

# 細胞に生じる様々な事象の評価

アポトーシス、細胞周期および細胞増殖

細胞増殖とアポトーシスのバランスは、発生と正常な組織の恒常性維持のため非常に重要です。細胞増殖は、細胞の成長と分裂による細胞数の増加であり、一連の「期」に分けられる細胞周期によって制御されています。また、アポトーシス、あるいはプログラム細胞死といった制御された自己破壊を引き起こします。

BD Biosciences は、最先端テクノロジーと製品を統合した包括的アプローチにより、アポトーシス、細胞周期、細胞増殖の研究を支援しています。



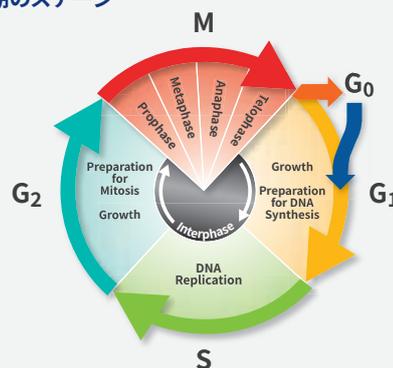
# 細胞周期と細胞増殖

真核細胞における細胞成長、複製、および分裂は、細胞周期と呼ばれる高度にコントロールされた一連の事象に従って起こります。様々な手法を使用することで、細胞周期の状態や個々の細胞の組織局在を、素早くかつ正確に判定できます。

## 細胞周期解析

細胞周期には主要なステージが2つあります。有糸分裂の間期、母細胞が2つの同一の遺伝子をもつ娘細胞に分裂する分裂期です。間期には3つの異なる連続的な段階があります。G1と呼ばれる最初の段階では、細胞は自身の環境を「モニター」し、必要なシグナルを受け取ると、細胞は成長を誘発させるためにRNAやタンパクを合成します。条件が整うと、細胞は細胞周期のS期に入り、DNA合成に「コミット」し、染色体DNAを複製します。最後にG2期で、細胞は成長を続け、有糸分裂に備えます。

細胞周期のステージ



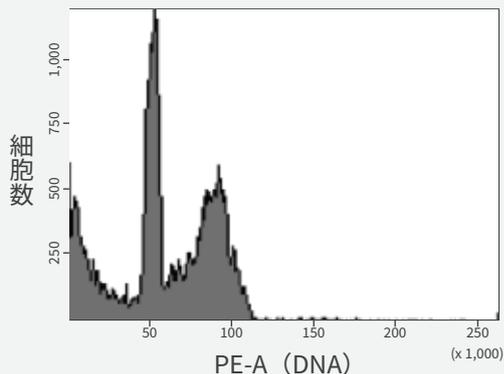
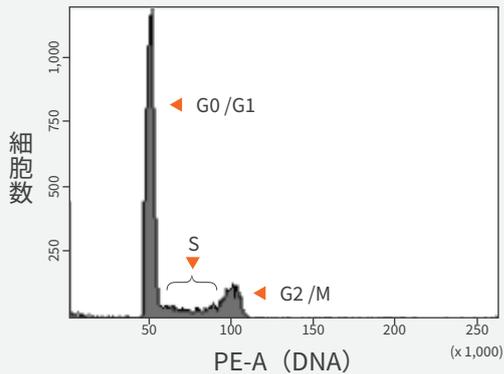
細胞周期・細胞増殖の測定方法				
測定	試薬	メカニズム	手法	サンプル
DNA	PI, 7-AAD, Hoescht, DRAQ5 <sup>™</sup> , DRAQ7 <sup>™</sup>	DNA2 本鎖との相互作用	フローサイトメトリー	固定、膜透過、無傷細胞の生 / 死識別
細胞増殖測定	BD Horizon <sup>™</sup> Violet Proliferation Dye 450 (VPD450), CFSE	生細胞に浸透後、細胞内の非特異的エステラーゼで加水分解され蛍光物質を産生	フローサイトメトリー	増殖している生細胞
新規合成DNA	BrdU と BrdU 抗体	BrdU が分割 DNA 中のチミジン (T) と置き換わり、BrdU 抗体で検出	フローサイトメトリー、細胞イメージング、免疫組織化学	固定・膜透過細胞、処理した組織 (細胞イメージング、免疫組織化学のみ)
タンパク量 (増殖)	Ki67, PCNA 抗体	増殖時のタンパク質の増加	フローサイトメトリー、バイオイメージング、免疫組織化学、ウェスタンブロット	固定細胞、組織、および抽出物
タンパク量 (細胞周期)	サイクリン、網膜芽細胞腫 (Rb)、その他の細胞周期マーカー抗体	細胞周期のステージによって増減	フローサイトメトリー、バイオイメージング、免疫組織化学、ウェスタンブロット	固定細胞、組織、および抽出物
タンパク修飾	リン酸化ヒストン H3、サイクリン依存性キナーゼ (cdk) 抗体	細胞増殖または細胞周期の変化によるリン酸化タンパクの検出	フローサイトメトリー、バイオイメージング、免疫組織化学、ウェスタンブロット	固定細胞、組織、および抽出物
タンパク定量	BD <sup>™</sup> CBA	ビーズアッセイによる目的タンパクの定量	フローサイトメトリー	上清および抽出物

## 細胞の DNA 含量解析

DNA 含量の変化を測定することで細胞周期を解析します。

### 解析試薬

- 核酸染色剤  
PI, Hoescht, DAPI7, AAD 等
- BD Cycletest™ Plus Reagent Kit (カタログ番号: 340242) 核酸染色剤 PI に加え、RNA 分解剤等のサンプル調整に必要な試薬を含むキットです。
- その他の評価  
倍数性評価、異なる DNA をもつ細胞集団の同定、DNA インデックスや種属系統の細胞周期分布評価のため、フローサイトメーターを使ってサンプルを分析します。  
細胞周期の段階が進んでいくと、Histon H3 Ser28 タンパクがリン酸化されるなど、修飾を受けたり発現量が変化したりします。DNA の複製を促進させるため、ヒストンは修飾され複製を開始できるようにクロマチンを開きます。



**コルセミド\* 処理をした細胞では  
4 倍体 DNA 量が増加している**

\* 分裂阻害剤、紡錘体の形成を妨げ、M 期で停止させる作用がある

### コルセミド処理をした マウス脾臓細胞の DNA 含有量解析

濃縮されたマウス CD4<sup>+</sup> 脾細胞を抗 CD3/CD28 抗体、IL-2 および IL-4 と共に 6 日間培養した。細胞を採集し、10 ng/mL の IL-2+1 μg/mL のコルセミドで 4 時間 (上) または 24 時間 (下) 処理し、BD Cycletest Plus DNA Reagent Kit で染色した。

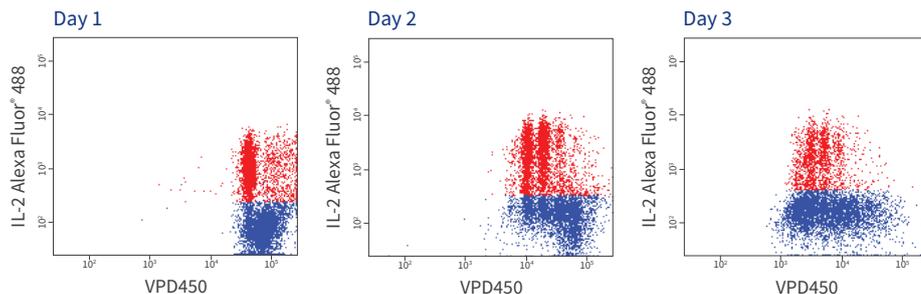
## 細胞増殖解析

細胞増殖は、サイトカインを始めとした種々の刺激に反応して起こり得ます。VPD450 はバイオレットレーザー、CFSE はブルーレーザーで細胞増殖を検出する色素です。これらの非蛍光性の色素は細胞に入った後、細胞内に存在するエステラーゼによりエステル基が切断され、色素が蛍光物に変化し、細胞内に閉じ込められます。細胞複製が起こるたびに細胞あたりの色素の量が減少し、特徴的なパターンとなります。

