

# β-galactosidase を検出したい

## 使用製品

SPiDER-βGal [SG02]

## 解析装置



## I はじめに

大腸菌由来のβ-galactosidase 遺伝子 (*lacZ*) は、レポータージーンアクセスマーカーとして幅広く用いられている。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るが、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る。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あった。

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 の開発に成功した<sup>1)</sup>。本試薬は、β-galactosidase との酵素反応により、キノンメ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、蛍光性になる。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る。

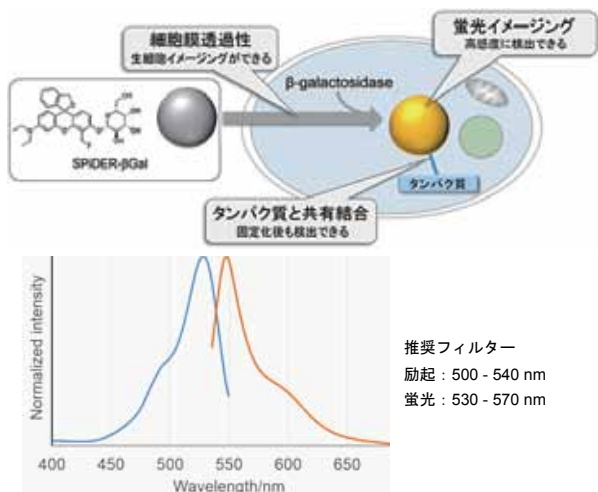


図1 β-galactosidase と反応後の SPiDER-βGal の励起(青)、蛍光(赤) スペクトル

## II 製品以外に必要なもの

- ・ Dimethyl sulfoxide (DMSO)
- ・ Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)
- ・ 培養培地
- ・ 4% パラホルムアルデヒド (PFA)/PBS
- ・ マイクロピペット
- ・ マイクロチューブ

## III 溶液の調製

- ・ 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 ~ 20 μmol/l SPiDER-βGal working solution の調製  
最終濃度が 1 ~ 20 μmol/l になるように 1 mmol/l SPiDER-βGal DMSO stock solution を HBSS 等で希釈する。  
※細胞の状態を維持するため HBSS または培養培地の使用をお勧めします。

## IV 細胞中の β-galactosidase 染色

### 染色操作



準備した細胞をバッファーで洗浄後、SPiDER-βGal を添加



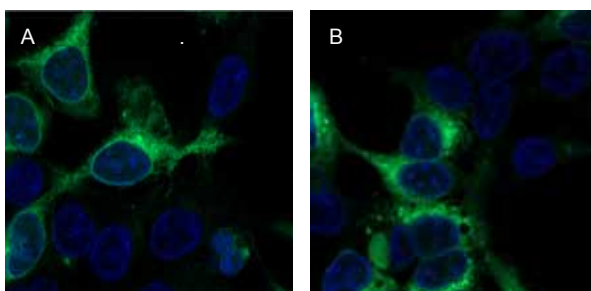
15 分間インキュベート(遮光下)後、細胞をバッファーにて洗浄



蛍光顕微鏡またはフローサイトメトリーにて蛍光観察

1. 細胞をディッシュまたはチャンパーに播種し、培養する。
2. 培地を吸引除去後、HBSS で 2 回洗浄する。
3. 調製した SPiDER-βGal working solution を添加する。
4. 5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで 37°C、15 分間インキュベートする。  
※ 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。また、インキュベーション時間と温度は検討し、染色条件を最適化していただく必要がございます。
5. 蛍光顕微鏡やフローサイトメーターで観察する。  
※ 染色後に固定化する場合は、下記の操作を行ってください。
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 200 μl を加え、室温で 15 分間固定化する。
7. 4% PFA/PBS 溶液を吸引除去し、200 μl の HBSS で 2 回洗浄する。
8. 200 μl の HBSS を加え、蛍光顕微鏡で観察する。

HEK293 細胞および β-galactosidase 安定発現 HEK/LacZ 細胞を 1:1 となるように混合培養し、固定化前後で SPiDER-βGal による染色を行い共焦点顕微鏡で観察した。SPiDER-βGal の膜透過性と細胞内滞留性により固定化前後ともに蛍光イメージングができることが確認された。



(緑：SPiDER-βGal 由来、青：Hoechst 33342)  
A. 生細胞、B. 固定化細胞 (4% PFA/PBS)

図2 HEK/LacZ 細胞と HEK 細胞の SPiDER-βGal による染色画像

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

HEK293 細胞および  $\beta$ -galactosidase 安定発現 HEK/LacZ 細胞を 1:1 となるよう混合培養し、SPiDER- $\beta$ Gal による染色後にフローサイトメトリーにて測定した。SPiDER- $\beta$ Gal が細胞内に滞留することにより、 $\beta$ -galactosidase 安定発現株（緑色）と未発現株（灰色）を分別することが可能となった。

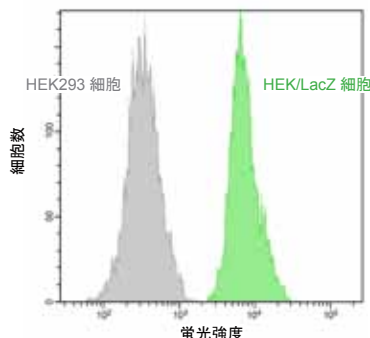


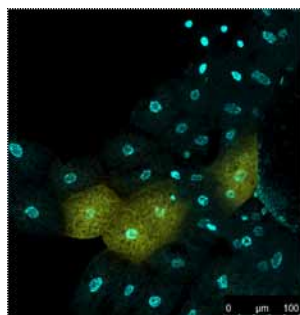
図3 HEK/LacZ 細胞と HEK 細胞の SPiDER- $\beta$ Gal によるフローサイトメトリー検出

