

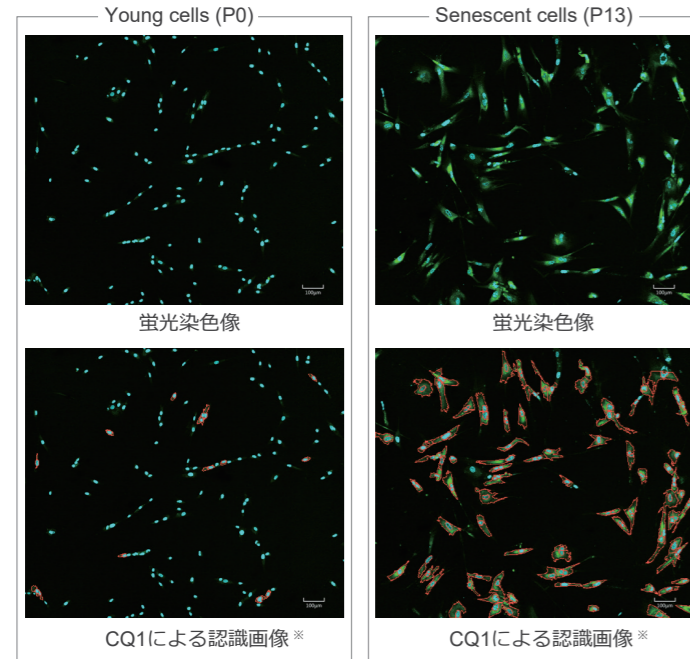
## 共焦点定量イメージサイトメーターによる定量解析

共焦点定量イメージサイトメーター（横河電機株式会社 CQ1）を用いた老化細胞の定量解析を行いました。

### 生細胞蛍光染色による解析

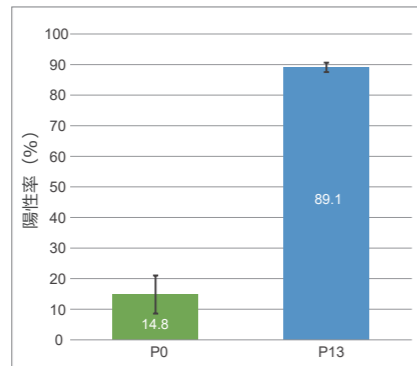
X-gal 法では顕微鏡で目視による全細胞数と老化細胞を計測し、全細胞数に対する老化細胞数の割合を陽性率として評価します。

共焦点定量イメージングサイトメーターを用いて、X-gal 法と同様に老化細胞を陽性率として定量解析を行いました。



### 横河電機 CQ1 撮影条件

- 使用プレート: 96 well plate
- 対物レンズ: 10 倍
- 撮影波長: 405 nm (Hoechst33342): シアン  
488 nm (SPiDER-βGal): 緑
- 視野: 8 視野
- ※ SA-β-gal ポジティブな WI-38 細胞 (赤色の輪郭)



### 定量解析 - 陽性率

核染色試薬 (Hoechst33342) で全細胞数を計測し、SPiDER-βGal で SA-β-gal を指標とした老化細胞数を計測した後、全細胞数に対する老化細胞数の割合を陽性率として定量解析を行いました。

WI-38 細胞の細胞分裂の程度に応じて陽性率に差が認められました。共焦点定量イメージングサイトメーターを用いることで、X-gal 法による目視観察と比較して迅速な定量解析が可能となりました。

# 老化細胞検出キット

## Cellular Senescence Detection Kit - SPiDER-βGal

老化細胞のマーカーである SA-β-gal (senescence-associated beta-galactosidase) を、定量的に素早く測定できる 新たな検出方法をご提案。

