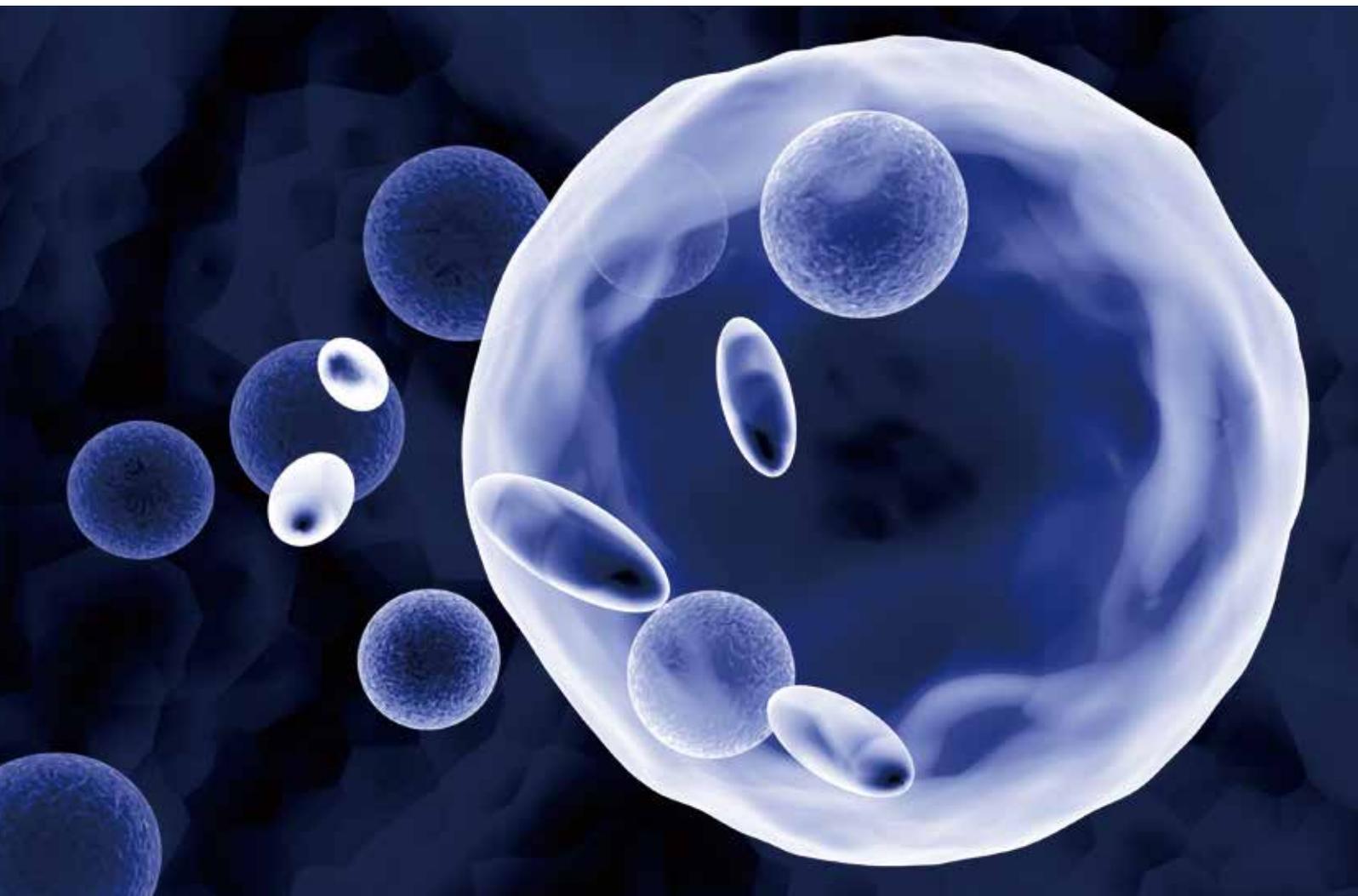


細胞アポトーシスと増殖



Our Mission

AAT Bioquest® 社では、一貫して高品質の製品とサービスを提供し、長期的、日常的な業務の継続改善に努めることによって、お客様の要求を常に満たすこと、上回ることを約束します。私たちの本質的価値はイノベーションとお客様満足です。

Our Story

AAT Bioquest®, Inc. (formerly ABD Bioquest, Inc.) develops, manufactures and markets bioanalytical research reagents and kits to life sciences research, diagnostic R&D and drug discovery. We specialize in photometric detections including absorption (color), fluorescence and luminescence technologies. The Company's superior products enable life science researchers to better understand biochemistry, immunology, cell biology and molecular biology. AAT Bioquest offers a rapidly expanding list of enabling products. Besides the standard catalog products, we also offer custom services to meet the distinct needs of each customer. Our current services include custom synthesis of biological detection probes, custom development of biochemical, cell-based and diagnostic assays and custom high throughput screening of drug discovery targets.

It is my greatest pleasure to welcome you to AAT Bioquest. We greatly appreciate the constant support of our valuable customers. While we continue to rapidly expand, our core value remains the same: Innovation and Customer Satisfaction. We are committed to being the leading provider of novel biological detection solutions. We promise to extend these values to you during the course of our service and to continue to support you with our new products and services. It is our greatest honor to receive valuable feedbacks and suggestions from you so that we can better serve your projects.

Very truly yours,



Zhenjun Diwu, Ph.D.
President

1 インフォメーション

2

2 アポトーシスアッセイとプローブ

3

2.1 アポトーシスによる細胞質内の変化.....	3
カスパーゼ活性アッセイ.....	3
カスパーゼ 3/7 検出.....	4
カスパーゼ 8 検出.....	5
カスパーゼ 9 検出.....	6
カスパーゼ 3、7、8、9 のマルチプレックス検出.....	6
カスパーゼ結合アッセイ.....	7
GSH- モニタリングアポトーシスアッセイ.....	8
2.2 アポトーシスによる細胞膜の変化.....	8
アネキシン V コンジュゲートを用いたホスファチジルセリン結合アッセイ.....	8
2.3 アポトーシスによるミトコンドリアの変化.....	11
JC-1 および JC-10™.....	11
ミトコンドリア膜電位アッセイキット.....	12
2.4 ミトコンドリア染色プローブ.....	12
2.5 TUNEL アポトーシスアッセイ.....	14
2.6 ネクローシスアッセイ.....	15
2.7 オートファジーアッセイ.....	16

3 細胞増殖

17

3.1 細胞周期アッセイ.....	17
3.2 CytoTell™ 色素.....	18
CytoTell™ Green & CytoTell™ UltraGreen.....	18
CytoTell™ Blue.....	19
CytoTell™ Red 590 & CytoTell™ Red 650.....	19
3.3 BrdU DNA 合成アッセイ.....	21

4 細胞生存と細胞毒性

23

4.1 細胞膜の完全性アッセイ.....	23
4.2 細胞核酸の検出.....	24
生細胞の核標識.....	24
死細胞の核標識.....	25
4.3 細胞毒性アッセイ.....	26

インフォメーション

Trademarks of AAT Bioquest

AAT Bioquest®
Amplite™
Apopxin™
Autophagy Blue™
Cell Meter™
Cell Navigator™
CytoCalcein™
CytoTell™
iFluor™
JC-10™
mFluor™
MitoLite™
Nuclear Blue™
Nuclear Green™
Nuclear Orange™
Nuclear Red™
PhagyGreen™
ProRed™
Thiolite™

Trademarks of Other Companies

Alexa Fluor® (Invitrogen)
Cy5® (GE Healthcare)
BD Horizon™ (Becton Dickinson Biosciences)
FACSCalibur™ (Becton Dickinson Biosciences)
Pacific Blue™ (Invitrogen)
SpectraMax® (Molecular Devices)
Texas Red® (Invitrogen)

1

インフォメーション

アポトーシスアッセイとプローブ

アポトーシスは、多細胞生物で起こりうるプログラムされた細胞死のプロセスです。アポトーシスの生化学的事象は、細胞の特徴的な変化（形態）をもたらし、死に至らしめます。これらの変化には、ブリーピング、細胞の収縮、核の断片化、クロマチンの凝縮、染色体 DNA の断片化などがあります。急性の細胞傷害から生じる外傷性細胞死であるネクローシスとは対照的に、アポトーシスは一般に、生物のライフサイクルの中で有益に働く死です。ネクローシスとは異なり、アポトーシスはアポトーシス小体と呼ばれる細胞片を生成し、細胞の内容物が周囲の細胞に流出して損傷を与える前に貪食細胞がそれらを飲み込んで素早く除去します。細胞増殖とアポトーシスのバランスは、発生と正常組織のホメオスタシスに重要です。細胞増殖とは、成長と分裂の結果、細胞数が増えることで、一連のフェーズに分けられた細胞周期によって制御されています。アポトーシス（プログラムされた細胞死）は、制御された自己破壊をもたらします。

アポトーシスに関する研究は、1990 年代初頭から大きく進展しています。生物学的現象としての重要性に加え、アポトーシスプロセスの欠陥が様々な疾患に関与していることが明らかになりました。アポトーシスが過剰になると萎縮し、不足するとがんなどの無秩序な細胞増殖が起こります。AAT Bioquest 社は、様々なサンプルのアポトーシス、細胞周期、細胞増殖の研究のために、包括的な試薬のポートフォリオを提供しています。

2.1 アポトーシスによる細胞質内の変化

カスパーゼ活性アッセイ

アポトーシスの初期段階における特徴として、カスパーゼ酵素の活性化が挙げられます。システイン - アスパラギン酸特異的プロテアーゼであるカスパーゼ（CED-3/ICE）ファミリーのメンバーは、アポトーシスに関連する複雑な生化学的事象の重要なメディエーターとして同定されています。カスパーゼの認識部位は、3～4 個のアミノ酸とそれに続くアスパラギン酸残基で、アスパラギン酸の後ろを切断します。

カスパーゼプロテアーゼは、通常、不活性な前駆体として合成されます。阻害剤の放出や補酵素の結合により、自己触媒作用または他のプロテアーゼの作用によって、内部のアスパラギン酸部位で切断され、活性化されます。

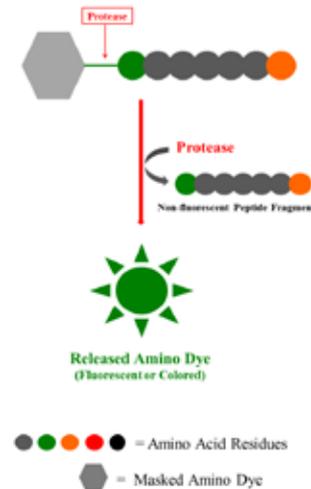


図 2.1. カスパーゼ感受性ペプチド断片をマスクしたアミノ色素は、カスパーゼによって分解されると、高蛍光色素（または高発色色素）を生成する。蛍光（または色）強度の増加は、カスパーゼ活性に比例する。

AAT Bioquest 社は、カスパーゼ阻害剤、発色・発蛍光性カスパーゼ基質、カスパーゼアッセイキットなど、多様な品揃えを提供しています。発色性カスパーゼ基質は、4-ニトロアニリン（4-PNA）をベースにしています。マルチカラー基質は、7-Amino-4-methylcoumarin (AMC)、7-Amino-4-trifluoromethylcoumarin (AFC)、Rhodamine 110 (R110)、ProRed™ の 4 種類の異なる蛍光を持つ基質を提供しています（図 2.2 参照）。特に、ProRed™ ベースのカスパーゼ基質は、励起・発光波長が長いいため、化合物ライブラリーからの自家蛍光の干渉がなく、カスパーゼ阻害剤のスクリーニングに極めて有効です。

表 2.1 各種アポトーシスプローブの特徴

パラメータ	プローブ	特徴
プラズマ膜の変化 (PS 曝露)	Annexin 結合アッセイ	初期アポトーシスマーカーの検出 フローサイトメトリーや免疫蛍光法への応用
カスパーゼ活性化 (細胞質)	カスパーゼ活性アッセイ	迅速・容易・ハイスループット
カスパーゼ結合 (細胞質)	蛍光カスパーゼ阻害剤	ELISA、フローサイトメトリー、またはウェスタンブロット
DNA の断片化 (核)	BrdU アッセイ TUNEL アッセイ	接着細胞への適用、フローサイトメトリーによる細胞周期解析、 コンジュゲートシングルセルの解析
ミトコンドリアの変化	ミトコンドリア染色	フローサイトメトリー、蛍光顕微鏡、蛍光マイクロプレートリーダーを用いた高速、簡便なシングルセル解析

