



# Technical Bulletin

---

## DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System

カタログ番号 G3250

**注意：**

この日本語マニュアルは製品に添付される英文マニュアルを翻訳したものです。常に更新されるものではありません。最新の英文マニュアルについては以下のサイトをご覧ください。

<http://www.promega.com/tbs/tb235/tb235.pdf/>

A large, faint illustration of a dragonfly is positioned on the left side of the page, extending from the bottom towards the middle. The dragonfly is rendered in a light yellow color, matching the background, and is shown in profile, facing right. Its wings and body are detailed with a grid-like pattern.

[www.promega.co.jp](http://www.promega.co.jp)

作成日：2015年3月

# DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System

カタログ番号 G3250

## 目次

I.はじめに.....	1
II.キットの構成および保存条件.....	4
III.考慮が必要な事項.....	4
A. 光感受性.....	4
B. 安全性.....	4
IV.アッセイプロトコール.....	4
A. 接着細胞におけるアポトーシス分析の手順.....	4
B. パラフィン包埋された組織の前処理.....	6
C. フローサイトメトリーによる浮遊細胞の解析手順.....	7
D. 蛍光顕微鏡による浮遊細胞の解析手順.....	8
E. 陽性コントロールを作成するための DNase 処理の手順 (オプション).....	8
V.Camptothecin または Anisomycin で HL-60 細胞のアポトーシスを誘導するプロトコール.....	9
VI.困ったときには.....	12
VII.バッファーと試薬の組成.....	13
VIII.関連製品の紹介.....	14
IX.参考文献.....	16

## I. はじめに

DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System (カタログ番号 G 3250) は、細胞集団中のアポトーシス細胞の特異的な検出と定量を目的としたキットです。このキットは、単一細胞レベルや懸濁した細胞において、in situ でアポトーシスを起こした細胞を簡単・正確・迅速に non-RI により検出します。また、培養細胞、ホルマリン固定およびパラフィン包埋された組織切片を含むさまざまなサンプルのアポトーシスによる細胞死のアッセイに使用できます。DeadEnd™ Fluorometric TUNEL Systemは、多くの細胞種からのアポトーシスの重要な生化学的な目印となるDNAの断片化を測定します。

高次の真核生物のほとんどの細胞は、その細胞が必要とされなくなったとき、あるいはひどい損傷を受けたときに内在性の細胞自殺プログラムを活性化することにより自己破壊する能力を備えています。この正常な生理的過程は、プログラムされた細胞死と呼ばれています。アポトーシスという用語の由来は、膜のblebbing (泡状化)、核と細胞質の萎縮、染色体 (クロマチン) の凝縮を含む特定の形態学的特徴を含めて定義されました。最初に定義されたときから、アポトーシスはプログラムされた細胞死の生化学的および形態学的特徴と関連させるために、広く使われるようになりました。

アポトーシスにより死ぬ細胞は、膜結合型のアポトーシス小体に断片化され、炎症反応を引き起こすことなくそのままマクロファージや近隣の細胞に貪食・消化されます。これは、細胞の膨潤、クロマチンの凝集、細胞膜の機能性の喪失、細胞溶解および局在性の炎症反応を引き起こす壊死 (ネクローシス) として知られる細胞死と対照的です。

アポトーシスは、恒常性の発生と維持、神経系および免疫系の成熟において重要な役割を果たします。アポトーシスはまた、自己反応性のリンパ球、ウイルスに感染した細胞、および腫瘍細胞などの望まれない危険性を伴う細胞を除去する主要な防御機構です。アポトーシスの有用性と対照的に、アポトーシスの不適切な活性化は虚血性卒中に続くアルツハイマー病における神経細胞の損失と同様に AIDS におけるT細胞の大量死などの多様な病気のプロセスに寄与している可能性があります(1-8)。

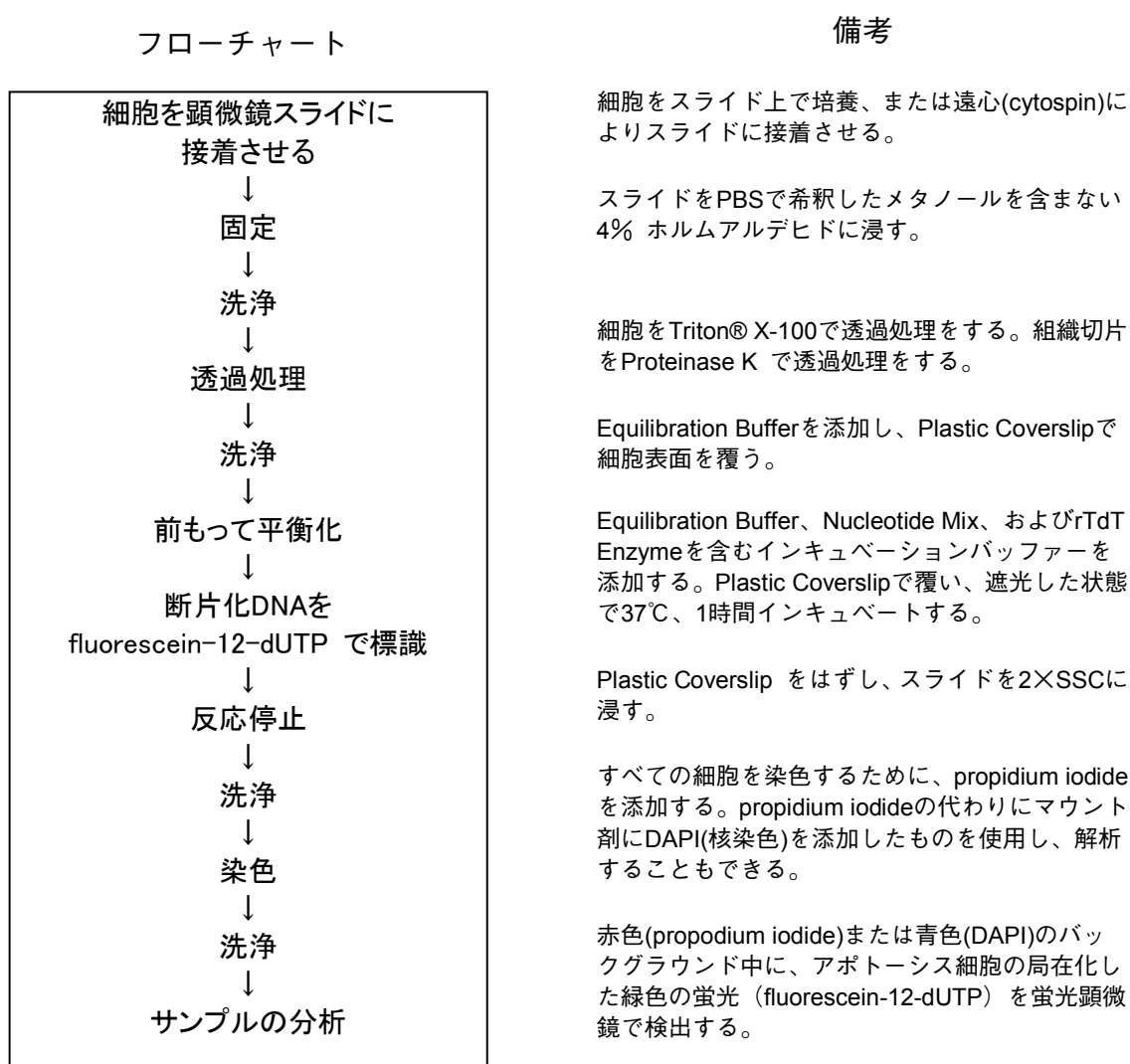
アポトーシスは遺伝的に制御されたプロセスで、そのメカニズムの側面のいくつかは、少なくとも部分的に進化の過程を通じて保存されています。アポトーシスを実行する基本的な機構は、

