

はじめに

DNAは、化学物質や活性酸素、紫外線、放射線などにより様々な損傷を受けます。DNA損傷の中でも、特にDNA二本鎖の切断が生じると、ヒストンタンパク質H2Aの亜種であるH2AXのSer-139残基が、速やか、かつ広範囲にわたってリン酸化されます。このリン酸化H2AXは γ H2AXと呼ばれ、DNA損傷のマーカーとして、発がん性評価への応用が期待されています。また近年では、 γ H2AXの検出は細胞老化を評価する手段のひとつとしても知られています。本製品群は、二次抗体法により γ H2AXを簡便に検出するための一次抗体、二次抗体及びブロッキング・染色溶液をセットにしたものです。



図1 γ H2AXの検出原理

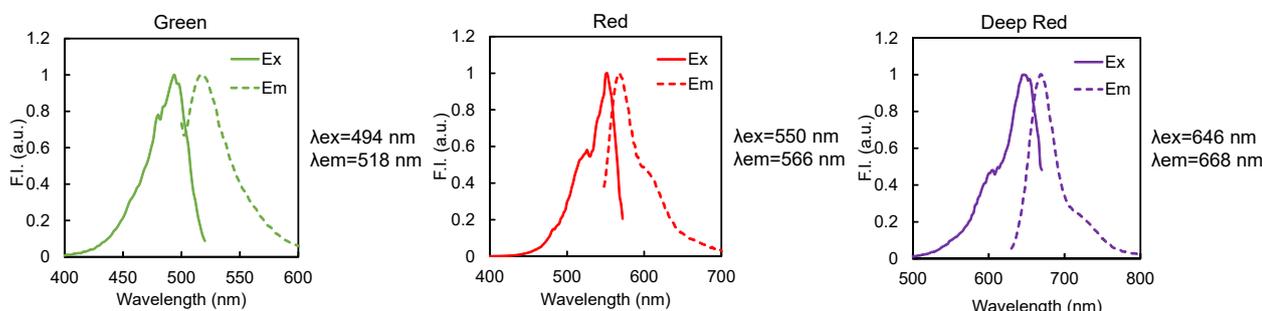


図2 各標識色素の励起・蛍光スペクトル

内容

- Anti γ H2AX antibody (マウス由来) x 1
- ※モノクローナル抗体研究所製の抗体を使用しております。
- Secondary antibody - Green, Red or Deep Red (ヤギ由来) x 1
- Blocking Solution x 1

保存条件

冷蔵保存してください。

キット以外に必要なもの

- 超純水
- Phosphate Buffered Saline (PBS)
- マイクロピペット
- Paraformaldehyde (PFA)
- Triton X-100
- 250 mM HEPES (pH7.4)

溶液調製

Anti γ H2AX antibody stock solution の調製

Anti γ H2AX antibody のチューブに超純水 100 μ L 加えピペッティングにより溶解し、Anti γ H2AX antibody stock solution を調製する。

※溶解後は冷蔵で保存して下さい。3週間は保存可能です。

Anti γ H2AX antibody staining solution の調製

Anti γ H2AX antibody stock solution を Blocking Solution で 50 倍希釈し、Anti γ H2AX antibody staining solution を調製する。

※調製後はその日の内にご使用ください。

Secondary antibody staining solution の調製

Secondary antibody - Green, Red, Deep Red を Blocking Solution で 50 倍希釈し、Secondary antibody staining solution を調製する。

※調製後はその日の内にご使用ください。

尚、本製品群の使用可能回数は染色溶液量は下表の通りです。

| 染色溶液量 | 使用回数 |
|-------------|------|
| 100 μ L | 50 |
| 200 μ L | 25 |
| 2 mL | 2 |

1. 細胞を蛍光イメージング用のディッシュ、チャンバースライドまたはマイクロプレートに播種し、37 °C、5% CO₂ インキュベーター内で一晚培養する。
2. 培地を除去し、PBS を用いて細胞を 1 回洗浄する。
3. 上清を除去し、4% PFA 及び 0.1% TritonX-100 を含む 250 mM HEPES (pH7.4) 溶液を添加し、室温で 5 分間静置する。
4. 上清を除去し、PBS で 2 回洗浄する。
5. 1% TritonX-100 を含む PBS 溶液を添加し、20 分間室温で静置する。
6. 上清を除去し、PBS で 2 回洗浄する。
7. Blocking Solution を添加し、20 分間室温で静置する。
8. 上清を除去し、PBS で 2 回洗浄する。
9. 上清を除去し、γH2AX staining solution を添加し、室温で 1 時間静置する。
10. 上清を除去し、PBS で 2 回洗浄する。
11. 上清を除去し、Secondary antibody staining solution を添加し、室温で 1 時間静置する。
12. 上清を除去し、PBS で 2 回洗浄する。
13. 蛍光顕微鏡で観察する。