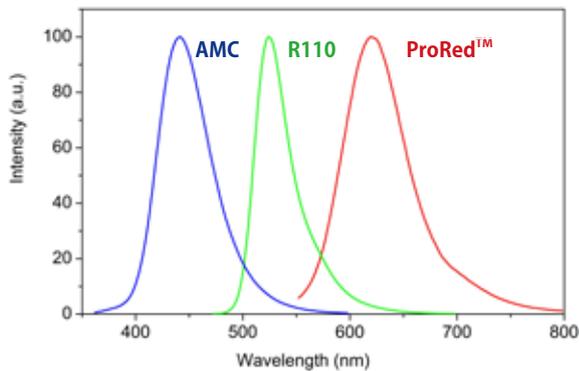


図 2.2. 水性バッファー (pH7.0) 中の AMC、R110、ProRed™ の正規化された蛍光スペクトル
AMC、R110 および ProRed™ カスパーゼ基質は、カスパーゼ活性の多重化に適している。

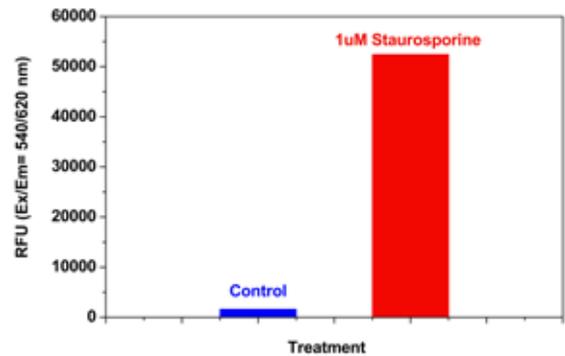


図 2.3. Amplitude™ Fluorimetric Caspase 3/7 Assay Kit *Red Fluorescence* (品番 13504) を使用したカスパーゼ 3/7 活性の検出
Jurkat 細胞を 200,000 細胞 / ウェル / 90 μL で播種。蛍光強度は Ex/Em = 540/620 nm で測定。

カスパーゼ 3/7 検出

カスパーゼ 3 (CPP32/ アポパイン) は、アポトーシス経路において重要なエフェクターであり、イニシエーターカスパーゼ (カスパーゼ 8 など) からのシグナルを増幅し、細胞分解への完全な関与が示されています。カスパーゼ 3 は、酵素カスケードで他のカスパーゼを切断する他、ポリ (ADP- リボース) ポリメラーゼ (PARP)、DNA 依存性プロテインキナーゼ、プロテインキナーゼ C δ、アクチンを切断します。

DEVD ペプチド配列は、カスパーゼ 3/7 に選択的であるため、多くのカスパーゼ 3/7 基質が開発されています。Z-DEVD-R110 基質は無蛍光のビスアミドで、カスパーゼ 3/7 (または近縁のプロテアーゼ) によって、まず蛍光性のモノアミドに変換され、さらに蛍光性の R110 (励起 / 発光極大 ~ 496/520 nm) へと変化します。R110 ベースのカスパーゼ基質は、クマリンベースのカスパーゼ基質 (例えば、AMC や AFC) よりも高い感度を示す一方で、2 段階の切断プロセスがあるため、ダイナミックレンジが狭くなります。エンドポイントアッセイには R110 ベースのカスパーゼ基質を、キネティックアッセイには AMC および AFC のカスパーゼ基質を使

表 2.2 カスパーゼ活性アッセイキット

品番	品名	生化学機能	包装	Ex (nm)	Em (nm)	希望販売価格
13401	Ac-DEVD-AFC	Fluorogenic Caspase 3/7 Substrate	5 mg	380	500	¥22,000
13402	Ac-DEVD-AMC	Fluorogenic Caspase 3/7 Substrate	5 mg	351	430	¥22,000
13403	Ac-DEVD-CHO	Caspase 3/7 Inhibitor	1 mg	N/A	N/A	¥22,000
13405	Ac-DEVD-pNA	Chromogenic Caspase 3/7 Substrate	5 mg	408	N/A	¥22,000
13410	Ac-IETD-AFC	Fluorogenic Caspase 8 Substrate	5 mg	380	500	¥46,000
13411	Ac-IETD-AMC	Fluorogenic Caspase 8 Substrate	5 mg	351	430	¥46,000
13412	Ac-IETD-CHO	Caspase 8 Inhibitor	5 mg	N/A	N/A	¥46,000
13431	(Ac-IETD)2-R110	Fluorogenic Caspase 8 Substrate	1 mg	498	520	¥22,000
13426	Ac-LEHD-AMC	Fluorogenic Caspase 9 Substrate	5 mg	351	430	¥34,000
13427	(Ac-LEHD)2-R110	Fluorogenic Caspase 9 Substrate	1 mg	498	520	¥22,000
13420	Z-DEVD-AFC	Fluorogenic Caspase 3/7 Substrate	5 mg	380	500	¥34,000
13421	Z-DEVD-AMC	Fluorogenic Caspase 3/7 Substrate	5 mg	351	430	¥34,000
13422	Z-DEVD-pNA	Chromogenic Caspase 3/7 Substrate	5 mg	408	N/A	¥22,000
13425	Z-IETD-AFC	Fluorogenic Caspase 8 Substrate	5 mg	380	500	¥29,000
13413	Z-IETD-pNA	Chromogenic Caspase 8 Substrate	5 mg	408	N/A	¥46,000
13433	Z-DEVD-ProRed™ 620	Fluorogenic Caspase 3/7 Substrate	1 mg	534	619	¥69,000
13430	(Z-DEVD)2-R110	Fluorogenic Caspase 3/7 Substrate	1 mg	498	520	¥22,000
13434	Z-IETD-ProRed™ 620	Fluorogenic Caspase 8 Substrate	1 mg	534	619	¥69,000
13435	Z-LEHD-ProRed™ 620	Fluorogenic Caspase 9 Substrate	1 mg	534	619	¥69,000

用することを推奨します。AAT Bioquest 社の ProRed™-DEVD 基質は、励起・発光波長が長いため、カスパーゼ 3/7 阻害剤のスクリーニングに非常に有効です。

Cell Meter™ カスパーゼ 3/7 活性アポトーシスアッセイキット (品番 22797) は、カスパーゼ 3 の活性化を測定することで、細胞のアポトーシスをモニターするように設計されています。カスパーゼ 3 の活性化はアポトーシスの開始に重要なため、信頼できる指標として広く受け入れられています。カスパーゼ 3 は、Asp-

Glu-Val-Asp (DEVD) というペプチド配列に対して基質選択性があるため、カスパーゼ 3 活性の蛍光インジケータとして Z-DEVD-ProRed™ が使用されています。カスパーゼ 3 による ProRed™ DEVD ブロッキングペプチドの切断により、強い赤色蛍光を発する ProRed™ が生成されます (Ex/Em = 530 nm/620 nm)。Cell Meter™ カスパーゼ 3/7 活性アポトーシスアッセイキットは堅牢で、マイクロプレートアッセイなど様々な蛍光プラットフォームでのハイスループットなアッセイに適応できます。

表 2.3 カスパーゼ 3/7 活性アッセイキット

品番	品名	包装	Ex (nm)	Em (nm)	希望販売価格
13502	Amplite™ Fluorimetric Caspase 3/7 Assay Kit *Blue Fluorescence*	500 tests	351	430	¥69,000
13503	Amplite™ Fluorimetric Caspase 3/7 Assay Kit *Green Fluorescence*	500 tests	498	520	¥69,000
13504	Amplite™ Fluorimetric Caspase 3/7 Assay Kit *Red Fluorescence*	100 tests	534	619	¥80,000
22795	Cell Meter™ Caspase 3/7 Activity Apoptosis Assay Kit *Blue Fluorescence*	200 tests	351	430	¥18,000
22796	Cell Meter™ Caspase 3/7 Activity Apoptosis Assay Kit *Green Fluorescence*	200 tests	498	520	¥37,000
22797	Cell Meter™ Caspase 3/7 Activity Apoptosis Assay Kit *Red Fluorescence*	100 tests	534	619	¥69,000
22823	Cell Meter™ Caspase 3/7 Activity Apoptosis Assay Kit *Green Fluorescence Optimized for Flow Cytometry*	100 tests	503	525	¥46,000

カスパーゼ 8 検出

カスパーゼ 8 は、アポトーシスの初期カスケードにおいて、カスパーゼ活性化カスケードのイニシエーターとして重要な役割を担っています。酵素の活性化は、アポトーシス誘導リガンドの細胞表面受容体のデスドメインと直接相互作用することで起こります。活性化されたプロテアーゼは、ミトコンドリアからのシトクロム c の放出を仲介する経路に関与し、カスパーゼ 3 などの下流のカスパーゼを活性化します。IETD ペプチド配列はカスパーゼ 8 に対して選択的です。AAT Bioquest 社では、カスパーゼ 8 を検出するためのカスパーゼ試薬とアッセイキットの両方を提供しています (表 2.2 および表 2.4 参照)。

表 2.4 カスパーゼ 8 活性アッセイキット

品番	品名	包装	Ex (nm)	Em (nm)	希望販売価格
22812	Cell Meter™ Caspase 8 Activity Apoptosis Assay Kit *Blue Fluorescence*	200 tests	351	430	¥46,000
22798	Cell Meter™ Caspase 8 Activity Apoptosis Assay Kit *Green Fluorescence*	200 tests	498	520	¥46,000
22816	Cell Meter™ Caspase 8 Activity Apoptosis Assay Kit *Red Fluorescence*	100 tests	534	619	¥46,000

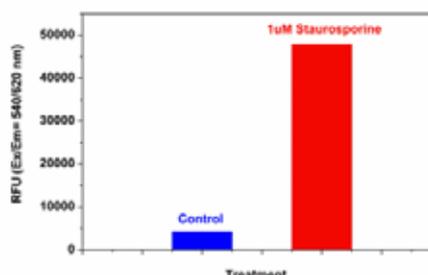


図 2.4. Cell Meter™ Caspase 8 Activity Apoptosis Assay Kit (品番 22816) を使用したカスパーゼ 8 活性の検出
Jurkat 細胞をマイクロプレート上に播種し、スタウロスポリンの有無で比較した。キットの Caspase 8 Working Solution でインキュベートした後、FlexStation 蛍光マイクロプレートリーダー (Molecular Devices 社) を用いて Ex/Em = 540/620 nm (Cutoff = 610 nm) で蛍光強度を測定した。

カスパーゼ 9 検出

カスパーゼ 9 は、システインプロテアーゼであるカスパーゼファミリーの CED-3 サブファミリーのメンバーで、アポトーシスの実行段階において重要な役割を担います。LEHD ペプチド配列はカスパーゼ 9 に選択的です。AAT Bioquest 社は、LEHD ペプチドフラグメントを含む PNA、AMC、AFC、R110 および ProRed™ カスパーゼ 9 基質を提供しています (表 2.2 および 2.5 参照)。

Cell Meter™ カスパーゼ 9 活性アポトーシスアッセイキットは、カスパーゼ 9 活性を測定することで、細胞のアポトーシスをモニターするように設計されています。キット品番 22799 はカスパー

ゼ 9 活性の蛍光インジケーターとして (Ac-LEHD)2-R110 を、キット品番 22813 はカスパーゼ 9 活性のモニターとして Ac-LEHD-AMC を用いています。カスパーゼ 9 による R110 ペプチドの切断により、R110 は強い緑色蛍光を発生し、Ac-LEHD-AMC はカスパーゼ 9 との相互作用により強い青色蛍光を発生する AMC を生成します。いずれのキットも、必要な構成成分はすべて揃っています。アッセイは堅牢で、ハイスループットスクリーニングに適応できます。アポトーシス細胞における活性化カスパーゼ 9 活性の定量化、またはカスパーゼ 9 阻害剤のスクリーニングに使用できます。

