

# 細胞生存性測定キット・ アポトーシス検出キットカタログ



Roche

The life science  
business of Merck  
operates as  
MilliporeSigma in  
the U.S. and Canada.

**Sigma-Aldrich®**  
Lab & Production Materials

# アポトーシス研究のためのキット一覧

| 研究項目                      | 検出項目                          | 検出方法                                    | 使用キット                         | ページ                                                  |                                                |
|---------------------------|-------------------------------|-----------------------------------------|-------------------------------|------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| はじめに    アポトーシスとネクローシス     |                               |                                         |                               | 3                                                    |                                                |
| アポトーシス                    | カスパーゼ活性                       | カスパーゼによる<br>サイトケラチン 18<br>の切断           | 透過光顕微鏡<br>蛍光顕微鏡               | M30 CytoDEATH                                        | 4                                              |
|                           |                               | PARP 切断                                 | ウエスタンブロット                     | Anti-Poly (ADP-Ribose) Polymerase (PARP)             | 4                                              |
|                           | 細胞膜の変化                        | 細胞膜の外層の<br>ホスファチジルセリン                   | フローサイトメトリー<br>透過光顕微鏡<br>蛍光顕微鏡 | Annexin-V-FLUOS<br>Annexin-V-FLUOS Staining Kit      | 5                                              |
|                           | 細胞集団に<br>おける<br>DNA 断片化       | DNA フラグメント                              | ELISA                         | Cell Death Detection ELISA <sup>PLUS</sup>           | 6                                              |
|                           |                               |                                         |                               | Cell Death Detection ELISA                           | 6                                              |
|                           |                               |                                         | ゲル電気泳動                        | Apoptotic DNA Ladder Kit                             | 7                                              |
|                           | 個別の細胞での<br>DNA フラグメン<br>テーション | DNA フラグメント                              | TUNEL                         | <i>In Situ</i> Cell Death Detection Kit, AP          | 9                                              |
|                           |                               |                                         |                               | <i>In Situ</i> Cell Death Detection Kit, POD         | 9                                              |
|                           |                               |                                         |                               | <i>In Situ</i> Cell Death Detection Kit, Fluorescein | 10                                             |
|                           |                               |                                         |                               | <i>In Situ</i> Cell Death Detection Kit, TMR red     | 10                                             |
| はじめに    細胞障害性、細胞増殖、細胞生存活性 |                               |                                         |                               | 11                                                   |                                                |
| 細胞毒性                      | 細胞集団に<br>おける<br>細胞障害性         | LDH の放出                                 | 発色法                           | Cytotoxicity Detection Kit <sup>PLUS</sup> (LDH)     | 12                                             |
|                           |                               |                                         |                               | Cytotoxicity Detection Kit (LDH)                     | 13                                             |
|                           |                               | 細胞膜からの漏出                                | ELISA                         | Cellular DNA Fragmentation ELISA                     | 13                                             |
| 細胞生存性                     | 代謝活性                          | 生細胞による<br>テトラゾリウム塩から<br>フォルマザン塩への<br>還元 | 発色法                           | Cell Proliferation Reagent WST-1                     | 14                                             |
|                           |                               |                                         |                               | Cell Proliferation Kit I (MTT)                       | 15                                             |
|                           |                               |                                         |                               | Cell Proliferation Kit II (XTT)                      | 15                                             |
|                           |                               |                                         | ATP の濃度                       | 生物発光                                                 | ATP Bioluminescence Assay Kit (HS II) (CLS II) |
|                           | 細胞集団での<br>DNA 合成              | BrdU の取り込み                              | 発色 ELISA                      | Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)        | 17                                             |
|                           |                               |                                         | 化学発光 ELISA                    | Cell Proliferation ELISA, BrdU (chemiluminescent)    | 18                                             |
|                           |                               |                                         | 発色 ELISA                      | BrdU Labeling and Detection Kit III (POD)            | 19                                             |
|                           | 個別の細胞での<br>DNA 合成             | BrdU の取り込み                              | 蛍光顕微鏡や<br>フローサイトメトリー          | BrdU Labeling and Detection Kit I (Fluorescein)      | 20                                             |
|                           |                               |                                         | 透過光顕微鏡                        | BrdU Labeling and Detection Kit II (AP)              | 20                                             |
| 蛍光顕微鏡や<br>フローサイトメトリー      |                               |                                         | Anti-BrdU 抗体                  | 21                                                   |                                                |

## ご注文情報

22

**HTS** ハイスループット スクリーニングに適応

# はじめに

## アポトーシスとネクローシス

細胞の死は2種類の異なる機構 - ネクローシスとアポトーシスで起こります。ネクローシス（“突然で偶発的な”細胞死）は、細胞が深刻な物理的、化学的障害に曝露されたときに起こる生理学的なプロセスです。アポトーシス（“プログラム”細胞死）は、増殖や他の生理学的なプロセスの間に不必要な細胞を取り除く自然な生物学的な現象です。

ロシュ社では以下の研究を通じて、アポトーシスと細胞死の特徴を研究するための製品を提供しています。

- カスパーゼ活性
- 細胞膜の変化
- DNA フラグメンテーション

### カスパーゼ活性

カスパーゼ（Cysteine-ASPartic-acid-protease（CASPASE））は、生体の細胞間タンパク質を切断するプロテアーゼファミリーでアポトーシスの亢進を誘導します。カスパーゼ（チモーゲンとして発現）は様々なインデューサーにより活性化されます。ひとたび活性化されると、ひとつのカスパーゼが他のカスパーゼをカスケード的に活性化します。カスパーゼはアポトーシスのかなり初期から発現し、後期ステージにおいても発現します（図1）。

### アポトーシス関連タンパク質の発現

いくつかのタンパク質（Fas や PARP）は、アポトーシス時のみ発現されるか、あるいは修飾されます。これらのタンパク質とその発現の研究は、アポトーシスに関する貴重な情報を提供します。

### 細胞膜の変化

正常細胞では、ホスファチジルセリンは細胞膜の内層にのみ見られます。アポトーシス細胞においては、ホスファチジルセリンのいくつかは外層に転移し、Annexin-V（ホスファチジルセリンに高い親和性を持つリン脂質結合性タンパク質）により検出できます。ネクローシス細胞の細胞膜が破れたとき、内層のホスファチジルセリンもまた曝露されます。しかし、ネクローシス細胞はヨウ化プロピジウムなどの DNA 染色色素を遮断することができないため、アポトーシス細胞とネクローシス細胞の判別が可能となります。

### DNA フラグメンテーション

アポトーシスの進行により（図1）、活性化されたエンドヌクレアーゼがゲノム DNA をヌクレオソームに分断し、モノおよびオリゴヌクレオソーム DNA 断片を生成します。このアポトーシスに特徴的な生化学的イベントは不可逆的で、細胞の死に関与しています。

### アポトーシスの進行例（イメージ）

細胞のアポトーシス過程におけるイベントの機序は、高度に調節され、統制されています。これらの生理学的なイベントは、アポトーシスの進行のモニターに使用できます（図1）。アポトーシスの誘導には様々なパスウェイに対応して確認のための様々なアッセイ法が使用されます。

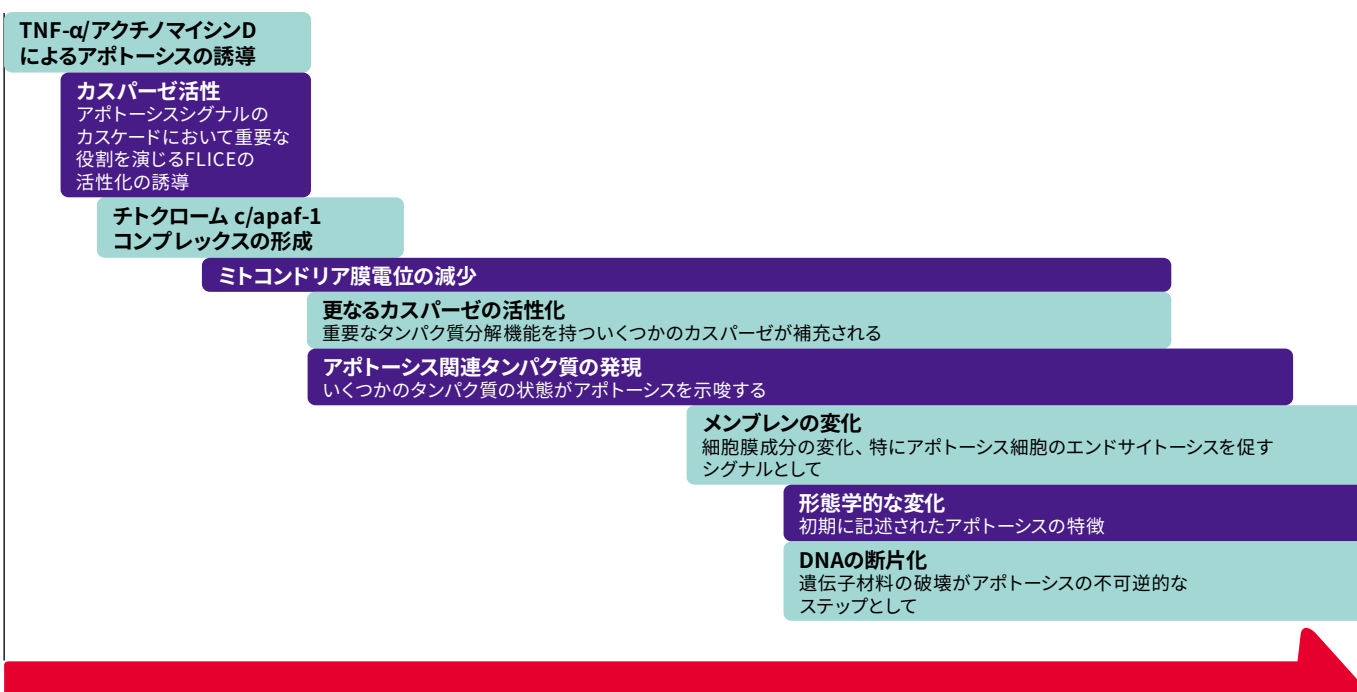


図1：HeLa細胞におけるアポトーシスイベントの相対的機序  
TNF- $\alpha$ /アクチノマイシンDで誘導したHeLa細胞のアポトーシス進行過程。

# カスパーゼ活性

## M30 CytoDEATH

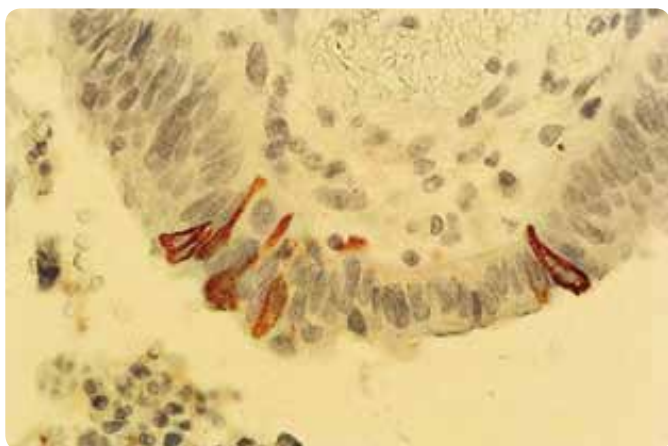
### 抗体を用いた初期アポトーシスの検出

アポトーシスの間、生命維持に必要な細胞内タンパク質のいくつかは分解されます。この工程に介在するタンパク質はカスパーゼと呼ばれています。カスパーゼはチモーゲン(前酵素)として発現し、様々なアポトーシスの誘導物質により活性化されます。一旦活性化されると、一つのカスパーゼが、そのカスケードを活性化させます。

**マウス モノクローナル M30 CytoDEATH 抗体**は、アポトーシス細胞中の、ヒトサイトケラチン 18 (CK18) 細胞骨格タンパク質のカスパーゼにより開裂された部位を特異的(ホルマリン抵抗性)なエピトープとして認識します。この抗体は、通常の細胞中の本来のサイトケラチン 18 には結合しません。したがって、M30 CytoDEATH 抗体は単一細胞、もしくは組織片中の非常に初期のアポトーシス・イベントの決定に簡単で、信頼性の高い価値あるツールです。

- **初期アポトーシスの検出：**高感度で上皮由来の細胞や組織片中の初期アポトーシスの検出(図2)。
- **カスパーゼ活性の決定：**ホルマリン固定、パラフィン包埋組織においても可能(図2)。
- **他の細胞死検出と併用可能**  
例；*In Situ* Cell Death Detection Kit, TMR red とのコンビネーション。
- **時間の節約：**便利で使用しやすいプロトコル。

**サンプル材料：**接着細胞、ルーチン固定組織片、パラフィン包埋組織片、クリオスタット切片



**図2：カスパーゼ切断サイトケラチン 18 の陽性染色を示すヒト大腸組織**  
M30 CytoDEATH、ビオチン標識抗マウス、HRP 標識ストレプトアビジン、AEC (基質) によるアポトーシス検出。ヘマトキシリンによるカウンター染色。M30 による染色(茶色)が細胞質に観察される。このアッセイは TUNEL 反応との組合せでも良好にワークする。

| 製品名           | カタログ番号         | 包装単位    |
|---------------|----------------|---------|
| M30 CytoDEATH | 12 140 322 001 | 50 テスト  |
|               | 12 140 349 001 | 250 テスト |

