

【RF-500】アポトーシスの解析

– Annexin V/PIを用いた細胞膜変化の検出 –

アプリケーションレポート Vol.27

アポトーシスとは細胞死の一種で、生物の発生過程や癌化した細胞の除去など組織をより良い状態に保つためにプログラムされた能動的な細胞死です。アポトーシスが引き起こされると、細胞膜の内側（細胞質）に存在するホスファチジルセリンが細胞膜の脂質二重層を通過して外側に転移することが知られています。Annexin Vはホスファチジルセリンに特異的に結合するタンパク質であり、蛍光標識されたAnnexin Vを用いることでアポトーシスの初期段階に生じる細胞膜の変化を検出し、アポトーシス細胞を同定することができます。本アプリケーションレポートでは、Annexin V/PIとフローサイトメーター RF-500を用いたアポトーシス解析の例をご紹介します。

結果

Jurkat細胞を10 μM Actinomycin Dで0, 3, 6, 12時間処理しました。細胞を回収後、Annexin V-FITCとPIで二重染色し、フローサイトメーター RF-500で測定しました。Actinomycin D処理により初期アポトーシス(Gate-4)、後期アポトーシス(Gate-2)領域の細胞割合がともに経時的に増加し、処理12時間後には約60%の細胞がアポトーシスを起こしていると考えられました。

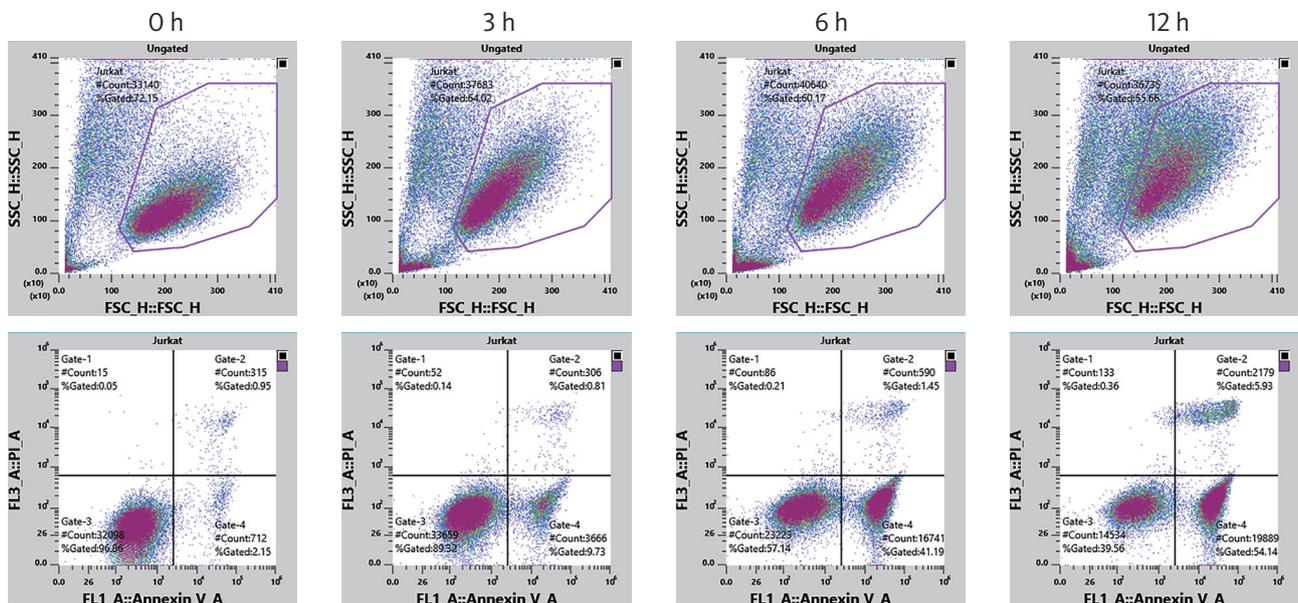


図1. Annexin V/PIとフローサイトメーター RF-500を用いたJurkat細胞の細胞膜変化の検出

(Gate-2) ネクローシスまたは後期のアポトーシス細胞の領域

ホスファチジルセリンが細胞膜表面に露出し、細胞膜に損傷が起こっている。

(Gate-3) 正常細胞の領域

ホスファチジルセリンが細胞膜の内側に存在し、細胞膜に損傷が起こっていない。

(Gate-4) 初期のアポトーシス細胞の領域

ホスファチジルセリンが細胞膜表面に露出しているが、細胞膜の損傷は起こっていない。

サンプル調製・測定

1. Jurkat細胞を 5×10^5 cells/mLに濃度調製し、一晚培養します。
2. 細胞を回収後 1×10^6 cells/mLに濃度調製し、12 wellプレートに1 mLずつ播種します。
3. Actinomycin Dを10 μ Mの濃度になるように添加し培養します。
4. 細胞を回収しPBS (-)で2回洗浄後、500 μ LのAnnexin V Binding Buffer(1x)で懸濁します。
5. 100 μ Lの細胞懸濁液を新しいチューブに移し、Annexin V-FITC Solutionを5 μ L添加します。
6. 遮光して、室温で15分間反応させます。
7. PI Solutionを5 μ L添加し、次に400 μ LのAnnexin V Binding Buffer(1x)を添加します。
8. CellTrics 30 μ mフィルターでろ過後、フローサイトメーター RF-500で測定します。

試薬・機器

- Actinomycin D - Apoptosis Inducer Set (Promocell, cat# PK-CA577-K121-5)
- Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (ナカライテスク, cat# 15342-54)
- CellTrics 30 μ m (Sysmex, cat# BP486257)
- フローサイトメーター RF-500 (Sysmex, cat# BF209548)

※ すべて研究用機器・試薬のため診断には使用できません。

※ 本誌の内容を無断で複写・複製・転写すると、著作権・出版権の侵害となることがありますのでご注意ください。

お問合せ先

シスメックス株式会社

日本・東アジア地域本部 R&I営業推進部

ソリューションセンター 神戸市西区室谷1-3-2 〒651-2241

東京支社 東京都品川区大崎1-2-2 〒141-0032