

Flow Cytometry -Cell Lab Quanta™-

アネキシン V とヨウ化プロピジウム (PI) または 7-アミノ-アクチノマイシン D (7-AAD) によるアポトーシスの解析

はじめに

細胞の収縮、核クロマチン凝縮及び核濃縮などの細胞形態の変化は、ミトコンドリア膜電位の消失、原形質膜非対称性の消失、ヌクレオソーム間での DNA 断片化へと至る生化学的現象とともに、アポトーシスの特徴となります。しかし、アポトーシスを起こしている細胞が必ずしもすべて DNA 鎖の断片化を示すわけではなく、断片化はアポトーシス経路の後期で生じます。

細胞表面へのホスファチジルセリン (PS) 残基 (通常は、原形質膜内に存在する) の局在の変化は、アポトーシスの検出・測定に用いられるパラメータの一つです。

細胞表面の PS の存在は、マクロファージによるアポトーシス細胞の識別と除去のための特異的シグナルの一つとなります。この PS の変化は、PS に対する結合親和性の高い抗凝固物質であるアネキシン V によって検出することができます。

アポトーシスの進行に伴い、細胞膜の完全性が失われます。細胞をヨウ化プロピジウム (PI) または 7-アミノ-アクチノマイシン D (7-AAD) などの DNA 特異的な細胞生死判定用の色素で染色し、Cell Lab Quanta で測定すると、アポトーシスの初期段階、アポトーシスの後期段階及び死細胞を識別することができます。

Cell Lab Quanta は、細胞容積 (EV) と蛍光を同時に測定するフローサイトメトリーシステムです。このアプリケーションノートでは、アポトーシス研究に有用なツールとなる簡単かつ迅速なプロトコルをご紹介します。

材 料

- FLOW-CHECK Fluorospheres 製品番号 6605359
- アネキシン V-FITC/7-AAD キット 製品番号 IM3614
- アネキシン V-FITC/PI キット 製品番号 IM2375

測定手順

1. 細胞浮遊液に氷冷したメディウムまたは PBS を加えて、4°C で 500×g、5 分間遠心洗浄します。上清を除去し、沈さに氷冷した 1×binding Buffer を添加して、 $5 \times 10^6 \sim 10 \times 10^6$ 個/mL となるように再浮遊します。水中に保存します。
2. 細胞浮遊液 100 μ L を用いて、以下のように対照及びサンプルを調製します。

試験管	細胞のみ	未処理		アポトーシス誘導処理	
		7-AAD または PI	アネキシン V-FITC	7-AAD または PI	アネキシン V-FITC
1	×				
2				×	
3					×
4		×	×		
5				×	×

3. 試薬の添加量及びインキュベーション時間については、試薬キットの添付文書をご参照ください。
4. 1×binding Buffer 400 μ L を添加します。サンプルカップに移し、30 分以内に Cell Lab Quanta で測定してください。

測定機器の調整は FLOW-CHECK Fluorospheres を用いて行ってください。

<アポトーシス分析プロトコル>

試験管 1 を用いて、装置の適切な設定を行います。:細胞容積 (EV) については、全細胞集団が表示されるように設定します (図 2)。蛍光については、FL1 及び FL2 集団が各軸の最初の 1 ログスケール内に表示されるように設定します。試験管 1 で設定した後、試験管 2 と試験管 3 を用いて適切な蛍光補正を行います (図 3、4)。試験管 1、2、3 で得られた設定で、試験管 4 を用いて 4 分割リージョンの位置が適切かどうか確認します (図 5)。

試験管 5 を測定し、各 4 分割リージョンの結果を分析します。:4 分割リージョン 1-死細胞、4 分割リージョン 2-後期アポトーシス細胞、4 分割リージョン 3-生細胞、4 分割リージョン 4-初期アポトーシス細胞 (図 6)。

測定機器の構成

- 488 nm レーザ
- 560 ダイクロイックショートパス
- 525/40 バンドパス (FL1) アネキシン V-FITC
- 570 ロングパス (FL2) PI または 7-AAD