画像: 本キットとγ-H2AX (DNA 損傷マーカー)、DNA (DAPI) の共染色画像

**FCM  
実績データ  
更新!**

## 老化細胞を定量できる

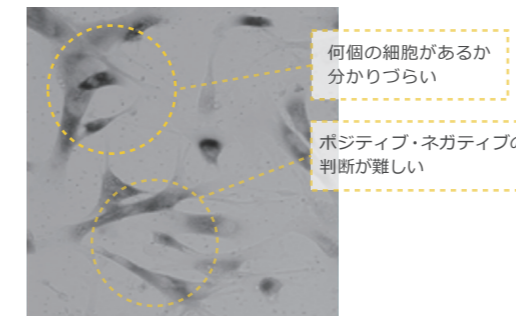
フローサイトメトリーによる蛍光解析

従来の検出法 (X-gal 法) では、比色染色した老化細胞を顕微鏡下で目視によりカウントする必要があり定量的な検出が困難でした。本キットでは、蛍光にて検出可能なβ-galactosidase 基質 (SPiDER-βGal) を採用しており、フローサイトメトリーによる定量解析が可能になりました。

### 従来法 (X-gal 法) では

細胞数を顕微鏡下で目視によるカウント

- ・人によってポジティブ細胞の判断が異なる
- ・実験毎のデータがバラつく

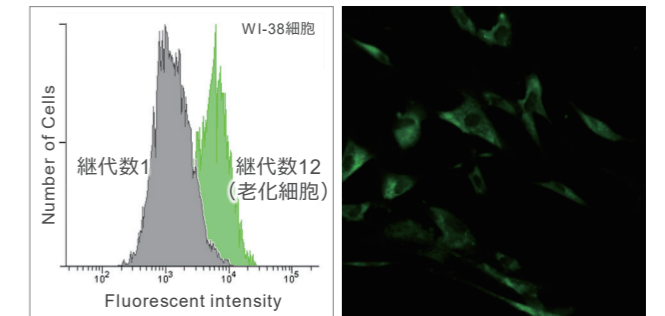


X-gal 法による染色像

### 本キットでは

蛍光法で細胞一つ一つを鮮明に検出

- ・フローサイトメトリーで定量できる

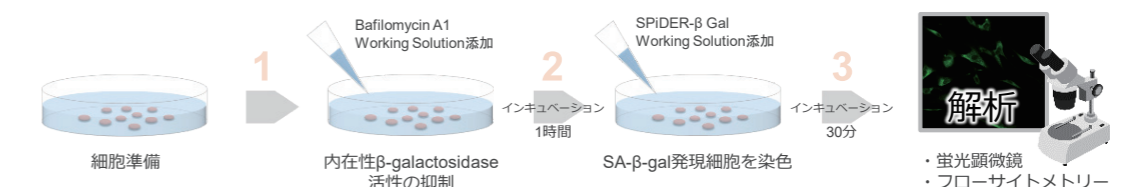


本キットによる検出結果

## 試薬添加だけの簡単操作

染色時間は 30 分

本キットでは生細胞にも固定化細胞にも適応でき、何れも染色操作は 30 分間で完了します。生細胞を用いた評価では、キットに同梱された 2 種の試薬をそれぞれ加え、インキュベーションするだけです。また固定化細胞を用いた場合でも、固定化後に 30 分の染色操作を行うだけで老化細胞を検出できます。



※ 上図は生細胞を利用した操作例。固定化細胞の場合はバッファー交換により内在性β-galactosidase 活性を抑制します。

品名	容量	希望納入価格	コード	メーカーコード
Cellular Senescence Detection Kit - SPiDER-βGal	10 assays* ※35 mm dishを用いた際のassay数	¥ 38,000	347-09181	SG03

- 記載価格は本体価格のみで、消費税等は含まれておりません。
- 記載価格はこのパンフレット編集時(2018年5月)における希望納入価格です。予告なしに変更する場合がございますのでご注意ください。
- 試験・研究用のみに使用するものです。医療用その他の目的には使用できません。

キーワードで検索

細胞老化 同仁 検索

### 発売元

富士フイルム 和光純薬株式会社

FreeDial: 0120-052-099 FreeFax: 0120-052-806  
URL: ffwk.fujifilm.co.jp

### 製造元・国内問合せ先

株式会社同仁化学研究所

Tel: 096-286-1515(代表) FreeDial: 0120-489-548  
URL: www.dojindo.co.jp E-mail: info@dojindo.co.jp

