

アポトーシス検出

By Abigail Farfan, M.A., and Hanan Abramovici, M.S., Promega Corporation

要約

プロメガでは、細胞、組織、溶解液レベルでアポトーシスを測定するツールを多数ご提供しています。これらの中には、カスパーゼの活性化 (初期アポトーシス) を検出するシステムや、アポトーシス関連タンパク質に対する抗体 (細胞内ターゲットの分解) を検出するシステムなどがあります。

編集者注：プロメガは、新たなアポトーシス検出システム Apo-ONE™ Homogeneous Caspase-3/7 Assay (カタログ番号 G7790) を発売いたしました。詳細は、3 ページの記事をご参照ください。

Apo-ONE™ Homogeneous Caspase-3/7 Assay は、標準的なカスパーゼアッセイと比べてどのような点が優れているのでしょうか？

操作が簡単：標準的なカスパーゼアッセイの場合、アッセイ抽出液の調製には複数の手順を経る必要があります。Apo-ONE™ Assay の場合は、細胞に試薬を添加してプレートシェーカーで 30 秒撹拌するだけでよく、その後は放置しておくだけで反応が進行します (1)。

感度：標準的なカスパーゼ-3/7 アッセイでは、蛍光測定用のクマリン基質 (DEVD-AMC(2) または DEVD-AFC) か、比色定量用の基質 (DEVD-pNA) を使用します。クマリンの蛍光基は比色法と比べて 10 倍の感度を示しますが (3)、Apo-ONE™ Reagent 基質である Z-DEVD-Rhodamine 110 (R110) は、クマリン誘導体のさらに 10 倍以上の感度を示します。標準的なアッセイ法では、数万もの細胞を使用する必要があるのに対し、本アッセイでは数百個の細胞でアポトーシスアッセイを行なうことができます。

なぜ FITC-VAD-FMK は *in situ* でのアポトーシスマーカーと考えられているのでしょうか？

CaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Marker (カタログ番号 G7461、G7462) は、細胞透過性のフルオレセインイソチオシアネート (FITC) を結合した pan caspase 阻害剤 VAD-FMK です。この阻害剤は、カスパーゼの活性部位のシステイン残基を不可逆的にアルキル化します (4)。FITC 標識した誘導体も同様な機能を有するため、アポトーシスが誘発された細胞を *in situ* で特異的に標識することができます。標識によって阻害作用を減少させることはありません (5)。

Anti-ACTIVE® Caspase-3 pAb の特異性は为什么呢？また推奨アプリケーションにはどのようなものがありますか？

Anti-ACTIVE® Caspase-3 pAb (カタログ番号 G7481) は、活性型ヒトカスパーゼ-3 の p17 フラグメント由来のペプチドに対するア

イニティ精製ウサギポリクローナル抗体です。この抗体は、ヒト、マウス、ラット、およびハムスターのタンパク質に共通のアミノ酸配列を有する抗原ペプチドを用いて作成されており、広範な種間交差反応性を有すると考えられます (6)。Anti-ACTIVE® Caspase-3 pAb は、アポトーシス誘発細胞で生じる活性型の酵素のみを検出し、アポトーシス誘発細胞内の活性型カスパーゼ-3 を推奨希釈比 1 : 250 で免疫細胞化学的に検出できるように開発されています。

Anti-PARP p85 Fragment pAb の推奨アプリケーションにはどのようなものがありますか？

Anti-PARP p85 Fragment pAb (カタログ番号 G7341) は、1 : 100 の希釈比で免疫細胞化学染色を行なえるようにデザインされており、PARP p85 カスパーゼ分解産物を特異的に検出します (7)。そのため、この抗体で染色された陽性の細胞はアポトーシスを起こしていることになります (8)。本抗体は、TUNEL アッセイと組み合わせて免疫組織化学的にも利用されています (9)。さまざまなマウス肝切片 (10) や、野生型およびノックアウトマウスのパラフィン包埋マウス皮膚切片 (11) において、この抗体の染色性が確認されています。

Anti-PARP pAb を用いてウェスタン分析を行なう場合、精製ウシ PARP p85 フラグメントを用いるときには 1 : 5,000 の希釈比で、細胞抽出液を用いるときには 1 : 400 の希釈比で実施することをお薦めします (8)。

参考文献

1. Apo-ONE™ Homogeneous Caspase-3/7 Assay Technical Bulletin #TB295, Promega Corporation.
◆ (www.promega.com/tbs/tb295/tb295.html)
2. Caspase™ Assay System, Fluorometric Technical Bulletin #TB248, Promega Corporation.
◆ (www.promega.com/tbs/tb248/tb248.html)
3. Betz, N. (1999) Sensitivity of the fluorometric and colorimetric Caspase™ Assay Systems and purification of fragmented DNA from apoptotic cells, eNotes online:
◆ (www.promega.com/enotes/applications/ap0003_tabs.htm)
4. Schotte, P. et al. (1999) *FEBS Lett.* **442**, 117–121.
5. Sylte, M. et al. (2000) *Promega Notes* **75**, 20–23.
6. Riss, T., Moravec, R. and O'Brien, M. (2000) *Promega Notes* **75**, 17–19.
7. O'Brien, M. et al. (2001) *Biotechniques* **30**, 886–891
8. Anti-PARP p85 Fragment pAb Technical Bulletin #TB273, Promega Corporation.
◆ (www.promega.com/tbs/tb273/tb273.html)
9. Knaapen, M. et al. (1999) *Promega Notes* **72**, 7–9.
10. Zhang, H. et al. (2000) *Nature Biotechnol.* **18**, 862–867.
11. Schmidt-Suppran, M. et al. (2000) *Mol. Cell* **5**, 981–992.