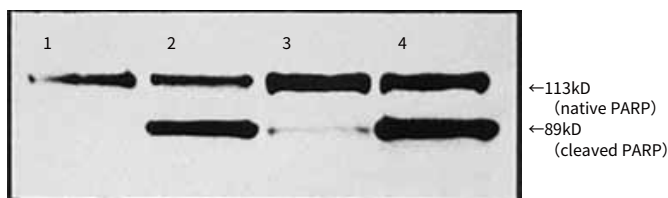
## Anti-Poly (ADP-Ribose) Polymerase (PARP)

### タンパク質分解を誘導する初期アポトーシスの検出

ポリ (ADP- リボース) ポリメラーゼ (PARP) は DNA 修復に関する核内酵素です。多くの細胞種において、アポトーシス初期生化学イベントは、PARP の保存性の高い分解サイトのカスパーゼによるタンパク質分解です。アポトーシス初期の変化は、**Anti-Poly (ADP-Ribose) Polymerase (PARP) 抗体** を使用して細胞抽出物における PARP タンパク質分解の検出を通して観察できます。大きな分解フラグメント (約 89 kD) の出現は、カスパーゼによるタンパク質分解活性の指標となります(図3)。免疫沈降、ウエスタンブロット、免疫組織化学の手法が使用できます。

- **初期アポトーシスの検出：**  
PARP のカスパーゼによる分解によります。
- **二重標識アプリケーションにも使用可能：**  
例；*In Situ* Cell Death Detection Kit, TMR red とのコンビネーション。
- **完全長 PARP の検出：**  
カスパーゼによる分解産物と同様に検出可能。

**サンプル材料：**霊長類またはげっ歯類由来のサンプル



**図3：アポトーシス誘導をかけた MCF-7 細胞の PARP 断片の検出**  
処理、未処理細胞からの抽出物をウエスタンブロットで解析。Anti-Poly (ADP-Ribose) Polymerase (PARP) による間接的免疫検出による。

**結果：**Anti-Poly (ADP-Ribose) Polymerase (PARP) は、PARP の完全長 (113 kD)、分解断片 (89 kD) の両方を認識。

**Lane 1：**未処理コントロール細胞  
**Lane 2：**100 ng/mL ドキシソルビシン処理細胞 (24 時間)  
**Lane 3：**1 mg/mL メトトレキサート処理細胞 (24 時間)  
**Lane 4：**1 mg/mL シタラビン処理細胞 (24 時間)

| 製品名                                      | カタログ番号         | 包装単位   |
|------------------------------------------|----------------|--------|
| Anti-Poly (ADP-Ribose) Polymerase (PARP) | 11 835 238 001 | 100 µL |

# 細胞膜の変化

## Annexin-V Conjugates

アポトーシスが誘導する細胞膜変化の検出とネクローシスからアポトーシスの識別

正常な細胞（図4左）においては、リン脂質の分布は非対称であり、内膜は陰イオン性リン脂質（ホスファチジルセリンのような）を含み、外膜は中性リン脂質が主です。しかしながらアポトーシス細胞（図4右）においては、細胞表面のホスファチジルセリン（PS）量が増加し、外液へ露出します。

**Annexin-V** は、カルシウム依存性リン脂質結合タンパク質であり、PS と高い親和性があります。それは、正常な生細胞とは結合しませんが、アポトーシス細胞表面に露出した PS とは結合します（図5、6）。

表1: Annexin-V とヨウ化プロピジウム (PI) を使用してのネクローシスとアポトーシスの判別

|              | 正常細胞 | アポトーシス細胞 | ネクローシス細胞 |
|--------------|------|----------|----------|
| Annexin-V 染色 | —    | +        | +        |
| ヨウ化プロピジウム染色  | —    | —        | +        |

### フローサイトメトリーや顕微鏡を使用したアポトーシスの検出

- **Annexin-V-FLUOS** を用いたフローサイトメトリーによる細胞懸濁液中のアポトーシス細胞の迅速定量（図6）。
- **Annexin-V-FLUOS Staining Kit** を用いたアポトーシス細胞のネクローシス細胞からの識別。本キットはヨウ化プロピジウムも添付されています（図5、6）。

サンプル材料：細胞株や新たに分離された細胞

| 製品名                                         | カタログ番号         | 包装単位            |
|---------------------------------------------|----------------|-----------------|
| Annexin-V-FLUOS                             | 11 828 681 001 | 250 テスト         |
| Annexin-V-FLUOS Staining Kit (ヨウ化プロピジウムを含む) | 11 858 777 001 | 1 kit (50 テスト)  |
|                                             | 11 988 549 001 | 1 kit (250 テスト) |

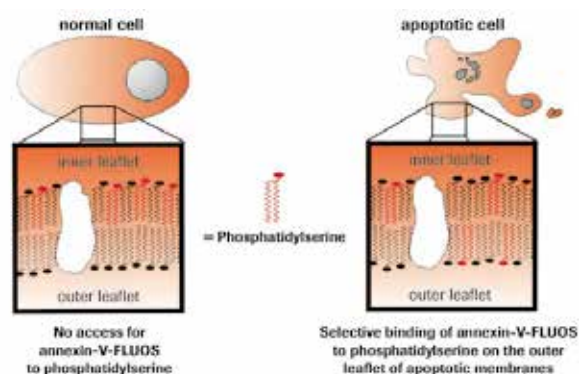


図4: アポトーシスにおける細胞膜の形態学的変化を検出  
外部から加えられた Annexin-V-FLUOS のような分子はアポトーシス細胞の外膜のホスファチジルセリンに特異的に結合するが、正常細胞のホスファチジルセリンとは反応することはない。

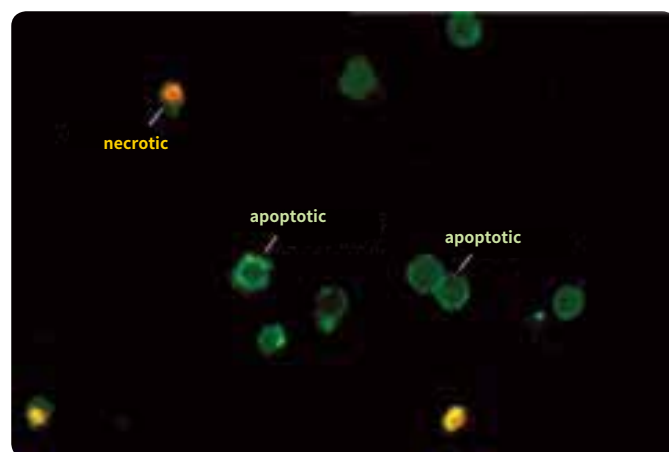


図5: カンプトデシン (CAM) 処理 U937 細胞のアポトーシスとネクローシスの識別

Annexin-V-FLUOS で検出された後期アポトーシス（緑）とヨウ化プロピジウムによる対比染色（ネクローシス細胞）。

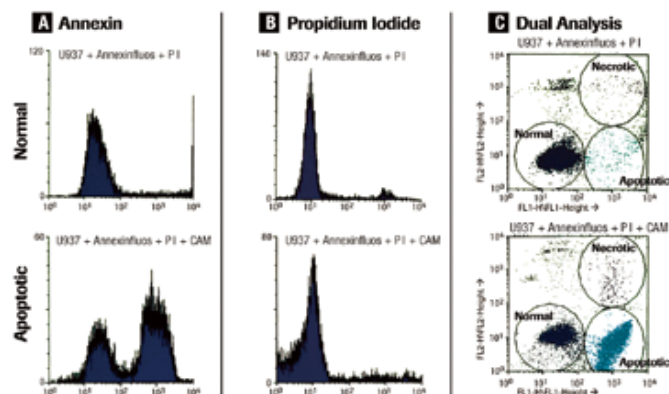


図6: Annexin-V-FLUOS とヨウ化プロピジウム (PI) でのアポトーシス、ネクローシス U-937 細胞の FACS 解析

細胞は、4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  カンプトデシン (CAM) の存在下（下図）、非存在下（上図）で4時間培養された。

- (A) Annexin-V-FLUOS によるシングルカラー解析
- (B) ヨウ化プロピジウムによるシングルカラー解析
- (C) Annexin-V-FLUOS (FL1) とヨウ化プロピジウム (FL2) によるデュアルカラー解析

# 細胞集団における DNA 断片化

## Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup> HTS

### 1 ステップ ELISA におけるネクロシス細胞からのアポトーシス細胞の識別

Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup> は、ヒストン複合型 DNA 断片（モノ - またはオリゴヌクレオソーム）を解析するために使用されます（図 7）。ヒストン複合型 DNA 断片は、アポトーシス進行中に細胞質に存在するものとして知られています（図 8、10）。

- DNA ラダー法と良好に相関する細胞死の再現性の高い相対定量が行えます。
- 百単位の細胞サンプルを並行して処理できるワンステップ ELISA により、細胞死のハイスループット解析が行えます。したがって、時間の節約および手技の簡便化が行えます（図 7）。
- ネクロシス進行中の細胞とアポトーシス進行中の細胞が一つのサンプル中に存在しても識別が可能です（図 8）。
- わずか 600 個の細胞におけるアポトーシス検出が可能な高感度を達成しています（図 9）。
- Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup> は Cell Death Detection ELISA に、手技の簡便化、実験時間の短縮、ABTS 停止液の利点を付加したキットです。

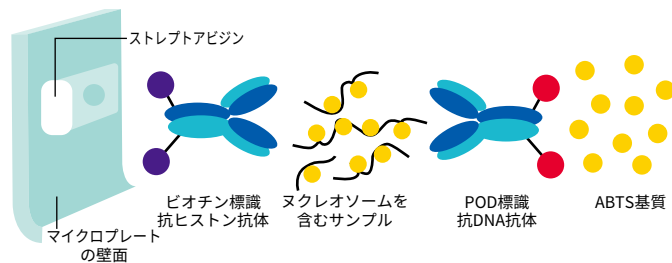


図 7: Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup> の原理スキーム

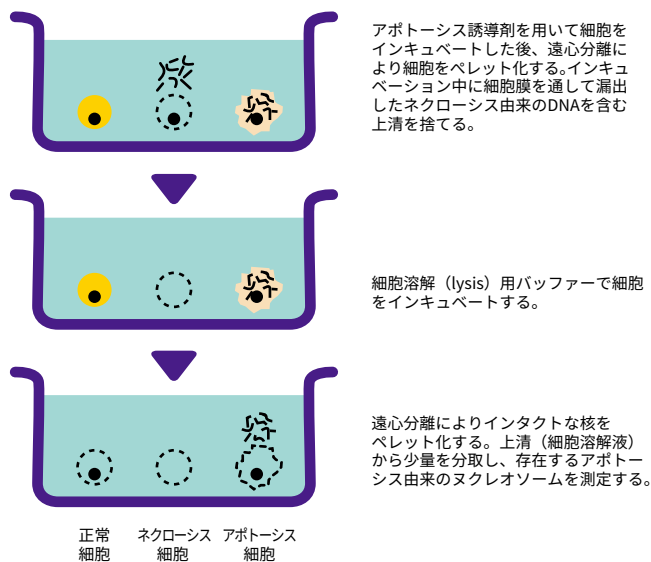


図 8: Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup> のためのサンプル準備ステップ

Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup> は、細胞間の相対定量や細胞集団におけるアポトーシス誘導剤の影響を比較する用途に使用できます。ヌクレオソーム粒子の数値化が可能です（図 9、10）ーゲル上のバンドパターンよりも定量的です。

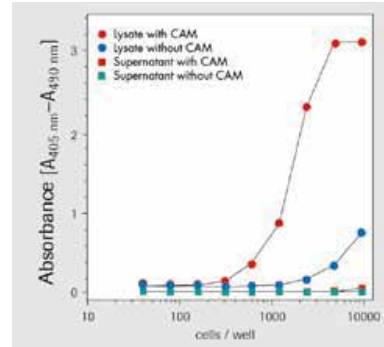


図 9: Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup> の感度

濃度の異なる U937 細胞を CAM (2 µg/mL) 存在下または非存在下で 37°C、4 時間インキュベートした。細胞培養上清および細胞ライセート 20 µL を ELISA で解析した。基質反応時間は 10 分間。● カンプトテシン (CAM) を含むライセート、● CAM を含まないライセート、■ CAM を含む上清、■ CAM を含まない上清。

結果: この ELISA を用いて、最少 600 個の細胞においてアポトーシスに関連するヌクレオソームを明確に検出することができる。

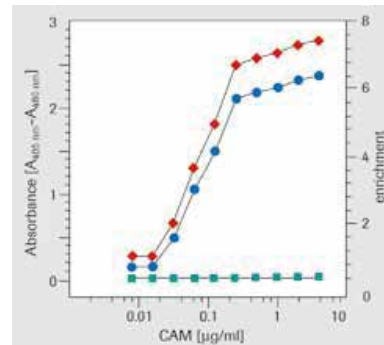


図 10: Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup> を用いた U937 細胞における用量依存性的アポトーシス誘導の検出