すべての哺乳類に本質的に存在します。しかし、アポトーシスのプロセスの活性化は、多くの生き残りシグナルと死シグナルの間のバランスにより制御されていると考えられています(9,10)。

多くの細胞種において、アポトーシスは、内在性のエンドヌクレアーゼの作用を介したDNA断片化を特徴としています(11-14)。アポトーシス細胞のDNAは、オリゴヌクレオソームのサイズに対応する180~200bp断片のマルチマーとして切断されます。したがって、アポトーシス細胞のDNAは一般的に180~200pbマルチマーのラダーとしてアガロースゲルで泳動されます。一本鎖DNAの切断が起きることも報告されています(15)。

## アッセイの原理

DeadEnd™ Fluorometric TUNEL Systemでは、リコンビナントのTerminal Deoxynucleotidyl Transferase(rTdT)を使ってDNAの3'-OH末端にfluorescein-12-dUTP<sub>(a)</sub>を取り込ませることによってアポトーシス細胞におけるDNAの断片化を測定します。TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling) アッセイの原理は、rTdTのテール重合反応を利用しています。fluorescein-12-dUTPで標識化されたDNAは、蛍光顕微鏡による観察(図1)やフローサイトメトリーによる定量(図2 および 3)が可能になります。



**図 1. DeadEnd™ Fluorometric TUNEL Systemを用いた、接着細胞の蛍光顕微鏡による観察のプロトコールの概要**

## II. キットの構成成分および保存条件

製品	サイズ	カタログ番号
DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System	60回分	G 3250

次の試薬が含まれます。

- 9.6ml Equilibration Buffer
- 300µl Nucleotide Mix (6 × 50µl)
- 3x20µl TdT (Terminal deoxynucleotidyl Transferase) Enzyme (3 × 600u)
- 70ml 20X SSC
- 10mg Proteinase K
- 60 Plastic Coverslips

**保存条件：**Equilibration Buffer、rTdT EnzymeおよびProteinase Kは、-15~-20°Cで保存する。Nucleotide Mixは遮光条件下で-15~-20°Cで保存する。すべての構成成分は、凍結融解の繰り返しを避けてください。20XSSCは、一度融解したあとは室温で保存してください。

キットに付属のProteinase Kは、使用前に1mlのProteinase K buffer（セクション VII を参照）で溶解する。Bufferで溶解して調製したProteinase K solutionの濃度は、10mg/mlです。調製後のProteinase K solutionは、分注して-20°Cで6ヶ月保存できます。

## III. 考慮が必要な事項

### A. 光感受性

キットに含まれるNucleotide Mixは光感受性です。Nucleotide Mix は、Nucleotide Mix を含む反応液、スライドと同様に遮光してください。

### B. 安全性

Equilibration Buffer にはカコジル酸カリウム（ジメチルアルシン酸）が含まれます。皮膚や目に触れないように気をつけてください。この試薬を操作するときは手袋と防護眼鏡を着用してください。

## IV. アッセイプロトコール

アッセイを実施する準備が十分整っていることを確認するために、DeadEnd™ Fluorometric TUNEL Systemを使用した実験をはじめる前に下記のマニュアルすべてに目を通してください。溶液の組成はセクション VII にあります。

### 準備するもの

- リン酸緩衝液（PBS）
- propidium iodide（Sigma、カタログ番号 P4170）
- オプション：SlowFade® Light Anti-Fade Kit（Molecular Probes、カタログ番号 S746 1）、またはVECTASHIELD®（Vector Labs、カタログ番号 H- 1000）
- オプション：VECTASHIELD®+DAPI（Vector Labs、カタログ番号 H- 1200）

### 培養細胞用として追加で準備するもの

- 1% メタノールフリー ホルムアルデヒド\* (Polysciences、カタログ番号 18814)、PBS 希釈
- 4% メタノールフリー ホルムアルデヒド\* (Polysciences、カタログ番号 18814)、PBS 希釈

**Note:** パラホルムアルデヒドの代わりに、メタノールフリーホルムアルデヒドを使用することもできます。

- 70% エタノール
- 0.2% Triton® X-100 溶液（PBS 希釈）
- 0.1% Triton® X-100 溶液（PBS 希釈、5mg/ml BSA を含む）
- DNase I（例えば、RQ1 RNase-Free DNase、カタログ番号 M6101）
- 20mM EDTA（pH 8.0）
- DNase buffer
- DNase-free RNase A

## パラフィン包埋組織切片用として追加で準備するもの

- 4% メタノール-フリー ホルムアルデヒド\* (Polysciences、カタログ番号 18814)、PBS 希釈

**Note:** パラホルムアルデヒドの代わりに、メタノールフリーホルムアルデヒドを使用することもできます。

- キシレン
- エタノール：脱イオン水中に100%、95%、85%、70%、および50%となるように脱イオン化水で希釈
- 0.85% NaCl 溶液
- Proteinase K buffer
- DNase I
- DNase I buffer

