



SPiDER- β Gal

Cat. No. SPI01

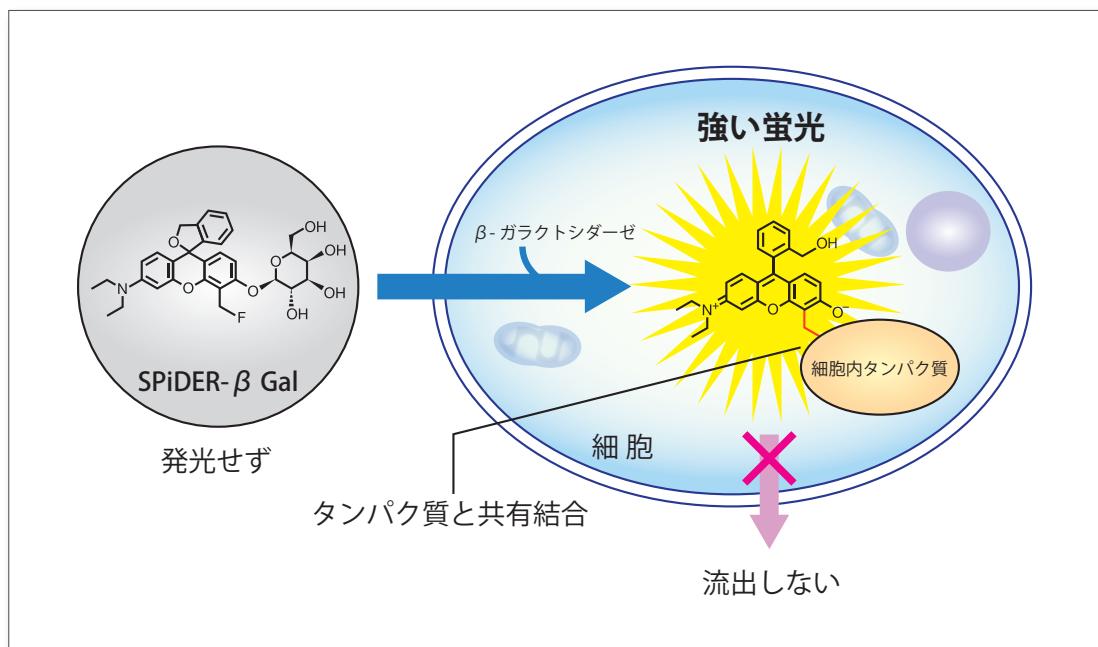
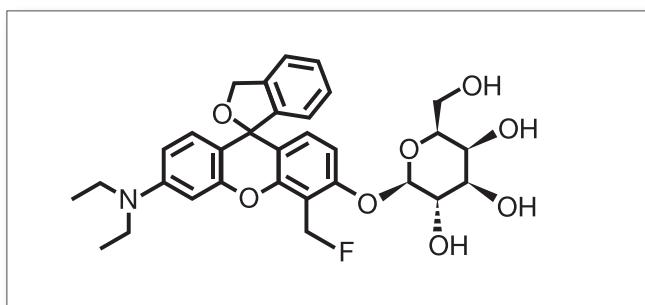
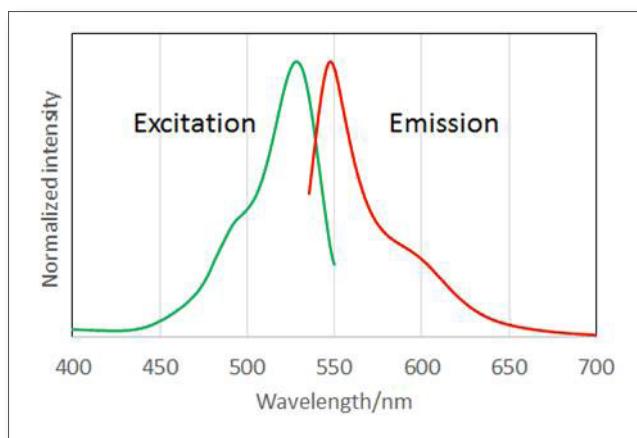
2017年10月1日作成

www.cosmobio.co.jp

【I】背景

大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子(*lacZ*)は、レポータージーンアッセイマークとして幅広く用いられています。代表的な β -ガラクトシダーゼの検出方法として、X-gal染色が広く利用されていますが、細胞膜透過性が乏しいため、細胞や組織を固定化する必要があります。また、従来の β -ガラクトシダーゼ検出蛍光試薬は、細胞内滞留性が低いため、 β -ガラクトシダーゼ未発現細胞と発現細胞を明確に区別できないことが課題でした。