## 増殖した細胞では IL-2 の産生が増加している

### VPD450 を用いて測定した IL-2 産生と細胞増殖の相関関係

濃縮した CD4<sup>+</sup> マウス細胞に 1 μM の VPD450 を 10 分間処理し、取り込ませた。続いて細胞を抗 CD3/CD28 抗体で刺激し、Day 1、Day 2、Day 3 で細胞を採集した。細胞を採集する約 4 から 6 時間前に、細胞を BD GolgiStop™ (タンパク輸送阻害剤) の存在下、PMA/イオノマイシンで刺激した。細胞を固定し、IL-2 染色後、BD™ LSR II フローサイトメーターで測定した。



# 細胞周期と細胞増殖

## 細胞増殖解析 –

### BrdU による新規 DNA 合成の測定

DNA 前駆物質チミジンのアナログである BrdU を用います。

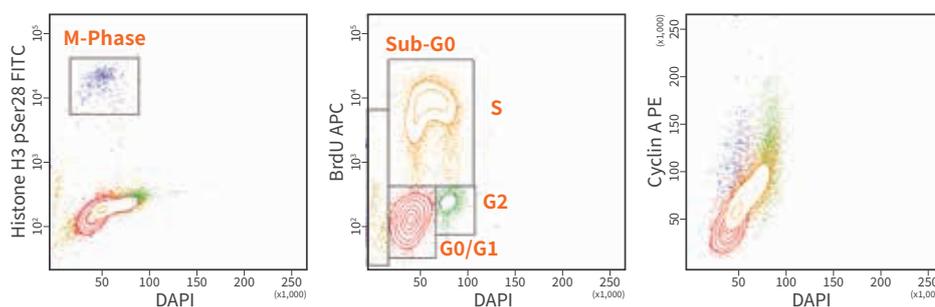
細胞周期の S 期 (DNA 合成) の間、BrdU は新しく合成された DNA に取り込まれ、抗 BrdU 抗体によって容易に検出することが出来ます。BD Biosciencies では、細胞内フローサイトメトリー用と免疫組織化学用の抗体およびキットを取り揃えています。

また、BrdU 取り込みと DNA 量を組合わせて解析することにより、G0/G1 期、S 期、G2/M 期を区別して測定することが出来ます。細胞表面抗原や他のタイプのマーカーと組み合わせて、さらに細胞のサブセットやその情報伝達経路に関する知見を得ることも可能です。

## Cyclin A の量は細胞周期のステージが進むに従って増加し G2 および M 期で最大となる

### HeLa 細胞における細胞周期・サイクリン解析

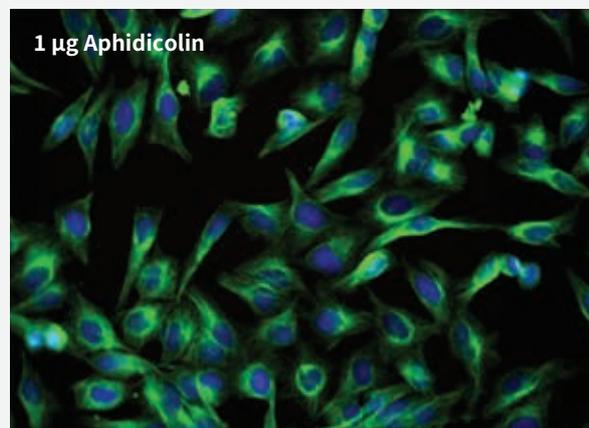
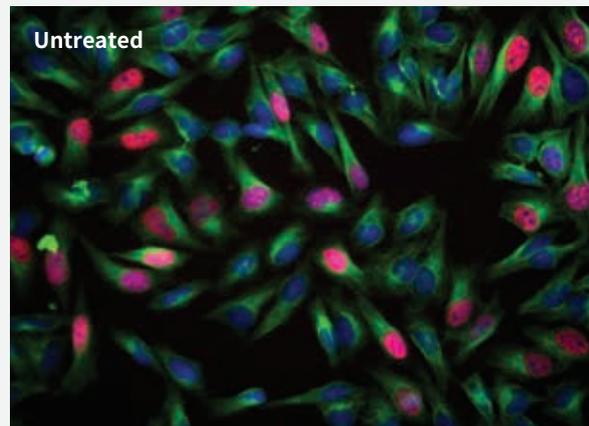
HeLa 細胞に BrdU をパルスし、固定後 APC BrdU Flow kit のプロトコルに従って行った。APC anti-BrdU, AF488 anti-Histone H3 pSer28, PE anti-Cyclin A で染色し、洗浄後 DAPI Solution (カタログ番号: 564907) 1 µg/mL で染色を行った。



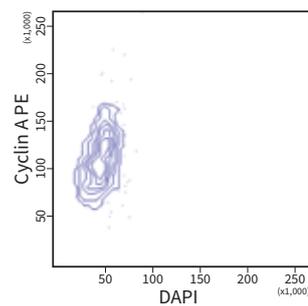
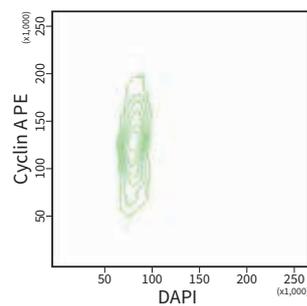
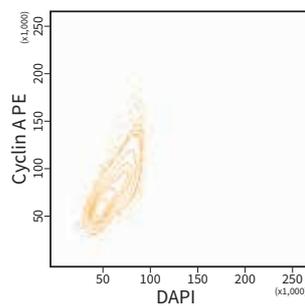
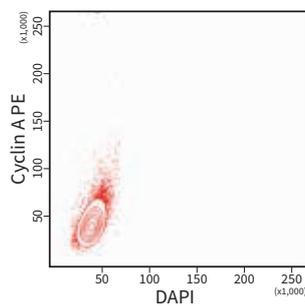
# PROLIFERATION

細胞の増殖期には DNA の増加に加え、ある種のタンパクのレベルも上昇します。例えば、Ki67 は細胞分裂中の核で増加するタンパク質で、細胞周期の G0 期では検出されません。同様に、Histone H3 は M 期のみでリン酸化されるタンパク質であるため、Histone H3 pSer28 は M 期に特異的なマーカーとして用いられます。Ki67 や Histone H3 pSer28 は、BrdU や VPD450 等の他の増殖マーカーと組み合わせることも可能です。これらのマーカーを細胞表面抗原などの他マーカーと組み合わせることにより、さらに細胞のサブセットやそのシグナル伝達経路に関する知見を得ることができます。

**アフィディコリン (DNA ポリメラーゼ阻害剤) で処理した HeLa 細胞の BrdU 染色による細胞周期解析。**  
アフィディコリンは初期 S 期への進行を阻害する。



Target	Pseudo-Color
Hoechst (DNA)	Blue
BrdU	Red
Histone H3 (pSer28)	Yellow
Tubulin	Green



