

# 老化細胞を検出したい

## 使用製品

Cellular Senescence Detection Kit - SPiDER-βGal [SG03]

## 解析装置



## I はじめに

正常細胞は、分裂を繰り返すことや、酸化ストレス等により DNA に損傷を生じる。損傷 DNA が修復されない異常細胞がこれ以上増えないようにするため、不可逆的に分裂を停止する細胞老化が引き起こされる。このようにして生じた老化細胞において過剰発現が認められる SA-β-gal (senescence-associated β-galactosidase) は、老化マーカーの 1 つとして広く用いられている。代表的な SA-β-gal の検出方法として X-gal 染色が広く利用されているが、(1) 細胞膜透過性が乏しいため細胞を固定化する必要がある、(2) 染色された細胞とそうでない細胞とを目視により見分ける必要があるため定量性に欠ける、(3) 染色に時間を要する、などが課題となっている。

本キットに含まれる β-galactosidase 検出試薬 SPiDER-βGal は、細胞膜透過性が高く、優れた細胞内滞留性を有し反応後の基質が細胞外へ漏れ出さない、という性質を有し、細胞内

β-galactosidase の高感度検出、短時間染色を実現できる。また、蛍光検出が可能なことから、X-gal 染色法では適用できなかったフローサイトメトリーも利用することができ、定量性のあるデータを取得できる。なお、生細胞のみならず X-gal 法と同様に固定化細胞を用いても SA-β-gal を簡便かつ迅速に検出することが可能である。

SPiDER-βGal は、染色のための特別な膜透過処理や固定化操作は不要で生細胞に適用できる。細胞膜を透過した SPiDER-βGal は、SA-β-gal と反応することで蛍光を発生し、かつ近傍のタンパク質と共有結合する。また、SPiDER-βGal を添加する前に本キットに含まれる Bafilomycin A1 を添加することで、生細胞中の内在性 β-galactosidase の活性を抑制し、バックグラウンドを抑えた状態で SA-β-gal を蛍光検出できる。

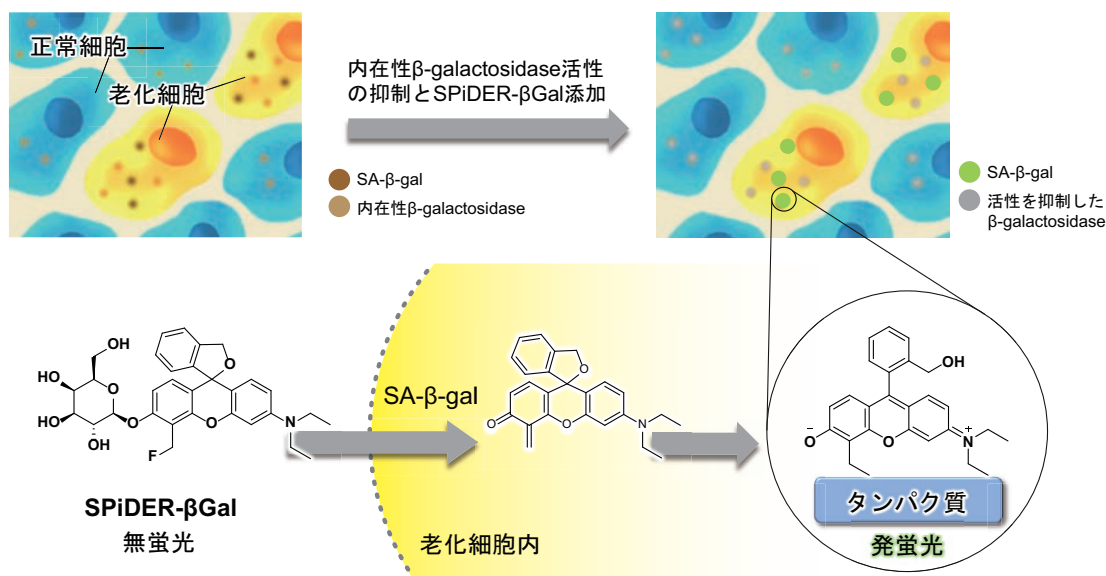


図 1 Cellular Senescence Detection Kit - SPiDER-βGal による老化細胞の検出原理

## II WI-38 細胞を用いた生細胞蛍光イメージング

### (1) 試薬

- Cellular Senescence Detection Kit - SPiDER-βGal
- Hoechst 33342
- Dimethyl sulfoxide (DMSO)
- WI-38 細胞 (ヒト胎児肺由来線維芽細胞)
- MEM 培地 (10% fetal bovine serum, 1% penicillin-streptomycin 含む)
- HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution ; Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Sodium bicarbonate, Glucose 含有, Phenol red 不含)

