

はじめに

核小体は膜を持たない核内構造体であり、リボソーム生合成の起点となる場所です。核小体にはリボソームを構成するリボソーム RNA (rRNA) が多く存在し、rRNA の転写やプロセッシングなどが行われております。タンパク質合成の初期段階が核小体で行われているため、核小体の変化は多くの細胞内イベントに関わっていると考えられています。これまで、核小体はがんの病理診断の指標の一つとして知られておりましたが、近年、核小体ストレスを含め核小体と DNA 損傷¹⁾、オートファジー²⁾ ウイルス感染³⁾ 及び細胞老化^{4), 5)} との関連性が報告され、がんのみならず多くの研究分野で注目されております。Nucleolus Bright 色素は核小体中の RNA に結合し蛍光性となる低分子蛍光色素であり、核小体を洗浄操作なしで明瞭に観察することができます。

本製品は、熊本大学発生医学研究所 細胞医学分野 中尾光善先生のご指導の下、製品化しました。

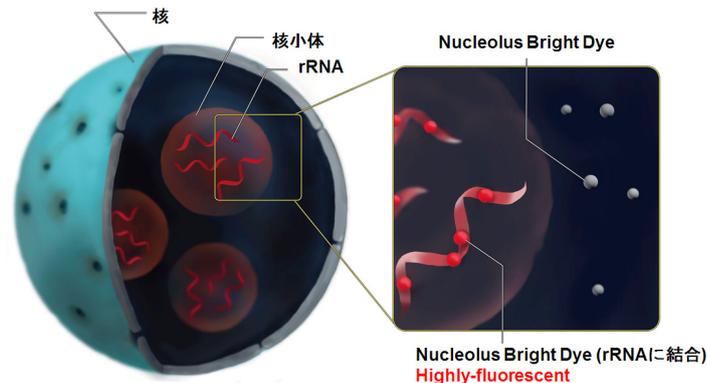


図 1 Nucleolus Bright の細胞染色原理

内容 N511 Nucleolus Bright Green 60 nmol x 1
N512 Nucleolus Bright Red 60 nmol x 1

保存条件 N511 遮光、冷暗所にて保存してください。
N512 冷暗所にて保存してください。

必要なもの - Dimethyl sulfoxide (DMSO)
- PBS
- マイクロピペット

補足資料 **Nucleolus Bright の蛍光特性**

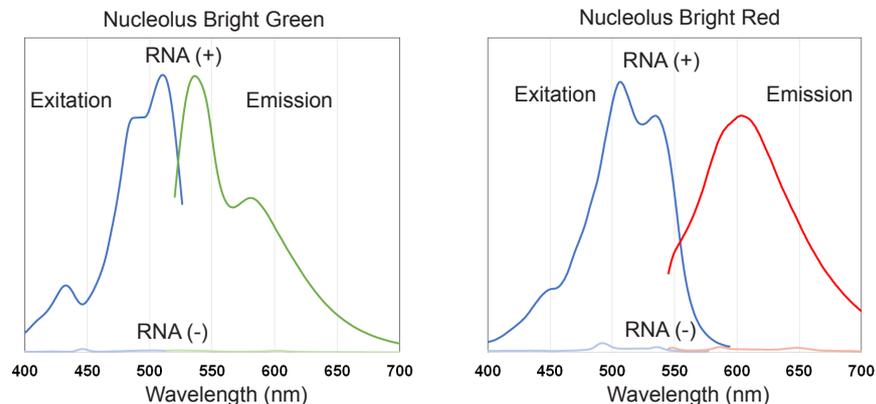


図 2 Nucleolus Bright Green、Red の励起、蛍光スペクトル

溶液調製 **Nucleolus Bright 1 mmol/l DMSO stock solution の調製**

60 nmol の色素を含むチューブに DMSO 60 μ l を加えピペッティングにより溶解し、1 mmol/l DMSO stock solution を調製する。