# アポトーシス・プログラム細胞死

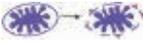
傷害を受けたり必要なくなった細胞は、胚発生や組織の恒常性維持において、正常な生理的プロセスであるアポトーシスまたはプログラム細胞死を起こします。

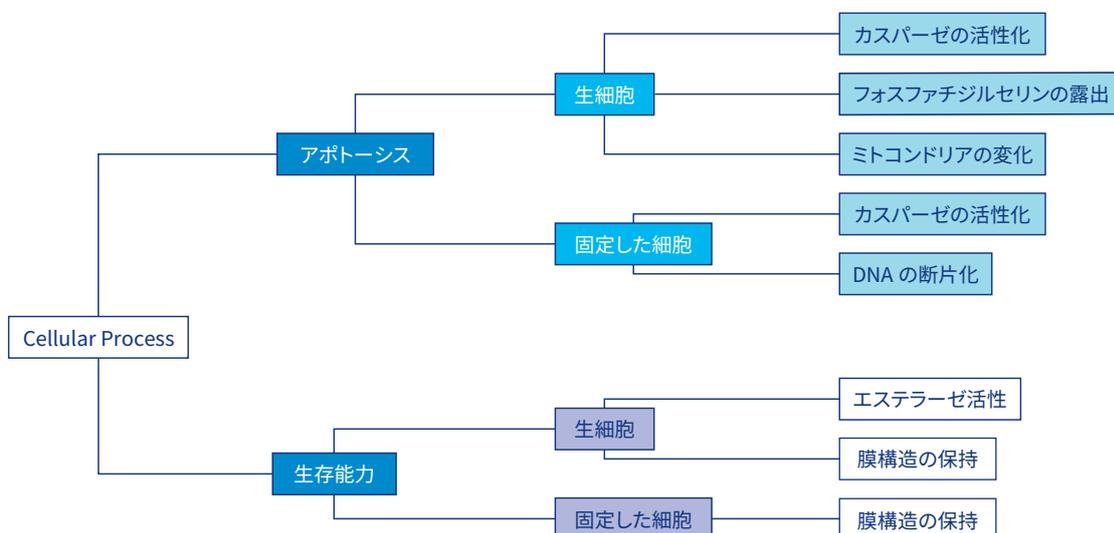
アポトーシスは、細胞再生あるいは異常な細胞成長をコントロールするために、細胞に自己破壊のシグナルを送る組織化されたプロセスです。壊死（ネクローシス）は組織が傷害を受けた結果起こり、傷害を受けた細胞とその周囲の細胞の両方を失うのに対して、アポトーシスは、傷害を受けた細胞の秩序ある死として制御されています。

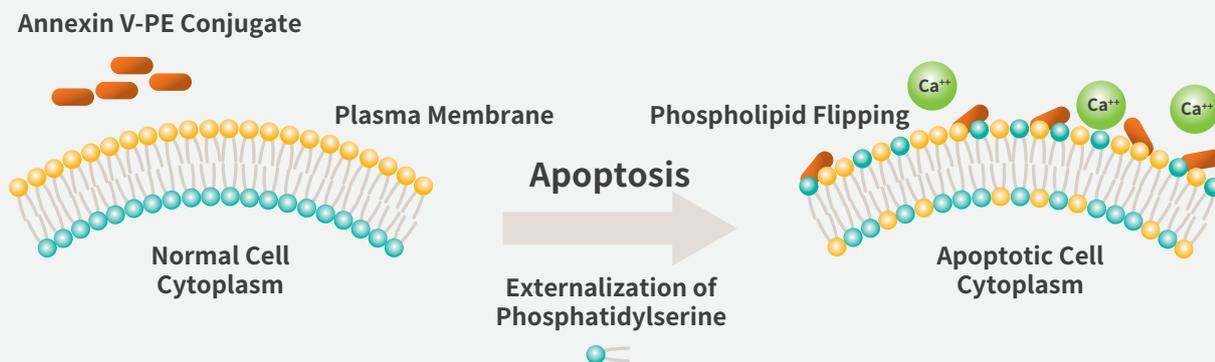
## アポトーシスの形態学的特徴

細胞膜の変化（膜対称性の喪失、膜接着の喪失など）、細胞質と核の凝縮、タンパクの切断、および DNA のヌクレオソーム間切断などを含みます。プロセスの最終段階で、死につく細胞は「アポトーシス小体」へと断片化した状態になり、その結果周囲の細胞に有意な炎症性傷害を及ぼすことなく、食細胞によって除去されます。

しかし、ある種の細胞はアポトーシスに特有の特徴を示しません。この場合、細胞死のメカニズムを確認するには、アポトーシスの複数の事象を解析します。

測定対象	アッセイ	製品の特徴
<b>細胞膜の変化</b> フォスファチジルセリンの露出 	Annexin V binding assay • 標識抗体（シングルターゲット） • Annexin キット	• アポトーシス初期のマーカーを検出 • 迅速、簡易 • フローサイトメトリーまたは蛍光顕微鏡に適用
<b>ミトコンドリアの変化</b> 	• BD Mitoscreen キット	• 迅速、簡易 • フローサイトメトリーまたは蛍光顕微鏡による単細胞解析
<b>Caspase の活性化</b> 	• Caspase Activity アッセイキットおよび試薬 • Active Caspase-3 イムノアッセイ (ELISA)	• 迅速、簡易 • 蛍光分光分析 • ELISA に適用
<b>DNA の断片化</b> 	• APO-DIRECT™ TUNEL アッセイ • APO-BrdU™ TUNEL アッセイ	• 接着細胞への適用 • フローサイトメトリーでの細胞周期解析との併用による単細胞解析





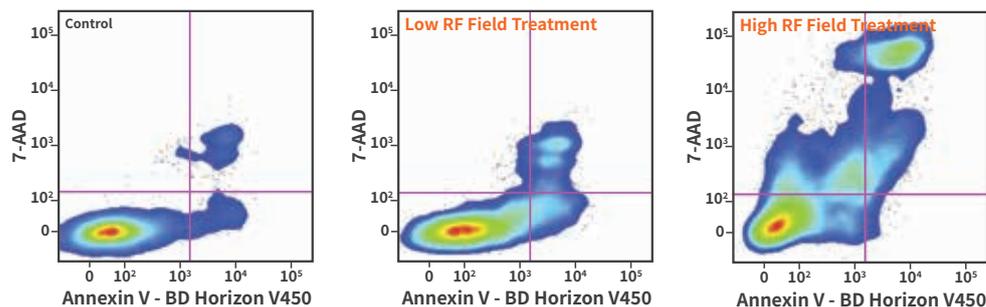
## 細胞膜の変化 — Annexin V

細胞膜の変化は、生細胞で検出されるアポトーシスプロセスの最初の特徴の1つです。フォスファチジルセリン (PS) は通常細胞膜の細胞質側に局在します。アポトーシスの間、PS は細胞膜の外側に移動します。カルシウム存在下、蛍光色素でラベルした Annexin V を結合させることにより、フローサイトメトリーや細胞イメージングによって検出することができます。

また、細胞膜が損傷すると細胞内 Annexin V も露出されるので、死細胞を除外するためアポトーシスを起こした細胞と既に死んでいる細胞を区別する 7-AAD, PI 等の細胞膜不透性染色剤を用いることでアポトーシス初期から後期までの測定が可能になります。Annexin V で染まった細胞集団は、アポトーシスを起こした細胞集団を表しています。