U937 細胞 (10<sup>4</sup> 細胞 / ウェル、200 µL 中) を異なる濃度の CAM とともに 37°C、4 時間インキュベートした。細胞溶解の前後に細胞を遠心分離し、20 µL の上清を Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup> を用いて解析した。結果を CAM の投与量に対する反応としてプロットした。基質反応時間は 5 分間とした。◆ ライセート、■ 上清、● ライセートのエンリッチメント因子。

結果: 細胞質由来のオリゴヌクレオソーム (アポトーシスの指標) 量は、CAM 濃度の増加に伴って増加した。処理後かつ溶解前に細胞から取り除かれた細胞培養上清からはシグナルは得られなかったことから、処理中にネクロシスを起こした細胞がなかったことが示唆される。

96 ウェルマイクロプレートフォーマットを使用し 1 ステップの ELISA 法

| 製品名                                        | カタログ番号         | 包装単位      |
|--------------------------------------------|----------------|-----------|
| Cell Death Detection ELISA <sup>PLUS</sup> | 11 774 425 001 | 96 テスト    |
|                                            | 11 920 685 001 | 10×96 テスト |

96 ウェルマイクロプレートフォーマットを使用し 3 ステップの ELISA 法

| 製品名                        | カタログ番号         | 包装単位   |
|----------------------------|----------------|--------|
| Cell Death Detection ELISA | 11 544 675 001 | 96 テスト |

## Apoptotic DNA Ladder Kit

ゲノム DNA のヒストン関連 DNA フラグメント（モノおよびオリゴヌクレオソーム）への切断は、細胞がアポトーシスを起こしていることの生化学的な指標です（図 11）。精製後のゲル電気泳動において、これらの DNA フラグメントは典型的なラダーパターンを作り出します（図 12）。Apoptotic DNA Ladder Kit は右記の特徴があります。

- 20 分以内に細胞サンプルから DNA を精製。
- 有機溶媒による抽出や DNA 沈殿ステップを回避することによる DNA 抽出の簡便化。
- キット内のフラグメント化した DNA コントロール（凍結乾燥アポトーシス U937 細胞から精製）と結果の比較より、データ評価が簡単にできます。

サンプル材料：全血や培養細胞

| 製品名                      | カタログ番号         | 包装単位            |
|--------------------------|----------------|-----------------|
| Apoptotic DNA Ladder Kit | 11 835 246 001 | 1 kit<br>20 テスト |

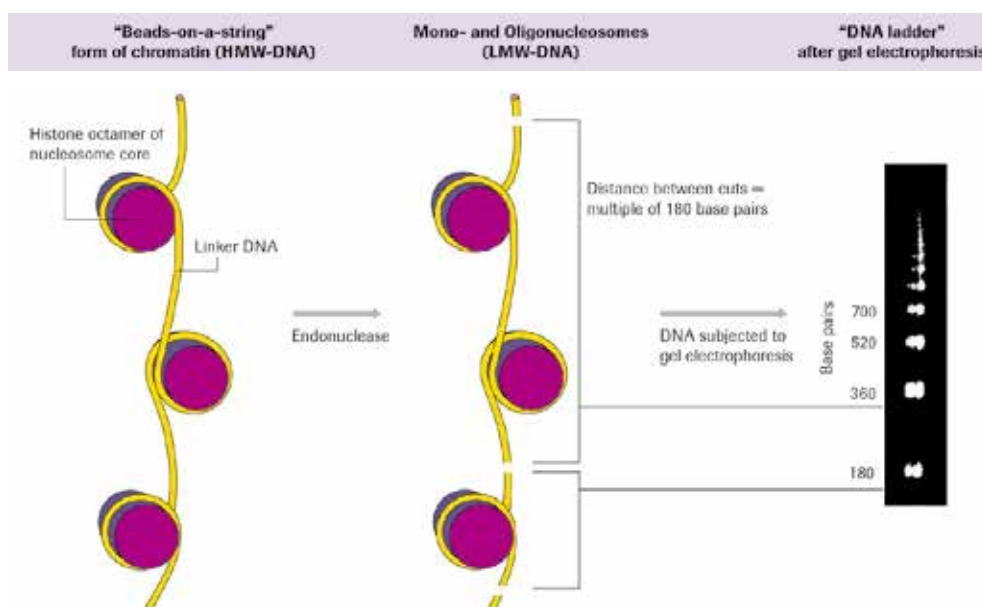


図 11：DNA フラグメンテーションの機構と“DNA ラダー”出現の概要

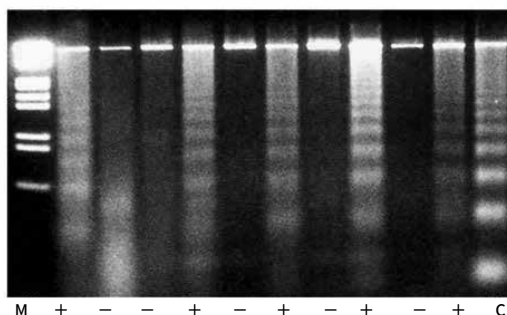


図 12：アポトーシス細胞での典型的な DNA ラダー  
Apoptotic DNA Ladder Kit で可視化。

レーンの説明：

- M サイズマーカー
- カンプトテシン未処理のコントロール細胞
- + カンプトテシン処理細胞
- C キットの陽性細胞

# 個別の細胞での DNA フラグメンテーション

## TUNEL アッセイによるアポトーシス検出

大規模な DNA 分解は、アポトーシスの初期段階で頻繁に生じる特徴的な現象の一つで、二重鎖、低分子 DNA 断片（モノおよびオリゴヌクレオソーム）や、ところどころが一本鎖に切断された（“nick”が入った）高分子 DNA が生じたりします。これらの断片化 DNA 鎖は、遊離 3'-OH 末端を修飾ヌクレオチドで酵素的に標識することで検出が可能です。この末端標識法は、TUNEL（Terminal deoxynucleotidyl transferase [TdT]-mediated dUTP Nick End Labeling）法と呼ばれ、組織や単一細胞におけるアポトーシスの高感度検出を可能としています（図 13）。

DNA 鎖切断部位に標識するためのフルオレセイン-dUTP の使用は、蛍光顕微鏡やフローサイトメトリーにより、直接、組み込まれたヌクレオチドの検出を可能とします。フルオレセイン-dUTP を用いた直接的な標識は、いくつかの利点があります。直接標識（図 14A）は、非特異的なバックグラウンドの低減を間接標識（図 14B）の感度を保ったまま実現します。したがって、アポトーシス検出において、間接法と同様に強力な方法です。

さらに、蛍光シグナルは、レポーター酵素と抗フルオレセイン抗体との複合体をサンプルに添加することにより、発色シグナルに変更することも可能です。

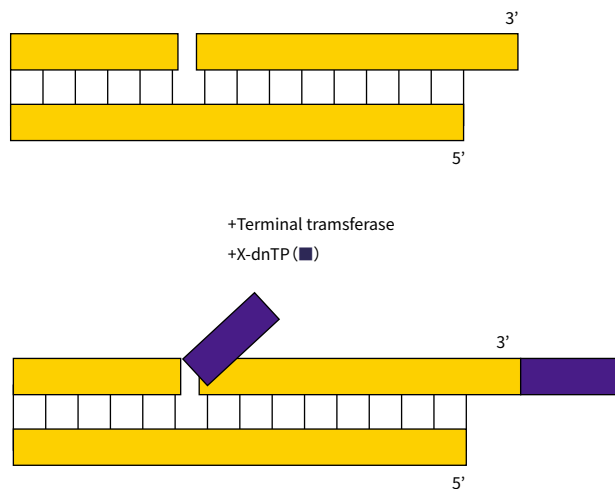


図 13: DNA の *In Situ* エンドラベリング  
TUNEL のスキーム。

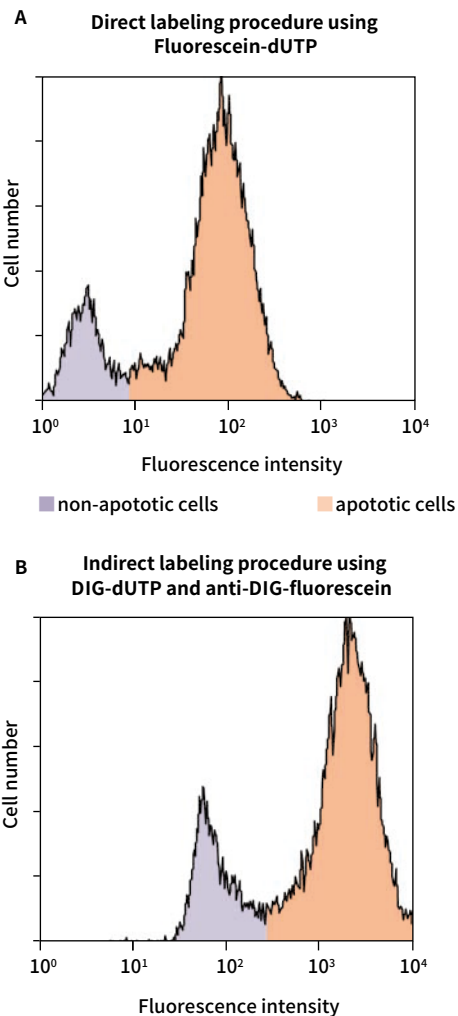


図 14: アポトーシス細胞における DNA 鎖分解を直接 (A) および間接 (B) 標識により比較

(データは R. Sgonc, University of Innsbruck, Austria のご好意により提供)

結果: 直接標識は、間接標識と同程度の感度を示し、非特異的なバックグラウンドは低く抑えられた。

## In Situ Cell Death Detection Kit

TUNEL は、細胞のアポトーシスを高感度に検出できます。

- 最小のバックグラウンドで最大の感度を達成。
- 組織や細胞での低レベルのアポトーシスを検出。
- フローサイトメトリー、蛍光顕微鏡、透過光顕微鏡など必要に応じた検出フォーマット選択し、細胞死の測定や定量。

**サンプル材料：**濁液中の細胞、サイトスピン、細胞塗沫標本、スライドガラス上で増殖した接着細胞、凍結およびパラフィン包埋組織切片

## In Situ Cell Death Detection Kit, AP

細胞をフルオレセイン-dUTPで標識し、アルカリホスファターゼ（AP）標識抗フルオレセイン抗体で検出します。発色基質を使用し透過光顕微鏡でアポトーシスを検出します。

## In Situ Cell Death Detection Kit, POD

細胞をフルオレセイン-dUTPで標識し、ペルオキシダーゼ（HRP、ホースラディッシュペルオキシダーゼ）標識抗フルオレセイン抗体で検出します。発色基質を使用し透過光顕微鏡でアポトーシスを検出します（図 16）。

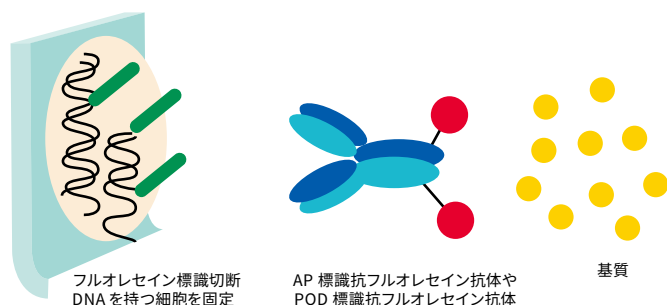


図 15：In Situ Cell Death Detection Kit, AP と POD の原理を表したスキーム

## 透過光顕微鏡用 TUNEL アッセイ

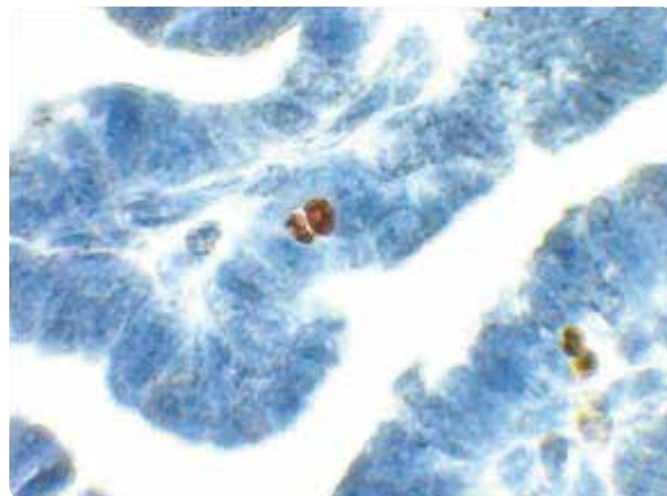


図 16：TUNEL とペルオキシダーゼ染色によるウサギ子宮内膜でのアポトーシス細胞の検出

調製された組織切片は、In Situ Cell Death Detection Kit, POD でアッセイした。ヘマトキシリンでカウンター染色し、透過光顕微鏡下で観察した。細胞の DAB 基質で可視化された褐色の染色は、アポトーシス核を示している。

| 製品名                                   | カタログ番号         | 包装単位   |
|---------------------------------------|----------------|--------|
| In Situ Cell Death Detection Kit, AP  | 11 684 809 910 | 50 テスト |
| In Situ Cell Death Detection Kit, POD | 11 684 817 910 | 50 テスト |