表 2.4 カスパーゼ 9 活性アッセイキット

品番	品名	包装	Ex (nm)	Em (nm)	希望販売価格
22813	Cell Meter™ Caspase 9 Activity Apoptosis Assay Kit *Blue Fluorescence*	200 tests	351	430	¥37,000
22799	Cell Meter™ Caspase 9 Activity Apoptosis Assay Kit *Green Fluorescence*	200 tests	498	520	¥69,000
22817	Cell Meter™ Caspase 9 Activity Apoptosis Assay Kit *Red Fluorescence*	100 tests	534	619	¥46,000
22820	Cell Meter™ Caspase 3/7, 8 and 9 Activity Multiplexing Assay Kit *Tricolor Fluorescence*	3x100 tests	Multiple Colors		¥115,000

カスパーゼ 3、7、8、9 のマルチプレックス検出

アポトーシスの過程では、カスパーゼの活性化が重要なイベントの 1 つです。Cell Meter™ 生細胞カスパーゼ結合キットは、カスパーゼ 1、2、3/7、6、8、9、10、13 の活性を検出するために、蛍光性の細胞透過性かつ無毒性のインジケーターを使用しています。カスパーゼに結合すると、蛍光試薬は細胞内に保持されます。結合することでカスパーゼの触媒作用は阻害されますが、アポトーシスの進行は阻止されません。カスパーゼ結合キットは、蛍光顕微鏡、フローサイトメーター、蛍光マイクロプレートリーダーで使用可能です。

Cell Meter™ 生細胞カスパーゼ 3/7 & ホスファチジルセリン検出キット (品番 22850) は、哺乳類細胞のカスパーゼ 3/7 とアネキシ

ン V 活性を同時にモニターすることで、アポトーシスを検出するように設計されています。

アネキシン V は、細胞表面にホスファチジルセリン (PS) を発現しているアポトーシス細胞を検出するために使用されます。細胞表面に PS が出現することは、細胞がアポトーシスの初期 / 中期であることを示し、普遍的なインジケーターとなります。アネキシン V-色素コンジュゲートは、PS のトランスロケーションを測定することにより、細胞のアポトーシスをモニターします。また、本キットでは、細胞集団全体の核を標識するための Hoechst 色素と、ネクローシス細胞を染色するヨウ化プロピジウム色素も提供しています。

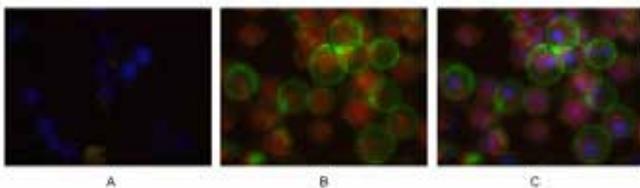


図 2.5. Cell Meter™ Live Cell Caspase 3/7 Binding Assay Kit *Red Fluorescence* (品番 20101) および Cell Meter™ Phosphatidylserine Apoptosis Assay Kit (品番 22791) を用いたカスパーゼ結合活性の検出

蛍光画像解析により、1 μM staurosporine で 3 時間誘導した Jurkat 細胞において、カスパーゼ 3/7 (赤、TF3-DEVD-FMK で染色) およびアネキシン V (緑、Annexin V-Fluor™ 488 で染色) の発現量が増加することを示した。細胞 (30 万個 / ウェル) の蛍光画像は、DAPI、FITC、TRITC チャンネルをそれぞれ用いてオリンパス蛍光顕微鏡で撮影。同じ細胞集団の個々の画像は、上記に示すようにマージされた。A: 非誘導コントロール細胞; B: スタウロスポリン誘導細胞のカスパーゼ 3/7 (赤) およびアネキシン V (緑) の二重染色; C: スタウロスポリン誘導細胞のカスパーゼ 3/7 (赤)、アネキシン V (緑) および核 (青) の三重染色。

表 2.6 マルチプレックスカスパーゼ活性およびアポトーシスアッセイキット

品番	品名	包装	希望販売価格
22820	Cell Meter™ Caspase 3/7, 8 and 9 Activity Multiplexing Assay Kit *Triple Fluorescence Colors*	3x100 tests	¥115,000
22850	Cell Meter™ Live Cell Caspase 3/7 and Phosphatidylserine Detection Kit *Triple Fluorescence Colors*	100 tests	¥69,000

カスパーゼ結合アッセイ

アポトーシスのプロセスでは、カスパーゼの活性化が重要なイベントの1つです。Cell Meter™ 生細胞カスパーゼ結合キットは、カスパーゼ 1、2、3/7、6、8、9、10、13の活性を検出するために、蛍光性の細胞透過性かつ無毒性のインジケーターを使用しています。カスパーゼに結合すると、蛍光試薬は細胞内に保持されます。結合することでカスパーゼの触媒作用は阻害されますが、アポトーシスの進行は阻止されません。カスパーゼ結合キットは、蛍光顕微鏡、フローサイトメーター、蛍光マイクロプレートリーダーで使用可能です。

Cell Meter™ 生細胞カスパーゼ 3/7 & ホスファチジルセリン検出キット (品番 22850) は、哺乳類細胞のカスパーゼ 3/7 とアネキシン V 活性を同時にモニターすることで、アポトーシスを検出するように設計されています。

アネキシン V は、細胞表面にホスファチジルセリン (PS) を発現しているアポトーシス細胞を検出するために使用されます。細胞表面に PS が出現することは、細胞がアポトーシスの初期 / 中期

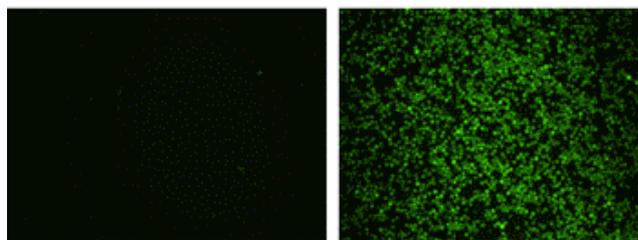


図 2.6. 蛍光イメージングにより、Jurkat 細胞において 1 μM staurosporine の添加による FITC-C6-DEVD-FMK (品番 13408) の蛍光強度の増加が示された。細胞を FITC-C6-DEVD-FMK とともに 37 °C で 1 時間インキュベートした。細胞 (200,000 細胞 / 100 μL / ウェル) の蛍光強度を、FITC チャンネルを用いた蛍光顕微鏡で観察した。A: コントロール, B: スタウロスポリンで処理した。

であることを示し、普遍的なインジケーターとなります。アネキシン V- 色素コンジュゲートは、PS のトランスロケーションを測定することにより、細胞のアポトーシスをモニターします。また、本キットでは、細胞集団全体の核を標識するための Hoechst 色素と、ネクローシス細胞を染色するヨウ化プロビジウム色素も提供しています。

表 2.7 カスパーゼ結合に基づく生細胞アポトーシス試薬とアッセイキット

品番	品名	包装	Ex (nm)	Em (nm)	希望販売価格
20108	Cell Meter™ Live Cell Caspase 1 Binding Assay Kit	25 tests	492	514	¥69,000
20111	Cell Meter™ Live Cell Caspase 2 Binding Assay Kit	25 tests	492	514	¥69,000
22850	Cell Meter™ Live Cell Caspase 3/7 and Phosphatidylserine Detection Kit	100 tests	Multiple Colors		¥69,000
20100	Cell Meter™ Live Cell Caspase 3/7 Binding Assay Kit *Green Fluorescence*	25 tests	492	514	¥69,000
20101	Cell Meter™ Live Cell Caspase 3/7 Binding Assay Kit *Red Fluorescence*	25 tests	556	574	¥69,000
20113	Cell Meter™ Live Cell Caspase 6 Binding Assay Kit	25 tests	492	514	¥69,000
20115	Cell Meter™ Live Cell Caspase 8 Binding Assay Kit	25 tests	492	514	¥69,000
20117	Cell Meter™ Live Cell Caspase 9 Binding Assay Kit	25 tests	492	514	¥69,000
20119	Cell Meter™ Live Cell Caspase 10 Binding Assay Kit	25 tests	492	514	¥69,000
20125	Cell Meter™ Live Cell Caspase 13 Binding Assay Kit	25 tests	492	514	¥69,000
13470	FAM-VAD-FMK	25 tests	492	518	¥22,000
13408	FITC-C6-DEVD-FMK	100 μg	492	516	¥46,000
13409	FITC-C6-LEHD-FMK	100 μg	492	516	¥46,000
13475	mFluor™ 450-VAD-FMK	25 tests	403	454	¥22,000
13476	mFluor™ 510-VAD-FMK	25 tests	414	508	¥22,000
13472	SRB-VAD-FMK [Sulforhodamine B-VAD-FMK]	25 tests	556	575	¥22,000
13471	TF4-VAD-FMK	25 tests	588	610	¥22,000
13420	Z-DEVD-AFC	5 mg	380	500	¥34,000
13421	Z-DEVD-AMC	5 mg	351	430	¥34,000
13433	Z-DEVD-ProRed™ 620	1 mg	534	619	¥69,000
13435	Z-IEHD-ProRed™ 620	1 mg	534	619	¥69,000
13425	Z-IETD-AFC	5 mg	380	500	¥29,000
13434	Z-IETD-ProRed™ 620	1 mg	534	619	¥69,000

GSH- モニタリングアポトーシスアッセイ

細胞のアポトーシスをモニターするためのパラメータは様々です。本キットは、還元型グルタチオン (GSH) の減少を測定することで、細胞のアポトーシスを検出するように設計されています。GSH は細胞の酸化還元レベルを維持するために重要であり、フリーラジカルの消去、薬物の解毒、細胞シグナル伝達、細胞増殖など、多くの細胞プロセスに関与しています。細胞内の GSH 濃度の低下は、多くの細胞において、様々なアポトーシス刺激に反応して細胞死を進行させる初期の特徴になります。

Cell Meter™ 細胞内 GSH アッセイキット (品番 22810) は、チオール (細胞内の GSH を含む) と反応すると強く蛍光する当社独自の非蛍光性 Thiolite™ Green を使用しています。正常細胞では、Thiolite™ Green は主に細胞質に蓄積されますが、アポトーシス細胞では Thiolite™ Green の染色強度が低下する一方で、一部がミトコンドリアへ移行します。

Thiolite™ Green で染色した細胞は、フローサイトメーターで Ex/Em = 490/520 nm (FL1 チャンネル) で可視化することができます。

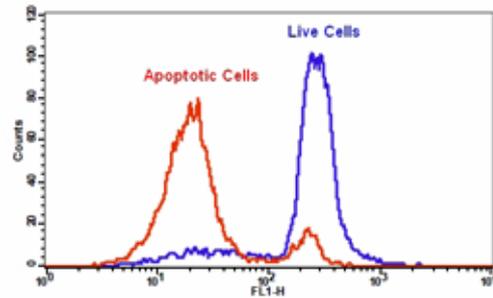


図 2.7. Cell Meter™ Intracellular GSH Assay Kit *Optimized for Flow Cytometry* (品番 22810) を用いたアポトーシス細胞における GSH の検出

Jurkat 細胞における camptothecin の添加による Thiolite™ Green 付加物の蛍光強度の減少を示す。Jurkat 細胞を 37°C、5%CO₂ インキュベーター内で、無添加 (青) または 20 μM camptothecin (赤) で一晩処理し、Thiolite™ Green を 30 分間反応させた。Thiolite™ Green の蛍光強度は、FACSCalibur™ (Becton Dickinson, San Jose, CA) フローサイトメーターで FL1 チャンネルを使用して測定した。

ます。本キットは、7-AAD (品番 17501) などの他の試薬と併用して、細胞生存率やアポトーシスのマルチパラメトリックな研究に使用することができます。フローサイトメーターによるアポトーシス活性化剤および阻害剤のスクリーニングに最適化されています。

表 2.8 細胞内 GSH アッセイキットとプローブ

品番	品名	包装	Ex (nm)	Em (nm)	希望販売価格
5524	Amplite™ Fluorimetric Thiol Quantitation Assay Kit *Green Fluorescence*	1 kit	490	515	¥46,000
22810	Cell Meter™ Intracellular GSH Assay Kit*Optimized for Flow Cytometry*	1 kit	490	515	¥46,000
21507	Thiolite™ Blue	5 mg	335	460	¥22,000
21506	Thiolite™ Blue, AM	1 mg	335	460	¥22,000