## ラジオ波 (RF) 照射量が増すにつれて、温度が上昇し、アポトーシス (右下) から明らかな壊死 (左上) へのシフトが認められる

Annexin V -BD Horizon™ V450 によって、低用量のセツキシマブ — 金ナノ粒子で処理した膀胱がん細胞株のラジオ波 (RF) 照射量依存のアポトーシス、壊死、および細胞死をモニターした。



# アポトーシス・生死細胞検出のための手法

## ミトコンドリアの変化 –

### BD Pharmingen™ MitoScreen Kit

アポトーシスが開始されると、ミトコンドリアの膜電位変化が起こります。これは、BD Pharmingen™ MitoScreen (JC-1) Kit や MitoStatus Dyes で測定が可能です。ミトコンドリアの膜電位の上昇により、ミトコンドリア膜の透過性が高まり、Cytochrome C や Pro-caspase 等の可溶性タンパク質の放出を引き起こします。

## Caspase の活性化

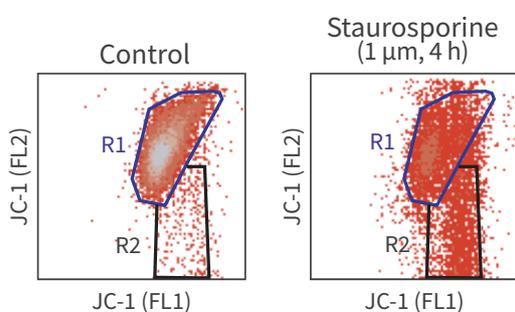
Caspase は、アポトーシスの最初の段階で、アスパラギン酸残基の位置で切断を受けて活性化する一連のプロテアーゼです。活性型 Caspase はその後、Poly-ADP ribose polymerase (PARP) や他の Caspase 等を含む多くのタンパクを切断することができます。

## DNA の断片化 – アポトーシスの最後段階

DNA の断片化は、アポトーシス過程におけるエンドヌクレアーゼの活性化に起因するアポトーシス最終段階の現象です。DNA 断片化の測定では、APO-BrdU™ キットで使用されている末端標識法、あるいは TUNEL 法が用いられています。このアッセイでは、TdT が二本鎖および一本鎖 DNA の 3' OH 末端への Br-dUTP の鋳型非依存的付加を触媒します。二本鎖および一本鎖 DNA へ Br-dUTP が取り込まれた末端部位は、標識した抗 BrdU で細胞を染色することによってフローサイトメトリーで特定します。対照的に BrdU 増殖アッセイは、新たに合成された DNA や DNA 鎖切断部位に BrdU を取り込ませませす。

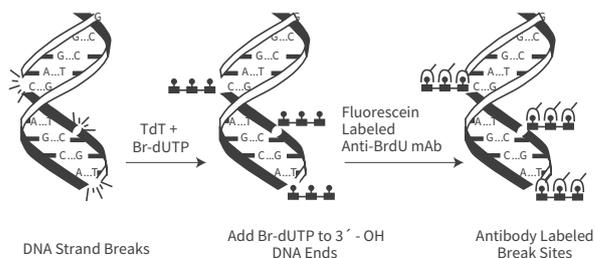
アポトーシスの後期には、細胞膜の変化により透過性をもつようになるため、7-AAD や Fixable Viability Stain (FVS) のような色素で染め分けることができます。FVS は細胞表面や細胞内のアミンに共有結合し透過性をもたない生細胞と透過性をもつ高い蛍光強度の死細胞を染め分けます。

FVS は 7-ADD と異なり固定膜透過処理を行うことができるので、さらなる細胞内抗原解析に最適です。



## ミトコンドリアの変化

Jurkat T 細胞をスタウロスポリンで処理してアポトーシスを誘導し、未処理細胞をコントロールとした。細胞を BD Pharmingen™ MitoScreen (JC-1) Kit (カタログ番号: 551302) で染色し、BD FACSCalibur™ フローサイトメーターで解析した。



## APO-BRDU™ 標識模式図

酵素、デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ (TdT) は 2 本鎖および 1 本鎖 DNA の 3'-水酸基 (-OH) 末端へのプロモデオキシウリジン三リン酸 (Br-dUTP) の鋳型非依存的な付加を触媒する。Br-dUTP 結合後、DNA の切断部位を FITC 標識 BrdU モノクローナル抗体で検出。

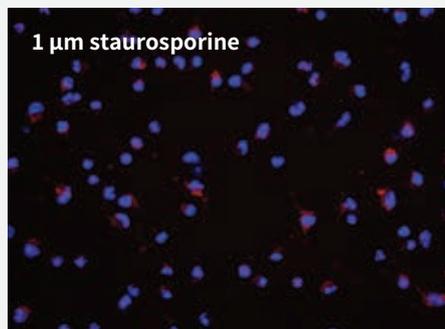
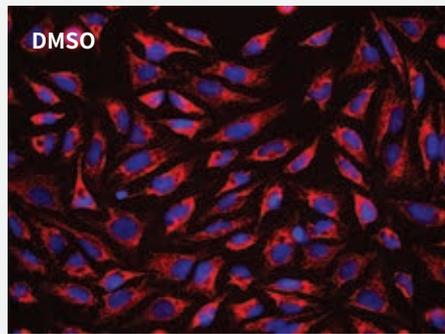
## 切断型 Caspases および PARP の測定

Caspases は、アポトーシスの重要なイニシエーターです。アポトーシスの最も早期に、かつ最も一貫して見られる特徴のひとつは、細胞質プロテアーゼ Caspase の活性化です。アポトーシスが活性化されると、Caspase は複数のタンパク質を一斉に切断して、細胞の構造と機能を喪失させ、最終的に細胞死に至らしめます。特に、Caspase-8、-9 および -3 はアポトーシスに関与し、Caspase-9 はミトコンドリア経路、Caspase-8 は Fas/CD95 経路、そして Caspase-3 はより下流で働き、複数の経路によって活性化されます。

## 蛍光色素による生死細胞の検出

アポトーシスの最終段階で膜構造が破壊されると、7-AAD などの膜透過性色素により細胞内が染色され、死細胞であることが分かります。

BD Horizon™ Fixable Viability Stain 試薬は生死細胞の識別に使用することができる新しい蛍光色素製品です。マルチカラー解析時の死細胞による非特異染色を検出し、解析から削除することができます。

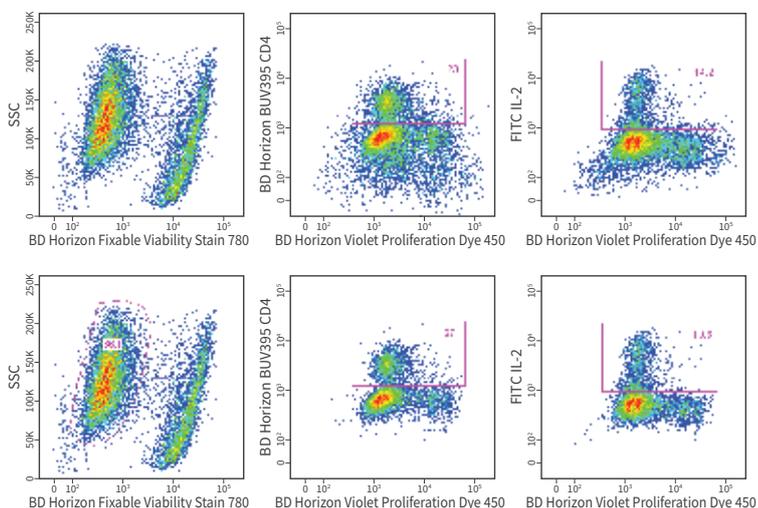


### HeLa 細胞の TMRE 免疫蛍光イメージング解析

HeLa 細胞は、0.02% ジメチルスルホキシド (DMSO)、あるいはアポトーシスを誘導するスタウロスポリン (1.0 mM, 3 時間) で処理した。その後、細胞を MitoStatus TMRE (ミトコンドリア染色) および Hoechst 5 μg/mL で染色し、DPBS ヘパッファー置換を行った。コントロールの細胞と比較し、スタウロスポリン処理した細胞集団はアポトーシスをおこしている細胞同様、核が濃縮しミトコンドリアが減少している。