SPiDER- β Galは、細胞膜透過性と細胞内滞留性を有する新しい蛍光試薬です¹⁾。 β -ガラクトシダーゼとの酵素反応により、キノンメチドと呼ばれる中間体を形成して、近傍のタンパク質中のSH基等の求核性基と安定な共有結合を形成し、蛍光性になります。このように、反応した試薬が細胞内タンパク質に固定化されることで優れた細胞内滞留性を有し、その結果、 β -ガラクトシダーゼ発現細胞を一細胞レベルで明確に検出することが可能となります。

図1 SPiDER- β Gal の細胞染色原理図2 SPiDER- β Gal の構造式
 $C_{31}H_{34}FNO_8=567.60$ 図3 β -ガラクトシダーゼと反応後の SPiDER- β Gal の励起・蛍光スペクトル



【II】商品内容

保存温度：4°C

内 容	容量
SPiDER- β Gal	20 μ g
	20 μ g × 3

SPiDER- β Gal はアルミラミジップに入っています。未使用的 SPiDER- β Gal は、アルミラミジップに入れたまま、チャックをしっかりと閉め、4°Cで保存してください。

ご準備いただくもの（その他必要なもの）

- Dimethyl sulfoxide (DMSO)
- Hank's balanced salt solution (HBSS)
- マイクロピペット
- マイクロチューブ

【III】溶液調製

<1 mmol/L SPiDER- β Gal DMSO 溶液の調製>

SPiDER- β Gal 20 μ g を含むチューブに 35 μ L の DMSO を加え、ピペッティングにより溶解する。

溶解後の SPiDER- β Gal DMSO 溶液は、-20°C以下で保存する。

<1 μ mol/L SPiDER- β Gal working solution の調製>

最終濃度が 1 μ mol/L になるように 1 mmol/L SPiDER- β Gal DMSO 溶液を HBSS 等で希釀する。

※細胞の状態を維持するため HBSS の使用をお勧めします。

【IV】操作方法

<SPiDER- β Gal による細胞染色>

1 細胞をディッシュまたはチャンバーに播種し、培養する。

2 培地を吸引除去後、HBSS で 2 回洗浄する。

3 調製した SPiDER- β Gal working solution を添加し、室温で 15 分間インキュベートする。

4 インキュベート後、蛍光顕微鏡やフローサイトメーターで観察する。

※染色後、洗浄操作無しでも観察できますが、必要に応じて洗浄操作を行ってください。



【V】実験例

<蛍光イメージングでの β -ガラクトシダーゼ発現細胞の検出・生細胞の場合>

- 1) 100 μ L の HEK 細胞懸濁液 (5×10^4 cells/mL) と 100 μ L の HEK/LacZ 細胞 (β -ガラクトシダーゼ安定発現株) 懸濁液 (5×10^4 cells/mL) を 8 well チャンバー (ibidi 社製) に DMEM 培地 (10% Fetal Bovine Serum、1% Penicillin-Streptomycin) で播種し、5% CO₂ インキュベーターで 37°C、一晩培養した。
- 2) 培地を吸引除去後、200 μ L の HBSS で 2 回洗浄した。
- 3) 調製した SPiDER- β Gal working solution 2 mL に Hoechst 33342 (1 mg/mL) 2 μ L を添加し、転倒混和した。
- 4) 3) の溶液を各 well に 200 μ L ずつ添加し、室温で 15 分間インキュベートした。
- 5) 上澄みを吸引除去し、200 μ L の HBSS で 2 回洗浄した。
- 6) 200 μ L の HBSS を加え、蛍光顕微鏡で観察した (図 4 A)。
- 7) 上澄みを吸引除去し、4% パラホルムアルデヒド (PFA)/PBS 溶液 200 μ L 加え、室温で 15 分間固定化した。
- 8) 4% PFA/PBS 溶液を吸引除去し、200 μ L の HBSS で 2 回洗浄した。
- 9) 200 μ L の HBSS を加え、蛍光顕微鏡で観察した (図 4 B)。