2.2 アポトーシスによる細胞膜の変化

アネキシン V コンジュゲートを用いたホスファチジルセリン結合アッセイ

アポトーシスのプロセスは、ある種の形態的特徴によって特徴づけられます。その特徴とは、細胞膜の変化 (膜の対称性の喪失や膜の付着の喪失など)、細胞質と核の凝縮、タンパク質の切断、DNA の核小体内切断などです。死にかけた細胞は、最終的に「アポトーシス小体」と呼ばれる断片化した状態になり、周囲の細胞に大きな炎症を起こさせることなく、食細胞によって排除されず。

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初期特徴の一つです。アポトーシスは、通常、細胞膜の細胞質側の面にあるホスファチジルセリン (PS) の存在によって検出することができます。アポトーシスが生じると、ホスファチジルセリンは細胞膜の外葉に転移して、カルシウムが存在する場合、蛍光色素で標識したアネキシン V コンジュゲートとの結合によりフローサイトメトリーや細胞イメージングで検出することができます。

アネキシンは、カルシウム依存性のリン脂質結合タンパク質のファミリーです。真核生物に多く存在し、シグナル伝達に関与するユビキタな細胞質タンパク質ファミリーに属しています。ア

ネキシン V の優先的な結合パートナーは PS で、通常、細胞膜の内葉 (細胞質側) に保たれています。アポトーシスでは、PS は細胞膜の外側に移動します。細胞表面の PS の出現は、細胞アポトーシスの初期 / 中間段階の普遍的なインジケーターであり、形態的变化が観察される前に検出することができます。

Cell Meter™ アネキシン V 結合アポトーシスアッセイキットは、ホスファチジルセリン (PS) と特異的に結合する光安定性に優れた当社独自の蛍光アネキシン V-iFluor™ PS センサーを使用してい

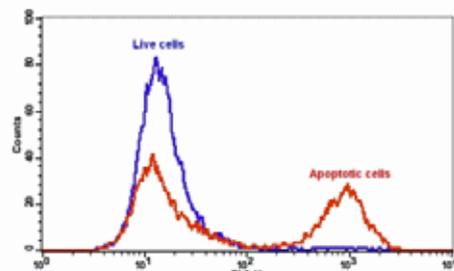


図 2.8. アネキシン V-iFluor™ 488 (品番 20071) による Jurkat 細胞におけるホスファチジルセリンへの結合検出

Jurkat 細胞を 37°C、5%CO₂ インキュベーター内で、無処理 (青) または 20 μM camptothecin (赤) で 4-5 時間処理し、アネキシン V-iFluor™ 488 で 30 分間反応させた。アネキシン V-iFluor™ 488 の蛍光強度は、FACSCalibur™ フローサイトメーターで FL1 チャンネルを使用して測定した。

ます。PS との親和性が非常に高いため、顕微鏡もしくはフローサイトメトリーでのみ使用される他社で市販されているアネキシンVベースのアポトーシスキットよりも堅牢なキットです。キットは、顕微鏡やフローサイトメトリープラットフォームの他に、蛍光マイクロプレートリーダーでも使用可能です。

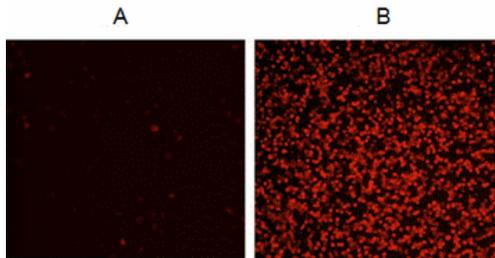


図 2.9. Cell Meter™ AnnexinV Binding Apoptosis Assay Kit *Red Fluorescence* (品番 22826) で染色した Jurkat 細胞画像
A: 未処理のコントロール細胞 B: 1 μM スタウロスポリンで5時間処理した細胞。

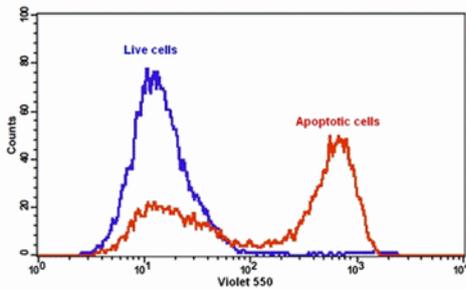


図 2.10. Cell Meter™ Annexin V Binding Apoptosis Assay Kit (品番 22830) による Jurkat 細胞におけるホスファチジルセリン結合活性の検出 Jurkat 細胞を 37°C、5%CO₂ インキュベーター内で、無処理 (青) または 1 μM staurosporine (赤) で 5 時間処理し、アネキシンV-mFluor Violet™ 540 で 30 分間反応させた。アネキシンV-mFluor Violet™ 540 の蛍光強度は、FACSCalibur™ (Becton Dickinson, San Jose, CA) フローサイトメーターで Ex/Em = 405/550 nm の紫色レーザーを用いて測定した。

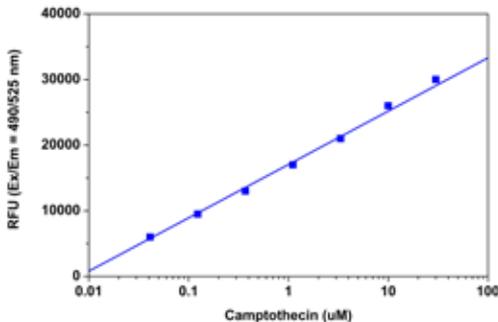


図 2.11. Cell Meter™ Phosphatidylserine Apoptosis Assay Kit (品番 22791) による Jurkat 細胞におけるホスファチジルセリン結合活性の検出 200,000 細胞 / 90 μL / ウェルの Jurkat 細胞を 96 ウェル Costar 黒色壁 / 透明底プレートに播種した。この細胞を、図示したように異なる用量の camptothecin で 5 時間処理した。Apoptin™ Green アッセイ溶液 (100 μL / ウェル) を加え、室温で 1 時間インキュベートした。蛍光強度は、NOVOstar 装置で Ex/Em = 490/525 nm でボトムリードモードで測定した。

アネキシンVは、APC や PE などの蛍光色素と結合させることができます (品番 22837 & 品番 22838)。このフォーマットは、ホスファチジルセリン (PS) に対して高い親和性を示すため、アポトーシスが進行している細胞を検出するフローサイトメトリー分析用の高感度プローブとして機能します。PS の外部化はアポトーシスの初期段階で起こるため、APC/PE アネキシンV 染色は、DNA 断

片化などの核の変化に基づくアッセイよりも早い段階でアポトーシスを特定することができます。

通常、ヨウ化プロピジウム (PI) や 7-アミノアクチノマイシン (7-AAD) のような生体染色色素と併用して、初期アポトーシス細胞 (7-AAD 陰性、APC アネキシンV 陽性) を特定するように組み合わせ使用します。膜が無傷な生存細胞は 7-AAD を排除しますが、死細胞や損傷細胞の膜は 7-AAD を透過させます。例えば、生存していると考えられる細胞は APC/PE 標識アネキシンV と 7-AAD の両方が陰性で、アポトーシス初期の細胞は APC 標識アネキシンV 陽性かつ 7-AAD 陰性を示し、アポトーシス後期または死細胞では APC/PE 標識アネキシンV と 7-AAD の両方が陽性になります。このアッセイでは、アポトーシスによって死に至った細胞とネクローシス経路の結果として死滅した細胞は区別できません。どちらの場合も、死滅した細胞は APC/PE アネキシンV と 7-AAD の両方で染色されるからです。

アポトーシスを経時的に測定すると、細胞の染色具合は、初めは APC/PE アネキシンV および 7-AAD 陰性 (生存可能、または測定可能なアポトーシスなし)、次いで APC/PE アネキシンV 陽性かつ 7-AAD 陰性 (初期アポトーシス、膜完全性あり)、最後に APC/PE アネキシンV および 7-AAD 陽性 (終期アポトーシスおよび死) と、追跡することができます。この 3 つの段階を経る細胞は、アポトーシスを起こしたことを示唆しています。一方で、APC/PE アネキシンV と 7-AAD の両方が陽性であることを示す単一の観察結果だけでは、死滅プロセスに関する情報があまり明らかにはされません。

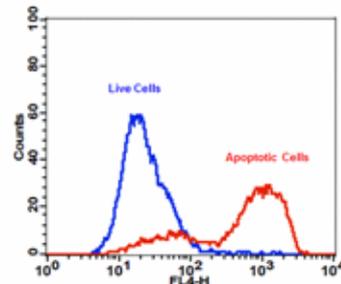


図 2.12. Cell Meter™ APC-Annexin V Binding Apoptosis Assay Kit (品番 22837) による Jurkat 細胞におけるホスファチジルセリン結合活性の検出 Jurkat 細胞を 37°C、5% CO₂ インキュベーター内で、無処理 (青) または 1 μM staurosporine (赤) で ~4 時間処理し、APC-アネキシンV で 30 分間反応させた。APC-アネキシンV の蛍光強度は、FACSCalibur™ (Becton Dickinson, San Jose, CA) フローサイトメーターで FL4 チャンネルを使用して測定した。

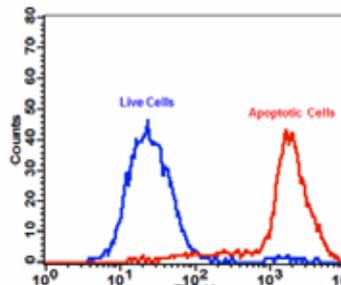


図 2.13. Cell Meter™ PE-Annexin V Binding Apoptosis Assay Kit (品番 22838) による Jurkat 細胞におけるホスファチジルセリン結合活性の検出 Jurkat 細胞を 37°C、5% CO₂ インキュベーター内で、無処理 (青) または 1 μM staurosporine (赤) で 4-5 時間処理した後、PE-アネキシンV を 30 分間反応させた。PE-アネキシンV の蛍光強度は、FACSCalibur™ (Becton Dickinson, San Jose, CA) フローサイトメーターで FL2 チャンネルを使用して測定した