### BD Horizon™ Fixable Viability Stain Reagents 生死判別試薬

色素	励起レーザー	Excitation (nm)	Emission (nm)	チャンネル	容量	カタログ番号	
FVS450	Violet	406	450	BV421, V450, Pacific Blue™	100 μg	562247	
FVS510	Violet	408	512	BV510, V500	100 μg	564406	
FVS520	Blue	498	521	BB515, FITC, Alexa Fluor® 488	150 μg	564407	
FVS570	Blue	Yellow-Green	547	573	PE	150 μg	564995
FVS620	Blue	Yellow-Green	523	617	PE-CF594, PE-Texas Red®	100 μg	564996
FVS660	Red	649	660	APC, Alexa Fluor® 647	100 μg	564405	
FVS700	Red	657	700	APC-R700, Alexa Fluor® 700	100 μg	564997	
FVS780	Red	759	780	APC-Cy® 7	200 μg	565388	



### BALB/c マウス脾臓細胞における細胞表面・細胞内抗原の表現型解析

BALB/c マウス脾臓細胞は、VPD450 で染色し CD3e/CD28 抗体と共に 3 日間培養を行った。PMA/Ionomycin で Golgi Stop タンパク輸送阻害剤存在下で再刺激を行い、細胞を回収後 FVS780 で染色した。固定・膜透過処理した後 BUV395 anti-mouse CD4, FITC anti-mouse IL-2 で染色した。死細胞を FVS780 によって除き CD4 IL-2 で解析を行った。死細胞を除くとより精度の高い CD4 IL-2 陽性細胞の解析をおこなうことができる。

Obtain the complete picture

# アポトーシス解析のためのさらなる抗原マーカー

Caspase と Annexin V の他にも、Bcl-2 ファミリー、腫瘍壊死因子受容体 (TNFR) ファミリー、PARP、シグナル伝達分子など、アポトーシス研究に重要ないくつかのタンパクが有ります。BCL2 ホモロジー (BH3) ドメインの存在によって同定される Bcl-2 ファミリーは、アポトーシスの主要な制御因子です。例えば、Bcl-2 はミトコンドリア膜に付随しミトコンドリアからの Cytochrome c の放出を阻害することで、アポトーシスから細胞を守ります。

対照的に、Bax 等の他の Bcl-2 ファミリーメンバーはアポトーシスを促進します。癌では、Bcl-2 レベルが上昇していることが報告されています。

TNFR ファミリーは、CD95 を含む多くのメンバーを有し、構造によって3つの主要グループに分けることができます。TNFR 経路を介したシグナル伝達はアポトーシスを引き起こします。PARP は、DNA 鎖の切断によって活性化される DNA 修復酵素です。Caspase-3 により PARP が 24- および 89-kDa の断片に切断されると、PARP 酵素は失活します。

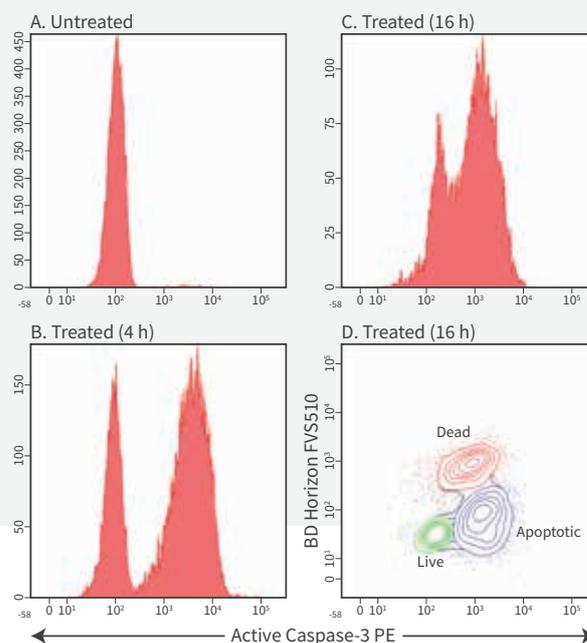
## 活性化 Caspase-3 と

### BD Horizon™ Fixable Viability Stain 510 (FVS510) によるアポトーシス細胞と死細胞のフローサイトメトリー解析

Jurkat 細胞をカンプトテシンで未処理 (A)、4 時間処理 (B)、16 時間処理 (C) し、アポトーシスと細胞死を誘導した。細胞は FVS510 未処理、処理にて、PE 標識活性化 Caspase-3 抗体で染色し解析を行った。

カンプトテシン 4 時間処理 Jurkat 細胞では、未処理細胞に比べて活性化 Caspase-3 の増加が検出された。16 時間処理細胞では多くの死細胞が存在し、不定量の Caspase-3 が検出された。この結果、死細胞集団により生細胞の活性化 Caspase-3 アポトーシス集団は不明瞭になった。

16 時間処理細胞を FVS510 で同時に処理する事により、生細胞、死細胞、アポトーシス細胞は明確に検出された (D)。活性化 Caspase-3 陰性、FVS510 陰性の生細胞 (緑)、活性化 Caspase-3 陽性、FVS510 陰性のアポトーシス細胞 (青)、活性化 Caspase-3 陽性、FVS510 陽性の死細胞 (赤)。

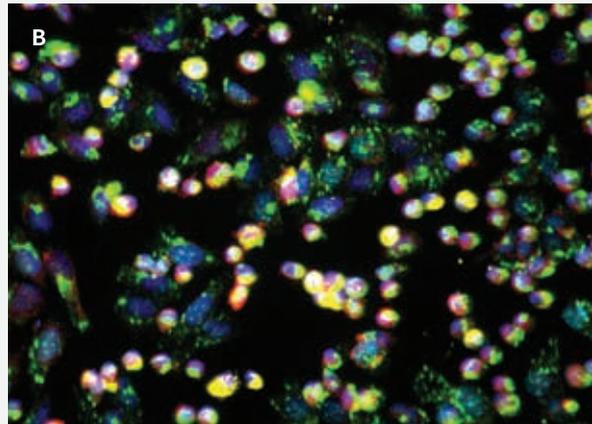
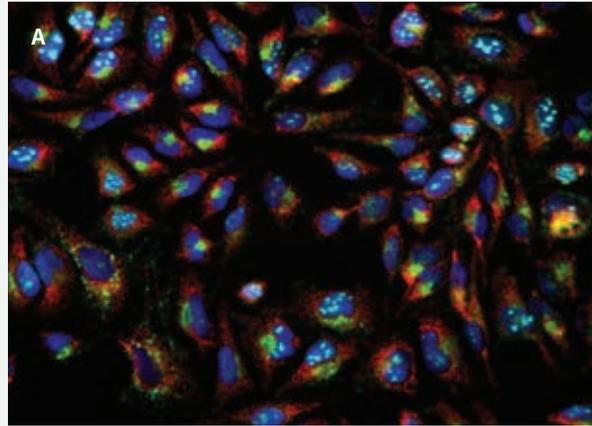


