Cellular Senescence Detection Kit - SPiDER-βGal

Technical Manual

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 に損傷を生じます。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ます。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ます。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ますが、(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) 染色された細胞を目視により判別す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ます。

本製品は、SA-β-gal を簡便かつ高感度に検出するためのキットです。キット付属の SPiDER-βGal は、細胞膜透過性が高く、優れた細胞内滞留性を有する新規の β- ガラクトシダーゼ検出用蛍光プローブであり、内在性の β- ガラクトシダーゼ活性を抑制するための試薬（Bafilomycin A1）と併用することで、固定化細胞だけでなく生細胞内の SA-β-gal を特異的に検出することができます。そのため、フローサイトメトリーを用いた定量解析にも有用です。

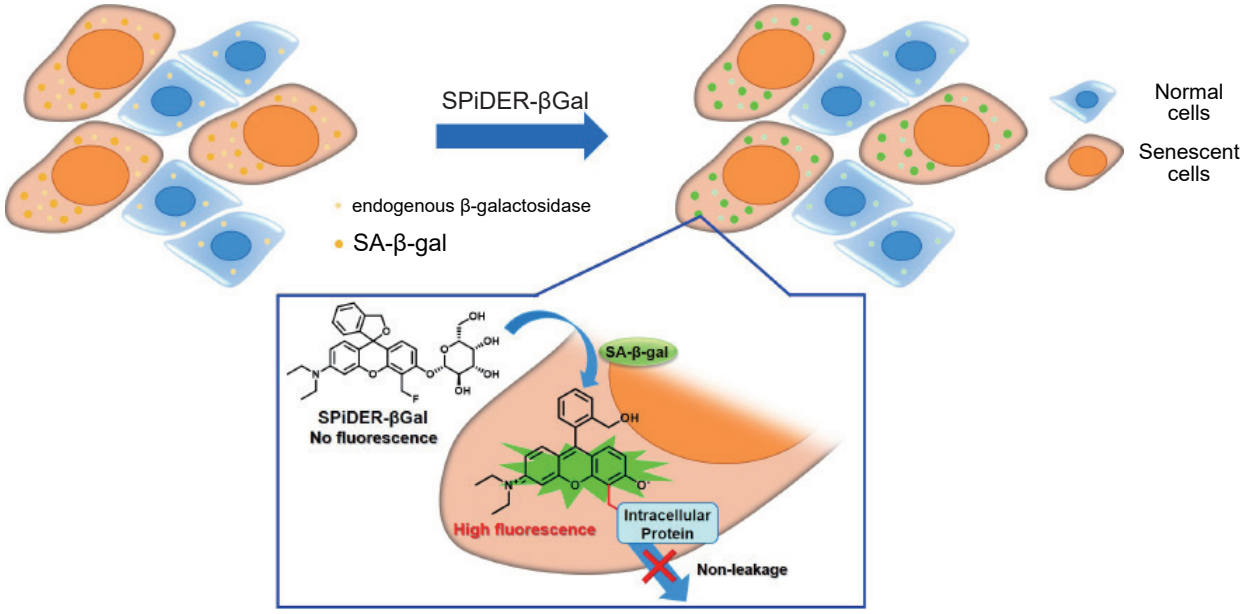

図 1　SPiDER-βGal による老化細胞の検出原理

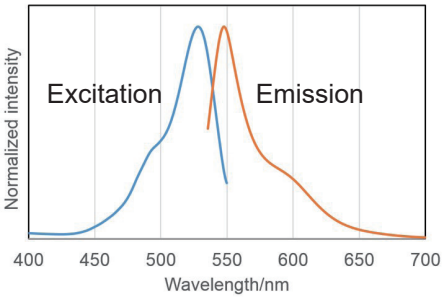

図 2　β- ガラクトシダーゼと反応後の SPiDER-βGal の励起・蛍光スペクトル

＜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。

キット内容

- SPiDER-βGal　x 1
- Bafilomycin A1　x 1

※ Bafilomycin A1 は極少量であるため、内容物が見え難くなっております。
取扱いにご注意下さい。

キット容量

10 assays（35 mm dish）

保存条件

0-5°C にて保存して下さい。

必要なもの（キット以外）

- Dimethyl sulfoxide (DMSO)
- 培地または HBSS
- マイクロピペット

溶液調製

SPiDER-βGal DMSO stock solution の調製

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。
溶解後の SPiDER-βGal DMSO stock solution は、-20°C 以下で保存して下さい。

Bafilomycin A1 DMSO stock solution の調製

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。
溶解後の Bafilomycin A1 DMSO stock solution は、-20°C 以下で保存して下さい

操作

※細胞老化が進むと細胞内にリポフスチンと呼ばれる不溶性物質が蓄積してきます。リポフスチンは自家蛍光を発するため、蛍光観察時にバックグラウンドとして影響することがあります。その場合、老化細胞中の SA-β-gal 活性を正確に評価するために、SPiDER-βGal を添加しない試料もご用意いただき確認することをお勧めします。詳細は小社製品 HP 中の FAQ『蛍光観察時の注意点』をご確認ください。

ー生細胞を用いたアッセイー

Bafilomycin A1 working solution の調製

Bafilomycin A1 DMSO stock solution を培地または HBSS で 1,000 倍希釈する。

SPiDER-βGal working solution の調製

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。
※ 1 ml 調製する場合、SPiDER-βGal DMSO stock solution 1 µl と Bafilomycin A1 DMSO stock solution 1 µl を培地または HBSS 1 ml に加えて調製する。