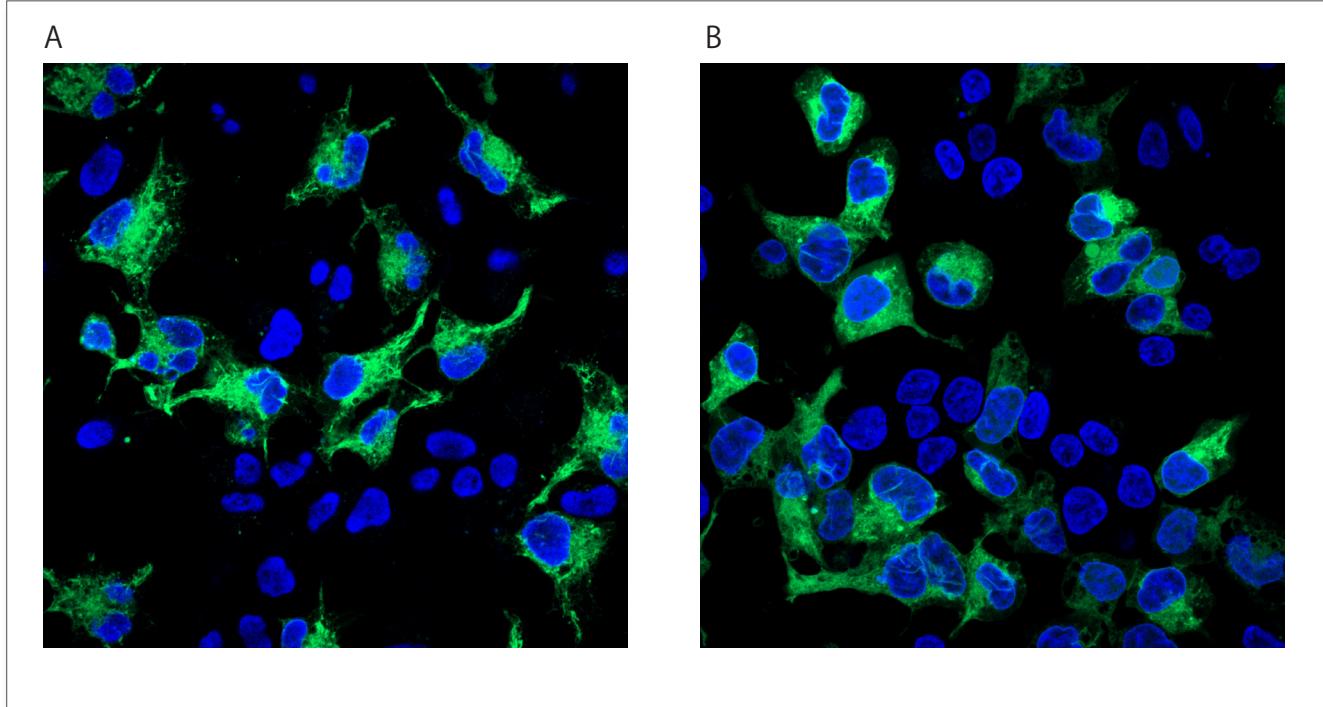


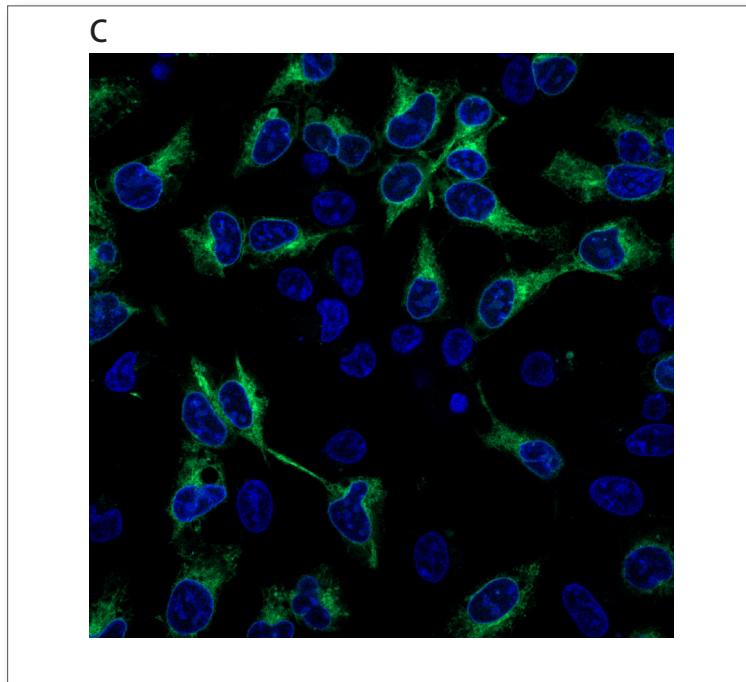
図 4 HEK/LacZ 細胞と HEK 細胞の細胞数比 1:1 試料の SPiDER- β Gal による染色画像

A. 生細胞、B. 固定化細胞 (4% PFA/PBS)
(緑 : SPiDER- β Gal 由来、青 : Hoechst 33342)

< 蛍光イメージングでの β -ガラクトシダーゼ発現細胞の検出・メタノール固定細胞の場合 >

※操作 5) までは生細胞のプロトコルと同じ操作となります。

- 6) 上澄みを吸引除去し、冷メタノール 200 μ L 加え、-20°Cで 20 分間固定化した。
- 7) メタノールを吸引除去し、200 μ L の HBSS で 2 回洗浄した。
- 8) 200 μ L の HBSS を加え、蛍光顕微鏡で観察した(図 5 C)。