## References

- 1 Lodish H, Baltimore D, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Darnell J, eds. Cell organization, subcellular structure, and cell division. Molecular Cell Biology. Third Edition. New York, NY: WH Freeman and Company;1995:141-188.
- 2 Pérez-Cadahía B, Drobnic B, Davie JR. H3 phosphorylation: dual role in mitosis and interphase. Biochem Cell Biol. 2009;87:695-709.
- 3 Hedrick SM, Chen IL, Alves BN. Intertwined pathways of programmed cell death in immunity. Immunol Rev. 2010;236:41-53.
- 4 Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol. 2007;35:495-516.
- 5 Galluzzi L, Aaronson SA, Abrams J, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. Cell Death Differ. 2009;16:1093-1107.
- 6 Perfetto SP, Chattopadhyay PK, Lamoreaux L, et al. Amine reactive dyes: an effective tool to discriminate live and dead cells in polychromatic flow cytometry. J Immunol Methods. 2006;313:199-208.
- 7 Salvesen GS, Riedl SJ. Caspase mechanisms. Adv Exp Med Biol. 2008;615:13-23.
- 8 Thornberry NA, Chapman KT, Nicholson DW. Determination of caspase specificities using a peptide combinatorial library. Methods Enzymol. 2000;322:100-110.
- 9 Buggins AG, Pepper CJ. The role of Bcl-2 family proteins in chronic lymphocytic leukaemia. Leuk Res. 2010;34:837-842.
- 10 Russo M, Mupo A, Spagnuolo C, Russo GL. Exploring death receptor pathways as selective targets in cancer therapy. Biochem Pharmacol. 2010;80:674-682.
- 11 Boulares AH, Yakovlev AG, Ivanova V, et al. Role of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage in apoptosis. Caspase 3-resistant PARP mutant increases rates of apoptosis in transfected cells. J Biol Chem. 1999;274:22932-22940.
- 12 Rouleau M, Patel A, Hendzel MJ, Kaufmann SH, Poirier GG. PARP inhibition: PARP1 and beyond. Nat Rev Cancer. 2010;10:293-301.
- 13 Tanaka T, Huang X, Halicka HD, et al. Cytometry of ATM activation and histone H2AX phosphorylation to estimate extent of DNA damage induced by exogenous agents. Cytometry A. 2007;71:648-661.

## アポトーシス、細胞周期、 および DNA 損傷の同時解析

アポトーシスと細胞増殖アッセイは、癌の基礎研究および創薬に特に有用です。サンプルの処理方法やタイミング、サンプルの違いによって、異なる実験間のデータ比較が困難なケースがあります。マルチカラーフローサイトメトリーおよびイメージングはこの困難なケースに対応可能であり、アポトーシスと細胞増殖の研究ツールとして非常に優れています。関連のあるマーカーを、細胞の表現型マーカーと組み合わせて、細胞集団の中の一部で起こる事象を調べることが可能です。リン酸化タンパク質に対する抗体は、リン酸されている細胞の解析に使用できます。



Ki-67 の発現レベルが低下し  
細胞質へ Cytochrome C が放出されると、  
Caspase-3 および LAMP-1 が活性化される

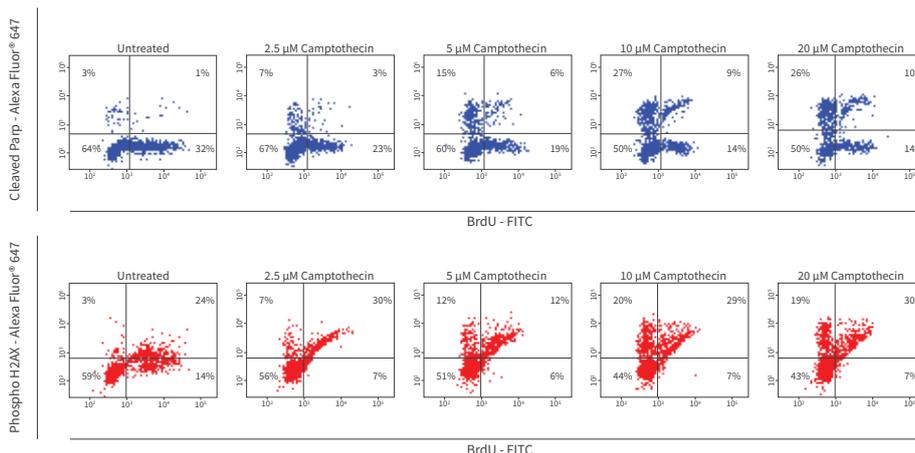
### 5 カラー免疫蛍光染色によるアポトーシス解析

HeLa 細胞で、(A) 無処置をしない細胞と、(B) カンプトテシン 20  $\mu\text{M}$  6 時間処置しアポトーシスを誘導した細胞を比較した。細胞は、固定・膜透過処理をし、ブロッキングを行い、Purified Rabbit anti-activated Caspase-3 抗体で染色した。その後、BD Horizon™ BV480 goat anti-rabbit Ig で二次染色をし、さらに BV421 mouse anti-LAMP-1, AF488 mouse anti-Cytochrome c, AF555 anti-human Ki-67 で染色した。

### Sample filter configuration for standard epifluorescence microscope

Fluorochrome	Pseudo-Color	Excitation (nm)	Excitation (nm)	Emission (nm)
BD Horizon BV421	Green	392/23	409	430/24
BD Horizon BV480	Yellow	438/24	458	485/20
Alexa Fluor® 488	Red	490/30	506	537/26
Alexa Fluor® 555	Cyan	543/22	562	593/40
DRAQ5	Blue	628/40	660	692/40

## アポトーシスを誘導した細胞は DNA 損傷が増加し、細胞増殖は減少している



### フローサイトメトリーによる 細胞増殖・アポトーシス・ DNA 損傷解析

Jurkat 細胞を、トポイソメラーゼ I の強力な阻害剤であり、アポトーシスを誘導するカンプトテシンで処理した。ゲノム整合性維持に重要なタンパクである H2AX のリン酸化は、DNA 損傷のレベルと関係していることが示されている。マルチカラーフローサイトメトリーを使って、細胞増殖 (BrdU)、アポトーシス (切断型 PARP)、および DNA 損傷 (ヒストン H2AX pS140) を、同一の実験で評価した。

# アポトーシス, 細胞増殖, 細胞周期解析

アポトーシス, 細胞増殖同時解析 キット					
製品名	反応性	アプリケーション	容量	希望小売価格 (円)	カタログ番号
<b>Apoptosis, DNA Damage and Cell Proliferation Kit</b>	Hu	FCM	50 tests	120,000	562253 
<b>〈構成品〉</b>					
Part A					
PerCP-Cy <sup>5</sup> 5.5 Mouse Anti-BrdU			50 tests		
Alexa Fluor <sup>®</sup> 647 Mouse Anti-H2AX (pS139)			50 tests		
PE Mouse Anti-Cleaved PARP (Asp214)			50 tests		
BD Cytotfix/Cytoperm <sup>™</sup> Fixation/Permeabilization Solution			25 mL		
BD Perm/Wash <sup>™</sup> Buffer (10X)			25 mL		
BD Cytotfix/Cytoperm <sup>™</sup> Plus Permeabilization Buffer			10 mL		
DAPI			100 µL		
Part B					
BrdU			5 mg		
DNase			300 µL		