AAT Bioquest, Inc. (Former ABD Bioquest, Inc.) メーカー略号: ABD

表 2.9 アネキシン V 結合に基づく細胞アポトーシス試薬・アッセイキット

品番	品名	包装	希望販売価格
20030	Annexin V, FITC Labeled	100 tests	¥46,000
20031	Annexin V, TRITC Labeled	100 tests	¥46,000
20065	Annexin V-Cy3 conjugate	100 tests	¥46,000
20066	Annexin V-Cy5 conjugate	100 tests	¥46,000
20067	Annexin V-Cy5.5 conjugate	100 tests	¥46,000
20068	Annexin V-Cy7 conjugate	100 tests	¥46,000
20070	Annexin V-iFluor™ 350 Conjugate	100 tests	¥46,000
20071	Annexin V-iFluor™ 488 Conjugate	100 tests	¥46,000
20072	Annexin V-iFluor™ 555 Conjugate	100 tests	¥46,000
20073	Annexin V-iFluor™ 594 Conjugate	100 tests	¥46,000
20074	Annexin V-iFluor™ 647 Conjugate	100 tests	¥46,000
20075	Annexin V-iFluor™ 680 Conjugate	100 tests	¥46,000
20077	Annexin V-iFluor™ 700 Conjugate	100 tests	¥46,000
20076	Annexin V-iFluor™ 750 Conjugate	100 tests	¥46,000
20085	Annexin V-mFluor™ Blue 570 Conjugate	100 tests	¥46,000
20080	Annexin V-mFluor™ Violet 450 Conjugate	100 tests	¥46,000
20081	Annexin V-mFluor™ Violet 510 Conjugate	100 tests	¥46,000
20082	Annexin V-mFluor™ Violet 540 Conjugate	100 tests	¥46,000
22828	Cell Meter™ Annexin V Binding Apoptosis Assay Kit *Blue Fluorescence Excited at 405 nm*	100 tests	¥46,000
22827	Cell Meter™ Annexin V Binding Apoptosis Assay Kit *Deep Red Fluorescence Optimized for Flow Cytometry*	100 tests	¥46,000
22829	Cell Meter™ Annexin V Binding Apoptosis Assay Kit *Green Fluorescence Excited at 405 nm*	100 tests	¥46,000
22824	Cell Meter™ Annexin V Binding Apoptosis Assay Kit *Green Fluorescence Optimized for Flow Cytometry*	100 tests	¥46,000
22830	Cell Meter™ Annexin V Binding Apoptosis Assay Kit *Orange Fluorescence Excited at 405 nm*	100 tests	¥46,000
22825	Cell Meter™ Annexin V Binding Apoptosis Assay Kit *Orange Fluorescence Optimized for Flow Cytometry*	100 tests	¥46,000
22826	Cell Meter™ Annexin V Binding Apoptosis Assay Kit *Red Fluorescence Optimized for Flow Cytometry*	100 tests	¥46,000
22837	Cell Meter™ APC-Annexin V Binding Apoptosis Assay Kit *Optimized for Flow Cytometry*	100 tests	¥46,000
22850	Cell Meter™ Live Cell Caspase 3/7 and Phosphatidylserine Detection Kit *Triple Fluorescence Colors*	100 tests	¥69,000
22838	Cell Meter™ PE-Annexin V Binding Apoptosis Assay Kit *Optimized for Flow Cytometry*	100 tests	¥46,000
22835	Cell Meter™ Phosphatidylserine Apoptosis Assay Kit *Blue Fluorescence Excited at 405 nm*	100 tests	¥46,000
22790	Cell Meter™ Phosphatidylserine Apoptosis Assay Kit *Blue Fluorescence Optimized for Microplate Readers*	100 tests	¥46,000
22832	Cell Meter™ Phosphatidylserine Apoptosis Assay Kit *Deep Red Fluorescence Optimized for Flow Cytometry*	100 tests	¥46,000
22793	Cell Meter™ Phosphatidylserine Apoptosis Assay Kit *Deep Red Fluorescence Optimized for Microplate Readers*	100 tests	¥46,000
22836	Cell Meter™ Phosphatidylserine Apoptosis Assay Kit *Green Fluorescence Excited at 405 nm*	100 tests	¥46,000
22831	Cell Meter™ Phosphatidylserine Apoptosis Assay Kit *Green Fluorescence Optimized for Flow Cytometry*	100 tests	¥46,000
22791	Cell Meter™ Phosphatidylserine Apoptosis Assay Kit *Green Fluorescence Optimized for Microplate Readers*	100 tests	¥46,000
22794	Cell Meter™ Phosphatidylserine Apoptosis Assay Kit *Orange Fluorescence Optimized for Microplate Readers*	100 tests	¥46,000
22792	Cell Meter™ Phosphatidylserine Apoptosis Assay Kit *Red Fluorescence Optimized for Microplate Readers*	100 tests	¥46,000

2.3 アポトーシスによるミトコンドリアの変化

ミトコンドリア機能障害は、アポトーシス誘導に関わり、アポトーシス経路の中心とさえ言われています。ミトコンドリア透過性遷移孔の開口は、膜貫通電位の脱分極、アポトーシス誘発因子の放出、酸化的リン酸化の喪失を誘導することが実証されています。一部のアポトーシスシステムでは、ミトコンドリア膜電位(MMP)の損失がアポトーシスプロセスの初期のイベントである可能性があります。アポトーシスが生じると、ミトコンドリア膜電位(MMP)は低下するため、MMPの変化は細胞のアポトーシスのモニタリングに使用されてきました。成長因子の除去後、早期にMMPは減少し、マトリックスは凝縮します。MMPを追跡して細胞のアポトーシスをモニターできるように、多くの蛍光色素(JC-1やJC-10TMなど)が用いられています。

JC-1 および JC-10TM

JC-1は、低濃度や低膜電位では緑色の蛍光を発するモノマーとして存在します。しかし、高濃度(0.1 μM以上の水溶液)や高電位では、赤色蛍光の「J-凝集体」を形成し、広い励起スペクトルと非常に狭い発光スペクトルを示すようになります。J-凝集体の形成は、30-180 mVの範囲で印加された膜電位に応じて直線的に増加するため、この現象を電位差測定に利用することができます。JC-1は、DiOC6(3)やローダミン123などの他のカチオン性色素よりも、ミトコンドリアと細胞膜の電位に特異的で、脱分極に対する反応がより安定しています。

緑色蛍光のJC-1モノマー(Ex/Em = ~514/529 nm)と赤色蛍光のJ-凝集体(Ex/Em = ~585/590 nm)のシグナルを組み合わせることで、485 nmからその最大吸収までの間で効果的に励起することができ、様々なタイプの比率測定が可能になります。JC-1は、アポトーシス細胞のミトコンドリア脱分極の検出や多剤耐性細胞のアッセイに広く使用されています。また、細胞を用いたハイスループットアッセイでミトコンドリア機能評価にも頻繁に使用されています。

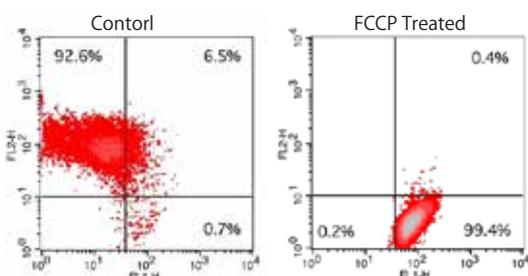


図 2.14. Cell MeterTM JC-10TM Mitochondrion Membrane Potential Assay Kit *Optimized for Flow Cytometry Assays* (品番 22801) による Jurkat 細胞の FCCP によるミトコンドリア膜電位変化の検出
Jurkat 細胞を DMSO (左) または 20 μM FCCP (右) と共に JC-10TM 色素負荷溶液で 10 分間反応させた。FACSCaliburTM フローサイトメーター (Becton Dickinson 社製) を用いて、JC-10TM の J-凝集体と単量体の両方の蛍光強度を、補正後に FL1 および FL2 チャンネルを用いて測定した。

AAT Bioquest 社では、JC-1 の優れた代替品として JC-10TM を開発しました。JC-10TM は、アポトーシス細胞のミトコンドリア脱分極を検出するために、JC-1 と同様の電位依存性の分光特性を有している一方で、JC-1 よりも感度が高く、水溶性が改善されているため、使い勝手がさらに優れています。JC-1 は水溶性が低く、1 μM の濃度でも、水性バッファー中で沈殿する傾向があり、用途によっては使用が困難でした。JC-10TM は高濃度でも問題なく、ミトコンドリア内に選択的に入ることができ、膜電位の上昇とともに緑色からオレンジ色に可逆的に色が変化します。この性質は、膜の偏光により JC-10TM の凝集体が可逆的に形成され、520nm (JC-10TM 単量体の蛍光) から 570nm (J-凝集体の蛍光) へ蛍光がシフトすることに起因しています。490nm で励起すると、ミトコンドリア膜の偏光が進むにつれて、JC-10TM の色が緑色からオレンジ色へと可逆的に変化します。すべてのフローサイトメーターに一般的に搭載されているフィルターで両色を検出することができます。緑色は蛍光チャンネル 1 (FL1) で、オレンジ色は蛍光チャンネル 2 (FL2) で解析できます。JC-10TM はフローサイトメーターでの使用以外にも、蛍光イメージングにも使用できます。JC-10TM を蛍光マイクロプレートプラットフォームで使用するためのプロトコールもご紹介します。一部の細胞株では、JC-10TM は JC-1 よりはるかに優れた性能を発揮します。

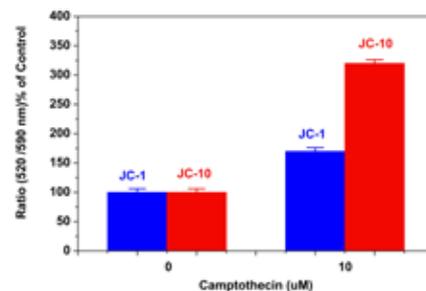


図 2.15. JC-10TM (品番 22204) および JC-1 (品番 22200) を用いた Jurkat 細胞におけるカンプトテシンによるミトコンドリア膜電位変化の測定
Jurkat 細胞を camptothecin (10 μM) で 4 時間処理した後、JC-1 および JC-10TM 色素負荷液をウェルに添加し、30 分間インキュベートした。J-凝集体と JC-1 および JC-10TM の単量体の両方の蛍光強度を、NOVOstar マイクロプレートリーダー (BMG Labtech) を用いて Ex/Em = 490/525 nm および 540/590 nm で測定した。

ミトコンドリア膜電位アッセイキット

Cell Meter™ ミトコンドリア膜電位 (MMP) アッセイキットは、最適化されたアッセイメソッドと必要な構成成分を提供します。これらの蛍光測定アッセイは、ミトコンドリア膜電位の変化を検出するために、独自のカチオン性ミトコンドリアプローブを使用しています。正常細胞では、ミトコンドリアプローブがミトコンドリア内に蓄積され、赤色蛍光強度が増加します。しかし、アポトーシス細胞では、MMP の崩壊に続いて、ミトコンドリア色素の蛍光強度が減少します。

ミトコンドリア膜電位の崩壊は、ミトコンドリア透過性遷移孔の開閉と一致し、シトクロムCの細胞質への放出につながり、アポトーシスカスケードの他の下流事象の引き金となります。このキットは、フローサイトメーター、蛍光顕微鏡、蛍光マイクロプレートリーダーを用いたアポトーシス活性化剤および阻害剤のスクリーニングにそれぞれ最適化されています。

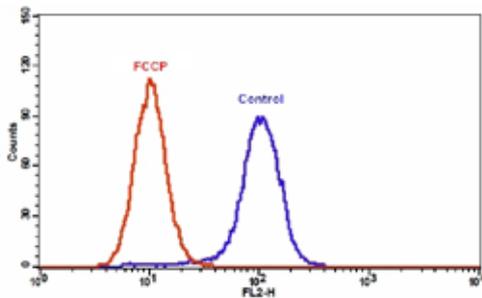


図 2.16. Cell Meter™ Mitochondrion Membrane Potential Assay Kit *Orange Fluorescence Optimized for Flow Cytometry* (品番 22804) による FCCP によるミトコンドリア膜電位変化の検出

Jurkat 細胞における FCCP 添加による MitoTell™ Orange の蛍光強度の減少を示す。Jurkat 細胞に MitoTell™ Orange 単独 (青) または 30 μM FCCP (赤) 存在下で 15 分間反応させた。MitoTell™ Orange の蛍光強度は、FACSCalibur™ (Becton Dickinson) フローサイトメーターで FL2 チャンネルを使用して測定した。

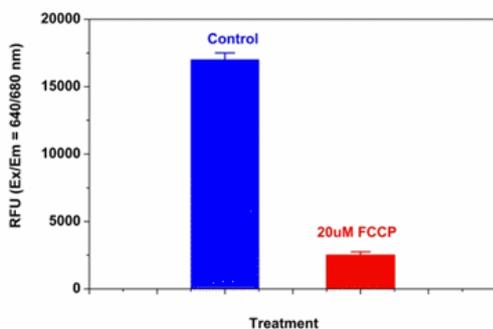


図 2.17. Cell Meter™ NIR Mitochondrion Membrane Potential Assay Kit *Optimized for Microplate Reader* (品番 22803) による FCCP によるミトコンドリア膜電位変化の検出 HeLa 細胞に MitoLite™ NIR を単独または 20 μM FCCP 存在下で 15 分間反応させた。MitoTell™ NIR の蛍光強度は、Assay Buffer B (構成成分) を添加した 30 分後に、FlexStation™ マイクロプレートリーダー (Molecular Devices) を用いて Ex/Em = 640/680 nm (カットオフ 665 nm、ボトムリード) で測定した。

2.4 ミトコンドリア染色プローブ

Cell Navigator™ ミトコンドリア染色キットは、生細胞のミトコンドリアを、青、緑、オレンジ、近赤外蛍光を含むフルセットの蛍光色で標識するように設計されています。このキットでは、ミトコンドリア膜電位勾配を介してミトコンドリアに選択的に蓄積される独自の色素を使用しています。ミトコンドリアインジケーターは、ミトコンドリア内に長時間保持され、光安定性を示します。この重要な特徴により、染色効率が大幅に向上します。標識プロトコールは堅牢で、最小限の作業時間しか必要としません。