1. 細胞を 35 mm ディッシュに播種し、37°C、5% CO_2 インキュベーターで一晩培養する。
2. 培地を吸引除去し、培地または HBSS 2 ml で 1 回洗浄する。
3. 調製した Bafilomycin A1 working solution 1 ml を加え、37°C、5% CO_2 インキュベーターで 1 時間静置する。
4. 調製した SPiDER-βGal working solution 1 ml を加え、37°C、5% CO_2 インキュベーターで 30 分間静置する。
5. 上澄みを吸引除去し、培地または HBSS 2 ml で 2 回洗浄後、蛍光顕微鏡で観察あるいはフローサイトで測定する。

ー固定化細胞を用いたアッセイー

SPiDER-βGal working solution の調製

SPiDER-βGal DMSO stock solution を McIlvaine buffer（pH 6.0）で 2,000 倍希釈する。
※ McIlvaine buffer（pH 6.0）: 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 を混合して調製し、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で pH 6.0 に調整する。この水溶液を超純水で 5 倍希釈する。

1. 細胞を 35 mm ディッシュに播種し、37°C、5% CO_2 インキュベーターで一晩培養する。
2. 培地を吸引除去し、HBSS 2 ml で 1 回洗浄後、4% パラホルムアルデヒド（PFA）/PBS 溶液 2 ml を添加し、室温で 3 分間固定化する。
3. 4% PFA/PBS 溶液を吸引除去し、HBSS 2 ml で 3 回洗浄する。
4. 調製した SPiDER-βGal working solution 2 ml を加え、37°C で 30 分間インキュベートする。
   ※固定化細胞を用いて SA-β-gal を検出する際は、5% CO_2 インキュベーターは使用しないで下さい。
   5% CO_2 インキュベーターを使用した場合、working solution の pH が酸性側に傾き、内在性の β- ガラクトシダーゼと反応することにより、バックグラウンドが上昇する恐れがあります。
5. インキュベート後、HBSS 2 ml で 2 回洗浄し、蛍光顕微鏡で観察あるいはフローサイトで測定する。

実験例

SA-β-gal の蛍光イメージング

1. 継代数 0 回および継代数 12 回の WI-38 細胞（5×10^4 cells/dish、10% fetal bovine serum、1% penicillin-streptomycin を含む MEM 培地）をそれぞれ µ-Dish 35 mm（ibidi 社製）に播種し、37°C、5% CO_2 インキュベーターで一晩培養した。
2. 培地を吸引除去し、HBSS 2 ml で 1 回洗浄した。
3. 調製した Bafilomycin A1 working solution 1 ml を加え、37°C、5% CO_2 インキュベーターで 1 時間静置した。
4. 調製した SPiDER-βGal working solution 1 ml に 1 mg/ml Hoechst 33342 水溶液 1µl を混合した溶液を加え、37°C、5% CO_2 インキュベーターで 30 分間静置した。
5. 上澄みを吸引除去し、HBSS 2 ml で 2 回洗浄後、HBSS 2 ml を加え共焦点レーザー顕微鏡で観察した。
   （励起波長 : 488 nm、蛍光波長 : 500-600 nm）

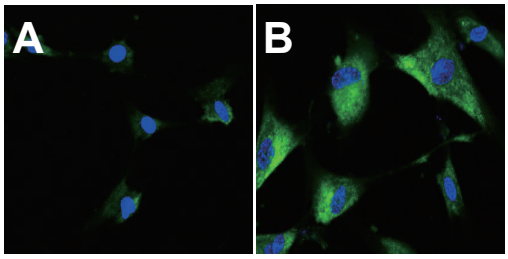

図 3 SA-β-gal の蛍光イメージング画像
A. 継代数 0 回　B. 継代数 12 回
（緑 : SPiDER-βGal、青 : Hoechst 33342）

フローサイトメトリーによる SA-β-gal 陽性細胞の定量解析

1. 継代数 1 回および継代数 12 回の WI-38 細胞（1×10^5 cells/dish、10% fetal bovine serum、1% penicillin-streptomycin を含む MEM 培地）をそれぞれ µ-Dish 35 mm（ibidi 社製）に播種し、37°C、5% CO_2 インキュベーターで一晩培養した。
2. 培地を吸引除去し、HBSS 2 ml で 1 回洗浄した。
3. 調製した Bafilomycin A1 working solution 1 ml を加え、37°C、5% CO_2 インキュベーターで 1 時間静置した。
4. 調製した SPiDER-βGal working solution 1 ml を加え、37°C、5% CO_2 インキュベーターで 30 分間静置した。
5. 上澄みを吸引除去し、HBSS 2 ml で 2 回洗浄した。
6. トリプシン処理により細胞を剥がした後、MEM 培地（10% fetal bovine serum、1% penicillin-streptomycin）で希釈し、フローサイトメーターで測定した（励起波長： 488 nm、蛍光波長 : 515-545 nm）。

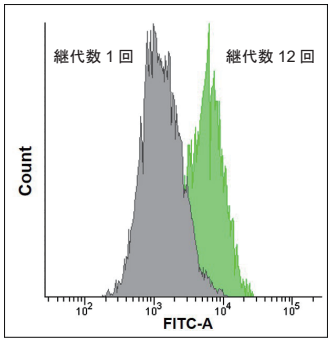

図 4　SA-β-gal 陽性 WI-38 細胞の定量

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