アポトーシス解析 [細胞膜の変化] Annexin V キット				
製品名	アプリケーション	容量	希望小売価格 (円)	カタログ番号
<b>FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I</b>	FCM	100 tests	89,000	556547
<b>〈構成品〉</b>				
FITC Annexin V		0.5 mL		
Propidium Iodide Staining Solution		2.0 mL		
10X Annexin V Binding Buffer		50 mL		
<b>FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit II</b>	FCM	100 tests	120,000	556570
<b>〈構成品〉</b>				
FITC Annexin V		0.5 mL		
Propidium Iodide Staining Solution		2.0 mL		
10X Annexin V Binding Buffer		50 mL		
Purified Recombinant Annexin V		100 µg		
<b>PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I</b>	FCM	100 tests	89,000	559763
<b>〈構成品〉</b>				
PE Annexin V		0.5 mL		
7AAD		2.0 mL		
10X Annexin V Binding Buffer		50 mL		

アポトーシス, 細胞増殖, 細胞周期解析 アポトーシス解析 [細胞膜の変化] Annexin V シングルバイアル					
製品名	アプリケーション	標識	容量	希望小売価格 (円)	カタログ番号
<b>Annexin V</b>	FCM, Blocking	Purified	0.1 mg	63,000	556416
	FCM	Biotin	100 tests	71,000	556418
		Biotin	200 tests	110,000	556417
		BUV395	100 tests	62,000	564871
		BV421	100 tests	62,000	563973
		BV605	100 tests	62,000	563974
		BV711	100 tests	65,000	563972
		FITC	100 tests	71,000	556420
		FITC	200 tests	110,000	556419
		FITC	25 tests	18,000	560931
		PE	100 tests	71,000	556422
		PE	200 tests	110,000	556421
		PE	25 tests	25,000	560930
		PerCP-Cy <sup>5</sup> 5.5	50 tests	36,000	561431
		Cy <sup>5</sup> 5	100 tests	45,000	559933
		Cy <sup>5</sup> 5	200 tests	75,000	559934
		Cy <sup>5</sup> 5.5	100 tests	54,000	559935
		APC	100 tests	65,000	550474
		APC	200 tests	100,000	550475
		V450	50 tests	44,000	560506
	V500	50 tests	44,000	561501	

 医薬用外劇物

アポトーシス解析 [DNA 断片化] キット						
製品名	反応性	アプリケーション	容量	希望小売価格 (円)	カタログ番号	
<b>APO-DIRECT<sup>™</sup> Kit</b>	Hu	FCM	50 tests	90,000	556381	<b>毒</b>
<b>〈構成成分〉</b>						
Part A						
PI/RNase Staining Buffer			25 mL			
Reaction Buffer			0.5 mL			<b>毒</b>
Rinsing Buffer			100 mL			
Wash Buffer			100 mL			<b>毒</b>
Part B						
FITC-dUTP (0.25 nMol)			0.4 mL			
Negative Control Cells			5 mL			
Positive Control Cells			5 mL			
TdT Enzyme			0.038 mL			
<b>APO-BRDU<sup>™</sup> Kit</b>	Hu	FCM	60 tests	110,000	556405	<b>毒</b>
<b>〈構成成分〉</b>						
Part A						
FITC-Labeled Anti-BrdU mAb			0.3 mL			
PI/RNase Staining Buffer			30 mL			
Reaction Buffer			0.6 mL			<b>毒</b>
Rinsing Buffer			126 mL			
Wash Buffer			120 mL			
Part B						
Br-dUTP			0.48 mL			
Negative Control Cells			5 mL			
Positive Control Cells			5 mL			
TdT Enzyme			0.045 mL			

アポトーシス解析 [ミトコンドリア膜電位変化] キット						
製品名	反応性	アプリケーション	容量	希望小売価格 (円)	カタログ番号	
<b>BD<sup>™</sup> MitoScreen (JC-1)</b>	Hu, Ms	FCM	100 tests	45,000	551302	
<b>〈構成成分〉</b>						
JC-1						
10x Assay Buffer			60 mL			
<b>BD<sup>™</sup> MitoStatus TMRE</b>		FCM	25 mg	23,000	564696	
<b>BD<sup>™</sup> MitoStatus Red</b>		FCM	100 µg	26,000	564697	

アポトーシス解析 [活性化型 Caspase-3] キット						
製品名	反応性	アプリケーション	容量	希望小売価格 (円)	カタログ番号	
<b>FITC Active Caspase-3 Apoptosis Kit</b>	Hu, Ms	IC/FCM	100 tests	75,000	550480	<b>劇</b>
<b>〈構成成分〉</b>						
FITC Anti-Active Caspase-3						
			100 tests			
Cytofix/Cytoperm <sup>™</sup> Fixation and Permeabilization Solution (1X)			65 mL			<b>劇</b>
Perm/Wash <sup>™</sup> Buffer (10X Solution)			65 mL			
<b>PE Active Caspase-3 Apoptosis Kit</b>	Hu, Ms	IC/FCM	100 tests	80,000	550914	<b>劇</b>
<b>〈構成成分〉</b>						
PE Anti-Active Caspase-3						
			100 tests			
Cytofix/Cytoperm <sup>™</sup> Fixation and Permeabilization Solution (1X)			65 mL			<b>劇</b>
Perm/Wash <sup>™</sup> Buffer (10X Solution)			65 mL			

アポトーシス解析 [活性化型 Caspase-3] シングル抗体								
製品名	反応性	クローン	アイソタイプ	アプリケーション	標識	容量	希望小売価格 (円)	カタログ番号
<b>Caspase-3, Active Form, (CPP32)</b>	Hu	C92-605	Rabbit IgG	IC/FCM	Biotin	100 tests	60,000	550557
					FITC	100 tests	73,800	559341
					FITC	25 tests	23,000	560901
					PE	100 tests	82,000	550821
					PE	25 tests	25,000	561011
					Alexa Fluor <sup>®</sup> 647	50 tests	40,000	560626
V450	50 tests	44,000	560627					

**毒** 医薬用外毒物

**劇** 医薬用外劇物

**アポトーシス, 細胞増殖同時解析 キット**

製品名	アプリケーション	容量	希望小売価格 (円)	カタログ番号
<b>BrdU Flow Kit</b>	FCM	50 tests	90,000	559619 
<b>〈構成成分〉</b>				
FITC Anti-BrdU Antibody		65 µL		
BD Cytofix/Cytoperm™ Buffer		25 mL		
BD Perm/Wash™ Buffer (10X)		25 mL		
BD Cytoperm™ Permeabilization Buffer Plus		10 mL		
7-AAD		1 mL		
BrdU		5 vials		
DNase		5 vials		
<b>BrdU Flow Kit</b>	FCM	50 tests	108,000	552598 
<b>〈構成成分〉</b>				
APC Anti-BrdU Antibody		65 µL		
BD Cytofix/Cytoperm™ Buffer		25 mL		
BD Perm/Wash™ Buffer (10X)		25 mL		
BD Cytoperm™ Permeabilization Buffer Plus		10 mL		
7-AAD		1 mL		
BrdU		5 vials		
DNase		5 vials		