## 準備する機器

### 接着培養細胞と組織切片の場合

- ポリ-L- リジンコートまたはシラン化した顕微鏡用のスライド。例えば、Poly-Prep™ Slides (Sigma、カタログ番号 P0425) またはその他の適切に前処理したスライド。例えば、Superfrost® Plus Glass Slides (Fisher、カタログ番号 12- 550-15)、または Lab-Tek® Chamber Slides (Nunc、カタログ番号 177380)
- セルスクレイパー
- コプリンジャー (オプションの DNase I 処理の陽性コントロールを行う場合には、専用のコプリンジャーが必要です)
- ピンセット
- 顕微鏡スライド用の湿式チャンバー
- 37°C インキュベーター
- マイクロピペッター
- ガラスカバースリップ
- ゴム系接着剤またはマニキュア
- 蛍光顕微鏡

### 細胞懸濁液の場合

- 卓上遠心機
- 37°C のインキュベーターまたは 37°C のウォーターバス
- ポリ-L- リジンコートまたはシラン化した顕微鏡用のスライド。例えば、Poly-Prep™ Slides (Sigma、カタログ番号 P0425) またはその他の適当な処理がされたスライド。例えば、Superfrost® Plus Glass Slides (Fisher、カタログ番号 12- 550-15)
- コプリンジャー (オプションの DNase I 処理の陽性コントロールを行う場合には、専用のコプリンジャーが必要です)
- ピンセット
- ガラスカバースリップ
- 顕微鏡スライド用の湿式チャンバー
- マイクロピペッター
- フローサイトメトリーまたは蛍光顕微鏡

## A. 接着細胞におけるアポトーシス分析の手順

### スライドの準備

すべての実験サンプルと同様に適切な陽性コントロールおよび陰性コントロールを行うために十分なポリ-L-リジンコートしたスライドを準備する。

**ポリ-L-リジンコートしたスライドの準備:** 50–100µlの0.01% (w/v) ポリ-L-リジン水溶液 (Sigma、カタログ番号 P9155 (凍結乾燥品) またはSigma、カタログ番号 P8920 (0.1%溶液のためD.W.で10倍希釈する)) を各洗浄したガラススライドの表面にピペティングにより載せる。細胞を固定するために使う領域の端々までポリ-L-リジンを薄く伸ばす。このスライドが乾燥したらすぐに、D.W.でリンスし、30~60分間の風乾を行う。ポリ-L-リジンコートしたスライドは常温で数ヶ月間保管することができます。

スライドに付着した付着細胞の調製: Lab-Tek<sup>®</sup>チャンバースライドの上で細胞を培養させる。アポトーシスを誘導するために実験コントロールに処理を行った後、スライドをPBSで2回洗浄し、以下のDeadEnd<sup>™</sup> Fluorometric TUNEL Systemのプロトコールにしたがって直接処理する。

### アポトーシスの検出

1. 新たに調製した 4% メタノールフリー ホルムアルデヒド溶液 (PBSに希釈、pH7.4) を入れたコプリングジャーにスライドを4℃で25分間浸し、細胞を固定する。

**Note:** パラホルムアルデヒドを直接メタノール-フリーホルムアルデヒドに代えて使うこともできます。

2. 未使用のPBSにスライドを室温で5分間浸し、洗浄する。洗浄操作をもう一回繰り返す。

**Note:** ステップ 2 の終了後、スライドは-20℃ で 70 % エタノール中、または 4℃でPBSに2週間まで保管できます。

3. PBSに希釈した0.2%Triton<sup>®</sup> X-100溶液にスライドを5分間浸して、細胞を透過処理する。

4. 未使用のPBS にスライドを室温で5分間浸し、リンスする。PBSによるリンスの操作をもう一回繰り返す。

**Note:** オプションの陽性コントロールスライドは、ステップ 4 で DNA の断片化を生じさせるためにDNase I 処理することにより調製できます。DNase I 処理のプロトコールはセクション IV.E をご覧ください。

5. スライドを軽くたたいて余分な液体を除く。100μl の Equilibration Buffer を加え、細胞を覆う。室温で 5 ~ 10 分間の平衡化を行う。

6. 細胞の平衡化を行っている間に、氷上で Nucleotide Mix を融解し、表1 にしたがって全ての実験およびオプションの陽性コントロール反応に十分なrTdTインキュベーションバッファーを調製する (セクション IV.E を参照)。必要なrTdTインキュベーションバッファーの総量を決定するために、実験および陽性コントロール反応数を50μl (5cm<sup>2</sup> 以下の標準反応の容量) に乗じる。より大きな表面積のサンプルでは、試薬の量を比例して増加させる。

**Note:**Nucleotide MixとrTdTインキュベーションバッファーは、遮光した状態で氷上に置いてください。

表1 実験サンプル数および陽性コントロール反応(オプション)のrTdT インキュベーションバッファーの調製

バッファー構成成分	標準反応液50μl あたりの の液量		反応数 (実験サンプル数+オプションの陽性コントロール)		それぞれの液量
Equilibration Buffer	45μl	×	_____	=	_____μl
Nucleotide Mix	5μl	×	_____	=	_____μl
rTdT Enzyme	1μl	×	_____	=	_____μl
<b>rTdT インキュベーションバッファーの総液量= _____μl</b>					

**陰性コントロールについて:** rTdT Enzymeを加えないコントロールインキュベーションバッファーを、45μlのEquilibration Buffer、5μlのNucleotide Mix、1μlの滅菌した D.W.で調製する (陰性コントロールインキュベーションバッファーの最終容量は1回の50ul標準反応に十分です。) 陰性コントロールは、ステップ7~16にしたがって処理する。

**陽性コントロールについて:** 陽性コントロールを必要とする場合、陽性コントロールスライドの調製のプロトコールがセクションIV.Eにあります。陽性コントロール専用のコプリングジャーを用意してください。

7. ティッシュペーパーで平衡化した領域の周りを吸い取り、5cm<sup>2</sup>の領域上の細胞に50μlのrTdTインキュベーションバッファーを加える。細胞が乾燥しないように注意する。