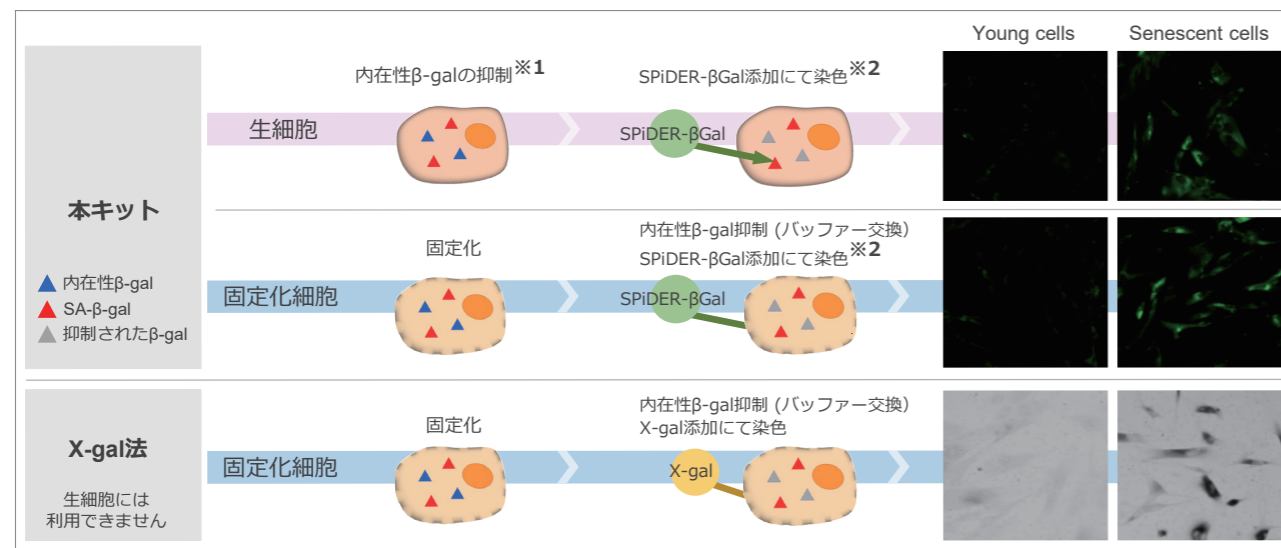
### 取扱店

ドージン・イースト(東京)

Tel: 03-3578-9651(代表)

## 本キットは生細胞・固定化細胞に適応

### 従来法 (X-gal 法) との比較



#### ※1 内在性β-galactosidaseの活性を抑制

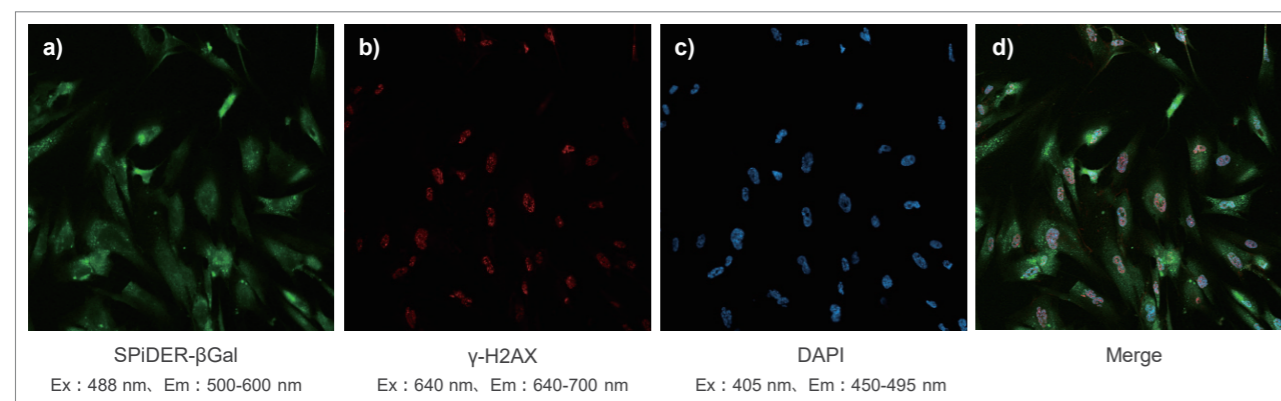
生細胞中には内在性のβ-galactosidaseが存在するため、そのままでは高いバックグラウンドとなり、SA-β-galを選択的に検出できません。本キットではBafilomycin A1を添加することにより、リソソーム中のATPase活性を阻害し、リソソーム中のpHを酸性から中性付近に変化させることで、内在性β-galactosidaseの活性が低下します。これにより老化マーカーであるSA-β-galを選択的に検出することができます。

