

製品コード MK600

研究用

TaKaRa

ApopLadder Ex™

説明書

v201608Da

アポトーシスは、クロマチン DNA のヌクレオソーム単位 (185 bp) での断片化が起こることが必須条件とされています。断片化 DNA の検出法としては、電気泳動法により Laddering を検出する方法が広く用いられています。ApopLadder Ex は特殊界面活性剤を含む Lysis buffer、酵素試薬、DNA 沈殿剤、Loading buffer からなるキットで、断片化 DNA を選択的に抽出し、妨害となるインタクトクロマチンの混入を最小限に抑え、より高感度な Laddering の検出が可能です。また蛍光色素による定量にも有用です。

I. 測定原理

アポトーシスを起こした細胞を、Lysis buffer で処理した後、遠心分離し、上清を得ることにより断片化 DNA をインタクトクロマチンから分離します。上清を酵素試薬で処理することにより不純物である蛋白質と RNA を分解した後、DNA 沈殿剤を用いて断片化 DNA を回収します。

II. 特徴

1. 簡便 Ready-to-Use な試薬です。
2. 高感度 アポトーシス DNA を高感度に検出できます。
3. 特異性 インタクトクロマチンの混入が少なく、断片化 DNA を選択的に抽出できます。
4. 迅速 エタノール沈殿処理まで、約 2.5 時間です。
5. 定量性 蛍光色素 (SYBR® Green I) との組み合わせにより、蛍光イメージアナライザーや蛍光プレートリーダーにより断片化 DNA の定量測定が可能です。
6. 安全性 フェノール、クロロホルムは使用しておりません。

III. キットの内容 (24 回分)

| | |
|------------------------|-------------|
| (1) Lysis buffer | 1.2 ml × 4 |
| (2) 10% SDS solution | 0.48 ml |
| (3) Enzyme A | 0.48 ml |
| (4) Enzyme B | 0.48 ml |
| (5) Precipitant | 1.04 ml × 3 |
| (6) 6 × Loading buffer | 0.48 ml |

IV. 保存

− 20℃

V. 使用方法

1. 本製品以外に必要な器具および試薬

- ・マイクロピペット
- ・37℃インキュベーター
- ・56℃インキュベーター
- ・ボルテックスミキサー
- ・高速遠心機
- ・低速遠心機
- ・1.5 ml マイクロチューブ
- ・TE buffer
- ・PBS (-) バッファー
- ・エタノール
- ・80%エタノール

(断片化 DNA を検出するためには、その他に、電気泳動装置、蛍光イメージアナライザー、蛍光色素 SYBR Green I 等の、目的に合った装置および試薬が必要となります。)

電気泳動用ゲルローディングバッファーについては、6×Loading buffer をキットの中に準備いたしておりますので、ご利用ください。

2. 操作手順

- (1) $10^6 \sim 10^7$ 個*1 程度の細胞を、PBS (-) バッファーで一回洗浄、少量の PBS (-) バッファーに浮遊させ、1.5 ml マイクロチューブに移し遠心機で $1,600 \times g$ 、5 分間遠心する。
- (2) 上清を除去、細胞ペレットを 1.5 ml マイクロチューブの底をかるく叩いて浮遊させてから、Lysis buffer 100 μ l を加え、ボルテックスミキサーで 10 秒間攪拌する。
- (3) $1,100 \times g$ で 5 分間遠心分離し、上清を別の 1.5 ml マイクロチューブに移す。
- (4) (3) で残ったペレットを (2) と同様に 1.5 ml マイクロチューブの底をかるく叩いて浮遊させてから、Lysis buffer 100 μ l を加え、ボルテックスミキサーで 10 秒間攪拌する。
- (5) $1,100 \times g$ で 5 分間遠心分離し、上清を (3) の 1.5 ml マイクロチューブに合わせて、粗抽出液を得る。
- (6) (5) の粗抽出液に 10% SDS solution を 20 μ l 添加した後、Enzyme A を 20 μ l 加え、56℃、1 時間、反応させる。
- (7) (6) に Enzyme B を 20 μ l 加え、37℃、1 時間、反応させる。
- (8) Precipitant 130 μ l を加えた後、0.95 ml のエタノールを加え -20℃に 1 時間以上放置する。
- (9) $12,000 \times g$ で約 15 分遠心し、上清を捨て、80%エタノールで洗浄する。
- (10) 再度、同様に遠心分離した後、エタノールを除き乾燥させる。
- (11) (10) に適当量の TE buffer (10 ~ 50 μ l 程度)*2 を加え良く攪拌し完全に溶解したものを、DNA 電気泳動の各種分析の試料とする。

* 1：最終的に得られる断片化 DNA 量は、全細胞に対してアポトーシスを起こした細胞がどの程度含まれるかによって異なります。

* 2：アポトーシスがあまり起こっていない場合は、TE buffer 量が多すぎると断片化 DNA を検出できない可能性があります。TE buffer は必要最小量を使用することをお勧めします。

【電気泳動により DNA Ladder を確認する場合】

(11) で得られた試料の一部を取り、試料：6×Loading buffer = 5：1になるよう混合（全量で6 μ l～15 μ l程度になるようにする）し、アガロースゲルのウェルに入れる。

【SYBR Green I を用いて蛍光検出する場合】

蛍光色素 SYBR Green I を TE buffer を用いて 1,000 倍希釈した液を調製する。一方、(11) で得られた試料を TE buffer で適当な濃度に希釈する。この希釈試料 50 μ l に対し、先に調製しておいた 1,000 倍希釈蛍光色素を 5 μ l 添加し、全量を蛍光プレートリーダー、蛍光分光光度計等の、目的に合った装置で測定する。