**Note:** プラスティックカバースリップは使用前に半分に切ることも出来ます。カバースリップのエッジを折ると除去や操作が簡単です。

！注意:ステップ7以降の操作は、光が当たらないように注意してください。

8. 試薬が均等に行き渡るようにプラスチックカバースリップで細胞を覆う。水で湿らせたペーパータオルを湿式チャンバーの底に置く。テーリング反応を行うために湿式チャンバー内にスライドをおき、37°Cで60分間インキュベートする。直射光を避けるためにチャンバーをアルミホイルで覆う。

9. 20×SSCを脱イオン水で10倍希釈し、標準的なコプリンジャー（40ml）を満たすだけの2×SSCを加える。プラスチックカバースリップを取り除き、スライドを2×SSCが入ったコプリンジャーに室温で15分間浸して反応を停止する。

！注意: 希釈前に20×SSCの塩類すべてが溶解していることを確認してください。

10. 新しいPBSを用いてサンプルを室温で5分間浸して洗浄する。同じ操作をさらに2回繰り返す（合計3回）、取り込まれなかったfluorescein-12-dUTPを除く。

11. 新たにPBSで1μg/mlに希釈した40mlのpropidium iodide溶液の入ったコプリンジャーサンプルを浸し、暗所で室温、15分間染色する。

**オプション:** Propidium iodideによる染色を省略する代わりに、オプションとして、核を染色するために、マウント剤に溶解したDAPI+VECTASHIELD® (Vector Labs、カタログ番号 H-1200) を用い、スライドにカバースリップを覆い、ステップ16へ進むことができます。

12. 脱イオン水にスライドを室温で5分間浸してサンプルを洗浄する。同じ操作をさらに2回繰り返す（合計3回）。

13. 余剰の脱イオン水をスライドから落とし、ティッシュペーパーで細胞の周りを拭う。

14. ステップ16にしたがってサンプルをすぐに分析する。または、処理した細胞を含む部分にAnti-Fade solution (Molecular Probes、カタログ番号 S74 61) を1滴落とし、ガラスカバースリップを使ってスライドをマウントする。

15. ガラスカバースリップの端を接着剤またはマニキュアで密封し、5～10分間乾燥させる。

16. フルオレセイン標準フィルターセットを用いてフルオレセインの緑色の蛍光を520±20nmで観察し、サンプルを即座に蛍光顕微鏡で分析する。>620nmでpropidium iodideの赤色の蛍光、460nmでDAPIの青色の蛍光を観察する。必要に応じて、スライドは4°Cで遮光して一晩保存できます。

**Note:** Propidium iodideはアポトーシス細胞と正常細胞の両方を赤色に染色します。

Fluorescein-12-dUTPは、断片化されたDNAの3'-OH末端に組み込まれ、アポトーシス細胞の核内に局在した緑色の蛍光が示されます。

## B. パラフィン包埋された組織の前処理

組織切片は様々な手法による切片作製のためにホルマリン固定およびパラフィン包埋を行います。標準的なプロトコールは参考文献17にあります。

1. 未使用のキシレンを入れたコプリンジャーに室温で5分間、組織切片（顕微鏡のスライドに接着したもの）を浸し、脱パラフィンする。もう一度繰り返す（合計2回、キシレンで洗浄する）。

2. 100% エタノールを入れたコプリンジャーにスライドを浸し、室温で5分間洗浄する。

3. エタノール（100%、95%、85%、70%、50%）に室温でそれぞれ3分間ずつ段階的に連続して浸し、サンプルを再水和する。

4. スライドを0.85% NaClに浸し、室温で5分間洗浄する。

5. スライドをPBSに浸し、室温で5分間洗浄する。

6. スライドをPBS希釈4% メタノールフリーホルムアルデヒド\*溶液に浸し、室温で15分間組織切片を固定する。

**Note:** パラホルムアルデヒドを直接メタノールフリーホルムアルデヒドに代えて使うこともできます。

7. スライドをPBSに浸し、室温で5分間洗浄する。同じ操作をもう一回繰り返す（合計2回のPBS洗浄を行う）。

8. 組織から液体を除き、平らな面にスライドを置く。再溶解したProteinase K（10mg/ml;セクションIIを参照）から20μg/ml Proteinase K溶液を調製する。組織切片を覆うように100μlの20μg/ml Proteinase Kをそれぞれのスライドに加える。スライドを室温で8～10分間インキュベートする。

**Note:** Proteinase Kは、次に行うステップで組織や細胞を染色試薬に対して浸透化するために役立ちます。最適な結果を得るために、Proteinase Kによるインキュベーション時間を最適化してください。4~6μmよりも厚い組織切片ではより長いインキュベーション時間が必要となるかもしれません。しかし、Proteinase Kのインキュベーションが長くなると、以降の洗浄ステップにおいてスライドから組織切片が剥離する場合があります。

9. PBSの入ったコプリングジャーにスライドを浸し、室温で5分間サンプルを洗浄する。
10. 洗浄後、PBS希釈4%メタノールフリーホルムアルデヒド溶液にスライドを浸し、室温で5分間組織切片を固定する。
11. PBSにサンプルを浸し、室温で5分間洗浄する。

**Note:** オプションの**陽性コントロールスライド**は、ステップ11でDNAの断片化を生じさせるDNase Iで処理することにより調製できます。DNase I処理のプロトコールは、セクションIV.Eをご覧ください。

12. セクションIV.Aのステップ5~16にしたがい、これらの前処理を行った組織切片を解析します。

**Note:** 組織切片の解析には、位相差顕微鏡の使用を推奨します。

### C. フローサイトメトリーによる浮遊細胞の解析手順

1. 4℃の遠心(300×g)によりPBSで3~5×10<sup>6</sup>個の細胞を2回洗浄し、0.5mlのPBSに懸濁する。
2. 5mlの1%メタノールフリーホルムアルデヒド\*を加え、氷上に20分間置くことにより細胞を固定する。

**Note:** パラホルムアルデヒドを直接メタノールフリーホルムアルデヒドに代えて使うこともできます。

3. 300×gの遠心を4℃で10分間行い、上清を除いたあと、5mlのPBSに懸濁する。同じ操作をもう一回行い、0.5mlのPBSに懸濁する。
4. 細胞懸濁液を5mlの70%氷冷したエタノールに加え、-20℃に少なくとも4時間置く。