参考文献

1. Princeton University, Department of Molecular 1. Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., Currie, A. R.: 1972. Apoptosis, a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26: 239–245.
2. Wyllie, A. H., Morris, R. G., Smith, A. L., Dunlop, D.: 1984. Chromatin cleavage in apoptosis: Association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J. Pathol* 142: 62–77.
3. Oberhammer, F., Wilson, J. W., Dive, C., Morris, I. D., Hickman, J. A., Wakerling, A. E., Walker, P. R., Sikorska, M.: 1993. Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *EMBO J* 9, 12: 3679–3684.
4. Martin, S. J., Reutelingsperger, C. P. M., McGahon, A. J., Rader, J., van Schie, R. C. A. A., LaFace, D. M., Green, D. R.: 1995. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus. Inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J. Exp. Med.* 182: 1545–1557.
5. Fadok, V. A., Voelker, D. R., Campbell, P. A., Cohen, J. J., Bratton, D. L., Henson, P. M.: 1992. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol* 7, 148: 2207–2216.
6. Diaz, C., Schroit, A. J.: 1996. Role of translocases in the generation of phosphatidylserine asymmetry. *J. Membrane Biol.* 151: 1–9.
7. Homburg, C. H. E., de Haas, M., von dem Borne, E. G. Kr., Verhoeven, A. J., Reutelingsperger, C. P. M., Roos, D.: 1995. Human neutrophils lose their surface FCγRIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis in vitro. *Blood* 2, 85: 532–540.
8. De Rosa, L.: 1993. Bone marrow autograft with immunomagnetic beads purging in poor prognosis B lymphoid malignancies. *Haematologica* 1, 78: 203.
9. Verhoven, B., Schlegel, R. A., Williamson, P.: 1995. Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 182: 1597–1601.
10. Vermes, I., Haanen, C., Reutelingsperger, C. P. M.: 1995. A novel assay for apoptosis: Flow Cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labeled Annexin V. *J. Immunol. Methods* 180: 39–52.
11. Castedo, M., Hirsch, T., Susin, S. A., Zamzami, N., Marchetti, P., Macho, A., Kroemer, G.: 1996. Sequential acquisition of mitochondrial and plasma membrane alterations during early lymphocyte apoptosis. *J. Immunol* 157: 512–521.
12. Aubry, J. P., Blaecke, A., Lecoanet-Henchoz, S., Heannin, P., Herbault, N., Caron, G., Moine, V., Bonnefor, J. Y.: 1999. Annexin V used for measuring apoptosis in the early events of cellular cytotoxicity. *Cytometry* 37: 197–204.
13. Koopman, G., Reutelingsperger, C. P. M., Kuijten, G. A. M., Keehnen, R. M. J., Pais, S. T., van Oers, M. H. J.: 1994. Annexin V for flow Cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 5, 84: 1415–1420.
14. Van Engeland, M., Ramaekers, F. C. S., Schutte, B., Reutelingsperger, C. P. M.: 1996. A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. *Cytometry* 24: 131–139.
15. Pepper, C., Thomas, A., Tucker, H., Hoy, T., Bentley, P.: 1998. Flow Cytometric assessment of three different methods for the measurement of in vitro apoptosis. *Leukemia Res* 22: 439–444.
16. Berthou, C., Michel, L., Soulie, A., Jean-Louis, F., Flageul, B., Bubertret, L., Sigaux, F., Zhang, Y., Sasportes, M.: 1997. Acquisition of granzyme B and Fas Ligand Proteins by human keratinocytes contributes to epidermal cell defense. *J. Immunol* 159: 5293–5300.
17. van den Eijnde, S., Boshart, L., Reutelingsperger, C. P. M., De Zeeuw, C. I., Vermeij-Keers, C.: 1997. Phosphatidylserine plasma membrane asymmetry in vivo: a pan-cellular phenomenon which alters during apoptosis. *Cell Death Differentiation* 4: 311–316.
18. van den Eijnde, S. M., Boshart, L., Baehrecke, E. H., De Zeeuw, C. I., Reutelingsperger, C. P. M., Vermeij-Keers, C.: 1996. Cell surface exposure of phosphatidylserine during apoptosis is phylogenetically conserved. *Apoptosis* 3: 9–16.