マイクロプレートアッセイ、免疫細胞化学、フローサイトメトリーなど、さまざまな蛍光プラットフォームに適応できます。細胞接着、走化性、多剤耐性、細胞生存率、アポトーシス、細胞毒性など、さまざまな研究に有用です。増殖・非増殖細胞のどちらにも適しており、浮遊細胞、接着細胞のいずれにも使用可能です。

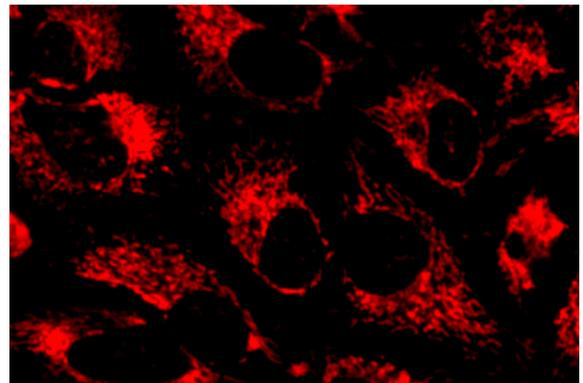


図 2.18. Cell Navigator™ Mitochondrion Staining Kit *Red Fluorescence* (品番 22668) で染色した HeLa 細胞画像

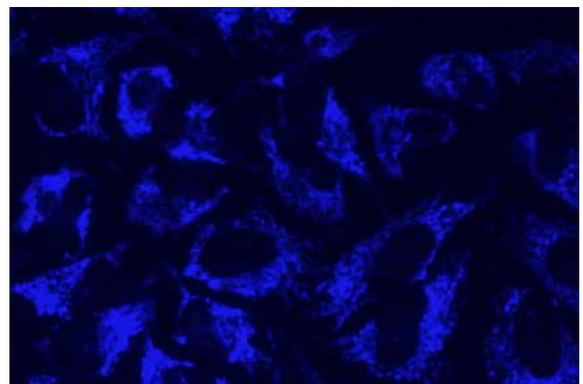


図 2.19. Cell Navigator™ Mitochondrion Staining Kit *Blue Fluorescence* (品番 22665) で染色した HeLa 細胞画像

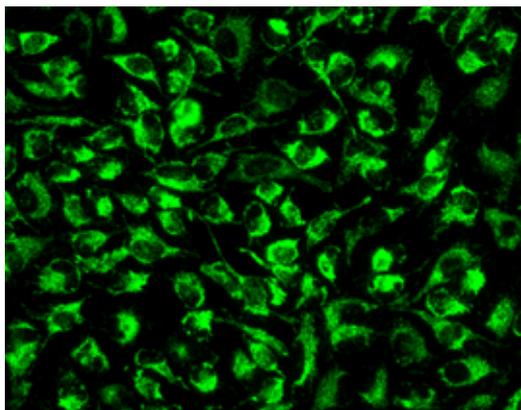


図 2.20. Cell Navigator™ Mitochondrial Staining Kit *Green Fluorescence* (品番 22666) で染色した U2OS 細胞画像

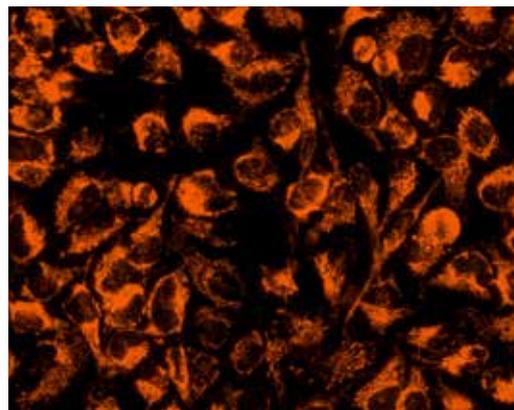


図 2.21. Cell Navigator™ Mitochondrial Staining Kit *Orange Fluorescence with 405 nm Excitation* (品番 22673) で染色した U2OS 細胞画像

表 2.10 ミトコンドリアプローブとアッセイキット

品番	品名	包装	Ex (nm)	Em (nm)	希望販売価格
22801	Cell Meter™ JC-10™ Mitochondrion Membrane Potential Assay Kit *Optimized for Flow Cytometry Assays*	100 tests	490	525/590	¥69,000
22800	Cell Meter™ JC-10™ Mitochondrion Membrane Potential Assay Kit *Optimized for Microplate Assays*	500 tests	490/540	525/590	¥69,000
22804	Cell Meter™ Mitochondrion Membrane Potential Assay Kit *Orange Fluorescence Optimized for Flow Cytometry*	100 tests	546	575	¥46,000
22805	Cell Meter™ Mitochondrion Membrane Potential Assay Kit *Orange Fluorescence Optimized for Microplate Reader*	500 tests	546	575	¥46,000
22802	Cell Meter™ NIR Mitochondrion Membrane Potential Assay Kit *Optimized for Flow Cytometry*	100 tests	646	659	¥46,000
22803	Cell Meter™ NIR Mitochondrion Membrane Potential Assay Kit *Optimized for Microplate Reader*	500 tests	646	659	¥46,000
22665	Cell Navigator™ Mitochondrion Staining Kit *Blue Fluorescence*	500 tests	350	490	¥46,000
22666	Cell Navigator™ Mitochondrion Staining Kit *Green Fluorescence*	500 tests	498	520	¥46,000
22669	Cell Navigator™ Mitochondrion Staining Kit *NIR Fluorescence*	500 tests	640	659	¥46,000
22667	Cell Navigator™ Mitochondrion Staining Kit *Orange Fluorescence*	500 tests	545	575	¥46,000
22673	Cell Navigator™ Mitochondrion Staining Kit *Orange Fluorescence with 405 nm Excitation*	500 tests	399	550	¥46,000
22668	Cell Navigator™ Mitochondrion Staining Kit *Red Fluorescence*	500 tests	575	600	¥46,000
22200	JC-1	5 mg	515	529	¥22,000
22204	JC-10™	5x100 µL	510	525	¥22,000
22674	MitoLite™ Blue FX490	500 tests	350	490	¥22,000
22675	MitoLite™ Green EX488	500 tests	498	520	¥22,000
22676	MitoLite™ Orange FX570	500 tests	545	575	¥22,000
22677	MitoLite™ Red FX600	500 tests	575	600	¥22,000
22678	MitoLite™ Deep Red FX660	500 tests	640	659	¥22,000
22679	MitoLite™ Orange EX405	500 tests	399	550	¥22,000
22690	MitoLite™ NIR FX690	500 tests	658	691	¥22,000
22695	MitoLite™ Green FM	10x50 µg	508	528	¥34,000
22698	MitoLite™ Red CMXRos	10x50 µg	578	598	¥34,000
22210	Rhodamine 123	25 mg	507	529	¥18,000
22220	TMRE	25 mg	549	574	¥22,000
22221	TMRM	25 mg	549	573	¥22,000

AAT Bioquest, Inc. (Former ABD Bioquest, Inc.) メーカー略号：ABD

2.5 TUNEL アポトーシスアッセイ

DNA の断片化は、後期アポトーシスの特徴です。アポトーシス細胞における DNA の断片化は、ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ (TdT) を介した dUTP ニックエンドラベリング (TUNEL) により検出することができます。この TUNEL アッセイは、DNA 中のニックの存在に依存し、ニックは TdT による標識済み dUTPs の付加によりマーキングされます。既存の TUNEL アッセイには、毒性の高いカゴジル酸ナトリウムが含まれており、アポトーシスの誘発、DNA 生成の減少や DNA 鎖の減少の恐れがあります。

Cell Meter™ TUNEL アポトーシスアッセイキット (品番 22844) は、カゴジル酸ナトリウムを含まない独自のバッファーステムを使用しています。本キットは、アポトーシス時に形成される DNA 断片の 3'OH 末端に蛍光色素 TF3 修飾デオキシウリジン 5'-三リン酸 (TF3-dUTP) を取り込むことに基づいています。本アッセイは、抗体を用いることなく、接着・非接着細胞のいずれにも使用可能です。蛍光マイクロプレートリーダー (Ex/Em = 550/590 nm)、蛍光顕微鏡、フローサイトメーターに適しています。

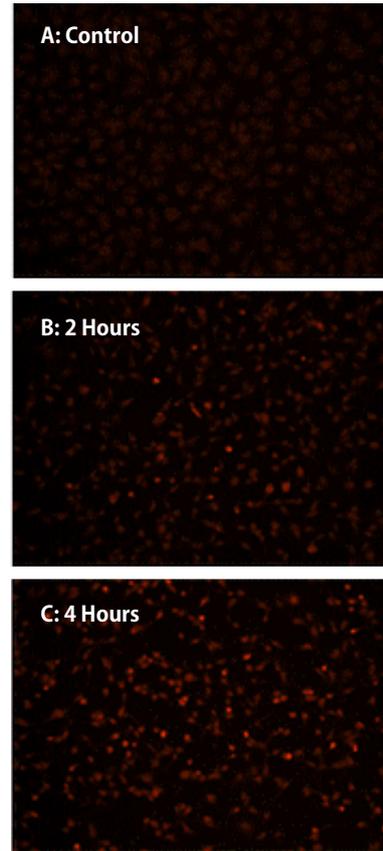


図 2.22. Cell Meter™ TUNEL Apoptosis Assay Kit (品番 22844) を用いた核内アポトーシス解析
 蛍光イメージングにより、HeLa 細胞において、コントロール (A) と比較して、1 μM staurosporine を 2 時間 (B) または 4 時間 (C) 添加した場合の TUNEL 反応の増加が示された。細胞は反応混合物とともに 37°C で 1 時間インキュベートした。細胞 (30,000 細胞/100 μL ウェル) の蛍光強度を、TRITC チャンネルを用いた蛍光顕微鏡で解析した。スタウロスポリンで処理した細胞では、DNA 鎖切断がより強い蛍光染色スポットとして示された。

表 2.11 TUNEL アポトーシスアッセイ

品番	品名	包装	Ex (nm)	Em (nm)	希望販売価格
22844	Cell Meter™ Live Cell TUNEL Apoptosis Assay Kit *Red Fluorescence*	50 tests	556	579	¥69,000
22849	Cell Meter™ Live Cell TUNEL Apoptosis Assay Kit *Green Fluorescence*	50 tests	497	520	¥69,000

2.6 ネクローシスアッセイ

アポトーシスは、炎症の誘発を避けるために、能動的にプログラムされた自律的な細胞解体のプロセスです。ネクローシスでは、炎症性の細胞内容物が制御されずに放出される、環境攪乱による受動的な偶発的な細胞死と特徴づけられています。核を標識する膜不透過性色素の能力によって示されるように、細胞膜の完全性の喪失は、後期アポトーシスとネクローシスを証明する簡単なアプローチです。ネクローシスは、細胞が生理的条件から極端に変化した場合（例：低体温、低酸素）に起こり、その結果、細胞膜に損傷を与える可能性があります。生理的条件下では、補体や溶血性ウイルスなどの薬剤によって、細胞膜に直接損傷が引き起こされます。

ネクローシスは、細胞の恒常性維持機能の障害から始まり、水と細胞外イオンの流入を引き起こします。細胞内小器官、特にミトコンドリアが膨張し、細胞全体が破裂します（細胞破裂）。最終的に細胞膜が破壊されるため、リソソーム酵素を含む細胞質内容物が細胞外液に放出されるため、しばしば激しい炎症反応に起因する広範な組織損傷を伴います。

これに対し、アポトーシスは、正常な生理的条件下で起こる細胞死の様式であり、細胞は自らの終焉に積極的です（「細胞の自殺」）。正常な細胞のターンオーバーと組織の恒常性、胚発