**Note:** 細胞は-20℃で冷却した70%エタノール中で少なくとも1週間は保存できます。別の方法として、ステップ3の後に細胞を0.2%Triton<sup>®</sup>X-100溶液を用いて氷上で5分間透過処理することも出来ます。

5. 細胞を300×g、10分間遠心して上清を除き、5mlのPBSに懸濁する。もう一度遠心を行い、1mlのPBSに懸濁する。
6. 2×10<sup>6</sup>個の細胞を1.5mlの遠心マイクロチューブに移す。
7. 300×gで10分間遠心して上清を除いたあとのペレットを80μlのEquilibration Bufferに懸濁する。室温で5分間インキュベートする。
8. 細胞を平衡化している間に、Nucleotide Mixを氷上で融解し、表2にしたがってすべての反応に対して十分量のrTdTインキュベーションバッファを調製する。2×10<sup>6</sup>個の細胞を用いた標準反応液量である50μlに反応させる検体数を乗じて、必要なrTdTインキュベーションバッファの量を算出する。

**Note:** Nucleotide MixとrTdTインキュベーションバッファは、遮光して氷上に保存してください。

**表2 実験サンプルのrTdT インキュベーションバッファの調製**

バッファ構成成分	標準反応液50μl あたりの液量	反応数 (実験サンプル数+オプションの陽性コントロール)	それぞれの液量
Equilibration Buffer	45μl	×	_____ μl
Nucleotide Mix	5μl	×	_____ μl
rTdT Enzyme	1μl	×	_____ μl
rTdT インキュベーションバッファの総液量=			_____ μl



**陰性コントロールについて:** 45µlのEquilibration Buffer、5µlのNucleotide Mix、1µlの滅菌した脱イオン水を混ぜて、rTdT Enzymeを含まないコントロールのインキュベーションバッファーを調製する（陰性コントロールインキュベーションバッファーの最終容量は、1回の50µlの標準反応に十分です）。陰性コントロールは、ステップ9~14にしたがってください。

9. 300×gで10分間遠心して上清を除いたペレットを50µlのTdTインキュベーションバッファーに懸濁する。遮光し、37°Cのウォーターバスで60分間インキュベートする。マイクロピペッターで15分おきに懸濁する。

**！注意:** ステップ9の完了後は、スライドが光にあたらないようにしてください。

10. 1mlの20mM EDTAを加えて、反応を停止する。穏やかにボルテックスする。
11. 300×gで10分間遠心して上清を除き、5mg/ml BSAを含む1mlのPBS希釈0.1% Triton® X-100溶液に懸濁する。同じ操作をもう一回繰り返す（合計2回）。
12. 300×gで10分間遠心して上清を除いた細胞のペレットを250µgのDNase-free RNase Aを含む0.5 mlのpropidium iodide溶液（5µg/mlとなるようにPBSで新たに希釈する）に懸濁する。
13. 遮光して室温で30分間、インキュベートする。
14. フローサイトメトリーで細胞を解析する。fluorescein-12-dUTPの緑色蛍光は520±20nmで、propidium iodideの赤色蛍光は>620nmで測定する。

**Note:** Propidium iodideはアポトーシス細胞と正常細胞の両方を赤色に染色します。  
Fluorescein-12-dUTPは、アポトーシス細胞の核内に局在した緑色の蛍光が示されます。

#### D. 蛍光顕微鏡による浮遊細胞の分析手順

適切な培地で浮遊細胞を培養する。アポトーシスを誘導するためのコントロールおよび実験処理に続いて、細胞を300×g、4°Cで10分間遠心し、細胞を吸引しないように注意しながら培養培地を除く。上記のように遠心によりPBSで細胞を洗浄し、約 $2 \times 10^7$ 個/mlとなるようにPBSに再懸濁する。50~100µlの細胞懸濁液をポリ-L-リジンコートしたスライドかシラン化した顕微鏡用スライドにピペティングする。細胞懸濁液を穏やかに清潔なスライドの面に塗る。セクションIV.Aに記載されているようにアポトーシス細胞を解析する。セクションIV.Aに記載されているように浮遊細胞の遠沈したサンプルを調製・分析することもできます。

#### E. 陽性コントロールを作成するためのDNase処理手順（オプション）

DNAの断片化を検出するための**陽性コントロール**は、以下の記述に従って接着細胞や組織で作成する。接着細胞では、セクションIV.Aのステップ1~4にしたがう。ステップ4の後、以下の概要に沿って細胞をDNase Iで処理し、陽性コントロールのスライドを調製する。パラフィン包埋組織では、セクションIV.Bのステップ1~11にしたがい、陽性コントロールはステップ11にしたがって準備する。

**Note:** 固定した細胞のDNase I処理により染色体DNAの断片化が起こる。その結果、fluorescein-12-dUTPを取り込むことができる3'-OHのDNA末端が数多く生じる。以下に概要を示したプロトコールでは、通常処理した細胞のほとんどが緑色の蛍光を示す。

1. 100µlのDNase Iバッファー（セクションVII）を固定した細胞に加え、室温で5分間インキュベートする。
2. 軽くたたいて溶液を落とし、5.5~10units/mlのDNase Iを含む100µlのDNase I(カタログ番号 M6101, RQ1 RNase-Free DNase、その他のメーカーのDNase Iを使用するときは、最適化が必要)バッファーを加える。室温で10分間インキュベートする。
3. スライドを軽くたたいて余分な液体を落とし、陽性コントロール用の脱イオン水が入ったコプリンジャーでスライドを3~4回よく洗浄する。
4. セクションIV.Aのステップ5~16にしたがい、陽性コントロール用のコプリンジャーを使って処理する。