### (2) 溶液調製

- SPiDER-βGal DMSO stock solution  
SPiDER-βGal を含むチューブに DMSO 14 μl を加え、ピペッティングにより溶解する。
- Bafilomycin A1 DMSO stock solution  
Bafilomycin A1 を含むチューブに DMSO 24 μl を加え、ピペッティングにより溶解する。
- Bafilomycin A1 working solution  
Bafilomycin A1 DMSO stock solution を培地または HBSS で 1,000 倍希釈する。
- SPiDER-βGal working solution  
SPiDER-βGal DMSO stock solution と Bafilomycin A1 DMSO stock solution を培地または HBSS で 1,000 倍希釈する。

細胞
増殖/毒性
酸化
ストレス
分子
生物学
細胞内
蛍光プローブ
細胞
染色
ミトコンドリア
関連試薬
細菌研究用
試薬
膜タンパク質
可溶化剤
ラベル
化剤
二価性
試薬
イオン
電極
その他
機能性
有機材料

(3) 方法

- 1) 継代数 0 回および継代数 12 回の WI-38 細胞懸濁液を MEM 培地 (10% fetal bovine serum、1% penicillin-streptomycin) を用いて調製する。
- 2) 各細胞懸濁液を  $\mu$ -Dish 35 mm (ibidi 社製) に播種し ( $5 \times 10^4$  cells/dish)、37°C、炭酸ガスインキュベーターで一晩培養する。
- 3) 培地を吸引除去し、HBSS 2 ml で 1 回洗浄する。
- 4) Bafilomycin A1 working solution 1 ml を加え、37°C、炭酸ガスインキュベーターで 1 時間静置する。
- 5) SPiDER- $\beta$ Gal working solution 1 ml に 1mg/ml Hoechst 33342 水溶液を 1 $\mu$ l 添加した溶液を加え、37°C、炭酸ガスインキュベーターで 30 分間静置する。
- 6) 上澄みを吸引除去し、HBSS 2 ml で 2 回洗浄する。
- 7) HBSS 2 ml を加えて蛍光顕微鏡で観察する。  
SPiDER- $\beta$ Gal: 励起波長 488 nm、蛍光波長 500-600 nm  
Hoechst 33342: 励起波長 405 nm、蛍光波長 450-495 nm

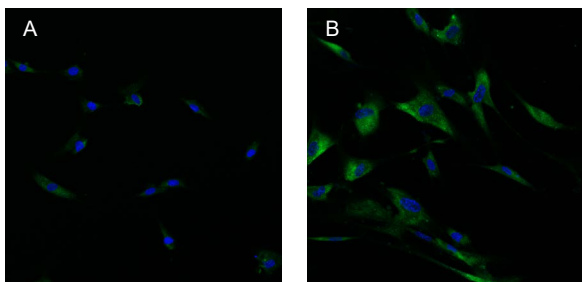


図 2 WI-38 細胞における SA- $\beta$ -gal の生細胞蛍光イメージング  
A. 継代数 0 回、B. 継代数 12 回  
(緑: SPiDER- $\beta$ Gal, 青: Hoechst 33342)

III WI-38 固定化細胞を用いた蛍光イメージング

(1) 試薬

- Cellular Senescence Detection Kit - SPiDER- $\beta$ Gal
- Dimethyl sulfoxide (DMSO)
- WI-38 細胞 (ヒト胎児肺由来線維芽細胞)
- MEM 培地 (10% fetal bovine serum, 1% penicillin-streptomycin 含む)
- HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution ;  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ , Sodium bicarbonate, Glucose 含有, Phenol red 不含)
- 4% パラホルムアルデヒドの PBS 溶液
- McIlvaine buffer (pH6.0)

※ 固定化細胞の場合、McIlvaine buffer を用いるため Bafilomycin A1 は使用しない。

(2) 溶液調製

- 1) McIlvaine buffer (pH6.0)  
0.1 mol/l クエン酸水溶液 3.7 ml と 0.2 mol/l リン酸水素二ナトリウム水溶液 6.3 ml を混合して、pH 6.0 であることを確認する (pH 6.0 でない場合は、クエン酸水溶液あるいはリン酸水素二ナトリウム水溶液を加えて pH 6.0 に調整する)。この溶液を超純水で 5 倍希釈する。
- 2) SPiDER- $\beta$ Gal DMSO stock solution  
SPiDER- $\beta$ Gal を含むチューブに DMSO 14  $\mu$ l を加え、ピペッティングにより溶解する。
- 3) SPiDER- $\beta$ Gal working solution  
SPiDER- $\beta$ Gal DMSO stock solution を McIlvaine buffer (pH6.0) で 2,000 倍希釈する。