表 2：必要な間接検出システムや DNA 標識酵素など、4 つの異なるキットから選択ください

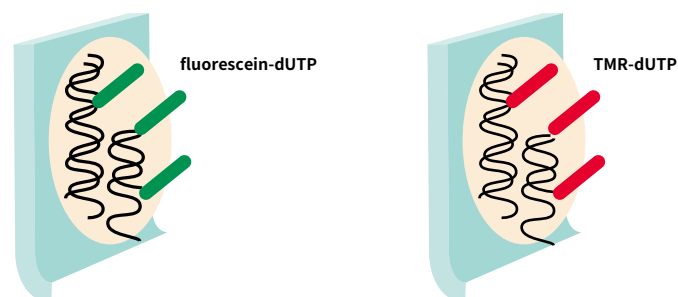
| 方法/製品                                         | 標識               | 間接的 (2次的) 検出システム        | 解析方法            |
|-----------------------------------------------|------------------|-------------------------|-----------------|
| In Situ Cell Death Detection Kit, AP          | Fluorescein-dUTP | Anti-Fluorescein-AP     | 透過光顕微鏡          |
| In Situ Cell Death Detection Kit, POD         | Fluorescein-dUTP | Anti-Fluorescein-POD    | 透過光顕微鏡          |
| In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein | Fluorescein-dUTP | None (direct detection) | フローサイトメトリー蛍光顕微鏡 |
| In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red     | TMR-dUTP         | None (direct detection) | フローサイトメトリー蛍光顕微鏡 |

## In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein

細胞をフルオレセイン-dUTP で標識します。蛍光顕微鏡やフローサイトメトリーによりアポトーシス細胞を検出します（図 18、19、20）。

## In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red

細胞をテトラメチルローダミン-dUTP で標識します。蛍光顕微鏡やフローサイトメトリーによりアポトーシス細胞を検出します（図 21）。



鎖が切断された部位でターミナルトランスフェラーゼによりFluoresceinあるいはTMR red 標識された固定化細胞の DNA

図 17 : In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein と TMR red の原理を表したスキーム

| 製品名                                           | カタログ番号         | 包装単位   |
|-----------------------------------------------|----------------|--------|
| In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein | 11 684 795 910 | 50 テスト |
| In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red     | 12 156 792 910 | 50 テスト |

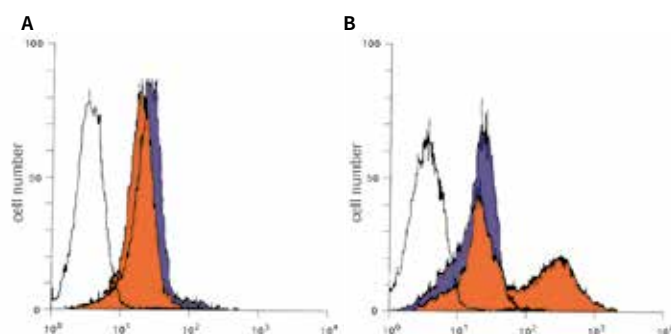


図 20 : In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein を使用したフローサイトメトリーによるアポトーシス細胞の検出

HL60 細胞を 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のカンプトテシン (CAM) 非存在下 (A)、または存在下 (B) で 37°C、3 時間培養した。

- 細胞の自家蛍光のコントロール。標識あるいは酵素溶液不含でインキュベーション。
- 陰性コントロール。ターミナルトランスフェラーゼ不含の標識溶液でインキュベーション。
- テストサンプル。TUNEL 反応混合液でインキュベーション。

## 蛍光顕微鏡やフローサイトメトリーを使用した TUNEL アッセイ

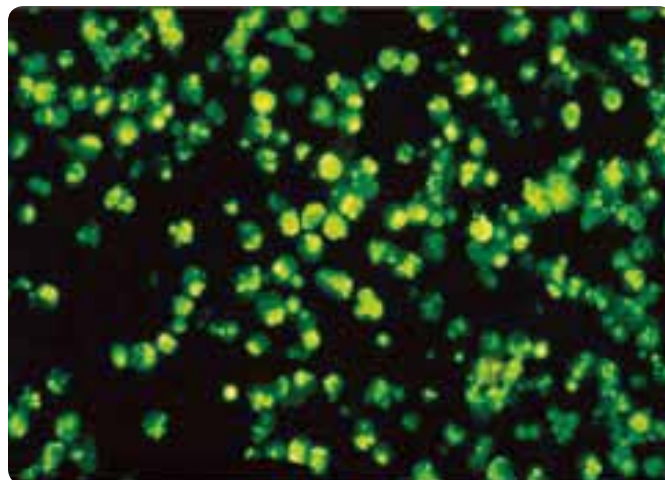


図 18 : In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein で染色された細胞懸濁液 U937 細胞が 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のカンプトテシン (CAM) で誘導され、アポトーシス核が陽性の染色を示している。注：この図は多数 (> 80%) のアポトーシス細胞を示している。二次的なネクローシスを起こしている細胞の検出を避けるために、アポトーシス誘導後、早い時期に分析した。

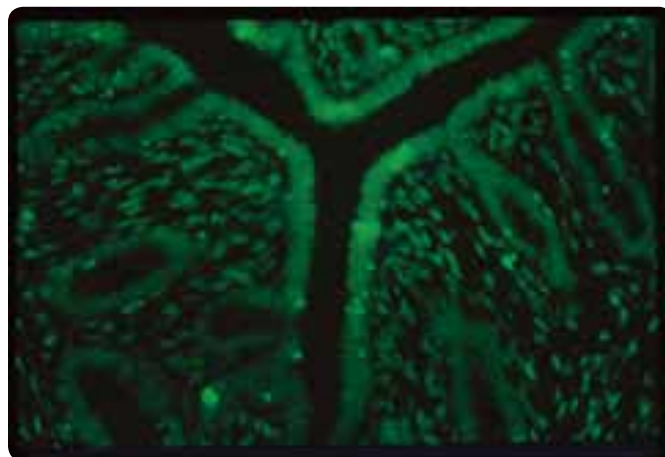


図 19 : 蛍光顕微鏡によるアポトーシス細胞 (緑) の検出  
ウサギ子宮内膜の組織切片を調製し、In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein で染色した。核の陽性染色 (明るい緑) と正常な周辺組織の自家蛍光が示されている。

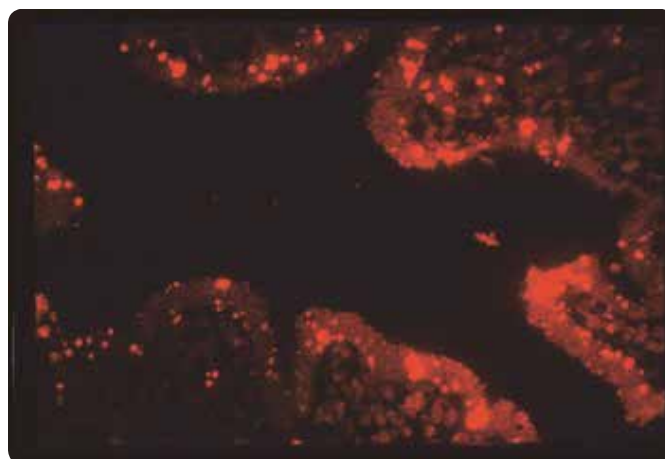


図 21 : 免疫組織化学染色によるアポトーシス細胞 (赤) の検出  
ウサギ子宮内膜の組織を In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red で分析し、蛍光顕微鏡で観察した。アポトーシス核は明るい赤で染色された。微弱な蛍光がバックグラウンド組織で観察されている。

## はじめに

# 細胞傷害性、細胞増殖、細胞生存活性

細胞傷害性や細胞増殖の検出および定量のための古典的な試験は、ラジオアイソトープの使用に基づいています。

ロシュ社ではこれらのアッセイのために、Non-RI の同等品を開発し、高感度で簡便、より安全な製品を提供しています。細胞傷害性、細胞増殖、細胞生存活性の方法を以下に記載します。

## 細胞傷害性

細胞傷害性は、合成化学薬品、天然に発生する毒素、免疫介在細胞（細胞傷害性 T 細胞やナチュラルキラー細胞）などの細胞を殺傷する性質です。ネクローシスやアポトーシスに対して、細胞傷害性という用語は、特異的な細胞死の機構を表しません。

## 細胞増殖と細胞生存活性

細胞増殖と細胞生存活性アッセイは一般的に、“細胞の健康”を評価するために使用されます。ほとんどすべてのケースで、これらのアッセイは健康な細胞と特徴付けられる“生存機能”を測定します。細胞生存活性測定は、サンプル中の健康な細胞数を評価し、細胞集団（初代細胞などの非分裂細胞を培養で単離、維持する場合）の最適な培養条件を決定する際にしばしば有用です。細胞増殖アッセイは、培養や組織中で活発に分裂している細胞の割合を測定します。

ロシュ社では、以下の測定方法を通じて細胞プロセスを研究するための製品を提供しています。

- 細胞膜の損傷
- 代謝活性
- DNA 合成

## 細胞膜の損傷

細胞膜の浸透性をモニターするアッセイは、色素による損傷を受けた（leaky）細胞の染色や、色素を排除する生細胞の計測を含みます。あるいは、膜の完全性はそれが失われたときに放出される物質の定量によりアッセイされます（乳酸脱水素酵素（LDH）など）。

## 代謝活性

細胞の代謝活性は、テトラゾリウム塩を細胞に添加することで測定できます。これらの塩は生細胞によりフォルマザン塩に変換され、分光光度計で測定されます。ATP レベルもエネルギーのキャパシティを表すために、細胞の生存活性が分析できます。

## DNA 合成

細胞増殖を示唆するとされる DNA 合成の測定が、細胞増殖を評価する方法としてしばしば使用されます。アッセイは増殖細胞の DNA に取り込まれる、ヌクレオチドの Non-RI のアナログである BrdU を使用して行われます。新たに合成された DNA の量は、BrdU に対するモノクローナル抗体を使用した ELISA（図 22）や細胞化学、免疫組織化学、フローサイトメトリーを使用して、取り込まれた BrdU を検出することで測定されます。

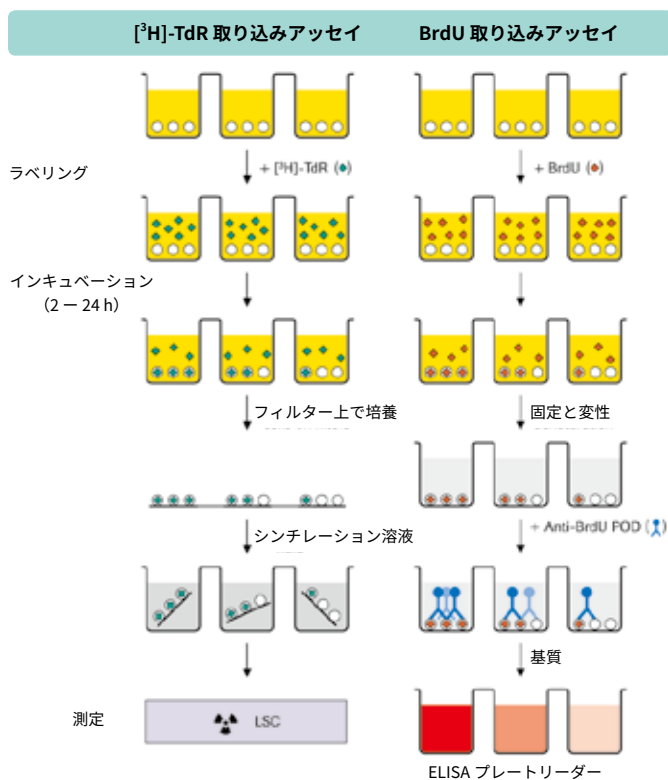


図 22 : 修飾ヌクレオチドである  $[^3\text{H}]$ -TdR と BrdU を使用した DNA 合成の測定

# 細胞集団における細胞傷害性

HTS

## Cytotoxicity Detection Kit<sup>PLUS</sup> (LDH)

96 もしくは 384 ウェルプレート ELISA による細胞毒性、細胞傷害の定量

Cytotoxicity Detection Kit<sup>PLUS</sup> (LDH) は、傷害を受けた細胞から放出される LDH 活性測定に基づいたシステムにより、多くの異なる *in vitro* 細胞における細胞毒性 / 細胞傷害を迅速かつ簡単に定量できます。細胞膜に傷害が起きると（例：細胞介在性細胞傷害）、細胞から乳酸脱水素酵素（lactate dehydrogenase (LDH)）が細胞培養上清にリークします。

LDH は、すべての細胞においてほぼ同様に一定の濃度で存在する安定な細胞質タンパク質です。実験のフレキシビリティを提供するために、本キットは、Cytotoxicity Detection Kit (LDH) の改良版で、反応停止液がコンポーネントに加わった他、実験手技も簡便化しております。

- **最少の手技でハイスループット解析を実現：**  
遠心分離操作やプレ標識ステップは必要ありません。
- **反応停止液の使用によりアッセイ条件をコントロール。**
- **放射性同位元素 (<sup>51</sup>Cr) を使用せず安全。**
- **高い精度：**  
得られる結果は、溶解した細胞数と強く相関します。
- **高感度：**  
少ない細胞数からも検出が可能です (<100 cells/well)。また直線性にも優れています (図 23、24)。
- **スピーディー：**  
ELISA 用プレートを使用することにより、96- もしくは 384- ウェルプレートも迅速に処理することが可能です。
- **WST-1 アッセイとの併用：**  
より多くの細胞状態の情報を取得可能です (図 25)。