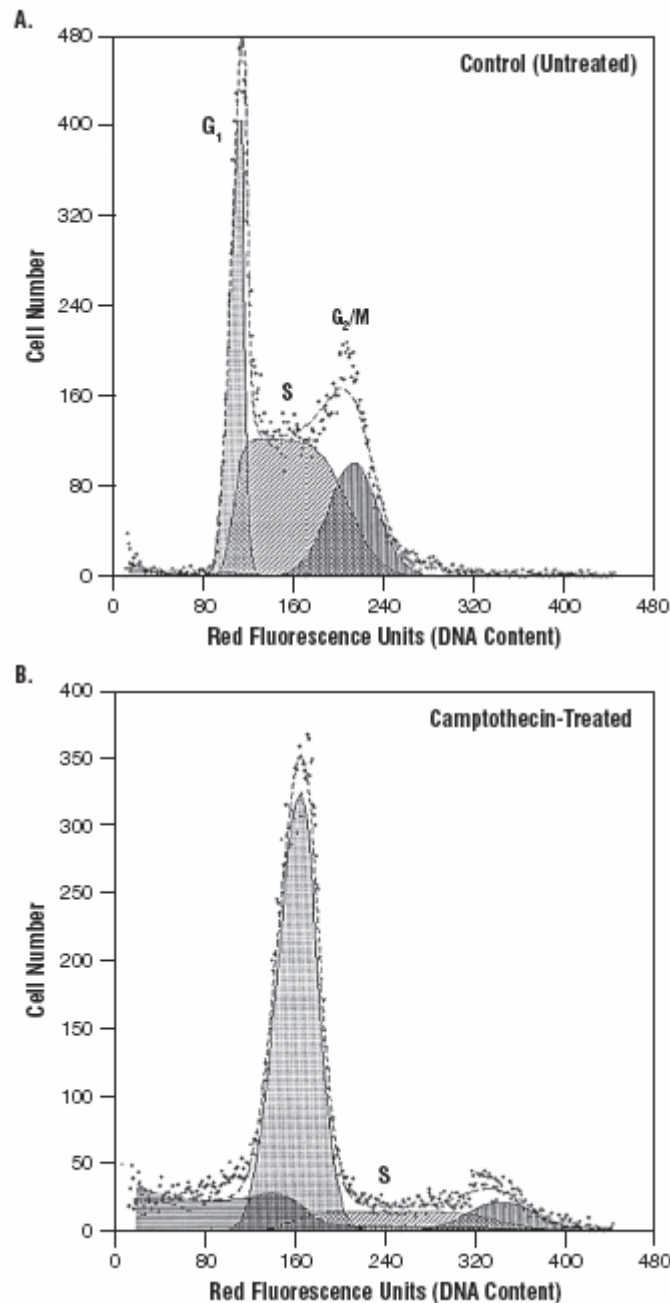
**Note:** 陽性コントロールのスライドに由来するDNase I活性により、実験用スライドで高いバックグラウンドが生じる可能性があるため、陽性コントロール用に別のコプリンジャーを使うことが重要です。

**生物学的な陽性コントロール用:** さまざまな手法によりアポトーシスを誘導することができます。

- anisomycin (タンパク質合成阻害剤など) や camptothecin (DNA topoisomerase I 阻害剤) で細胞を処理することにより、ヒトの前骨髄細胞由来細胞株HL-60にアポトーシスを誘導できます (18-20; セクションVを参照)。
- 成長因子に依存した細胞株については、成長因子を除くことにより、アポトーシスを誘導できます。例えば、PC12や交感神経ニューロンの培養からNGFを剥奪するとアポトーシスが誘導されます(22)。
- 糖質コルチコイドやデキサメタゾンを *in vitro* で処理することにより、マウス胸腺リンパ球にアポトーシスが誘導されます(16, 23)。
- FasまたはTNF受容体を有する細胞は、各受容体に対応するリガンドにより活性化されます。また、アゴニスト抗体により交差結合することで、これらの細胞のアポトーシスを誘導することができます(24)。

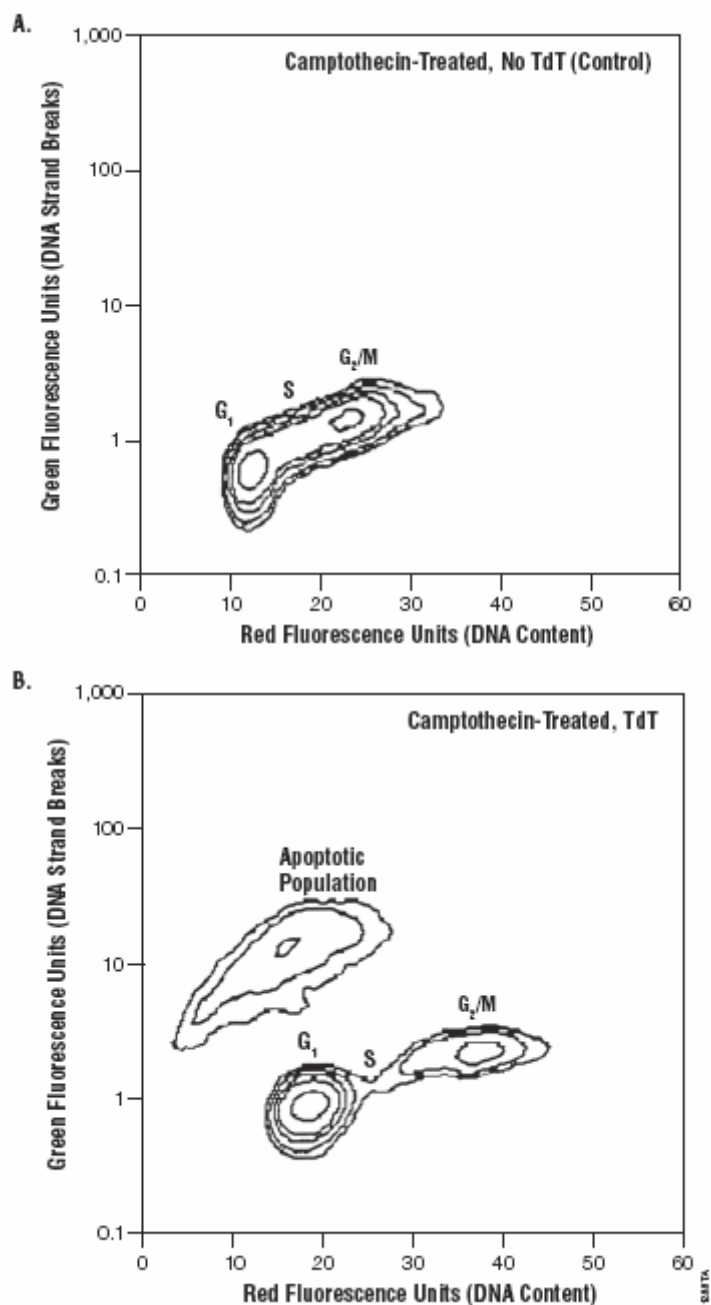
## V. CamptothecinまたはAnisomycinを用いたHL-60 細胞のアポトーシス誘導のプロトコル