(3) 方法

- 1) 継代数 0 回および継代数 12 回の WI-38 細胞懸濁液を MEM 培地 (10% fetal bovine serum、1% penicillin-streptomycin) を用いて調製する。
- 2) 各細胞懸濁液を  $\mu$ -Dish 35 mm (ibidi 社製) に播種し ( $5 \times 10^4$  cells/dish)、37°C、炭酸ガスインキュベーターで一晩培養する。
- 3) 培地を吸引除去し、HBSS 2 ml で 1 回洗浄する。
- 4) 4% パラホルムアルデヒド/PBS 溶液 2 ml を添加し、室温で 3 分間固定化する。
- 5) 4% パラホルムアルデヒド/PBS 溶液 2 ml を吸引除去し、HBSS 2 ml で 2 回洗浄する。
- 6) SPiDER- $\beta$ Gal working solution 2 ml を加え、37°C で 30 分間静置する<sup>※</sup>。
- 7) HBSS 2 ml で 2 回洗浄する。
- 8) 蛍光顕微鏡で観察する。

SPiDER- $\beta$ Gal: 励起波長 488 nm、蛍光波長 500-600 nm  
※ 炭酸ガスインキュベーターは使用しないで下さい。working solution の pH が酸性側に傾くことで、SPiDER- $\beta$ Gal が内在性  $\beta$ -galactosidase と反応してバックグラウンドが上昇する恐れがあります。

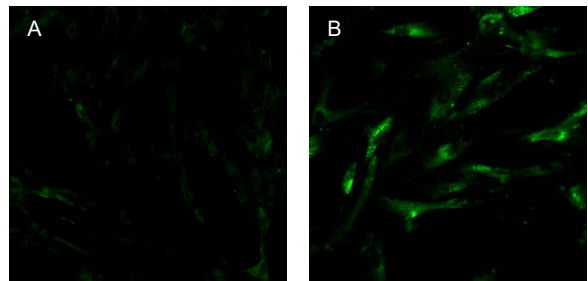


図 3 WI-38 固定化細胞における SA- $\beta$ -gal の蛍光イメージング  
A. 継代数 1 回、B. 継代数 14 回

IV フローサイトメーターを用いた検出例

(1) 試薬

- Cellular Senescence Detection Kit - SPiDER- $\beta$ Gal
- Dimethyl sulfoxide (DMSO)
- WI-38細胞(ヒト胎児肺由来線維芽細胞)
- MEM培地(10% fetal bovine serum, 1% penicillin-streptomycin含む)
- HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ , Sodium bicarbonate, Glucose含有, Phenol red 不含)

(2) 溶液調製

II WI-38 細胞を用いた生細胞蛍光イメージングを参照

(3) 方法

- 1) 継代数 1 回および継代数 12 回の WI-38 細胞懸濁液を MEM 培地 (10% fetal bovine serum、1% penicillin-streptomycin) を用いて調製する。
- 2) 各細胞懸濁液を  $\mu$ -Dish 35 mm (ibidi 社製) に播種し ( $1 \times 10^5$  cells/dish)、37°C、炭酸ガスインキュベーターで一晩培養する。
- 3) 培地を吸引除去し、HBSS 2 ml で 1 回洗浄する。
- 4) Bafilomycin A1 working solution 1 ml を加え、37°C、炭酸ガスインキュベーターで 1 時間静置する。
- 5) SPiDER- $\beta$ Gal working solution 1 ml を加え、37°C、炭酸ガスインキュベーターで 30 分間静置する。
- 6) 上澄みを吸引除去し、HBSS 2 ml で 2 回洗浄する。

- 7) トリプシン処理後、MEM 培地（10% fetal bovine serum、1% penicillin-streptomycin）を用いて染色後の細胞懸濁液を調製する。
- 8) 操作 7 の細胞懸濁液を用いてフローサイトメーターで測定する。励起波長 488 nm、蛍光波長 515-545 nm

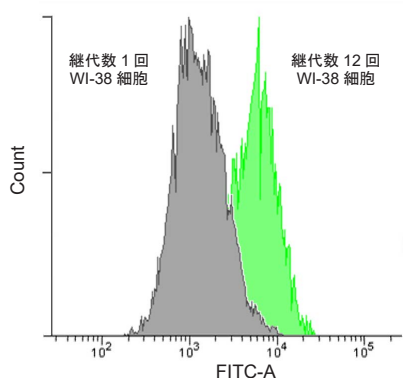


図 4 フローサイトメーターを用いた SA-β-gal 発現 WI-38 細胞の測定

### FAQ

Q: 固定後、試料の染色はできますか？

A: 可能です。4% パラホルムアルデヒドで固定化し蛍光観察した実績があります。固定化により β-galactosidase 活性は低下しますので、固定化条件の検討を行ってください。染色時は pH6 の McIlvaine 緩衝液をご使用ください。

### 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.

細胞
増殖/毒性
酸化
ストレス
分子
生物学
細胞内
蛍光プローブ
細胞
染色
ミトコンドリア
関連試薬
細菌研究用
試薬
膜タンパク質
可溶化剤
ラベル
化剤
二価性
試薬
イオン
電極
その他
機能性
有機材料