VIABILITY APPLICATION

7-AAD or PI

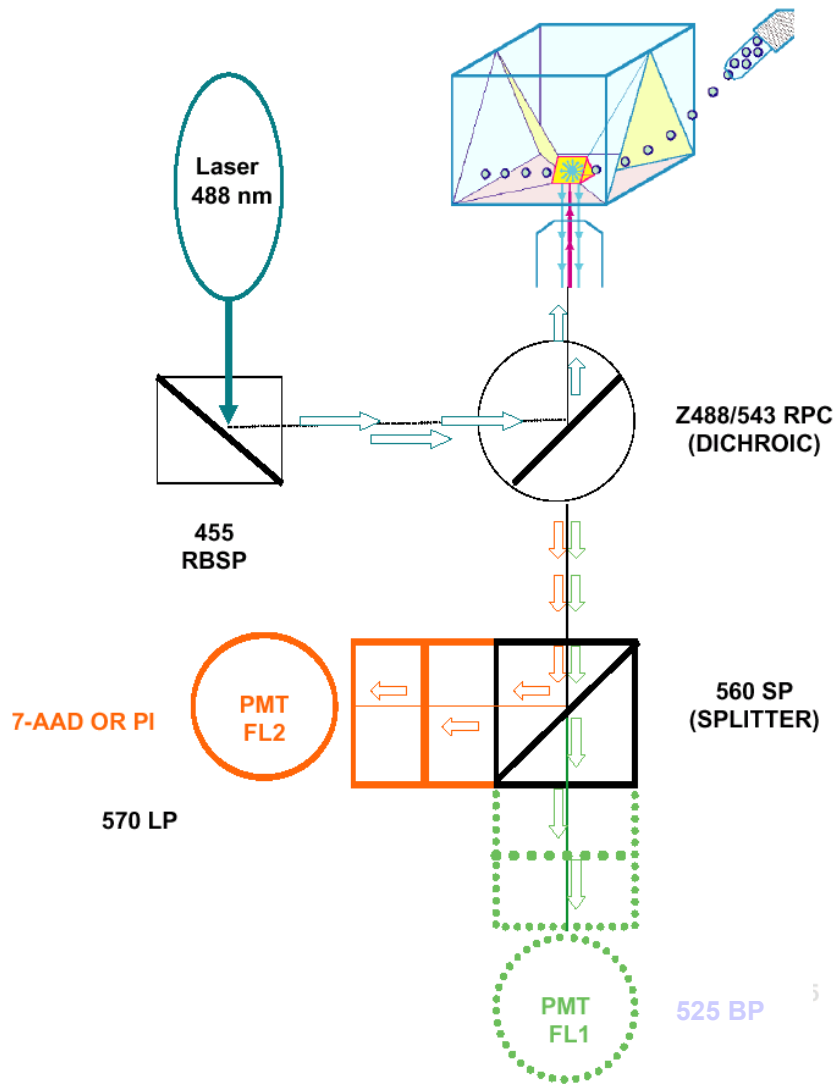


図1.

Cell Lab Quantaの 488 nmダイオードレーザー光学系配置

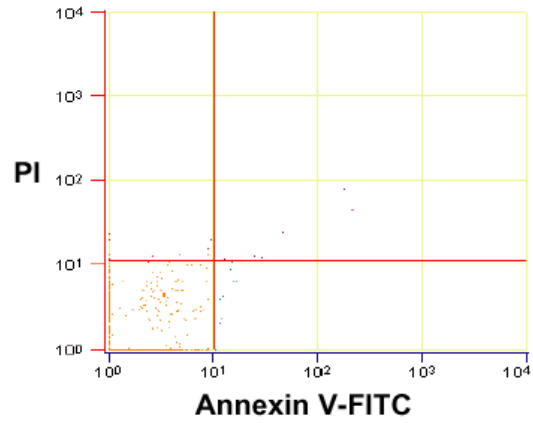
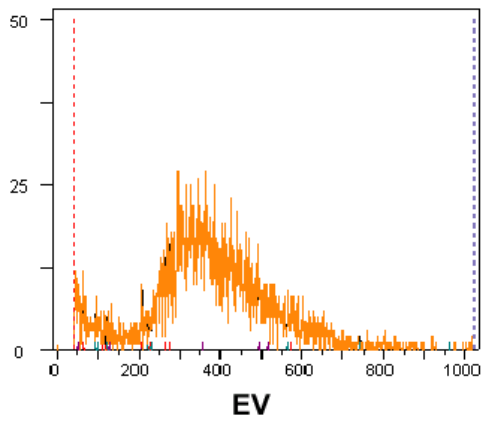