**サンプル材料：**細胞を 96- もしくは 384- ウェルプレートで培養した場合に得られる培養上清

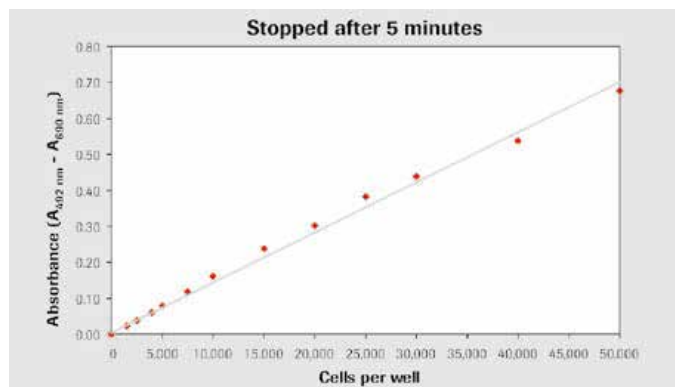


図 23 : Cytotoxicity Detection Kit<sup>PLUS</sup> (LDH) の直線性領域

細胞培養全体における異なる細胞数の U-937 細胞からのトータル LDH 活性を決定するためにキットを使用した。この図は、Cytotoxicity Detection Kit<sup>PLUS</sup> (LDH) の基質混合液と 5 分間インキュベーションした後の値を示している。

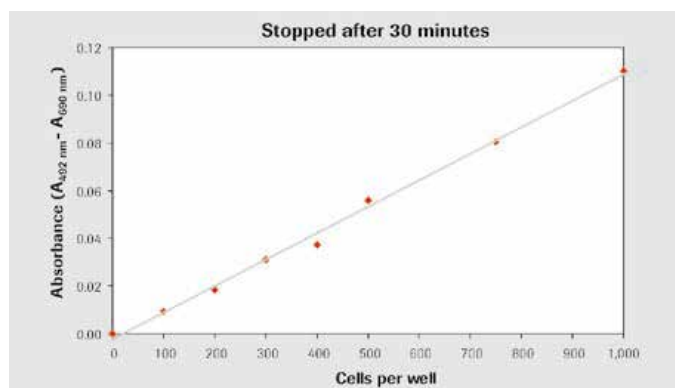


図 24 : Cytotoxicity Detection Kit<sup>PLUS</sup> (LDH) の感度

細胞培養全体における異なる細胞数の U-937 細胞からのトータル LDH 活性を決定するためにキットを使用した。この図は、最低 100 cells/well の細胞と基質を 30 分間インキュベーションした後の値を示している。

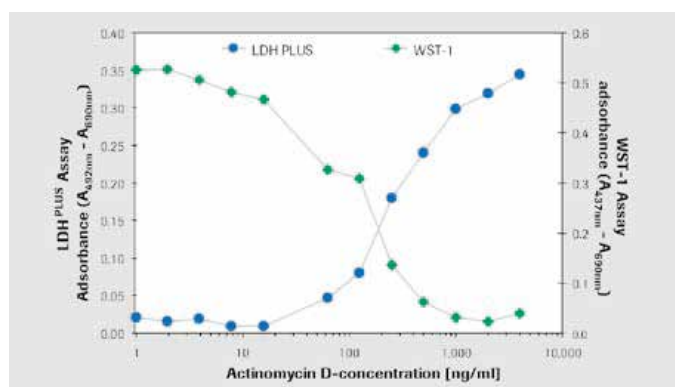


図 25 : Cytotoxicity Detection Kit<sup>PLUS</sup> (LDH) と Cell Proliferation Reagent WST-1 を用いた U-937 細胞の用量反応の実験

異なる濃度のアクチノマイシン D を細胞に添加し、培養における細胞傷害性を両キットを用いて測定した。

Cytotoxicity Detection Kit<sup>PLUS</sup> (LDH)と並行してCell Proliferation Reagent WST-1を使用することにより、迅速かつ簡単に細胞ステータスを決定できます。これにより、より深く細胞培養における生物学的プロセスを理解することができます（図25、前ページ）。

（より詳細なCell Proliferation Reagent WST-1の情報については14ページを参照ください）

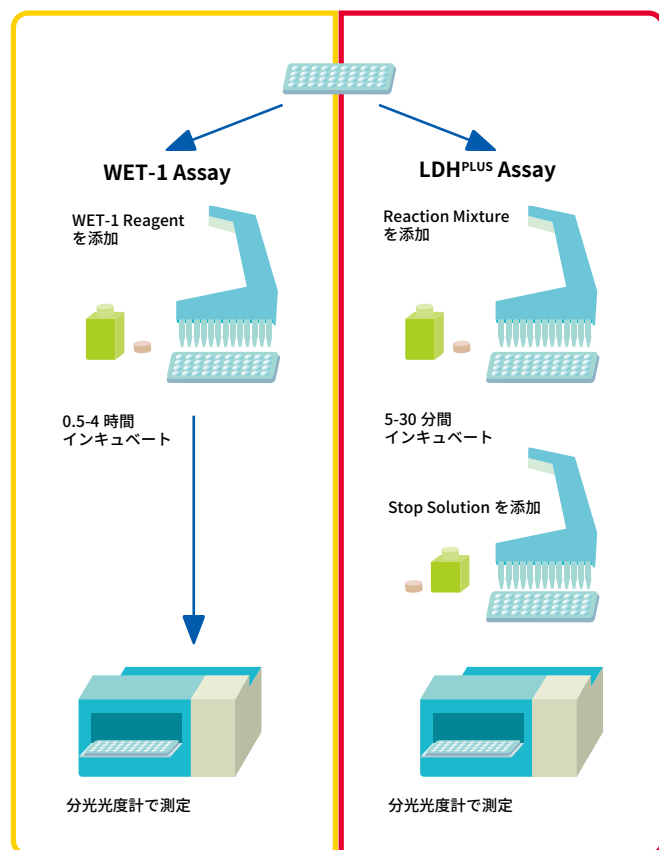


図 26 : Cell Proliferation Reagent WST-1 と Cytotoxicity Detection Kit<sup>PLUS</sup> (LDH) アッセイの概要

移送や遠心操作、洗浄、ブレ標識操作等を省くことで、より簡単なハンドリングを両キットで達成。

| 製品名                                              | カタログ番号         | 包装単位              |
|--------------------------------------------------|----------------|-------------------|
| Cytotoxicity Detection Kit <sup>PLUS</sup> (LDH) | 04 744 926 001 | 1 kit (400 テスト)   |
|                                                  | 04 744 934 001 | 1 kit (2,000 テスト) |

Cytotoxicity Detection Kit (LDH) は、96 ウェルフォーマットを用いた細胞傷害性検出キットです。

| 製品名                              | カタログ番号         | 包装単位      |
|----------------------------------|----------------|-----------|
| Cytotoxicity Detection Kit (LDH) | 11 644 793 001 | 2,000 テスト |

## Cellular DNA Fragmentation ELISA

このフレキシブルなキットで、培養上清や細胞質の BrdU (5-Bromo-2'-deoxyuridine) - 標識 DNA 断片を測定することにより、アポトーシス、ネクローシス、細胞介在性細胞傷害の研究が可能です。BrdU 標識 DNA フラグメントは、サンドイッチ ELISA 法（図 27）で測定します。

- 細胞溶解物中の BrdU 標識 DNA 量の測定。
- ネクローシスや細胞傷害性により培養培地中に放出された BrdU 標識 DNA の定量。
- 細胞集団におけるアポトーシス誘導剤の効果の比較と定量。

**サンプル材料：**代謝的に BrdU でプレ標識した DNA を含む、細胞（例：細胞株、他の *in vitro* 増殖細胞）の培養上清や細胞質フラクション（ライセート）

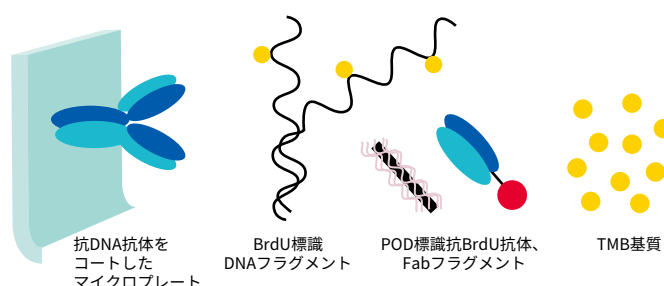


図 27 : Cellular DNA Fragmentation ELISA の原理スキーム

| 製品名                              | カタログ番号         | 包装単位            |
|----------------------------------|----------------|-----------------|
| Cellular DNA Fragmentation ELISA | 11 585 045 001 | 1 kit (500 テスト) |

細胞毒性

# 代謝活性

## テトラゾリウム塩を使用した代謝活性のアッセイ

代謝活性を測定することにより細胞集団における細胞の生存活性、増殖、もしくは細胞傷害を定量することができます。ロシュ社では、生細胞によるテトラゾリウム塩のフォルマザン塩への還元を介して代謝活性を測定する3種類のマイクロプレートタイプのアッセイを提供しています。これらの中で、最も高感度で便利なのは、Cell Proliferation Reagent WST-1です。

## Cell Proliferation Reagent WST-1

### 即使用可能な試薬でワンステップの測定

毒性がなく、ラジオアイソトープを使用しない Cell Proliferation Reagent WST-1 により、簡単に正確に、細胞の生存活性、増殖（図 28）や細胞毒性（図 29）を測定することができます。この便利なワンステップアッセイは、生細胞によるテトラゾリウム塩 WST-1 の還元により可溶性フォルマザンを生成するという原理に基づいています。本法は、単に試薬を細胞に添加し、インキュベートしてマイクロプレートリーダーで吸光度を測定するだけで、煩雑な手技を必要としません。

- **正確な細胞増殖測定：**  
細胞数と強く相関した吸光度アッセイ。
- **MTT や XTT よりも低細胞数で検出でき、高感度**  
(図 30)。
- **ワンステップアッセイ、試薬は即使用可能であり、洗淨ステップが不要。**  
また追加試薬も必要ないなどスピーディに処理が可能です。
- **WST-1 とレポータージーンアッセイを併用することで、細胞数の標準化ができます。**
- **LDH アッセイとの併用により、より多くの情報を取得できます**（図 31）。

サンプル材料：96 ウェルマイクロプレート上で培養した接着・浮遊細胞

| 製品名                              | カタログ番号         | 包装単位              |
|----------------------------------|----------------|-------------------|
| Cell Proliferation Reagent WST-1 | 05 015 944 001 | 8 mL (800 テスト)    |
|                                  | 11 644 807 001 | 25 mL (2,500 テスト) |

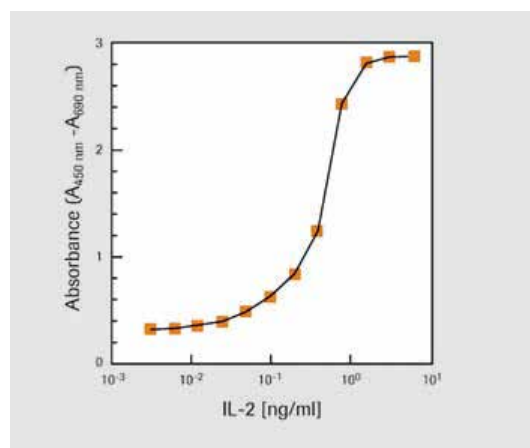


図 28：WST-1 によるヒトインターロイキン-2 (hIL-2) に対する CTLL-2 細胞の反応の測定

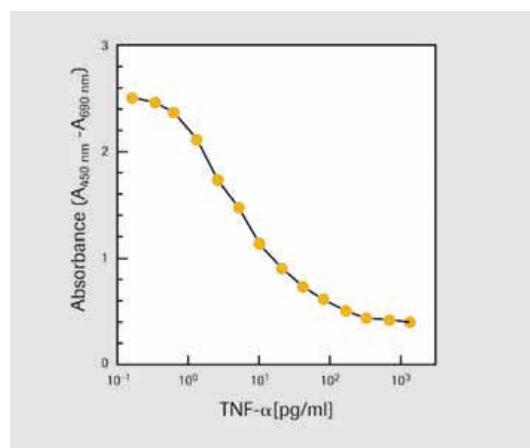


図 29：WST-1 を使用した WEHI-164 細胞における TNF-α の毒性活性の決定

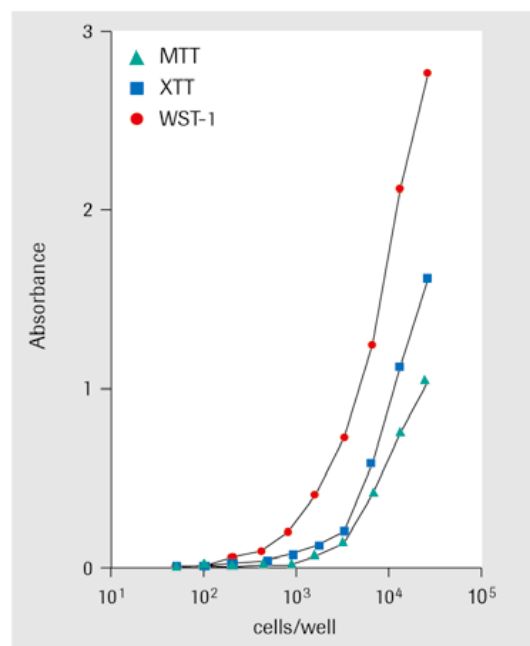


図 30：WST-1 は MTT もしくは XTT よりも 5 倍の感度を達成

P815 細胞を種々の濃度で 20 時間プレインキュベーションした後、MTT (▲、p15 参照)、XTT (■、p15 参照)、または WST-1 (●) が添加された。4 時間の基質との反応後、ELISA プレートリーダー（マイクロプレートリーダー）を用いて適切な波長における吸光度を測定した。