### V 組織中の $\beta$ -galactosidase 染色

ショウジョウバエ組織

<ライブ染色>

1. ショウジョウバエの幼虫から lacZ 発現組織を取り出す。
2. 組織を 10-20  $\mu$ mol/l の SPiDER- $\beta$ Gal と 16  $\mu$ mol/l Hoechst 33342 を含む培地で室温にて 20-30 分間インキュベートする。  
※1、※2、※3



SPiDER- $\beta$ Gal (黄色)  
励起：514 nm、蛍光：525-600 nm

Hoechst 33342 (青色)  
励起：405 nm、蛍光：415-490 nm

図4 ショウジョウバエ組織のライブイメージング  
(データ提供：東京大学大学院医学系研究科 浦野泰照教授)

<固定組織の染色>

1. ショウジョウバエの幼虫から lacZ 発現組織を取り出す。
2. 組織を 4% PFA を含む PBS 溶液中で、20 分間インキュベートし固定する。
3. PBS で洗浄後、10-20  $\mu$ mol/l の SPiDER- $\beta$ Gal を含む PBS 溶液に浸し、室温にて 10-30 分間インキュベートする。  
※1、※3

<免疫染色との併用>

1. ショウジョウバエの幼虫から lacZ 発現組織を取り出す。
2. 組織を 4% PFA を含む PBS 溶液中で 20 分間インキュベートし固定する。
3. PBS-T で 5 分間浸漬しブロッキングする。この操作を 3 回繰り返す。
4. 一次抗体を PBS-T に溶解、組織に添加し、30 分間インキュベートする。
5. PBS-T で 5 分間浸漬し、洗浄する。この操作を 3 回繰り返す。
6. 10-20  $\mu$ mol/l の SPiDER- $\beta$ Gal working solution と 16  $\mu$ mol/l の Hoechst 33342、蛍光標識二次抗体を含む PBS 中で 30 分間インキュベートする。  
※3
7. PBS で 5 分間浸漬し洗浄する。この操作を 3 回繰り返す。

マウス組織

<ライブ染色>

1. マウスから lacZ 発現組織を取り出す。
2. 10-20  $\mu$ mol/l の SPiDER- $\beta$ Gal working solution を含む培地で 37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件にて 20-30 分間インキュベートする。  
※1、※2、※3

<固定組織の染色>

1. マウスから lacZ 発現組織を取り出す。
2. 組織を 1% パラホルムアルデヒド (PFA)、0.2% グルタルアルデヒド (GA) を含む固定液にて固定する。
3. 組織を 10-20  $\mu$ mol/l の SPiDER- $\beta$ Gal working solution を含む PBS 中で室温条件下 60 分間インキュベートする。  
※1、※3

※1 核を同時染色したい場合、16  $\mu$ mol/l Hoechst 33342 を同時に添加します。

※2 染色後に 4%PFA を含む PBS 溶液で固定することも可能です。

※3 インキュベーション時間は用いる組織に応じて最適化します。

### 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, "Detection of LacZ-Positive Cells in Living Tissue with Single-Cell Resolution.", *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2016**, 55 (33), 9620
- 2) H. Omori, S. Ogaki, D. Sakano, M. Sato, K. Umeda, N. Takeda, N. Nakagata, S. Kume, "Changes in Expression of C2cd4c in Pancreatic Endocrine Cells During Pancreatic Development.", *FEBS Lett.*, **2016**, 509 (16), 2584
- 3) 堂浦智裕, 神谷真子, 浦野泰照, "生体組織中の lacZ 発現細胞のライブ蛍光検出", *実験医学*, **2016**, 34 (19), 3197
- 4) Y. Nakamura, A. Mochida, T. Nagaya, S. Okuyama, F. Ogata, P. L. Choyke, and H. Kobayashi, "A Topically-Sprayable, Activatable Fluorescent and Retaining Probe, SPiDER- $\beta$ Gal for Detecting Cancer, Advantages of Anchoring to Cellular Proteins after Activation", *Oncotarget*, **2017**, 8, 39512.
- 5) S. Lu, S. Liu, A. Wietelmann, B. Kojonazarov, A. Atzberger, C. Tang, R. T. Schermuly, H. J. Groene, and S. Offermanns, "Developmental vascular remodeling defects and postnatal kidney failure in mice lacking Gpr116 (Adgrf5) and Eitd1 (Adgrl4)", *PLoS ONE.*, **2017**, 12, e0183166.

### FAQ

Q: 既存の  $\beta$ -galactosidase 検出試薬に対する利点を教えてください。

A: 生細胞に適用できます。また細胞膜透過性、細胞内滞留性が優れているため  $\beta$ -galactosidase 発現細胞のみを一細胞レベルで染色できます。小社 HP の「 $\beta$ -galactosidase 検出試薬の比較データ」にて詳しい情報がご覧いただけます。

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やメタノールで固定化しても蛍光観察ができます。固定化により  $\beta$ -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。

最新の測定データやアプリケーション、論文情報を小社 HP にて掲載。ご興味のある方は、小社 HP にて最新情報をご確認下さい。

SPiDER 同仁

検索