図2.

アポトーシス-アネキシン V-FITC と PI

試験管 1: 正常 Jurkat 細胞 (未処理) で細胞容積の測定範囲を設定し、FL1 及び FL2 の蛍光シグナルが最初の1ログスケール内に入るように設定

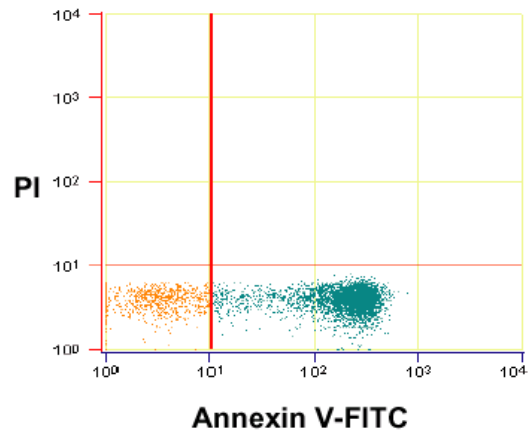
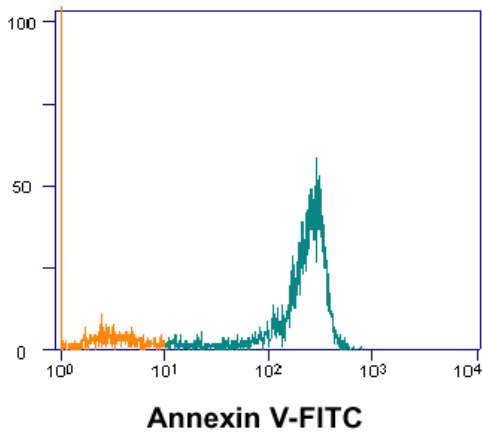


図3.

アポトーシス-アネキシン V-FITC と PI

試験管 2: Camptothecin を 37°C で一晩作用させて (アポトーシス誘導処理)、アネキシン V-FITC のみ染色した Jurkat 細胞

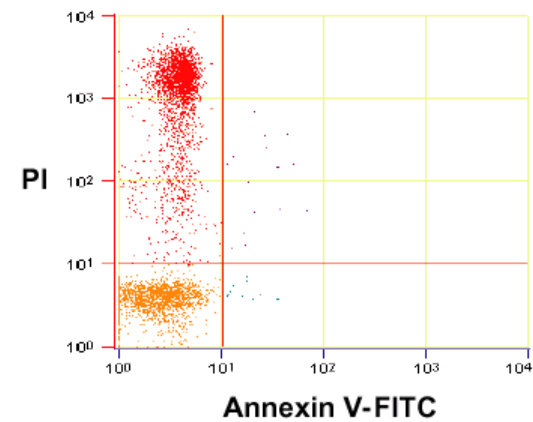
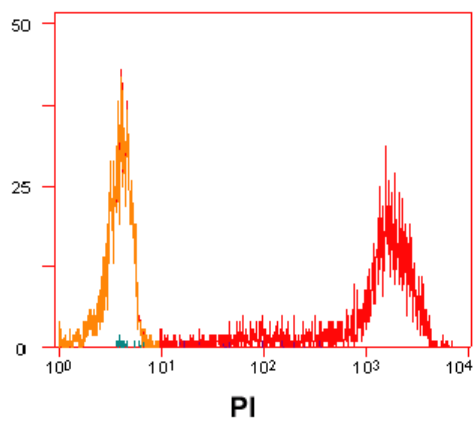
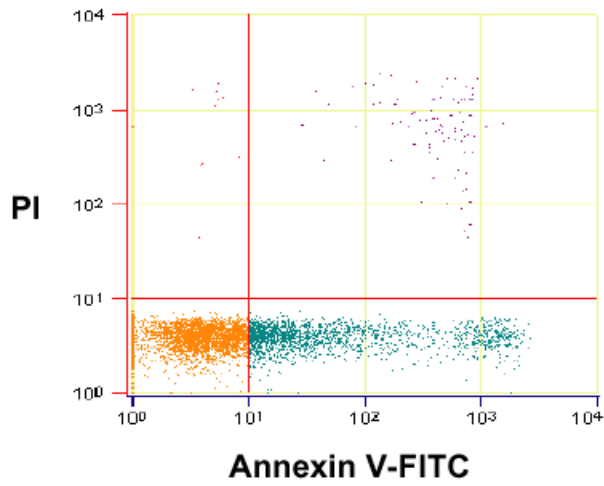


