytokines and Chemokines					
IL-1	ALF-161	Hamster IgG	PE	0.1 mg	559810
IL-2	JES6-5H4	Rat IgG _{2b}	FITC	0.1 mg	554427
			PE	0.1 mg	554428
			APC	0.1 mg	554429
IL-3	MP2-8F8	Rat IgG ₁	PE	0.1 mg	554383
IL-4	BVD4-1D11	Rat IgG _{2b}	PE	0.1 mg	554389
IL-4	11B11	Rat IgG ₁	PE	0.1 mg	554435
			APC	0.1 mg	554436
IL-5	TRFK5	Rat IgG ₁	PE	0.1 mg	554395
			APC	0.1 mg	554396
IL-6	MP5-20F3	Rat IgG ₁	PE	0.1 mg	554401
IL-10	JES5-16E3	Rat IgG _{2b}	FITC	0.1 mg	554466
			PE	0.1 mg	554467
			APC	0.1 mg	554468
IL-12 (p40/p70)	C15.6	Rat IgG ₁	PE	0.1 mg	554479
			APC	0.1 mg	554480
IL-17	TC11-18H10	Rat IgG ₁ , κ	PE	0.1 mg	559502
GM-CSF	MP1-22E9	Rat IgG _{2a}	PE	0.1 mg	554406
IFN-	XMG1.2	Rat IgG ₁	FITC	0.1 mg	554411
			PE	0.1 mg	554412
			APC	0.1 mg	554413
MCP-1	2H5	Hamster IgG, κ	PE	0.1 mg	554443

Description	Clone	Isotype	Format	Size	Cat. No.
Mouse Cytokines and Chemokines (Continued)					
TNF	MP6-XT22	Rat IgG ₁	FITC	0.1 mg	554418
			PE	0.1 mg	554419
			APC	0.1 mg	554420
TNF	TN3-19.12	Hamster IgG	PE	0.1 mg	559503
Rat Cytokines and Chemokines					
IL-4	OX-81	Mouse IgG ₁ , κ	PE	0.1 mg	555082
IL-10	A5-4	Mouse IgG _{2b}	PE	0.1 mg	555088
IFN-g	DB-1	Mouse IgG ₁ , κ	FITC	100 Tests	559498
			PE	100 Tests	559499
GM-CS	B61-5	Mouse IgG ₁	PE	0.1 mg	555092
MCP-1	2H5	Hamster IgG, κ	PE	0.1 mg	554443
TNF	TN3-19.12	Hamster IgG	PE	0.1 mg	559503
Pig Cytokines and Chemokines					
IFN-γ	P2G10	Mouse IgG ₁	PE	0.1 mg	559812

Recombinant proteins useful as specificity controls for intracellular cytokine flow cytometry

Description	Format	Size	Cat. No.
Human			
IL-2	Standard	10 µg	554603
IL-3	Standard	10 µg	554604
IL-4	Standard	5 µg	554605
IL-5	Standard	5 µg	554606
IL-6	Standard	10 µg	550071
IL-8	Standard	20 µg	554609
IL-10	Standard	5 µg	554611
IL-16	Standard	5 µg	554637
GM-CSF	Standard	10 µg	550068
MIP-1	Standard	10 µg	554622
TNF	Standard	10 µg	554618
LT-a(TNF-b)	Standard	10 µg	554619

Mouse

IL-2	Standard	20 µg	550069
IL-3	Standard	10 µg	554579
IL-4	Standard	10 µg	550067
IL-5	Standard	5 µg	554581
IL-6	Standard	5 µg	554582
IL-10	Standard	10 µg	550070
GM-CSF	Standard	10 µg	554586
MCP-1	Standard	5 µg	554590
TNF	Standard	10 µg	554589

Rat

IL-4	Standard	5 µg	555107
IL-10	Standard	5 µg	555113
GM-CSF	Standard	5 µg	555111
MCP-1	Standard	5 µg	555110