実験例 1 Doxorubicin 処理による HeLa 細胞中の γH2AX 検出

1. μ-Slide 8 well に HeLa 細胞を播種し、37 °C、5% CO₂ インキュベーター内で一晚培養した。
2. 培地を除去し、0.5 μmol/L Doxorubicin を含む培地を添加し、37 °C、5% CO₂ インキュベーター内で一晚培養した。
3. 上清を除去し、PBS で 2 回洗浄した。
4. 上清を除去し、4% PFA 及び 0.1% TritonX-100 を含む 250 mM HEPES (pH7.4) 溶液 200 μL を添加し、室温で 5 分間で静置した。
5. 上清を除去し、PBS で 2 回洗浄した。
6. 1% TritonX-100 を含む PBS 溶液 200 μL を添加し、20 分間室温で静置した。
7. 上清を除去し、PBS で 2 回洗浄した。
8. Blocking Solution 200 μL を添加し、20 分間室温で静置した。
9. 上清を除去し、PBS で 2 回洗浄した。
10. 上清を除去し、Anti γH2AX antibody staining solution 200 μL を添加し、室温で 1 時間静置した。
11. 上清を除去し、PBS で 2 回洗浄した。
12. 上清を除去し、Secondary antibody staining solution 200 μL を添加し、室温で 1 時間静置した。
13. 上清を除去し、PBS で 2 回洗浄した。
14. 蛍光顕微鏡で観察した。

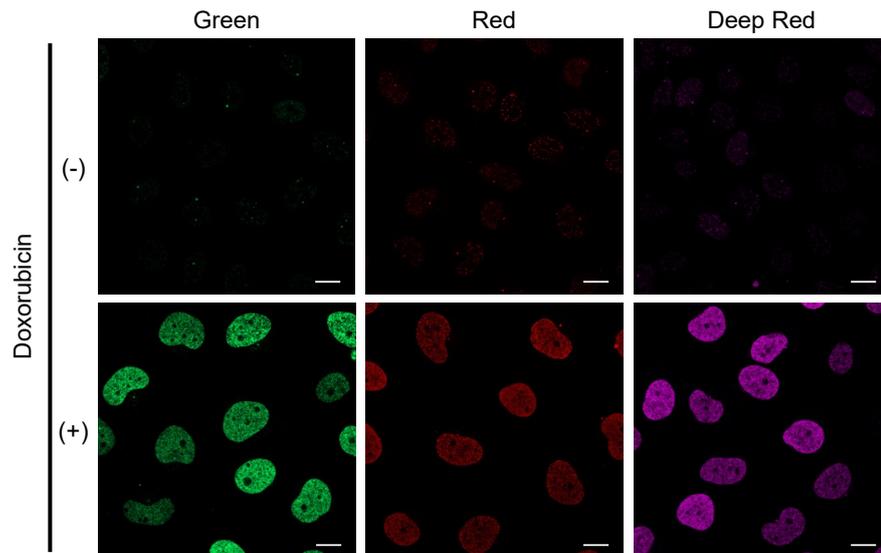


図 3 Doxorubicin 処理による HeLa 細胞中の γH2AX 検出

| | |
|------------|----------------------------|
| Green | Ex/Em = 488 nm/ 500–550 nm |
| Red | Ex/Em = 561 nm/ 570–620 nm |
| Deep Red | Ex/Em = 640 nm/ 650–700 nm |
| Scale bars | 20 μm |

本製品は試験・研究用途です。臨床診断用途には使用できません。
ご質問・ご要望は下記までお問い合わせください。

DOJINDO 株式会社同仁化学研究所
 熊本県上益城郡益城町田原 2025-5
 熊本テクノリサーチパーク 〒 861-2202
 Tel:096-286-1515 (代表) Fax:096-286-1525
 E-mail: info@dojindo.co.jp URL: www.dojindo.co.jp

ドージン・イースト (東京)
 東京都港区芝大門 2-1-17 朝川ビル 7F 〒 105-0012
 Tel: 03-3578-9651 (代表) Fax: 03-3578-9650
 フリーダイヤル :0120-489548
 フリーファックス :0120-021557

G265: DNA Damage Detection - γH2AX - Green
 G266: DNA Damage Detection - γH2AX - Red
 G267: DNA Damage Detection - γH2AX - Deep Red