図4.

アポトーシス-アネキシン V-FITC と PI

試験管 3: Camptothecin を 37°C で一晩作用させて (アポトーシス誘導処理)、PI のみ染色した Jurkat 細胞

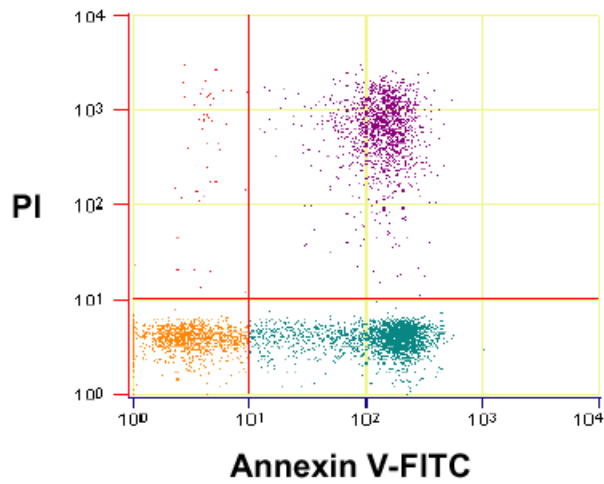


	Dead Cells	Late Apoptosis	Viable Cells	Early Apoptosis
PCT	0.22	1.68	63.74	34.36

図5.

アポトーシス-アネキシン V-FITC と PI

試験管 4: Camptothecin を 37℃で一晩作用させて(アポトーシス誘導処理)、PIのみ染色した Jurkat 細胞



	Dead Cells	Late Apoptosis	Viable Cells	Early Apoptosis
PCT	0.96	27.52	25.58	45.94

図6.

アポトーシス-アネキシン V-FITC と PI

試験管 5: Camptothecin を 37℃で一晩作用させて(アポトーシス誘導処理)、アネキシン V-FITC と PI で染色した Jurkat 細胞

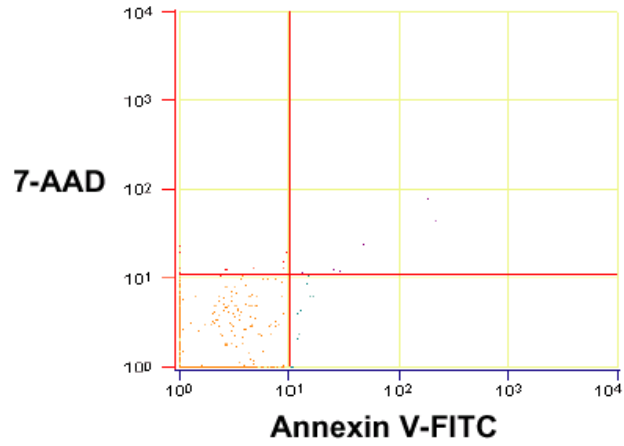
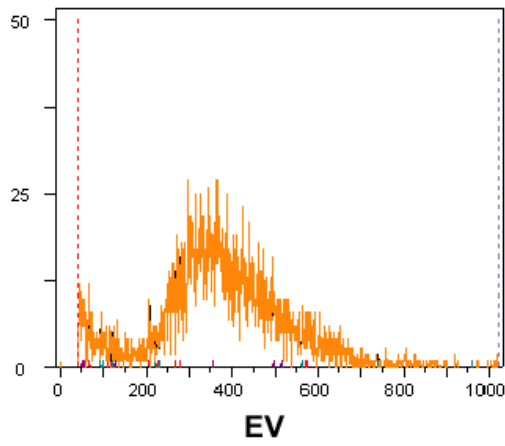


図7.