※詳細な応用データにつきましては弊社ウェブサイトをご参照ください。

VI. Q & A

Q1：ApopLadder Ex はどんな試料に応用できるか？

A1：基本的には培養細胞用として開発されています。しかし、例えば全血からバクティイナ採血管 (Becton Dickinson 社) などのリンパ球分離用チューブで分離されたリンパ球や、脾臓から分離されたリンパ球のように、培養細胞と同等の均一性をもった細胞集団には応用が可能と考えられます。なお、臓器片からの直接抽出には利用できません。

Q2：凍結した細胞からでもうまく抽出できるか？

A2：サンプリングした細胞は、凍結しないで速やかに抽出操作に用いることをお勧めします。弊社のデータでは、3回の凍結融解処理を施した培養細胞からでも断片化 DNA の抽出、検出は可能でしたが、収量は著しく減少しました。

Q3：抽出した断片化 DNA の保存方法は？安定性は？

A3：小分けして -20°C 以下で保存し、凍結融解を繰り返すことは避けてください。弊社データでは -20°C で少なくとも 1 ヶ月、また 4°C 保存で少なくとも 7 日間は安定でした。

Q4：抽出操作がうまくいったかどうかの目安となるコントロール系はないのか？

A4：アポトーシスによる DNA の断片化は、ターゲットの細胞、誘導剤、濃度、誘導のタイミングによって大きく影響を受けます。さらに最近では、DNA の断片化を伴わないアポトーシスも報告されています。従って「これぞ」というコントロールの系はないともいえます。ただ、弊社のこれまでの経験からは、HL60 細胞をスタウロスポリン (Sigma-Aldrich, Code. S4400) で処理する系がコントロールとしてお勧めできます。

< HL60 細胞を用いた実施例 >

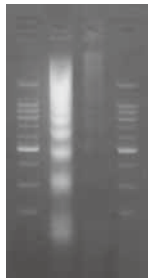
90 mm ディッシュに、HL60 細胞を 10^7 個 / 10 ml 培地となるように播き、同時にスタウロスポリンを $3\ \mu\text{M}$ となるように添加した。 37°C 、5% CO_2 条件下で 5 時間* 培養した後、全量を遠心分離により回収した。

PBS (-) バッファーで 1 回洗浄後、得られたペレットを少量の PBS (-) バッファーに浮遊させ、 5×10^6 個分の細胞を 1.5 ml マイクロチューブに移した。

以下、操作手順に従い断片化 DNA を得た。得られた断片化 DNA は最終的に $20\ \mu\text{l}$ の TE バッファーに溶解し、このうち $5\ \mu\text{l}$ を 3% アガロースゲルを用いて電気泳動した。

*：細胞の培養状態によってもスタウロスポリンの効果は異なります。弊社では 3 ~ 5 時間の処理で、同等のラダーが得られています。

M 1 2 M



M：100bp DNA Ladder 200 ng 分

1：スタウロスポリン処理

2：スタウロスポリン未処理

Q5：電気泳動の結果、DNA がスメアしてきれいなラダーが得られないが？

A5：次の原因が考えられます。

1) アポトーシスが進行しすぎて非特異的に DNA が切断されている。

2) 操作の途中で DNase の混入があった。

それぞれの解決策として、次のことを試してみてください。

1) 検体サンプリングの時間をもっと早期にする。

2) 手袋を着用するなどにより、DNase の混入を防ぐ。

Q6：電気泳動の結果、全くバンドが検出できないが？

A6：次の原因が考えられます。

1) アポトーシスが起こっていない。

2) 回収された断片化 DNA 量が検出限界以下である。

それぞれの解決策として、次のことを試してみてください。

1) ・アポトーシス透導剤の使用濃度を上げるか、誘導時間を延長する。

・別の方法（例えば *In situ* Apoptosis Detection Kit（製品コード MK500）や形態学的判定法）でアポトーシスが起きているかを確認する。

2) ・処理する検体の細胞数を増やす。

・エタノール沈殿後の DNA をできるだけ少量の TE buffer に溶解する（step 11）。

Q7：10% SDS solution を室温で解凍したが、沈殿が生じてしまった。どうすればよいか？

A7：問題ありません。約 40℃で少し温めると SDS はすぐに溶解します。

Q8：アポトーシス断片化の定量の際に、SYBR Green I 以外の蛍光色素は使えないのか？

A8：PicoGreen（Thermo Fisher Scientific 社）も使用できます。

Q9：適しているアガロースゲルの種類、濃度は？

A9：3% PrimeGel™ Agarose PCR-Sieve（製品コード 5810A）を使用されることをお勧めします。

Q10：キットの 6 × Loading buffer が黄褐色をしているが、大丈夫か？

A10：DNA バンドの写真撮影を妨害しない黄色系色素を用いています。

Q11：接着細胞での DNA の断片化を確認したい。細胞を剥がすにはどのような方法を用いればよいか？

A11：セルスクレーパーで細胞を剥がす方法をお勧めします。セルスクレーパーを用いた場合の方が、トリプシン処理して細胞を剥がした場合と比べ、検出された DNA ラダーがきれいであることを確認しています。

VII. 関連製品

PrimeGel™ Agarose PCR-Sieve (製品コード 5810A)
SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain (製品コード 5760A/ 5761A)
500 bp DNA Ladder (製品コード 3411A/B)
100 bp DNA Ladder (製品コード 3407A/B)
in situ Apoptosis Detection Kit (製品コード MK500)

VIII. 参考文献

Takeda, Y. *et al. J Gastroenterol.* (2001) **36**, 79-90.

IX. 注意

- ・本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- ・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ・ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- ・SYBR は Life Technologies Corporation の登録商標です。ApopLadder Ex、PrimeGel はタカラバイオ株式会社の商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先

テクニカルサポートライン

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ウェブサイト <http://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社