生、免疫寛容の誘導と維持、神経系の発達、内分泌依存性の組織萎縮の際に最もよく見られるものです。アポトーシスを起こした細胞は、特徴的な形態学的、生化学的特徴を示します。これらの特徴には、クロマチンの凝集、核および細胞質の凝縮、リボソーム、形態的に無傷なミトコンドリアおよび核物質を含む膜結合小胞（アポトーシス小体）への細胞質および核の分割が含まれます。生体内では、これらのアポトーシス小体は、マクロファージや隣接する上皮細胞によって速やかに認識され、貪食されます。このように、生体内でアポトーシス細胞を効率的に除去するメカニズムにより、炎症反応が引き起こされることはありません。試験管内では、アポトーシス小体だけでなく、残った細胞片も最終的に膨張し、溶解します。

Cell Meter™ アポトーシス・ネクローシス検出キット（品番 22840）は、アポトーシス、ネクローシスおよび健康細胞をフローサイトメーターや蛍光顕微鏡を用いて同時にモニターするように設計・最適化されています。品番 22843 も同様に使用することができます。どちらのキットも、健康な細胞のモニタリングには Calcein AM、アポトーシス細胞には Apopxin™ コンジュゲート、ネクローシスまたは死滅した細胞には DNA 色素を使用しています。

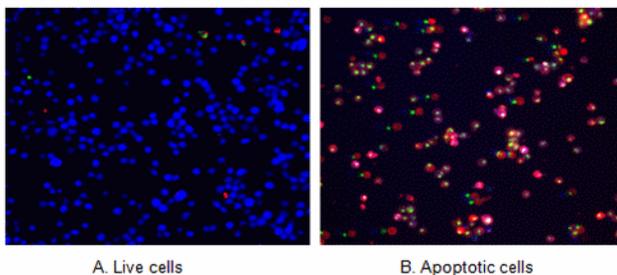


図 2.23. Cell Meter™ Apoptotic and Necrotic Detection Kit *Triple Fluorescence Colors* (品番 22843) によるアポトーシスとネクローシスの検出

Apopxin™ DeepRed の Jurkat 細胞におけるホスファチジルセリンへの結合活性。蛍光イメージングにより、生細胞（青）は CytoCalcein™ Violet 450、アポトーシス細胞（赤）は Apopxin™ Deep Red、壊死細胞（緑）は Nuclear Green™ DCS1 で染色されたことが実証された。アポトーシスは、1 μM staurosporine で 3 時間誘導した。細胞の蛍光画像は、オリンパス蛍光顕微鏡で Violet、Cy5、FITC チャンネルをそれぞれ用いて撮影した。同じ細胞集団から各チャンネルで撮影した個々の画像は、上記のようにマージした。A：非誘導コントロール細胞、B：スタウロスポリン誘導細胞の 3 重染色。

表 2.12 アポトーシスとネクローシス検出アッセイキット

品番	品名	包装	希望販売価格
22840	Cell Meter™ Apoptotic and Necrotic Multiplexing Detection Kit I *Triple Fluorescence Colors*	100 tests	¥57,000
22843	Cell Meter™ Apoptotic and Necrotic Multiplexing Detection Kit II *Triple Fluorescence Colors*	100 tests	¥69,000

2.7 オートファジーアッセイ

オートファジーは、動物細胞における細胞内高分子の分解を行う主要な経路の一つです。そのプロセスは、不要な細胞質物質や細胞内小器官をオートファゴソームという膜で封じ込め、そこにリソソームが融合し、封じ込められた物質が分解されるというものです。

Cell Meter™ オートファジーアッセイキット (品番 23002) および Cell Meter™ オートファジーイメージングキット (品番 23001) は、特定のオートファゴソームマーカーを使用してオートファジーの活性を解析します。このアッセイは、接着・非接着細胞のいずれにも使用可能です。蛍光顕微鏡観察に最適化されており、フローサイトメーターにも適しています。Cell Meter™ オートファジーアッセイキットは、マイクロプレートリーダーにも適しています。

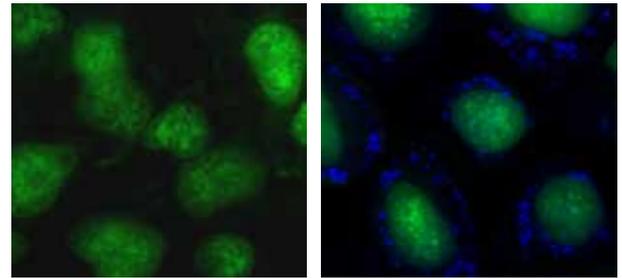


図 2.24. HeLa 細胞の飢餓状態によって誘導された小胞の Cell Meter™ Autophagy Fluorescence Imaging Kit (品番 23001) による標識

HeLa 細胞を通常の DMEM 培地 (左:コントロール) または 5% 血清を含む 1X HBSS バッファ (右:オートファジー処理) 中で 16 時間インキュベートした。コントロール細胞も処理細胞も、Autophagy Super Blue™ 作業液で 20 分間 37°C、5% CO₂ インキュベーター内でインキュベートし、洗浄バッファで 3 回洗浄した。細胞は、DAPI チャンネル (青色) を備えた蛍光顕微鏡で直ちに画像化された。細胞核は Nuclear Green™ LCS1 (品番 17540、緑色) で染色した。

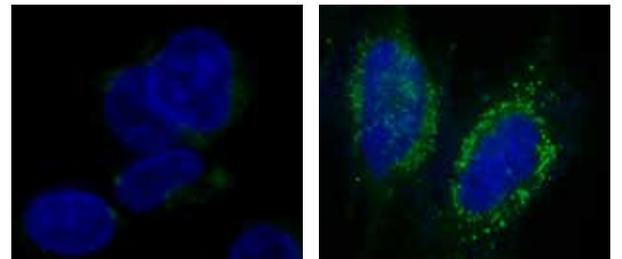
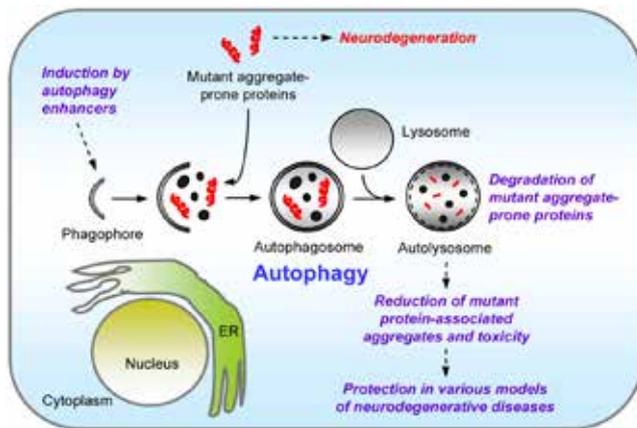


図 2.25. HeLa 細胞の飢餓状態によって誘導された小胞の Cell Meter™ Autophagy Assay Kit *Green Fluorescence* (品番 23002) による標識

HeLa 細胞を通常の DMEM 培地 (左:コントロール) または 5% 血清を含む 1X HBSS バッファ (右:オートファジー処理) で 16 時間インキュベートした。コントロール細胞と飢餓状態の細胞の両方を、37°C、5% CO₂ インキュベーター内で PhagyGreen™ ワーキングソリューションと 20 分間インキュベートし、洗浄バッファで 3 回洗浄しました。細胞は、FITC チャンネル (緑) を備えた蛍光顕微鏡で直ちに画像化された。細胞核は Hoechst 33342 (品番 17530、青) で染色した。

表 2.13 オートファジーアッセイキット

品番	品名	包装	Ex (nm)	Em (nm)	希望販売価格
23000	Cell Meter™ Autophagy Assay Kit *Blue Fluorescence*	200 tests	333	518	¥46,000
23002	Cell Meter™ Autophagy Assay Kit *Green Fluorescence*	200 tests	447	553	¥69,000
23001	Cell Meter™ Autophagy Fluorescence Imaging Kit	200 tests	333	518	¥69,000

細胞増殖

3.1 細胞周期アッセイ

細胞周期には G0/G1、S、G2、M の 4 段階があり、細胞が細胞周期を通過する間に、S（合成）期で DNA が複製され、M（分裂）期で 2 つの娘細胞に平等に分配されます。この 2 つの段階は、2 つのギャップ期、すなわち G0/G1 期と G2 期によって区切られています。この 2 つのギャップ期は、細胞が成長し、タンパク質や細胞小器官の質量が 2 倍になるための時間であり、また、細胞周期の次の段階に進む前に、内部および外部の状態を監視するためにあります。細胞が細胞周期を通過する際には、多くの制御タンパク質によって制御されています。

AAT Bioquest 社の Cell Meter™ アッセイキットは、細胞の生存率や増殖をモニタリングするためのツールセットです。細胞の生存率と増殖をモニタリングするパラメータは様々です。正常な細胞の DNA 密度は、細胞の成長、分裂、休止、または通常の機能を果たしているかどうかによって変化します。細胞周期の進行は、様々な細胞周期制御因子の複雑な相互作用によって制御されています。これらの制御因子が、DNA に結合する転写因子を活性化し、細胞分裂をもたらすタンパク質産生のオン・オフをさせます。この制御カスケードに誤りがあると、異常な細胞増殖が起こり、腫瘍形成など多くの病的状態の原因になります。生細胞研究の応用としては、細胞 DNA 量や細胞周期分布の測定による成長パターンの変化の検出、アポトーシスのモニタリング、腫瘍細胞の挙動や抑制遺伝子機構の評価などが考えられます。

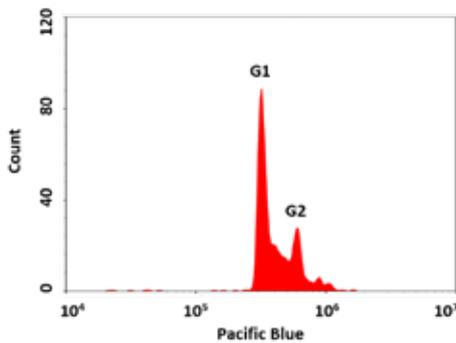


図 3.1. 成長中の Jurkat 細胞における DNA プロファイル

Jurkat 細胞を Cell Meter™ Fluorimetric Cell Cycle Assay Kit *Optimized for 405 nm Violet Laser Excitation* (品番 22845) で 30 分染色した。蛍光強度は、ACEA NovoCyte フローサイトメーターを用いて、Pacific Blue のチャンネルで測定した。成長中の Jurkat 細胞では、G0/G1 期と G2/M 期のヒストグラムピークが S 期分布で分離されている

Cell Meter™ 蛍光細胞周期アッセイキット (品番 22841、22842、22845) は、透過・固定化した細胞に独自の細胞周期色素を使って、細胞周期の進行と増殖をモニターするように設計されています。色素は細胞膜透過性で、細胞 DNA にインターカレートします。細胞周期色素のシグナル強度は、DNA 量に正比例します。サンプル中の G0/G1 期、S 期、G2/M 期の細胞の割合や、アポトーシス前のサブ G1 期の細胞は、フローサイトメーターでモニターすることが可能です。キットは、緑、青、赤の 3 色の蛍光色で構成されています。

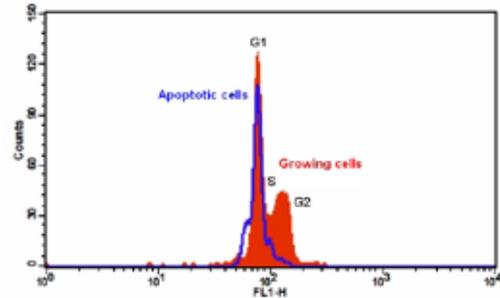


図 3.2. Cell Meter™ Fluorimetric Cell Cycle Assay kit (品番 ; 22841) による増殖性かつカンプトテシン処理 Jurkat 細胞の DNA プロファイル

Jurkat 細胞を 37°C の 5% CO₂ 培養器内で、20 μM カンプトテシンにより 8 時間処理 (青色) または無処理 (赤色) した。その後、Cell Meter™ Fluorimetric Cell Cycle Assay kit (品番 ; 22841) の指示に従いアッセイを行った。Nuclear Green™ LCS1 (component A) の蛍光強度を FACS Calibur™ フローサイトメーターの FL1 チャンネルで測定した。増殖性の Jurkat 細胞では、Nuclear Green™ LCS1 で染色した核が G1、S、および G2 期 (赤色) を示した。カンプトテシン処理したアポトーシス性細胞 (B) は、Nuclear Green™ LCS1 の蛍光強度が低下し、S と G2 期が減少していた。