#### ※2 細胞膜透過性を持つβ-galactosidase基質 (SPiDER-βGal) による染色

本キットで使用する染色基質SPiDER-βGalは、細胞膜透過性を有するため生細胞にも適応し、細胞内に滞留することから鮮明なイメージングが可能です。また従来法 (X-gal法) との相関性もみられます。

## 蛍光法だからできる多重染色

### 異なる老化マーカーとの共染色



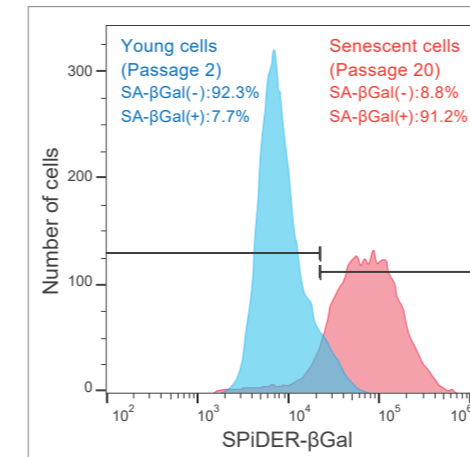
ご要望が多かった本キットを用いた多重染色例をご紹介します。上記実験では、老化細胞のモデルとして継代培養を繰り返したWI-38細胞 (Passage 10) を用い、本キットによるSA-β-galの検出<sup>a)</sup>、異なる老化マーカーとしてγ-H2AX (DNA損傷マーカー) の免疫染色<sup>b)</sup>、更には全細胞の核染色 (DAPI) <sup>c)</sup>を行いました。結果、SA-β-galとγ-H2AXの両老化マーカーで相関する結果が得られました<sup>d)</sup>。実験の詳細は、小社製品HPにてご案内しています。

## フローサイトメーターによる定量解析

スペクトル型セルアナライザー SA3800(ソニーイメージングプロダクツ & ソリューションズ株式会社)を用いた老化細胞の定量解析を行いました。

### ヒストグラムによる解析

横軸に SPiDER 染色による蛍光強度、縦軸に細胞数をとり任意のしきい値を設定し、SA-β-gal 発現細胞の陽性率を算出しました。



#### 実験条件

老化細胞のモデルとして継代培養を 20 回繰り返した WI-38 細胞と継代回数 2 回の WI-38 細胞を用いて、本キットによる SA-β-gal の検出を行いました。

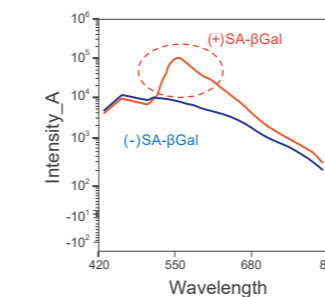
#### 検出条件

Excitation (Laser) : 488 nm  
Emission (スペクトル検出) : 420-800 nm

#### 結果

継代培養を繰り返した WI-38 細胞において、約 90% の細胞が SA-β-gal の発現が亢進していることを確認しました。

### スペクトル検出



老化細胞ではリポスチン等の生成によりバックグラウンドとしてみられることがあります。しかし本装置では、蛍光スペクトル検出が可能のため、老化細胞のバックグラウンドを予めスペクトルで確認し、550 nm 近傍にピークを持つ SPiDER-βGal の蛍光パターンを選択的に読み込むことで、より鮮明に SA-β-gal 発現細胞の検出ができています。



スペクトル型セルアナライザー SA3800  
ソニーイメージングプロダクツ & ソリューションズ株式会社

## 2次元プロットによる解析

横軸に FSC、縦軸に SPiDER 染色による蛍光強度をとり任意のしきい値より SA-β-gal 発現細胞の陽性率を算出しました。実験条件および検出条件は上記と同じ方法で行いました。