図 5 HEK/LacZ 細胞と HEK 細胞の細胞数比 1:1 試料の SPiDER- β Gal による染色画像

C. 固定化細胞(メタノール)

(緑: SPiDER- β Gal 由来、青: Hoechst 33342)

<フローサイトメトリーでの β -ガラクトシダーゼ発現細胞の検出>

- 1) 500 μ L の HEK 細胞懸濁液 (5×10^5 cells/mL) と 500 μ L の HEK/LacZ 細胞懸濁液 (5×10^5 cells/mL) を 1.5 mL チューブに混合した。
- 2) 調製した SPiDER- β Gal stock solution 1 μ L を添加し、室温で 15 分間インキュベートした。
- 3) その細胞懸濁液をフローサイトメーターで測定した (488 nm excitation, 530/30 nm bandpass filter)。

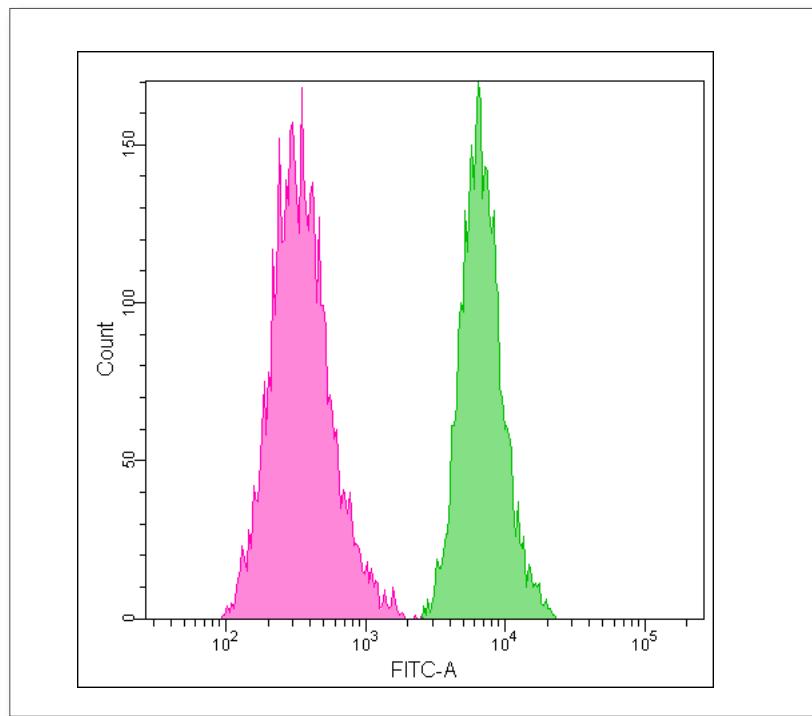


図 6 HEK/LacZ 細胞と HEK 細胞の細胞数比 1:1 試料の SPiDER- β Gal によるフローサイトメトリーでの分別測定



【VI】参考文献

- [1] T. Doura, M. Kamiya, F. Obata, Y. Yamaguchi, T. Y. Hiyama, T. Matsuda, A. Fukamizu, M. Noda, M. Miura, Y. Urano, "Detection of LacZ-Positive Cells in Living Tissue with Single-Cell Resolution.", *Angew Chem Int Ed Engl.*, 2016, 55(33), 9620-9624.
- [2] H. Omori, S. Ogaki, D. Sakano, M. Sato, K. Umeda, N. Takeda, N. Nakagata, S. Kume, "Changes in expression of C2cd4c in pancreatic endocrine cells during pancreatic development.", *FEBS Lett.*, 2016, doi: 10.1002/1873-3468.12271

本商品をご利用になられた文献、発表データを募っておりまます。

本商品をご利用いただきて投稿された論文、学会発表パネルなどを送付いただきましたお客様に粗品を進呈させていただきます。ご提供いただきました論文などは、WEB やカタログ、技術資料を通じて多くの研究者の方への技術情報として利用させていただく場合がございます。是非皆様のご協力をお願いいたします。

送付方法

郵 送 〒135-0016 東京都江東区東陽 2-2-20 東陽駅前ビル
コスモ・バイオ株式会社 製品情報部 宛

E-mail tech@cosmobio.co.jp ※ PDF ファイルにてお送りください。



コスモ・バイオ株式会社
COSMO BIO CO., LTD.

- 12596
— 商品の価格・在庫・納期に関するお問い合わせ —
TEL: 03-5632-9630 (受付時間 9:00 ~ 17:30)
FAX: 03-5632-9623 E-mail: nouki@cosmobio.co.jp
- 商品に関するお問い合わせ —
TEL: 03-5632-9610 (受付時間 9:00 ~ 17:30)
FAX: 03-5632-9619 E-mail: service@cosmobio.co.jp
- 本社所在地 〒135-0016 東京都江東区東陽 2-2-20 東陽駅前ビル