

はじめに

大腸菌由来のβ-ガラクトシダーゼ遺伝子 (*lacZ*) は、レポーター遺伝子アクセスマーカーとして幅広く用いられています。代表的なβ-galactosidaseの検出方法として、X-gal染色が広く利用されていますが、細胞膜透過性が乏しいため、細胞や組織を固定化する必要があります。また、従来のβ-galactosidase検出蛍光試薬は細胞内滞留性が低いため、β-galactosidase未発現細胞と発現細胞を明瞭に区別できないことが課題でした。

これらの課題を克服するため、浦野、神谷らは細胞膜透過性と細胞内滞留性を有する新たな蛍光試薬 SPiDER-βGal の開発に成功しました¹⁾。本試薬は、β-ガラクトシダーゼとの酵素反応により、キノンメチドと呼ばれる中間体を形成して、近傍のタンパク質中のSH基等の求核性基と安定な共有結合を形成し、蛍光性になります。このように、反応した試薬が細胞内タンパク質に固定化されることで優れた細胞内滞留性を有し、その結果、β-galactosidase発現細胞を一細胞レベルで明確に検出することが可能となります。

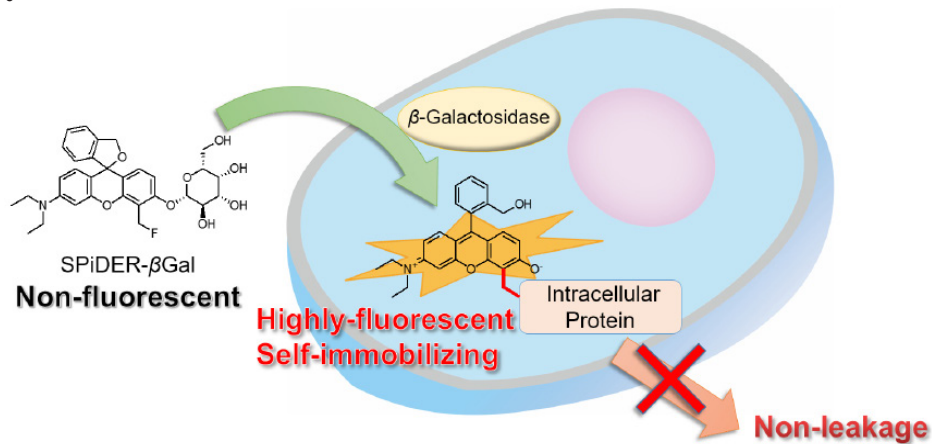
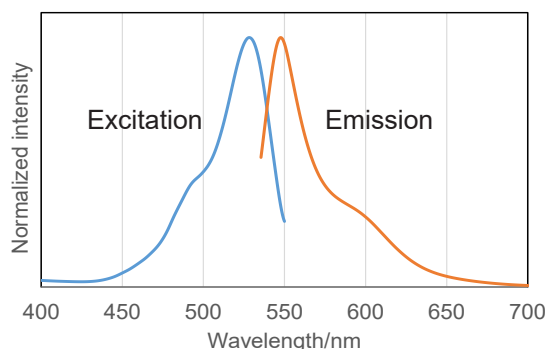


図1 SPiDER-βGalの細胞染色原理



<推奨フィルター>

励起：500～540 nm

蛍光：530～570 nm

共焦点レーザー顕微鏡およびフローサイトメーターでは、488 nm 励起により検出した実績があります。

図2 β-galactosidase と反応後の SPiDER-βGal の励起・蛍光スペクトル

キット内容 - SPiDER-βGal 20 μg x 3

保存条件 0-5 °Cにて保存してください。

SPiDER-βGal は、アルミラミジップに3本入っています。未使用の SPiDER-βGal は、アルミラミジップに入れたまま、チャックをしっかりと閉め、0-5°Cで保存してください。

必要なもの (キット以外)

- Dimethyl sulfoxide (DMSO)
- Hanks' HEPES buffer
- マイクロピペット
- マイクロチューブ

溶液調製 1 mmol/l SPiDER-βGal DMSO stock solution の調製

SPiDER-βGal 20 μg を含むチューブに 35 μl の DMSO を加え、ピペッティングにより溶解する。溶解後の SPiDER-βGal DMSO stock solution は、-20°C以下で保存する。

1 μmol/l SPiDER-βGal working solution の調製

最終濃度が 1 μmol/l になるように 1 mmol/l SPiDER-βGal DMSO stock solution を Hanks' HEPES buffer 等で希釈する。※細胞の状態を維持するため Hanks' HEPES buffer の使用をお勧めします。

操作 SPiDER-βGal による細胞染色

1. 細胞をディッシュまたはチャンバーに播種し、培養する。
 2. 培地を吸引除去後、Hanks' HEPES buffer で 2 回洗浄する。
 3. 調製した SPiDER-βGal working solution を添加し、37°C で 15 分間インキュベートする。
 4. インキュベート後、蛍光顕微鏡やフローサイトメーターで観察する。
- ※染色後、洗浄操作無しでも観察できますが、必要に応じて洗浄操作を行ってください。