1. 10%仔ウシ血清、2mMグルタミン、1%ペニシリンおよびストレプトマイシンを含むRPMI1640 培地を用いて、37°Cの湿式CO<sub>2</sub>インキュベーターでHL-60細胞を培養する。
  2. 細胞密度を6×10<sup>5</sup>個/ml に合わせる。camptothecin 処理では、0.2μg/mlの最終濃度(DMSO に溶解されたストック溶液) を用い、湿式 5%CO<sub>2</sub> インキュベーターで37°C、5時間培養する。anisomycin処理では、2μg/mlの最終濃度(DMSOに溶解したストック溶液) を用い、湿式 5% CO<sub>2</sub>インキュベーターで37°C、2時間培養する。陰性コントロールの細胞は、阻害剤を含まない同じ量のDMSOで処理し、同じ条件下でインキュベートする。
  3. 細胞を回収し、セクションIV.C に記載されているステップ1~14にしたがって、フローサイトメトリーによる懸濁液中の細胞のアポトーシス分析を行う。
- 図2と3は、コントロールとcamptothecin 処理された細胞で生成されたデータです。



**図 2. camptothecinでアポトーシスを誘導したHL-60 細胞のフローサイトメトリーによる分析**

HL-60 細胞は、camptothecinの存在下（あるいは非存在下）で培養した。断片化されたDNAは、セクションIV.Cの『フローサイトメトリーによる懸濁液中の細胞のアポトーシス分析』の記述にしたがって標識された（EPICS<sup>®</sup> Profile II, Beckman Coulter, Inc.）。コントロール（未処理）HL-60細胞（上）およびcamptothecin処理HL-60細胞（下）のDNA分布頻度ヒストグラムが示されている。細胞周期はMulti Cycleソフトウェア（Phoenix Flow System）を用いて分析した。DNA量の分析はElite<sup>™</sup>ソフトウェアを用いて実施した（Beckman Coulter, Inc.）。



**図 3. HL-60細胞のTdT Enzyme存在下（下）および非存在下（上）におけるcamptothecinによるアポトーシスの検出**

図2の記述にあるようにフローサイトメトリー分析を実施した。断片化されたDNAはElite™ソフトウェア（Beckman Coulter, Inc.）を使って分析した。

## VI. 困ったときには・・・

ここに記載のない疑問点については、プロメガテクニカルサービスまでお問い合わせください。

E-mail : [prometec@jp.promega.com](mailto:prometec@jp.promega.com)

症状	原因および改善点
バックグラウンドが高い（アポトーシスを起していない細胞でも強い緑色蛍光のバックグラウンド染色が見られる）	<p>fluorescein-12-dUTP の非特異的な取り込み。セクションIV. Aのステップ8またはそれ以降の手順で細胞を乾燥させないでください。</p> <p>セクション IV.A のステップ10 において、スライドを0.1%Triton® X-100および5mg/mlBSAを含むPBSで5分間ずつ3回洗浄し、続いて1回PBSで洗浄する。</p>
染色されていない	<p>Triton® X-100やProteinase Kを用いた浸透が不十分です。サンプルを十分に浸透させるための試薬のインキュベーション時間を調整し、浸透化条件の最適化を行ってください。</p>
スライドから組織切片がなくなった	<p>組織切片を接着する前に行うスライドのコーティングが不十分です。顕微鏡用スライドを3-aminopropyl triethoxysilane (TESPA; Sigma カタログ番号 A3648) でコートした後に、参考文献17の手順に従って組織切片を広げてください。TESPAはポリ-L-リジンよりも組織切片のガラス面からの剥離を防止します。</p> <p>組織切片がスライドから酵素で消化されているセクションIV.Bのステップ8で行うProteinase Kのインキュベーション時間を最適化する。</p>
最後の顕微鏡またはフローサイトメトリ分析まで細胞がほとんど残っていない	<p>操作中にほとんどの細胞を失った。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ より多数の細胞からはじめてください。</li> <li>・ セクションIV.Dで顕微鏡スライドへ接着させる細胞懸濁液を準備するときに、細胞を1%BSAを含むPBSで遠心・洗浄してください。</li> <li>・ 可能な限り、細胞を顕微鏡スライドに接着させるためにサイトスピン遠心機を用いてください。</li> <li>・ セクション IV.C のステップ1 で浮遊細胞を調製するときに、1% BSA を含むPBSで細胞を遠心・洗浄してください。</li> </ul>

## VII. バッファーと試薬の組成

### Equilibration Buffer

200mM potassium cacodylate  
(pH 6.6 at 25°C)  
25mM Tris-HCl  
(pH 6.6 at 25°C)  
0.2mM DTT  
0.25mg/ml BSA  
2.5mM cobalt chloride

### Proteinase K buffer

100mM Tris-HCl (pH 8.0)  
50mM EDTA

### Nucleotide Mix

50µM fluorescein-12-dUTP  
100µM dATP  
10mM Tris-HCl (pH 7.6)  
1mM EDTA

### Propidium iodide solution (1mg/ml)

10mg の propidium iodide を秤量し、10mlの PBS に溶解する。この溶液は遮光して0~4°C に保存する。使うときには適切な濃度に希釈する。

### 2X SSC

析出した塩類を再溶解するために、20XSSC を室温に温める。使用前に脱イオン水で10 倍希釈を行う。

### DNase I buffer

40mM Tris-HCl (pH 7.9)  
10mM NaCl  
6mM MgCl<sub>2</sub>  
10mM CaCl<sub>2</sub>

### 1 X PBS (pH 7.4)

137mM NaCl  
2.68mM KCl  
1.47mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
8.1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

### rTdT incubation buffer

以下の試薬を混合する：  
90µl Equilibration Buffer  
10µl Nucleotide Mix  
2µl rTdT Enzyme

この量は 2 回の反応に十分です。これらの試薬は氷上で融解する。使用する直前に調製し、使うまでは遮光して氷上に置いてください。

### 1% formaldehyde solution

90mlのPBSと6.25mlの16%メタノールフリーホルムアルデヒドを混ぜる。数滴の 1N NaOH を加え、pH を7.4 に合わせる。PBS で最終液量を100ml にする。用事調製してください。

### 4% formaldehyde solution

70mlのPBSと25mlの16%メタノールフリーホルムアルデヒドを混合する。数滴の1N NaOH を加え、pHを7.4に合わせる。PBS で最終液量を 100 ml にする。用事調製してください。