* 調製後は遮光、 -20°C で保存して下さい。調製後 1 ヶ月間は安定です。

Nucleolus Bright working solution の調製

DMSO stock solution を PBS で 200-2000 倍希釈し、0.5-5 μ mol/l working solution を調製する。

35 mm dish: 30 枚分使用可能 (色素濃度 1 μ mol/l で使用時)。

* 調製後はその日の内にご使用下さい。

操作

1. 細胞をディッシュまたはチャンバースライドに播種し、 37°C 、5% CO_2 インキュベーター内で一晩培養する。
2. 培地を取り除き、4% パラホルムアルデヒド (PFA)/PBS 溶液を添加し、室温で 5 分間インキュベートし細胞を固定化する。もしくは、冷メタノールを添加し、室温で 1 分間インキュベートし細胞を固定化する。
3. 上澄み液を除去し、PBS を用いて細胞を 3 回洗浄する。
4. 1% Triton X-100/PBS 溶液を添加し、室温で 20 分間インキュベートする。
5. 上澄み液を除去し、PBS を用いて細胞を 3 回洗浄する。
6. 調製した Nucleolus Bright working solution を加え室温で 5 分間インキュベートする。
7. 蛍光顕微鏡にて細胞を観察する。

実験例 1 Nucleolus Bright による HeLa 細胞の核小体染色

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晩培養した。
2. 培地を取り除き、4% PFA/PBS 溶液を添加し、室温で 5 分間インキュベートし細胞を固定化した。
もしくは、冷メタノールを添加し、室温で 1 分間インキュベートし細胞を固定化した。
3. 上澄み液を除去し、PBS を用いて細胞を 3 回洗浄した。
4. 1% Triton X-100/PBS 溶液を添加し、室温で 20 分間インキュベートした。
5. 上澄み液を除去し、PBS を用いて細胞を 3 回洗浄した。
6. 調製した Nucleolus Bright working solution と DAPI の混合溶液 200 μ l を添加し、室温で 5 分間インキュベートした。
8. 蛍光顕微鏡にて観察した。

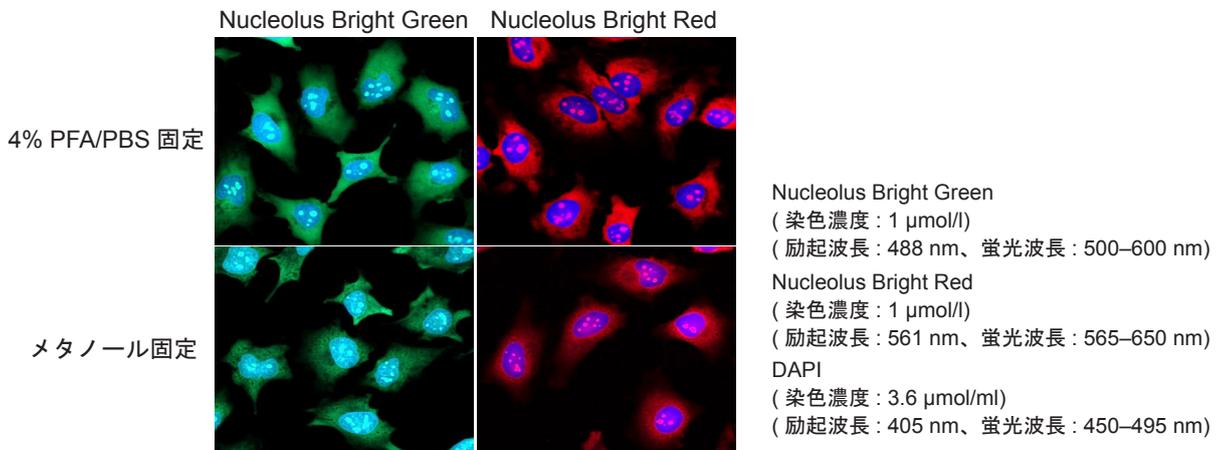


図 3 HeLa 細胞の核小体染色
(青: DAPI、緑: Nucleolus Bright Green、赤: Nucleolus Bright Red)