結果：Cell Proliferation Reagent WST-1 は、Cell Proliferation Kit I (MTT) や Kit II (XTT) よりも 5 倍高感度である。

## Cell Proliferation Kit (MTT と XTT)

WST-1 に加え、ロシュ社では第 1 世代の Cell Proliferation Kit I (MTT) と、第 2 世代の Kit II (XTT) を提供しています。MTT は最初に記述されたテトラゾリウム塩で、不溶性のフォルマザンを形成するため、キット内の可溶化溶液を使用して可溶化します。これに対して XTT は、可溶性のフォルマザンを形成するため、更なる可溶化ステップがなく、直接測定できます。

- 成長因子、サイトカイン、マイトジェン、栄養因子などへの応答による細胞増殖の迅速な測定。
- スピーディ・経済的：  
洗浄操作や他の追加試薬は必要ありません。
- 抗がん剤や他の医薬成分などの細胞傷害性および増殖抑制成分の分析。
- 増殖阻止抗体や生理学的メディエーターの評価。
- 時間の短縮：  
1 個のマイクロプレートですべてのアッセイの実施。

サンプル材料：96 ウェルマイクロプレート内の接着および浮遊培養細胞

| 製品名                             | カタログ番号         | 包装単位              |
|---------------------------------|----------------|-------------------|
| Cell Proliferation Kit I (MTT)  | 11 465 007 001 | 1 kit (2,500 テスト) |
| Cell Proliferation Kit II (XTT) | 11 465 015 001 | 1 kit (2,500 テスト) |

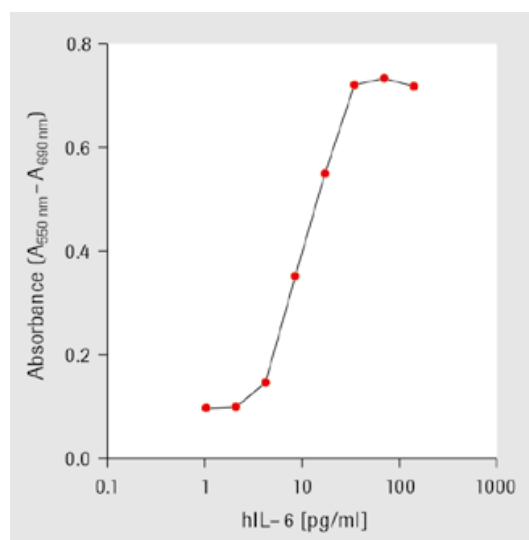


図 31 : Cell Proliferation Kit I (MTT) を使用したマウスハイブリドーマセルラインのヒトインターロイキン 6 (hIL-6) 活性の測定

7TD1 細胞 ( $2 \times 10^3$ /ウェル) を様々な量の hIL-6 の存在下でインキュベートした。インキュベーション 4 日後、Cell Proliferation Kit I (MTT) により解析した。

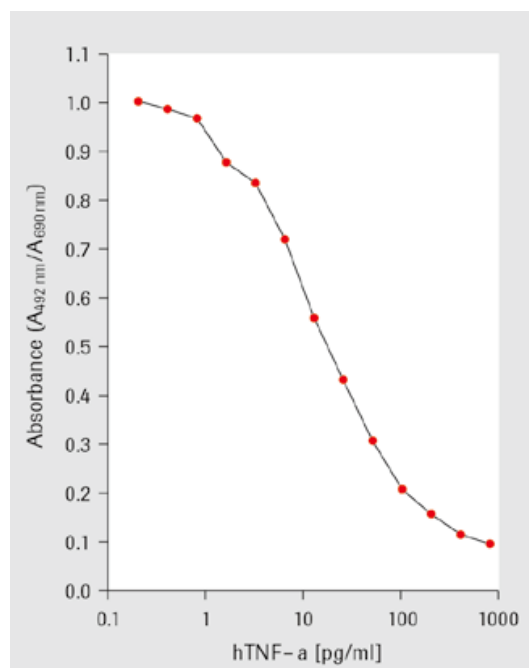


図 32 : Cell Proliferation Kit II (XTT) によるマウス線維肉腫セルライン WEHI-164 細胞における hTNF-α 活性の測定

細胞 ( $1 \times 10^5$ /mL) はアクチノマイシン C ( $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) と 3 時間プレインキュベーション後、細胞 ( $5 \times 10^4$ /ウェル) はアクチノマイシン C の存在下で、様々な量の hTNF-α と 24 時間インキュベーションした。細胞反応は Cell Proliferation Kit II (XTT) により解析した。

## ATP Bioluminescence Assay Kit

生きている細胞は、ATP の形状を取る自由なエネルギーの連続的なインプットを必要とします。それゆえ、細胞増殖は ATP レベルの増加により測定することができます。これらのキットはルシフェラーゼによる生物発光により高感度な ATP の定量検出に使用できます。

- 生物発光を使用した ATP の測定という、十分に確立された技術で細胞増殖を測定。
- アプリケーションに応じて 2 種類のフォーマットから選択。
- 非常に低濃度の ATP を検出。
- 96 ウェルマイクロプレート内の接着および浮遊培養細胞に対応。

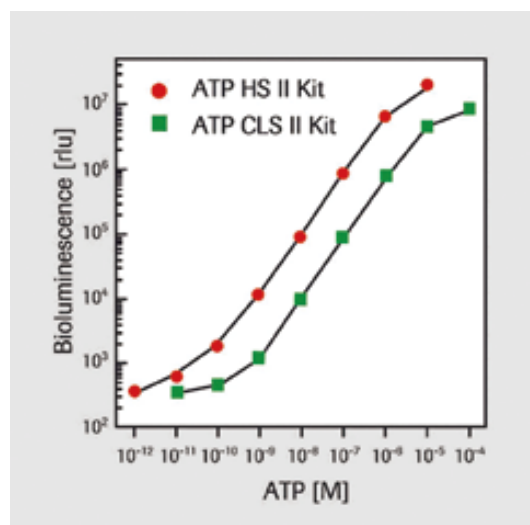


図 33 :ATP Bioluminescence Assay Kit HS II と CLS II のダイナミックレンジ

## ATP Bioluminescence Assay Kit HS II

最も高い感度を必要とする場合に、このキットを使用してください。キットは ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II の 10 倍の感度を持ち (図 33)、高い感度レンジでの測定に推奨されます。

効率的な細胞溶解試薬も添付されています。

サンプル材料：真核および原核細胞

| 製品名                                 | カタログ番号         | 包装単位                                             |
|-------------------------------------|----------------|--------------------------------------------------|
| ATP Bioluminescence Assay Kit HS II | 11 699 709 001 | 1 kit<br>(1,000 アッセイ/マイクロプレート、<br>500 アッセイ/チューブ) |

## ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II

定常的なシグナル発生による高い再現性が必要な場合、こちらのキットを使用してください (たとえば、酵素のカイネティックス研究や、代謝研究、酵素を組み合わせたアッセイなど) (図 34)。

サンプル材料：真核および原核細胞

| 製品名                                  | カタログ番号         | 包装単位                                             |
|--------------------------------------|----------------|--------------------------------------------------|
| ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II | 11 699 695 001 | 1 kit<br>(1,600 アッセイ/マイクロプレート、<br>800 アッセイ/チューブ) |

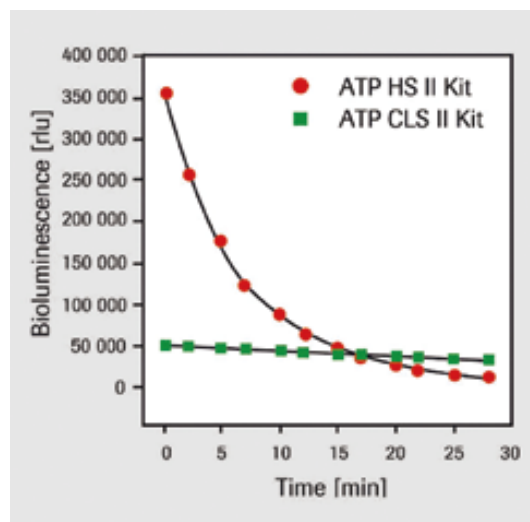


図 34 :ATP Bioluminescence Assay Kit HS II と CLS II の発光カイネティックス  
50  $\mu$ L 中の 10 pmol ATP が 50  $\mu$ L のルシフェラーゼ試薬により黒色マイクロプレート中で測定された。

# 細胞集団での DNA 合成

## BrdU の取り込みを検出

Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric および chemiluminescent) アッセイは、増殖中の細胞の DNA にチミジンの代わりに取り込まれる BrdU の、Non-RI での検出に基づいています。DNA 合成を測定するためには、これらの改良された第 2 世代のキットを使用してください。

- 成長因子やサイトカインで誘導される細胞増殖の検出および定量化。
- 細胞増殖における様々な成分の阻害および促進効果の測定。

サンプル材料：接着および浮遊培養細胞

## Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)

ELISA リーダーで増殖細胞を検出する場合に、このキットを使用してください。発色とその吸光度値は直接に DNA 合成量、つまりマイクロプレートでの培養中の増殖細胞数と相関します。

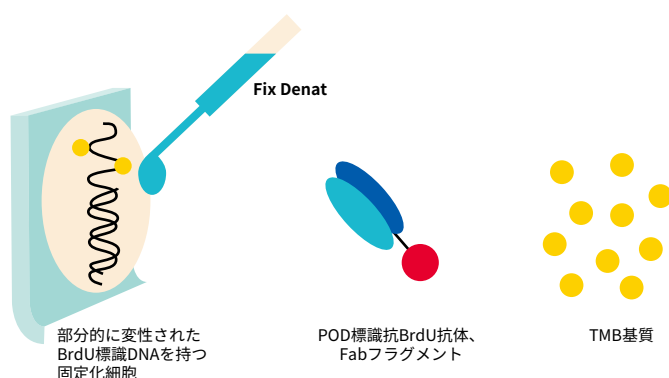


図 35 : Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) の原理スキーム

| 製品名                                           | カタログ番号         | 包装単位              |
|-----------------------------------------------|----------------|-------------------|
| Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) | 11 647 229 001 | 1 kit (1,000 テスト) |

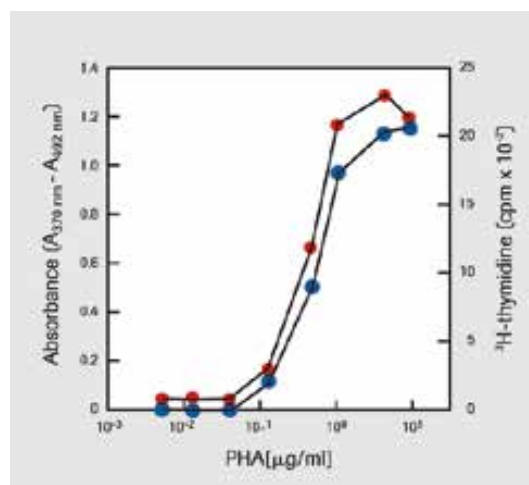


図 36 : Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) とラジオアクティブなチミジン ( $[^3\text{H}]$ -TdR) 取り込みアッセイとの種々の濃度におけるマイトゲン刺激の測定比較

フィトヘマグルチニン (PHA) で刺激されたヒト末梢血リンパ球を、BrdU (●) あるいは  $[^3\text{H}]$ -TdR (●) で 4 時間標識した。

結果：Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) (●) は、 $[^3\text{H}]$ -TdR アッセイ (●) と同等な感度でマイトゲン刺激を測定。

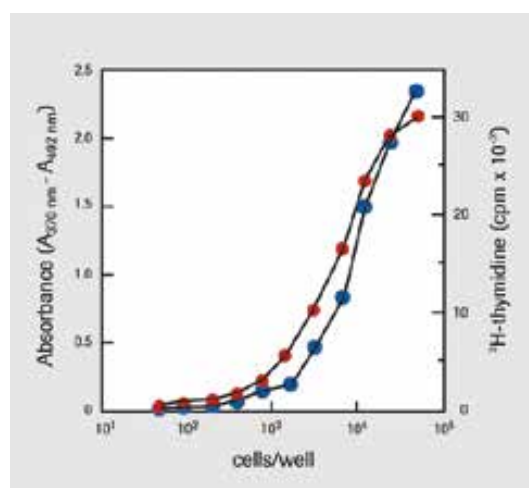


図 37 : Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) とラジオアクティブなチミジン ( $[^3\text{H}]$ -TdR) 取り込みアッセイとの種々の細胞濃度での増殖測定の感度比較