蛍光イメージングでの β -galactosidase 発現細胞の検出

1. 500 μ l の HEK 細胞懸濁液 (5×10^5 cells/ml) と 500 μ l の HEK/LacZ 細胞 (β -galactosidase 安定発現株) 懸濁液 (5×10^5 cells/ml) を 35 mm ディッシュに DMEM 培地 (10% fetal bovine serum, 1% penicillin-streptomycin) で播種し、5%CO₂ インキュベーターで 37°C、一晚培養した。
2. 培地を吸引除去後、2 ml の Hanks' HEPES buffer で 2 回洗浄した。
3. 調製した SPiDER- β Gal working solution 2 ml を添加し、5%CO₂ インキュベーター (37°C) で 15 分間インキュベートした。
4. 上澄みを吸引除去し、2 ml の Hanks' HEPES buffer で 2 回洗浄した。
5. 2 ml の Hanks' HEPES buffer を加え、蛍光顕微鏡で観察した。(図 3A)
6. 上澄みを吸引除去し、4% パラホルムアルデヒド (PFA)/PBS 溶液 2 ml 加え、室温で 15 分間固定化する。
7. 4%PFA/PBS 溶液を吸引除去し、2 ml の Hanks' HEPES buffer で 2 回洗浄した。
8. 2 ml の Hanks' HEPES buffer を加え、蛍光顕微鏡で観察した。(図 3B)

Filter (wavelength/band pass)

蛍光イメージング : 550/25 nm (Ex), 605/70 nm (Em)

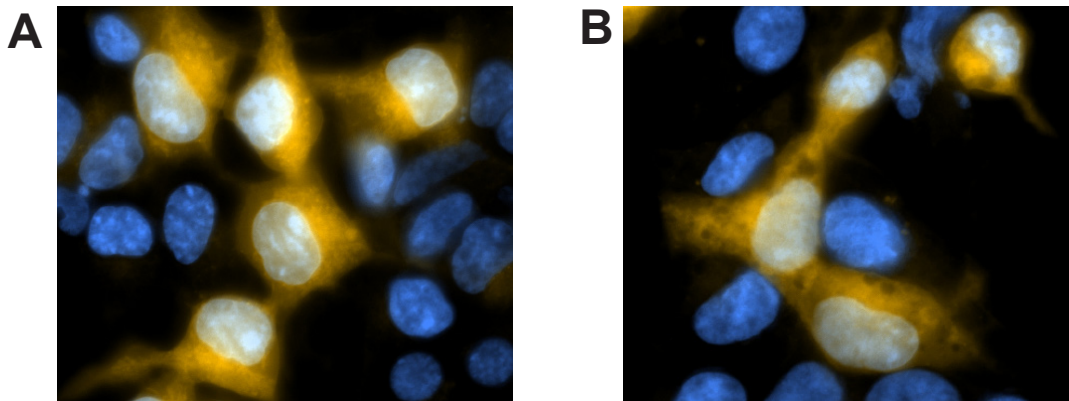


図 3 HEK/LacZ 細胞と HEK 細胞の細胞数比 1:1 試料の SPiDER- β Gal による染色画像
A. 生細胞、B. 固定化細胞 (4%PFA/PBS)
(黄 : SPiDER- β Gal 由来、青 : Hoechst 33342)

蛍光イメージングの結果 (図 3)、 β -galactosidase を強発現している HEK/LacZ 細胞を明瞭に観測出来ました。また、固定化後も一細胞レベルでの lacZ 細胞染色像に変化はありませんでした。

フローサイトメトリーでの β -galactosidase 発現細胞の検出

1. 500 μ l の HEK 細胞懸濁液 (5×10^5 cells/ml) と 500 μ l の HEK/LacZ 細胞懸濁液 (5×10^5 cells/ml) を 1.5 ml チューブに混合した。
2. 調製した SPiDER- β Gal stock solution 1 μ l を添加し、37°C で 15 分間インキュベートした。
3. その細胞懸濁液をフローサイトメーターで測定した。(488 nm excitation, 530/30 nm bandpass filter)

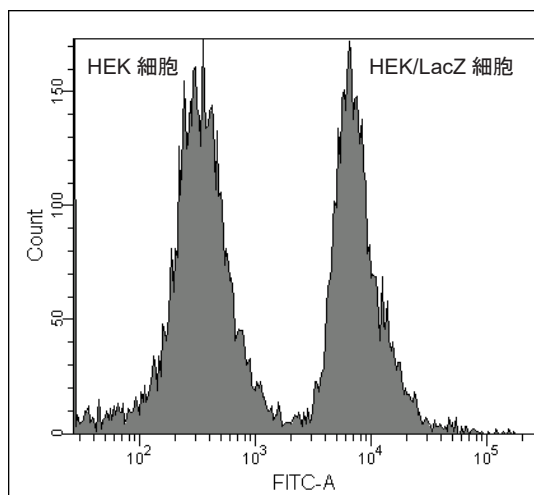


図 4 HEK/LacZ 細胞と HEK 細胞の細胞数比 1:1 試料の SPiDER- β Gal によるフローサイトメトリーでの分別測定

フローサイトメトリーの結果 (図 4)、HEK 細胞と β -galactosidase を強発現している HEK/LacZ 細胞を明瞭に分別出来ました。

参考文献

- 1) T. Doura, M. Kamiya, F. Obata, Y. Yamaguchi, T. Y. Hiyama, T. Matsuda, A. Fukamizu, M. Noda, M. Miura and Y. Urano, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2016**, 55, 9620.

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