実験例 2 Nucleolus Bright を用いた細胞老化に伴う核小体の形態変化

1. 継代数 3 回及び 18 回の WI-38 細胞懸濁液 (5×10^4 cells/ml, 10% fetal bovine serum, 1% penicillin-streptomycin を含む MEM 培地) を、それぞれ μ -Slide 8 well に播種し、37 °C、5% CO₂ インキュベーター内で一晩培養した。
2. 培地を取り除き、4% PFA/PBS 溶液を添加し、室温で 5 分間インキュベートし細胞を固定化した。
3. 上澄み液を除去し、PBS を用いて細胞を 3 回洗浄した。
4. 1% Triton X-100/PBS 溶液を添加し、室温で 20 分間インキュベートした。
5. 上澄み液を除去し、PBS を用いて細胞を 3 回洗浄した。
6. 調製した Nucleolus Bright working solution と DAPI の混合溶液 200 μ l を添加し、室温で 5 分間インキュベートした。
7. 蛍光顕微鏡にて観察した。

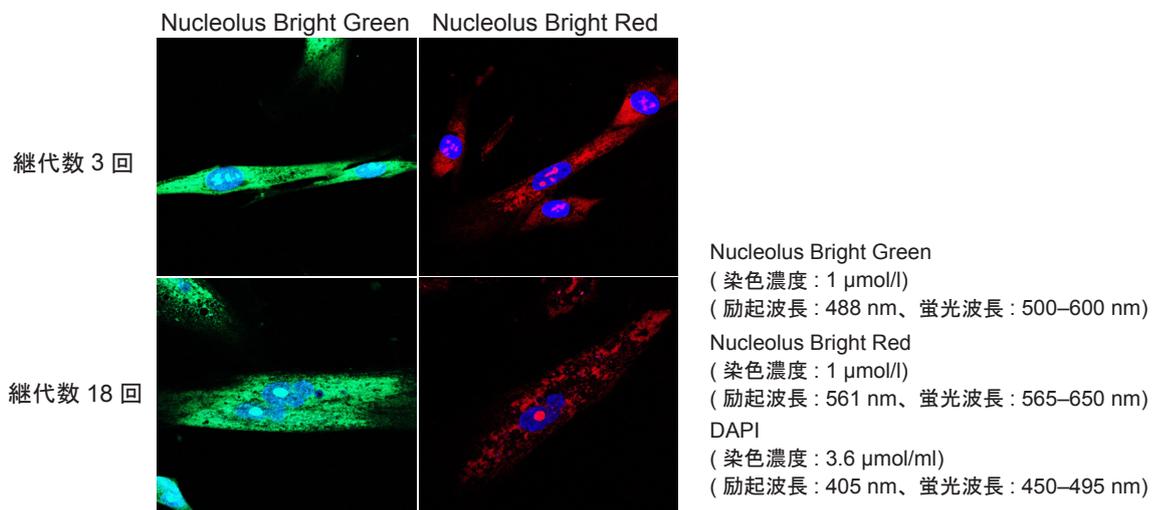


図 4 細胞老化に伴う WI-38 細胞の核小体形態変化
(青: DAPI、緑: Nucleolus Bright Green、赤: Nucleolus Bright Red)

参考文献

- 1) Greenberg, R. A. et al., *Cell Reports*, **2015**, 13, 251–259.
- 2) Kimura, K. et al., *Scientific Reports*, **2015**, 5, 8903.
- 3) Hiscox, J. A. et al., *Cellular Microbiology*, **2006**, 8, 1147–1157.
- 4) Nakao, M. et al., *Cell Reports*, **2017**, 18, 2148–2161.
- 5) Antebi, A. et al., *Trends in Cell Biology*, DOI: 10.1016/j.tcb.2018.03.007.

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

N511 : Nucleolus Bright Green
N512 : Nucleolus Bright Red