種々の濃度の L929 細胞を、BrdU (●) あるいは  $[^3\text{H}]$ -TdR (●) で 4 時間標識した。

結果：Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) (●) は、すべての細胞濃度において、 $[^3\text{H}]$ -TdR アッセイ (●) と同等な感度で増殖を測定した。

## 使いやすい ELISA の利点

- 増殖細胞数と強く相関する結果を獲得（低い変動係数）。
- 少なくとも [ $^3\text{H}$ ]-チミジン取り込みアッセイと同感度で、より広い直線性を持つ Non-RI 法の使用。
- キット内に供給される FixDenat 試薬による 1 ステップでの細胞の変性と固定。その後、わずか 1 回の洗浄と 2 回のインキュベーションステップで実行。
- 危険なラジオアイソトープの使用を回避。
- 安定で最適化された試薬とその簡便性：  
1 つのマイクロプレート内ですべてのアッセイを実行。
- 穏やかな固定と DNA 変性法により細胞の形態を保持。

## Cell Proliferation ELISA, BrdU (chemiluminescent)

化学発光 ELISA リーダーで細胞増殖を検出する場合に、このキットを使用してください。

相対発光強度 / 秒 (rlu/s) は直接に DNA 合成量、つまりマイクロプレート培養中の増殖細胞数と相関します (図 39)。

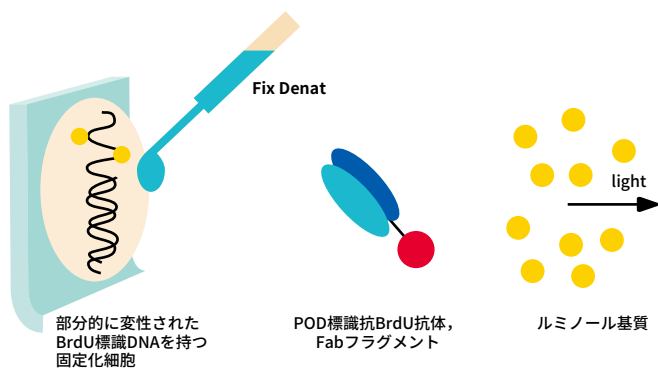


図 38 : Cell Proliferation ELISA, BrdU (chemiluminescent) の原理スキーム

| 製品名                                               | カタログ番号         | 包装単位              |
|---------------------------------------------------|----------------|-------------------|
| Cell Proliferation ELISA, BrdU (chemiluminescent) | 11 669 915 001 | 1 kit (1,000 テスト) |

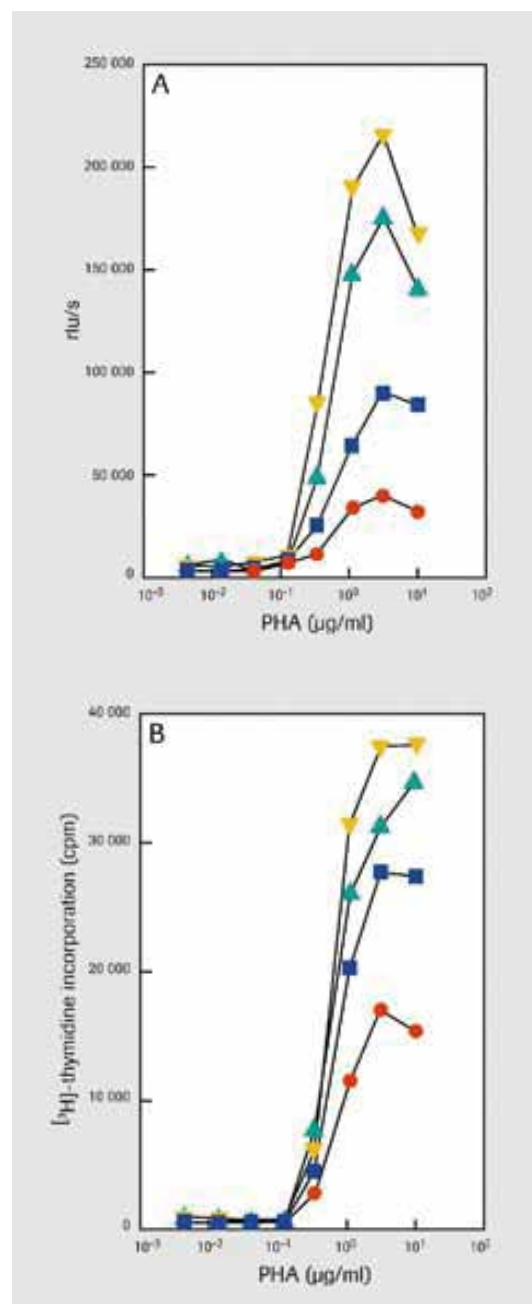


図 39 : マイトジェンで刺激されたヒト末梢血リンパ球の増殖の測定による、Cell Proliferation ELISA, BrdU (chemiluminescent) とラジオアクティブなチミジン取り込みアッセイとの比較

PBLs は単離され、マイクロプレート中で 48 時間培養された。次に、BrdU[A] あるいは [ $^3\text{H}$ ]-チミジン[B] を加え、さらに 2 時間 (●)、4 時間 (■)、8 時間 (▲)、24 時間 (▼) インキュベーションした。

BrdU の取り込みは Cell Proliferation ELISA, BrdU (chemiluminescent) を使って測定した。 [ $^3\text{H}$ ]-チミジンの取り込みアッセイは常法で行った。

結果 : Cell Proliferation ELISA, BrdU (chemiluminescent) で得られたデータは、 [ $^3\text{H}$ ]-チミジン取り込みアッセイで得られたデータとよく相関している。

## BrdU Labeling and Detection Kit III (POD)

### 発色検出 ELISA を使用した細胞増殖の測定

96 ウェル ELISA フォーマットを使用して、新たに合成される細胞 DNA へ取り込まれた BrdU の定量的検出により、細胞集団の増殖を測定します (図 40)。

ラジオアイソトープを使用する技術に比べ、このキットは多くの利点が得られます。

- **ラジオアイソトープを使用しないことによる高い安全性。**
- **正確なデータを獲得：**  
[<sup>3</sup>H]-チミジン法と強く相関する結果。
- **[<sup>3</sup>H]-チミジン法と同等の感度を Non-RI アッセイで達成。**
- **時間の短縮：**  
マルチウェル ELISA リーダーの使用で多数サンプル処理が可能。
- **コストの削減：**  
高価な機器やシンチレーション溶液などの追加試薬を必要としないアッセイによるコストの削減。

**サンプル材料：**96 ウェルマイクロプレート内の接着および浮遊培養細胞

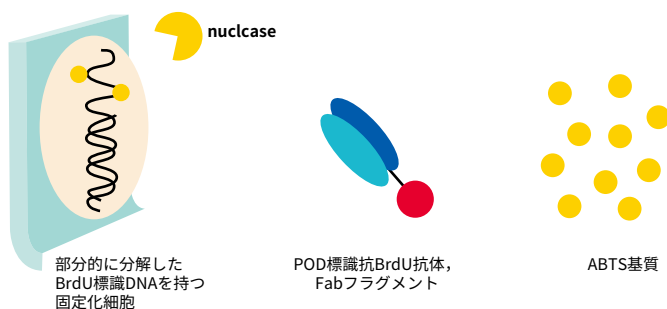


図 40 : BrdU Labeling and Detection Kit III (POD) の原理スキーム

| 製品名                                                     | カタログ番号         | 包装単位              |
|---------------------------------------------------------|----------------|-------------------|
| 5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit III | 11 444 611 001 | 1 kit (1,000 テスト) |

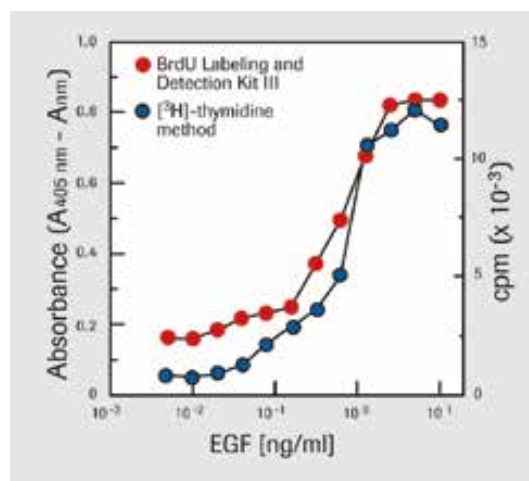


図 41 : リコンビナントヒト上皮細胞増殖因子 (hEGF) に応答した AKR-2B 細胞 (マウス線維芽細胞株) の増殖

それぞれ BrdU Labeling and Detection Kit III (●)、あるいは [<sup>3</sup>H]-チミジン法 (●) を用いた。

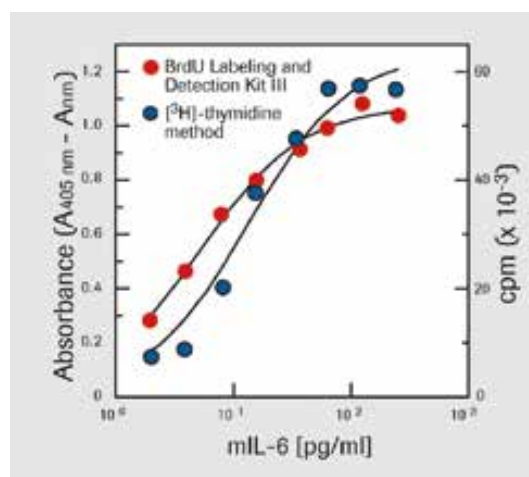


図 42 : リコンビナントマウスインターロイキン-6 (mIL-6) に応答した 7TD1 細胞 (マウス - マウスハイブリドーマ) の増殖

それぞれ BrdU Labeling and Detection Kit III (●)、あるいは [<sup>3</sup>H]-チミジン法 (●) を用いた。

**結果：**図 41 と 42 は hEGF と mIL-6 刺激アッセイにおいて、BrdU と [<sup>3</sup>H]-チミジン法が同等の感度であることを示している。

# 個別の細胞での DNA 合成

## BrdU Labeling and Detection Kit I (Fluorescein) と II (AP)

### 蛍光 (Kit I) や透過光 (Kit II) 顕微鏡で使用するための第 1 世代の免疫染色アッセイ

DNA 合成の間に細胞 DNA に取り込まれた Non-RI の BrdU (5-Bromo-2'-deoxyuridine) の検出により、個々の細胞レベルで細胞増殖を研究できます。キットにて供給されている抗 BrdU モノクローナル抗体と酵素、あるいは蛍光標識二次抗体により、取り込まれた BrdU は容易に検出できます。免疫蛍光には BrdU Labeling and Detection Kit I、光学顕微鏡検出 (免疫細胞 / 組織化学) には Kit II を使用します。

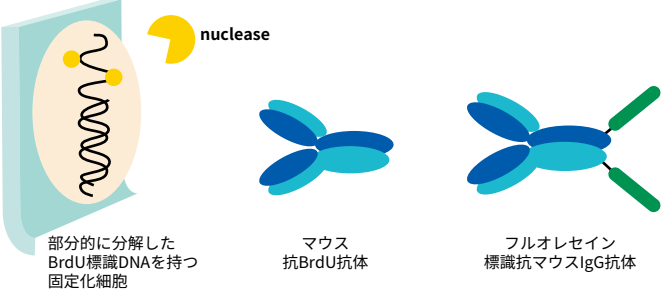


図 43 : BrdU Labeling and Detection Kit I (Fluorescein) の原理スキーム

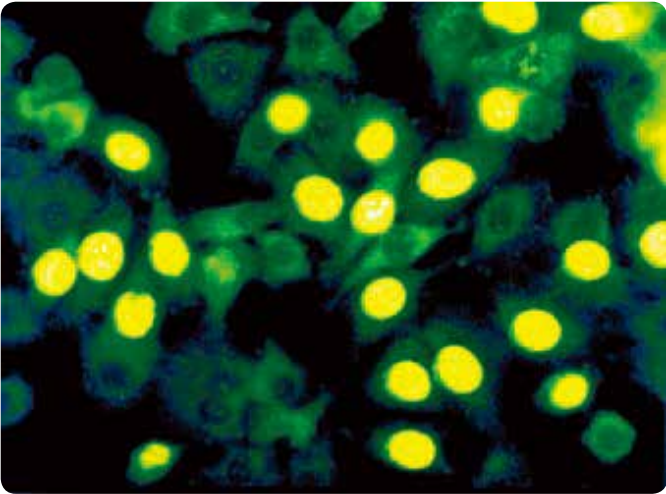


図 44 : 蛍光顕微鏡による、DNA 合成を行っている細胞の検出  
BrdU の取り込みを BrdU Labeling and Detection Kit I を使って検出した。  
明るい緑色は、明確に増殖細胞を示している。

| 製品名                                                   | カタログ番号         | 包装単位            |
|-------------------------------------------------------|----------------|-----------------|
| 5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit I | 11 296 736 001 | 1 kit (100 テスト) |