**アポトーシス, 細胞増殖, 細胞周期解析 細胞増殖, 細胞周期因子解析 特異抗体 & アイソタイプコントロール キット**

製品名	反応性	クローン	アイソタイプ	アプリケーション	標識	容量	希望小売価格 (円)	カタログ番号
<b>Cyclin B1 &amp; ICtrl Set</b>	Hu, Ms, Ham			IC/FCM		100 tests	93,000	554108
<b>〈構成成分〉</b>								
FITC Anti-Cyclin B1		GNS-1	Ms IgG1		FITC			
FITC Mouse IgG1 κ		MOPC-21	Ms IgG1, κ		FITC			
Isotype Control								
<b>Cyclin B1 &amp; ICtrl Set</b>	Hu			IC/FCM		100 tests	115,000	550783
<b>〈構成成分〉</b>								
PE Anti-Cyclin B1		GNS-1	Ms IgG1		PE			
PE Mouse IgG1 κ		MOPC-21	Ms IgG1, κ		PE			
Isotype Control								
<b>Ki-67 &amp; ICtrl Set</b>	Hu, Ms Rat, Pig			IC/FCM		100 tests	93,000	556026
<b>〈構成成分〉</b>								
FITC Anti-Ki-67		B56	Ms IgG1, κ		FITC			
FITC Mouse IgG1, κ		MOPC-21	Ms IgG1, κ		FITC			
Isotype Control								
<b>Ki-67 &amp; ICtrl Set</b>	Hu, Ms Rat, Pig			IC/FCM		100 tests	98,000	556027
<b>〈構成成分〉</b>								
PE Anti-Ki-67		B56	Ms IgG1, κ		PE			
PE Mouse IgG1, κ		MOPC-21	Ms IgG1, κ		PE			
Isotype Control								
<b>p16 &amp; ICtrl Set</b>	Hu			IC/FCM		100 tests	99,000	556560
<b>〈構成成分〉</b>								
FITC Anti-p16		G175-1239	Ms IgG1		FITC			
FITC Mouse IgG1, κ		MOPC-21	Ms IgG1, κ		FITC			
Isotype Control								
<b>p16 &amp; ICtrl Set</b>	Hu			IC/FCM		100 tests	112,000	556561
<b>〈構成成分〉</b>								
PE Anti-p16		G175-1239	Ms IgG1		PE			
PE Mouse IgG1, κ		MOPC-21	Ms IgG1, κ		PE			
Isotype Control								

アポトーシス, 細胞増殖, 細胞周期解析 **細胞増殖, 細胞周期因子解析 特異抗体 & アイソタイプコントロール キット (続き)**

製品名	反応性	クローン	アイソタイプ	アプリケーション	標識	容量	希望小売価格 (円)	カタログ番号
<b>p53 &amp; ICtrl Set</b>	Hu, Cow Monk			IC/FCM		100 tests	98,000	554298
<b>&lt;構成成分&gt;</b>								
FITC Anti-p53		DO-7	Ms IgG2b		FITC			
FITC Mouse IgG2b Isotype Control (anti-dansyl)		27-35	Ms IgG2b, κ		FITC			
<b>p53 &amp; ICtrl Set</b>	Hu, Cow Monk			IC/FCM		100 tests	112,000	556534
<b>&lt;構成成分&gt;</b>								
PE Anti-p53		DO-7	Ms IgG2b		PE			
PE Mouse IgG2b, κ Isotype Control (anti-dansyl)		27-35	Ms IgG2b, κ		PE			
<b>Anti-p53 &amp; ICtrl Set</b>	Hu, Ms Rat			IC/FCM		100 tests	83,000	557026
<b>&lt;構成成分&gt;</b>								
FITC Anti-p53		G59-12	Ms IgG1		FITC			
FITC Mouse IgG1, κ Isotype Control		MOPC-21	Ms IgG1, κ		FITC			
<b>p53 &amp; ICtrl Set</b>	Hu, Ms Rat			IC/FCM		100 tests	96,000	557027
<b>&lt;構成成分&gt;</b>								
PE Anti-p53		G59-12	Ms IgG1		PE			
PE Mouse IgG1, κ Isotype Control		MOPC-21	Ms IgG1, κ		PE			
<b>Cytokeratin 14, 15, 16 and 19 &amp; ICtrl Set</b>	Hu			IC/FCM		100 tests	74,000	550953
<b>&lt;構成成分&gt;</b>								
※推奨細胞膜浸透化: 1% パラホルムアルデヒド & 0.01% Toriton X-100								
PE Anti-Human Cytokeratin 14, 15, 16 and 19 PE Mouse IgG1 κ Isotype Control		KA4	Ms IgG1, κ		PE			
		MOPC-21	Ms IgG1, κ		PE			

**細胞周期解析 キット**

製品名	アプリケーション	容量	希望小売価格 (円)	カタログ番号
<b>BD Cycletest™ Plus DNA Reagent Kit*</b>	FCM	40 tests	48,000	340242
<b>&lt;構成成分&gt;</b>				
• Solution A (トリプシン緩衝液)		10 mL		
• Solution B (トリプシン阻害剤, RNase)		8 mL		
• Solution C (Propidium Iodide (PI) 染色液)		8 mL		
• Buffer Solution (緩衝液)		50 mL x 3 vials		
<b>BD DNA QC Particles</b>	FCM	25 tests	46,000	349523 
<b>&lt;構成成分&gt;</b>				
• バイアル A (ニワトリ赤血球核 CEN)				
• バイアル B (仔牛胸腺細胞核 CTN)				
• バイアル C (機器精度管理用 2 ミクロン蛍光ビーズ)				
• バイアル D (Propidium Iodide (PI) 染色液)				

\* Human 以外でも使用可能。

サポート製品				
製品名	アプリケーション	容量	希望小売価格 (円)	カタログ番号
<b>BD Cytofix/Cytoperm™ Fixation and Permeabilization Solution</b>	IC/FCM	125 mL	36,000	554722 
<b>BD Perm/Wash™ Perm/Wash Buffer (10X)</b>	IC/FCM	100 mL	36,000	554723
<b>Permeabilization Buffer Plus</b>	IC/FCM	10 mL	12,000	561651
<b>Bromodeoxyuridine (BrdU) Solution</b>	FCM, Bioimaging, IHC	25 mg	18,000	550891
<b>7AAD Staining Solution</b>	FCM	2 mL	15,000	559925
<b>Annexin V Binding Buffer, 10x Concentrate</b>	FCM	50 mL	12,000	556454
<b>Propidium Iodide Staining Solution</b>	FCM	2 mL	15,000	556463
<b>PI/RNase Staining Buffer</b>	FCM	100 mL	15,000	550825
<b>BD Cytofix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Solution Kit</b>	IC/FCM	250 tests	71,000	554714
<b>〈構成〉</b>				
BD Cytofix/Cytoperm™ Fixation and Permeabilization Solution		125 mL		
BD Perm/Wash™ Perm/Wash Buffer (10X)		100 mL		

 医薬用外劇物

※研究用です。本製品は、疾病の診断・治療または予防に使用することはできません。

※上記価格はあくまでも参考情報として該当製品に統一的に設定している当社の希望小売価格です。

販売代理店からの販売価格はそれぞれの代理店様が自主的に決定されております。お見積は販売代理店へお問い合わせ下さい。

※上記価格は、本書発行日時点での価格となります。上記価格には、消費税は含まれておりません。

※本冊子に記載されている価格は2022年5月度現在の希望小売価格です。

## 日本ベクトン・ディッキンソン株式会社

本社：〒107-0052 東京都港区赤坂4-15-1 赤坂ガーデンシティ

カスタマーサービス ☎ 0120-8555-90 FAX:024-593-3281

(ご注文・納期・資料請求)

[bdbiosciences.com/ja-jp/](https://bdbiosciences.com/ja-jp/)

機器・試薬の使用法および学術に関するサポート

☎ 0120-4890-77 E-Mail:tech.cell@bd.com

機器のトラブルに関するサポート

☎ 0120-7099-12