アポトーシス-アネキシン V-FITC と 7-AAD

試験管 1: 正常 Jurkat 細胞 (未処理) で細胞容積の測定範囲を設定し、FL1 及び FL2 の蛍光シグナルが最初の1ログスケール内に入るように設定

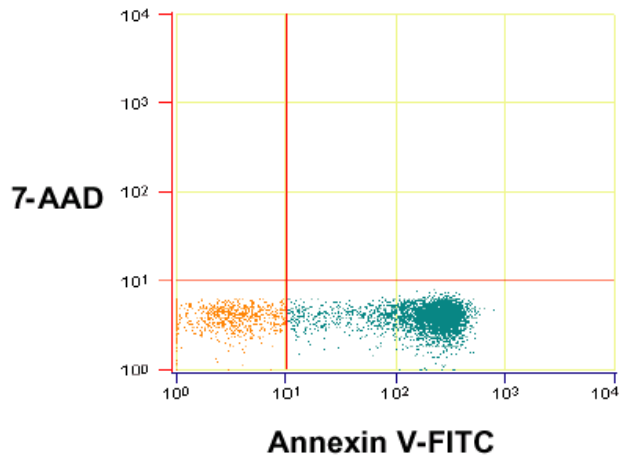
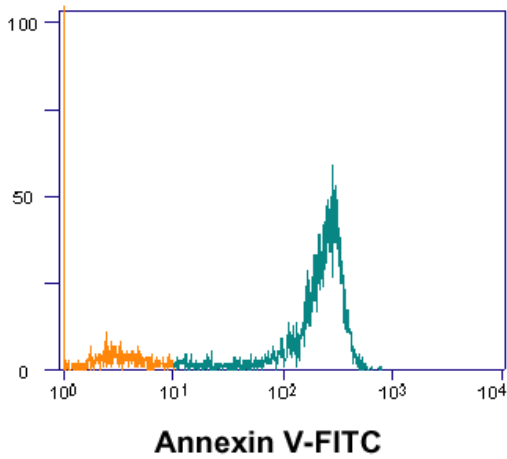


図8.