BrdU Labeling and Detection Kit I および II は DNA の変性にヌクレアーゼを使用し細胞統合性にダメージを与えることなく BrdU に対して抗体を結合させます。細胞の形態や細胞表面マーカーを含む細胞の完全性を保持するため、以下のことが可能となります。

- 他のマーカーとの同時検出の実行 (二重染色)。
- *In vitro* および *in vivo* での細胞の標識。
- 危険で不便なラジオアイソトープ ( $[^3\text{H}]$ -チミジン) を使用しないで細胞の増殖を測定。

サンプル材料 : 接着や浮遊細胞、凍結およびパラフィン包埋組織切片 (BrdU での *in vivo* 標識後)

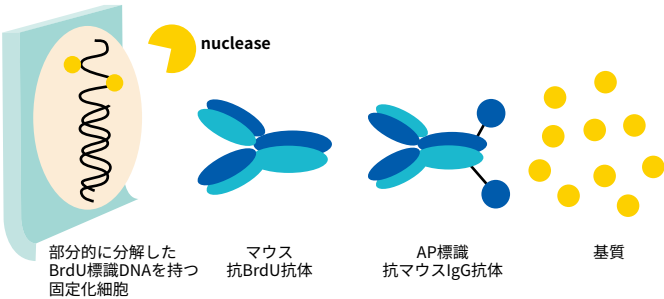


図 45 : BrdU Labeling and Detection Kit II (AP) の原理スキーム

| 製品名                                                    | カタログ番号         | 包装単位            |
|--------------------------------------------------------|----------------|-----------------|
| 5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit II | 11 299 964 001 | 1 kit (100 テスト) |

## Aniti-Bromodeoxyuridine 抗体

ロシュ社では細胞 DNA に取り込まれた BrdU の検出を通じて細胞増殖を測定するための抗体を提供しています。

- 細胞増殖研究に高品質な抗体を採用してください。
- 数種類の製品から必要に応じて選択してください。
- 高い特異性を達成：  
抗体は他の細胞成分との交差反応はありません。
- 増殖中の個々の細胞内の BrdU 標識 DNA の検出。

**サンプル材料：**培養あるいは新たに単離された細胞、摘出組織や切片

## Aniti-Bromodeoxyuridine formalin grade

個々の細胞レベルでの細胞増殖（BrdU の取り込み）を定性的に測定します。細胞切片、パラフィン切片、フローサイトメトリー、免疫組織化学で使用してください。

モノクローナル Aniti-Bromodeoxyuridine 抗体は、標識した形質細胞を決定するだけでなく、血液、組織、腫瘍の増殖細胞に使用できます。

| 製品名                                    | カタログ番号         | 包装単位           |
|----------------------------------------|----------------|----------------|
| Aniti-Bromodeoxyuridine formalin grade | 11 170 376 001 | 50µg (250テスト*) |

## Aniti-Bromodeoxyuridine-Fluorescein formalin grade

個々の細胞レベルでの細胞増殖（BrdU の取り込み）を定性的に測定します。細胞切片、パラフィン切片、フローサイトメトリー、免疫組織化学で使用できます。

| 製品名                                                | カタログ番号         | 包装単位             |
|----------------------------------------------------|----------------|------------------|
| Aniti-Bromodeoxyuridine-Fluorescein formalin grade | 11 202 693 001 | 50 µg (250 テスト*) |

## Aniti-Bromodeoxyuridine-Peroxidase, Fab fragments formalin grade

個々の細胞レベルでの細胞増殖（BrdU の取り込み）を細胞切片、パラフィン切片、免疫組織化学で定性的に測定します。また ELISA による細胞集団での増殖の定量的測定に使用できます。

| 製品名                                                              | カタログ番号         | 包装単位   |
|------------------------------------------------------------------|----------------|--------|
| Aniti-Bromodeoxyuridine-Peroxidase, Fab fragments formalin grade | 11 585 860 001 | 15 U** |

\* フローサイトメトリー

\*\* 0.2 U/mL (ELISA)、1.5 U/mL (免疫化学)

# ご注文情報

## DNA断片化を測定するための製品

| 製品名                                                  | カタログ番号         | 包装単位                |
|------------------------------------------------------|----------------|---------------------|
| Apoptotic DNA Ladder Kit                             | 11 835 246 001 | 1 kit (20 tests)    |
| Cell Death Detection ELISA <sup>PLUS</sup>           | 11 774 425 001 | 1 kit (96 tests)    |
| Cell Death Detection ELISA <sup>PLUS</sup> , 10x     | 11 920 685 001 | 1 kit (10×96 tests) |
| Cell Death Detection ELISA                           | 11 544 675 001 | 1 kit (96 tests)    |
| <i>In Situ</i> Cell Death Detection Kit, AP          | 11 684 809 910 | 1 kit (50 tests)    |
| <i>In Situ</i> Cell Death Detection Kit, Fluorescein | 11 684 795 910 | 1 kit (50 tests)    |
| <i>In Situ</i> Cell Death Detection Kit, POD         | 11 684 817 910 | 1 kit (50 tests)    |
| <i>In Situ</i> Cell Death Detection Kit, TMR red     | 12 156 792 910 | 1 kit (50 tests)    |
| TUNEL Enzyme                                         | 11 767 305 001 | 2×50 µL (20 tests)  |
| TUNEL Label Mix                                      | 11 767 291 910 | 3×550 µL (30 tests) |
| TUNEL AP                                             | 11 772 457 001 | 3.5 mL (70 tests)   |
| TUNEL POD                                            | 11 772 465 001 | 3.5 mL (70 tests)   |
| TUNEL Dilution Buffer                                | 11 966 006 001 | 2×10 mL             |

## 細胞膜変化を測定するための製品

| 製品名                          | カタログ番号         | 包装単位              |
|------------------------------|----------------|-------------------|
| Annexin-V-FLUOS              | 11 828 681 001 | 250 tests         |
| Annexin-V-FLUOS Staining Kit | 11 858 777 001 | 1 kit (50 tests)  |
|                              | 11 988 549 001 | 1 kit (250 tests) |

## カスパーゼを測定するための製品

| 製品名                                      | カタログ番号         | 包装単位      |
|------------------------------------------|----------------|-----------|
| Anti-Poly (ADP-Ribose) Polymerase (PARP) | 11 835 238 001 | 100 µL    |
| M30 CytoDEATH*                           | 12 140 322 001 | 50 tests  |
|                                          | 12 140 349 001 | 250 tests |

## 細胞傷害性を測定するための製品

| 製品名                                              | カタログ番号         | 包装単位                |
|--------------------------------------------------|----------------|---------------------|
| Cytotoxicity Detection Kit <sup>PLUS</sup> (LDH) | 04 744 926 001 | 1 kit (400 tests)   |
|                                                  | 04 744 934 001 | 1 kit (2,000 tests) |
| Cytotoxicity Detection Kit (LDH)                 | 11 644 793 001 | 1 kit (2,000 tests) |
| Cellular DNA Fragmentation ELISA                 | 11 585 045 001 | 1 kit (500 tests)   |

## 細胞増殖を測定するための製品

| 製品名                                                     | カタログ番号         | 包装単位                |
|---------------------------------------------------------|----------------|---------------------|
| 5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit I   | 11 296 736 001 | 1 kit (100 tests)   |
| 5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit II  | 11 299 964 001 | 1 kit (100 tests)   |
| 5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit III | 11 444 611 001 | 1 kit (1,000 tests) |
| Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)           | 11 647 229 001 | 1 kit (1,000 tests) |
| Cell Proliferation ELISA, BrdU (chemiluminescent)       | 11 669 915 001 | 1 kit (1,000 tests) |
| Cell Proliferation Kit I (MTT)                          | 11 465 007 001 | 1 kit (2,500 tests) |
| Cell Proliferation Kit II (XTT)                         | 11 465 015 001 | 1 kit (2,500 tests) |
| Cell Proliferation Reagent WST-1                        | 05 015 944 001 | 8 mL (800 tests)    |
|                                                         | 11 644 807 001 | 25 mL (2,500 tests) |

\* The M30 antibody is made under a license agreement from Peviva AB, Sweden. Patent No. 6,296,850;6,706,488;6,716,968

# ご注文情報

## その他

| 製品名                                                              | カタログ番号         | 包装単位              |
|------------------------------------------------------------------|----------------|-------------------|
| ATP Bioluminescence Assay Kit HS II                              | 11 699 709 001 | 1 kit             |
| ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II                             | 11 699 695 001 | 1 kit             |
| Aniti-Bromodeoxyuridine formalin grade                           | 11 170 376 001 | 50 µg (250 tests) |
| Aniti-Bromodeoxyuridine-Fluorescein formalin grade               | 11 202 693 001 | 50 µg (250 tests) |
| Aniti-Bromodeoxyuridine-Peroxidase, Fab fragments formalin grade | 11 585 860 001 | 15 U              |

## 抗生物質

| 製品名                            | カタログ番号         | 包装単位                         |
|--------------------------------|----------------|------------------------------|
| Ampicillin                     | 10 835 242 001 | 5 g                          |
|                                | 10 835 269 001 | 50 g                         |
| BM-Cyclin                      | 10 799 050 001 | 37.5 mg (for 2×2.5 L medium) |
| G-418 Solution                 | 04 727 878 001 | 20 mL                        |
|                                | 04 727 894 001 | 100 mL                       |
| Hygromycin B                   | 10 843 555 001 | 1 g (20 mL)                  |
| Kanamycin sulfate              | 10 106 801 001 | 5 g                          |
| Mitomycin C                    | 10 107 409 001 | 2 mg                         |
| Penicillin-Streptomycin (500x) | 11 074 440 001 | 20 mL (500x)                 |

## マイコプラズマの検出と除去

| 製品名                  | カタログ番号         | 包装単位                         |
|----------------------|----------------|------------------------------|
| Mycoplasma PCR ELISA | 11 663 925 910 | 1 kit (96 reactions)         |
| DAPI                 | 10 236 276 001 | 10 mg                        |
| BM-Cyclin            | 10 799 050 001 | 37.5 mg (for 2×2.5 L medium) |

## その他関連商品

| 製品名                                          | カタログ番号         | 包装単位       |
|----------------------------------------------|----------------|------------|
| DNase I                                      | 10 104 159 001 | 100 mg     |
| DAB Substrate, metal enhanced, precipitating | 11 718 096 001 | 1 pack     |
| NBT/BCIP Stock Solution                      | 11 681 451 001 | 8 mL       |
| NBT/BCIP Ready-to-Use Tablets                | 11 697 471 001 | 20 tablets |

## トランスフェクション試薬

| 製品名                                     | カタログ番号         | 包装単位   |
|-----------------------------------------|----------------|--------|
| X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent | 06 366 244 001 | 0.4 mL |
|                                         | 06 366 236 001 | 1 mL   |
|                                         | 06 366 546 001 | 5×1 mL |
| X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagent  | 06 365 779 001 | 0.4 mL |
|                                         | 06 365 787 001 | 1 mL   |
|                                         | 06 365 809 001 | 5×1 mL |
| X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent  | 04 476 093 001 | 1 mL   |
|                                         | 04 476 115 001 | 5×1 mL |

# Sigma-Aldrich®

Lab & Production Materials



メルク公式アカウント  
友だち追加は  
コチラ



サイエンス系  
お役立ちメディア  
**M-hub**



かんたんカタログ検索  
**カタログ  
ファインダー**



メルクライフサイエンス公式 Facebook ページ  
メルクライフサイエンス - Merck で検索



メルクライフサイエンス公式 Twitter アカウント  
メルクライフサイエンス - Merck で検索



メルクライフサイエンス - メールニュース  
[www.merckmillipore.jp/wm](http://www.merckmillipore.jp/wm)

本紙記載の製品は試験・研究用です。ヒト、動物への治療、もしくは診断目的として使用しないようご注意ください。掲載価格は希望販売価格（税別）です。実際の価格は弊社製品取扱販売店へご確認ください。なお、品目、製品情報、価格等は予告なく変更される場合がございます。予めご了承ください。記載内容は2020年6月時点の情報です。Merck, the vibrant M, and Sigma-Aldrich are trademarks of Merck KGaA, Darmstadt, Germany or its affiliates. All other trademarks are the property of their respective owners. Detailed information on trademarks is available via publicly accessible resources. ©2020 Merck KGaA, Darmstadt, Germany. All rights reserved.

## シグマ アルドリッチ ジャパン リサーチ事業部

〒153-8927 東京都目黒区下目黒 1-8-1 アルコタワー 5F

製品の最新情報はこちら [www.sigma-aldrich.com/japan](http://www.sigma-aldrich.com/japan)

製品に関するお問い合わせは、テクニカルサービスへ

E-mail: [jpts@merckgroup.com](mailto:jpts@merckgroup.com) Tel: 03-6756-8245

在庫照会・ご注文に関するお問い合わせは、カスタマーサービスへ

E-mail: [sialjpcs@merckgroup.com](mailto:sialjpcs@merckgroup.com) Tel: 03-6756-8275 Fax: 03-6756-8301

シグマ アルドリッチ ジャパン合同会社はメルクのグループ会社です。

RBM179-2006-0.5K-H