### 4% paraformaldehyde solution

ヒュームフード内で 4g のパラホルムアルデヒドを秤量し、100mlになるようにPBSを加える。密閉したボトルに移し、溶解するためウォーターバスで65°C、2時間加熱する。溶液は4°Cで保存する。この場合、少なくとも2週間は安定です。

### 10% Triton® X-100 solution

85mlのオートクレーブした脱イオン水と10ml の Triton® X-100 をスターラーを使って混ぜる。脱イオン水で 100 mlに合わせる。

## VIII. 関連製品の紹介

Product	Size	Cat.#
Anti-ACTIVE® Caspase-3 pAb	50µl	G7481
Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay	10ml	G7790
	100ml	G7791
Caspase-Glo® 3/7 Assay* (luminescent)	2.5ml	G8090
	10ml	G8091
	100ml	G8092
Caspase-Glo® 8 Assay* (luminescent)	2.5ml	G8200
	10ml	G8201
	100ml	G8202
Caspase-Glo® 9 Assay* (luminescent)	2.5ml	G8210
	10ml	G8211
	100ml	G8212
DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System*	20 reactions	G7360
	40 reactions	G7130
CaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Marker	50µl	G7461
	125µl	G7462
Caspase Inhibitor Z-VAD-FMK	50µl	G7231
	125µl	G7232
Caspase Inhibitor Ac-DEVD-CHO	100µl	G5961
CaspACE™ Assay System, Colorimetric*	50 assays	G7351
	100 assays	G7220
CaspACE™ Assay System, Fluorometric*	160 assays	G3540
Anti-PARP p85 Fragment pAb	50µl	G7341
Anti-Cytochrome c mAb	100µg	G7421

\*For Laboratory Use.

## VIII. 関連製品の紹介(続き)

Product	Size	Cat.#
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (ATP, luminescent)	10ml 10 × 10ml 100ml 10 × 100ml	G7570 G7571 G7572 G7573
CellTiter-Blue® Cell Viability Assay (resazurin, fluorometric)	20ml 100ml 10 × 100ml	G8080 G8081 G8082
CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay (LDH, fluorometric)	200-400 assays 1,000-4,000 assays	G7890 G7891
CellTiter 96® A <sub>QUEOUS</sub> One Solution Cell Proliferation Assay* (MTS, colorimetric)	200 assays 1,000 assays 5,000 assays	G3582 G3580 G3581
CellTiter 96® A <sub>QUEOUS</sub> Non-Radioactive Cell Proliferation Assay* (MTS, colorimetric)	1,000 assays 5,000 assays 50,000 assays	G5421 G5430 G5440
CellTiter 96® A <sub>QUEOUS</sub> MTS Reagent Powder*	250mg 1g	G1112 G1111
CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay* (MTT, colorimetric)	1,000 assays 5,000 assays	G4000 G4100
CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay* (LDH, colorimetric)	1,000 assays	G1780
rhTNF-α	10μg	G5241
Terminal Deoxynucleotidyl Transferase, Recombinant*	300u	M1871
RQ1 RNase-Free DNase*	1,000u	M6101

\*For Laboratory Use.



---

## IX. 参考文献

1. Kerr, J.F.R. et al. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**, 239.
2. Wyllie, A.H. et al. (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* **68**, 251.
3. Ellis, R.E. et al. (1991) Mechanisms and functions of cell death. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **7**, 663.
4. Raff, M.C. (1992) Social controls on cell survival and cell death. *Nature* **356**, 397.
5. Martin, S.J. et al. (1994) Dicing with death: dissecting the components of the apoptosis machinery. *Trends Biochem. Sci.* **19**, 26.
6. Cohen, J.J. and Duke, R.C. (1992) Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **10**, 267.
7. Nagata, S. (1994) Fas and Fas ligand: a death factor and its receptor. *Adv. Immunol.* **57**, 129.
8. Thompson, C.B. (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**, 1456.
9. Steller, H. (1995) Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* **267**, 1445.
10. Oltvai, Z. and Korsmeyer, S.J. (1994) Checkpoints of dueling dimers foil death wishes. *Cell* **79**, 189.
11. Schwartzman, R.A. and Cidlowski, J.A. (1993) Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine Rev.* **14**, 133.
12. Walker, P.R. et al. (1991) Topoisomerase II-reactive chemotherapeutic drugs induce apoptosis in thymocytes. *Cancer Res.* **51**, 1078.
13. Oberhammer, F. et al. (1993) Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *EMBO J.* **12**, 3679.
14. Roy, C. et al. (1992) The topoisomerase II inhibitor teniposide (VM-26) induces apoptosis in unstimulated mature murine lymphocytes. *Exp. Cell Res.* **200**, 416.
15. Bortner, C.D. et al. (1995) The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Biol.* **5**, 21.
16. Gavrieli, Y. et al. (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell. Biol.* **119**, 493.
17. Ben-Sasson, S.A. et al. (1995) Identification of dying cells-in situ staining. *Meth. Cell Biol.* **46**, 29.
18. Del Bino, G. et al. (1991) The concentration-dependent diversity of effects of DNA topoisomerase I and II inhibitors on the cell cycle of HL-60 cells. *Exp. Cell Res.* **195**, 485.
19. Li, X. et al. (1995) Single-step procedure for labeling DNA strand breaks with fluoresceinor BODIPY-conjugated deoxynucleotides: detection of apoptosis and bromodeoxyuridine incorporation. *Cytometry* **20**, 172.
20. Gorczyca, W. et al. (1993) The cell cycle related differences in susceptibility of HL-60 cells to apoptosis induced by various antitumor agents. *Cancer Res.* **53**, 3186.
21. Darzynkiewicz, Z. et al. (1992) Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* **13**, 795.
22. Batistatou, A. and Greene, L.A. (1991) Aurintricarboxylic acid rescues PC12 cells and sympathetic neurons from cell death caused by nerve growth factor deprivation: correlation with suppression of endonuclease activity. *J. Cell Biol.* **115**, 461.
23. Cohen, J.J. and Duke, R.C. (1984) Glucocorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death. *J. Immunol.* **132**, 38.
24. Tewari, M. and Dixit, V.M. (1995) Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is inhibited by the poxvirus crmA gene product. *J. Biol. Chem.* **270**, 3255. 17