アポトーシス-アネキシン V-FITC と 7-AAD

試験管 2: Camptothecin を 37°C で一晩作用させて (アポトーシス誘導処理)、アネキシン V-FITC のみ染色した Jurkat 細胞

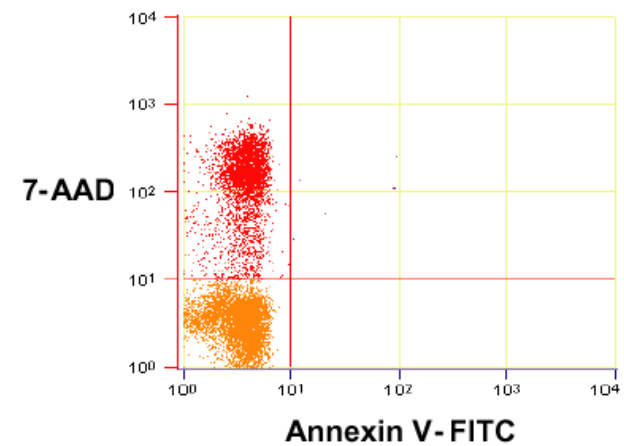
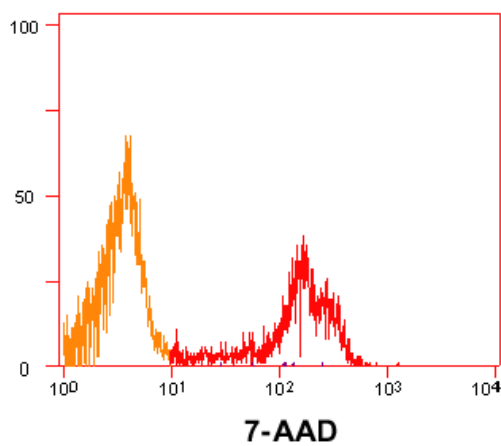
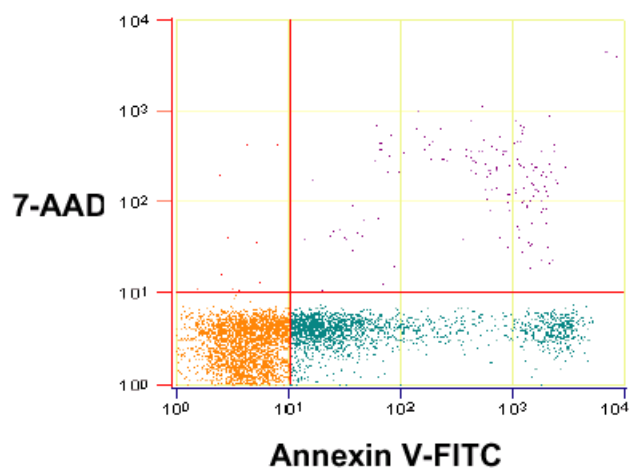


図9.

アポトーシス-アネキシン V-FITC と 7-AAD

試験管 3: Camptothecin を 37°C で一晩作用させて (アポトーシス誘導処理)、7-AAD のみ染色した Jurkat 細胞

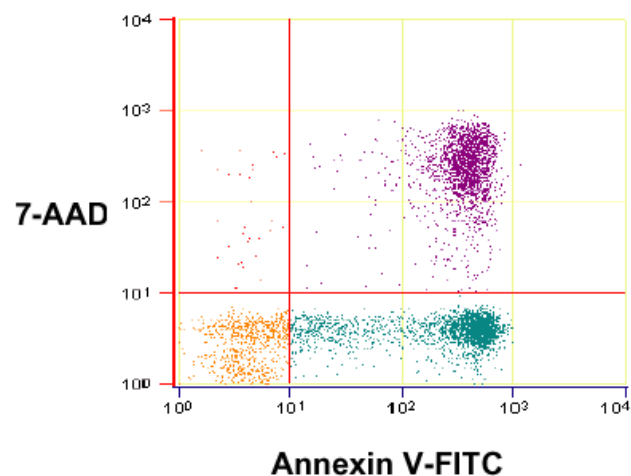


	Dead Cells	Late Apoptosis	Viable Cells	Early Apoptosis
PCT	0.22	2.86	57.26	39.66

図10.

アポトーシス-アネキシン V-FITC と 7-AAD

試験管 4: アネキシン V-FITC と 7-AAD で染色した正常 Jurkat 細胞 (未処理)



	Dead Cells	Late Apoptosis	Viable Cells	Early Apoptosis
PCT	0.58	38.66	13.72	47.04

図11.

アポトーシス-アネキシン V-FITC と 7-AAD

試験管 5: Camptothecin を 37°C で一晩作用させて (アポトーシス誘導処理)、アネキシン V-FITC と 7-AAD で染色した Jurkat 細胞

ベックマン・コールター株式会社

本 社 〒105-0001 東京都港区虎ノ門3-5-1 虎ノ門37森ビル

お客様専用 ☎0120-70-5203 ☎03-5404-8424 FAX03-3578-4605

URL <http://www.beckmancoulter.co.jp>

アプリケーション関連: FAX03-5404-8364 E-mail bckkas@beckmancoulter.co.jp

札幌 ☎011-825-9244 ・ 仙台 ☎022-225-8072 ・ 名古屋 ☎052-934-3082 ・ 大阪 ☎06-4863-1674 ・ 広島 ☎082-261-6863 ・ 福岡 ☎092-622-7392

上記の他にも万全のサービスネットワークで、全国のお客様をサポートいたします。