Intracellular Cytokine-Positive Control Cells

Description	Cytokines Expressed	Cat. No.
Human		
HiCK 1	Positive for IL-2, IFN- γ , TNF	555061
HiCK 2	Positive for IL-3, IL-4, IL-10, IL-13, GM-CSF	555062
HiCK 3	Positive for IL-1, IL-1, IL-6, IL-12, TNF	555063
HiCK 4	Positive for IL-8, GRO- α , IP-10, MCP-1, MCP-3, MIG, MIP-1	555064

Mouse

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

Rat

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

Description	Clone	Format	Size	Cat. No.
Isotype Controls				
Mouse IgG1,	MOPC-21	FITC	0.1 mg	554679
		PE	0.1 mg	554680
		PE	100 Tests	559320
		APC	0.1 mg	554681
Mouse IgG2a,	G155-178	FITC	0.1 mg	554647
		PE	0.1 mg	554648
		PE	100 Tests	559319
Mouse IgG2b,	27-35	FITC	0.1 mg	555057
		PE	0.1 mg	555058
Rat IgG1	R3-34	FITC	0.1 mg	554684
		PE	0.1 mg	554685
		PE	100 Tests	559318
		APC	0.1 mg	554686
Rat IgG2a,	R35-95	FITC	0.1 mg	554688
		PE	0.1 mg	554689
		PE	100 Tests	559317
		APC	0.1 mg	554690
Rat IgG2b	A95-1	FITC	0.1 mg	556923
		PE	0.1 mg	556925
		APC	0.1 mg	556924
Hamster IgG	G235-2356	PE	0.1 mg	554711

Intracellular Cytokine Flow Cytometry Kits and Reagents

Description	Cat. No.
Kits	
BD Cytotfix/Cytoperm Kit	554714
BD Cytotfix/Cytoperm Kit (with BD GolgiStop)	554715
BD Cytotfix/Cytoperm Kit (with BD GolgiPlug)	555028
Human Intracellular Cytokine Staining Starter Kit	559302
Mouse Intracellular Cytokine Staining Starter Kit	559311
FITC BrdU Flow Kit	559619
APC BrdU Flow Kit	552598

Description	Clone	Format	Size	Cat. No.
Related Flow Cytometric Reagents and Buffers				

anti-BrdU	3D4	Purified	0.1 mg	555627
anti-BrdU		FITC Set	100 tests	556028
anti-BrdU		PE Set	100 tests	556029
BD Cytotfix/Cytoperm		Buffer	125 mls	554722
BD Perm/Wash Buffer (10 ×)			100 mls	554723
BD GolgiStop (containing monensin)			0.7 mL	554724
BD GolgiPlug (containing brefeldin A)			1.0 mL	555029
BD Cytotfix Buffer			100 mls	554655
BD Pharmingen Stain Buffer (FBS)			500 mls	554656
BD Pharmingen Stain Buffer (BSA)			500 mls	554657
BrdU Solution			25.0 mg	550891
7-AAD Staining Solution			2.0 mL	559925
Propidium Iodide Staining Solution			2.0 mL	556463

Related BrdU Products

BD Pharmingen BrdU <i>In-Situ</i> Detection Kit	50 tests	550803
BD Pharmingen BrdU <i>In-Situ</i> Detection Kit II	200 tests	551321

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. Dean, 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. Lakhanpal, S., N. J. Gonchoroff, J. A. Katzmann 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. Knüchel and F. Hofstädter. 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. Hafn. 1993. The life span of naive alpha/beta T cells in secondary lymphoid organs. *J. Exp. Med.* 177:891-896.

20. Schittek, 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.



日本ベクトン・ディッキンソン株式会社

〒960-2152 福島県福島市土船字五反田1

本社: 〒107-0052 東京都港区赤坂4-15-1 赤坂ガーデンシティ

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