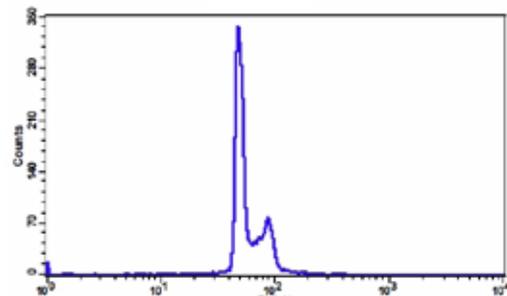


図 3.3. Cell Meter™ Fluorimetric Cell Cycle Assay kit (品番 ; 22842) による RNaseA 処理 Jurkat 細胞の DNA プロファイル

Jurkat 細胞を固定し、Cell Meter™ Fluorimetric Cell Cycle Assay Kit (品番 22842) と RNase A で 30 分間反応させた。Nuclear Red™ CCS1 (Component A) の蛍光強度は、FACSCalibur™ (Becton Dickinson, San Jose, CA) フローサイトメーターで FL2 チャンネルを使用して測定した。

表 3.1 細胞周期アッセイ

品番	品名	包装	Ex (nm)	Em (nm)	希望販売価格
22841	Cell Meter™ Fluorimetric Cell Cycle Assay Kit *Green Fluorescence Optimized for Flow Cytometry*	100 tests	503	526	¥46,000
22845	Cell Meter™ Fluorimetric Cell Cycle Assay Kit *Optimized for 405 nm Violet Laser Excitation*	100 tests	401	459	¥46,000
22842	Cell Meter™ Fluorimetric Cell Cycle Assay Kit *Red Fluorescence Optimized for Flow Cytometry*	100 tests	535	617	¥46,000

3.2 CytoTell™ 色素

CytoTell™ Green & CytoTell™ UltraGreen

蛍光染色と組み合わせたフローサイトメトリーは、不均一な細胞集団を分析するための強力なツールです。既存の蛍光色素の中で、CFSE は生細胞解析に広く使用されている好ましい細胞増殖インジケーターです。しかし、細胞増殖のモニタリングに CFSE を使用する上で、いくつか大きな問題が挙げられます。

- 1) CFSE はすべてのアミノ基と無差別に反応し、細胞内タンパク質の重要な機能（細胞膜 GPCR など）に影響を与えるため、細胞に対して強い毒性を持つ。
- 2) CFSE は反応が遅く、使用に不便。第 2 世代の細胞の CFSE 蛍光強度は、第 1 世代から 10 倍以上減少しますが、細胞増殖解析を開始するには、もう 1 世代待つ必要があります。
- 3) 培地除去が必要。CFSE は培地成分と反応するため、フローサイトメーターで細胞解析を行う際には培地を除去する必要があります。
- 4) CytoTell™ UltraGreen は、CFSE に比べ非常に安定です。原液は、室温で数日間保存が可能。

CytoTell™ Green (品番 22253) は、上記の制限を解消するために開発されました。標識細胞の長期間の追跡にも使用できます。2パラメータプロットを使用した解析では、特に未分割の細胞と最初の世代の間で、各世代の解像度の向上が期待できます。CytoTell™ Green で標識された細胞は、標準的なホルムアルデヒド含有固定剤とサポニンベースの透過バッファーを用いて、細胞内標的の解析のために固定・透過化することができます。CytoTell™ Green は、488nm の青色レーザーラインによって励起され、520nm に発光のピークを持つため、FITC フィルターセットと互換性があります。

CytoTell™ Green の特徴

- CFSE、FITC とスペクトル的に類似している。
- CFSE に比べ、細胞増殖に対する反応が非常に速い。
- CFSE よりも使い勝手が良い。
- CFSE よりも高感度
- CFSE よりも安定性が高い。

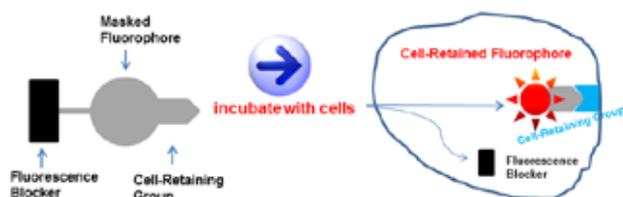


図 3.4. CytoTell™ 染料の動作原理

CytoTell™ dye は、a). 蛍光ブロッカー、b). マスク蛍光体、c). 細胞保持性部分の 3 成分から構成されています。生細胞に入ると、蛍光ブロッカーが除去されることで CytoTell™ dye の蛍光が放出され、放出された蛍光体は細胞保持性基を介して細胞内に保持されます。

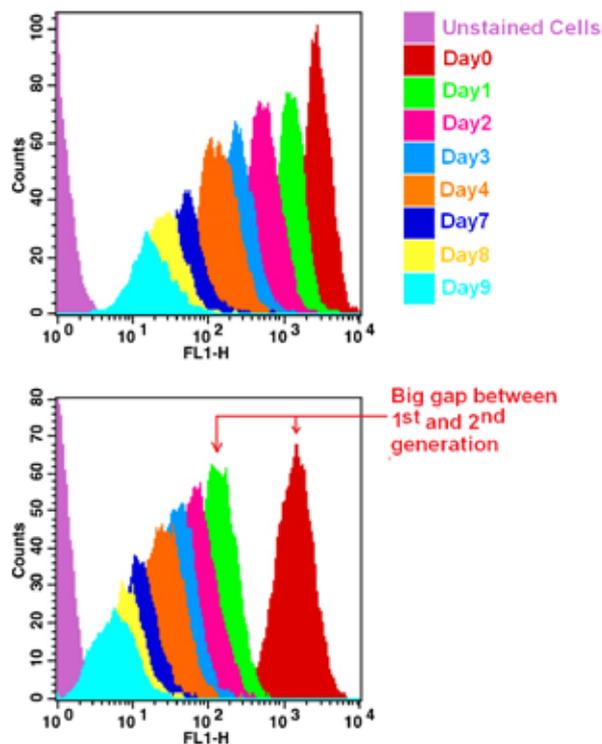


図 3.5. CytoTell™ Green 及び CFSE を用いた細胞追跡

Jurkat 細胞 ($\sim 2 \times 10^6$ cells/mL) を CytoTell™ Green 及び CFSE (0.5 μ M) で染色した (Day0)。細胞は 1 : 1 の割合で 9 日間継代し、フローサイトメーターで測定した (FACS Calibur, FL1 チャネル)。

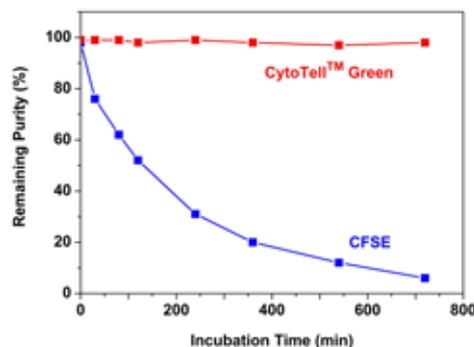


図 3.6. CytoTell™ Green (品番 22253) と CFSE (品番 22022) の安定性の比較

CytoTell™ Green と CFSE の 5 mM PBS 作業溶液は、HPLC (pH7.2) を使用してモニターされた。

CytoTell™ Green をご使用のお客様からのフィードバックに基づき、CytoTell™ UltraGreen (品番 22240) が新たに開発されました。この製品には以下のような特長があります。

- 1) CytoTell™ UltraGreen は細胞内によく保持される。
- 2) CytoTell™ UltraGreen は CFSE よりもはるかに速い応答性を示し、より便利に使用できる。第 1 世代と第 2 世代の蛍光強度の差は著しく減少し、細胞分裂に伴い、CytoTell™ UltraGreen は娘細胞に均等に分配され、色素の蛍光強度が半分になることを測定できる。
- 3) CytoTell™ UltraGreen は CFSE よりも高感度。最大 9 世代まで可視化が可能。
- 4) CytoTell™ UltraGreen は、CFSE に比べ非常に安定です。原液は、室温で数日間保存が可能。

CytoTell™ UltraGreen は、標識細胞の長期間の追跡にも使用できます。2 パラメータープロットを使用した解析では、特に未分割のセルと最初の世代の間で、各世代の解像度の向上が期待できます。CytoTell™ UltraGreen で標識された細胞は、標準的なホルムアルデヒド含有固定剤とサポニンベースの透過バッファーを用いて、細胞内標的の解析のために固定・透過化することができます。CytoTell™ UltraGreen の励起波長は 519 nm で、青色 (488 nm) レーザーで励起することができるため、FITC フィルターセットと互換性があります。

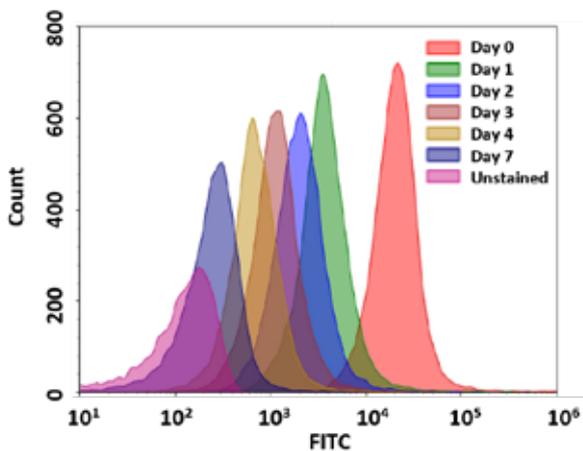


図 3.7. CytoTell™ UltraGreen (品番 22240) を使用した細胞追跡アッセイ
Jurkat 細胞 (約 2×10^5 細胞/mL) を 0 日目に CytoTell™ UltraGreen で染色した。細胞を 1:1 の比率で 7 日間連続継代した。蛍光強度は、ACEA NovoCyte フローサイトメーターを使用して FITC チャネルで測定した。連続した世代は異なる色で表された。

CytoTell™ Blue

CFSE およびその蛍光類似体は、GFP や FITC の励起・発光スペクトルとほぼ同じであるため、GFP 導入細胞や FITC 標識抗体を使用する用途には使用できません。CytoTell™ 色素は、405 nm、488 nm、633 nm などの主要なレーザーラインでよく励起され、多色発光を示します。これらは GFP や FITC とは異なる励起・発光スペクトルを持つため、細胞毒性が少なく、GFP 細胞株や FITC 標識抗体を用いたマルチカラーアプリケーションに使用されます。

CytoTell™ Blue は、細胞を均一に染色する青色蛍光色素です。405nm に励起ピークを持ち、405nm のバイオレットレーザーラインで励起することが可能です。450nm のピーク蛍光は、450/20nm のバンドパスフィルター (Pacific Blue®、BD Horizon® V450 相当) で検出できるため、GFP や FITC 抗体を用いたマルチカラー細胞解析のアプリケーションに対応しています。

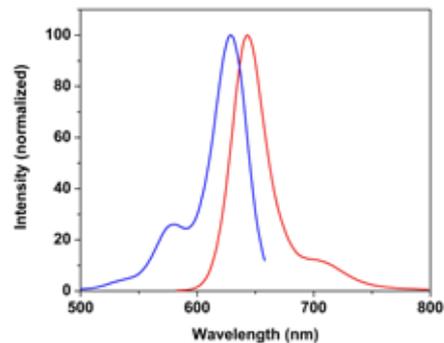


図 3.8. CytoTell™ Blue (Ex/Em = 403/454 nm、品番 22251)、CytoTell™ Green (Ex/Em = 511/525 nm、品番 22253)、および CytoTell™ Red (Ex/Em = 628/643 nm、品番 22255) の PBS 緩衝液 (pH 7.2) における発光分光スペクトル比較

CytoTell™ Red 590 & CytoTell™ Red 650

CytoTell™ Red 650 (品番 22255) および CytoTell™ Red 590 (品番 22261) は、細胞を均一に染色する赤色蛍光色素です。細胞が分裂する際、色素は娘細胞間で均等に分配され、色素の蛍光強度が連続的に半分になることで測定することができます。CytoTell™ Red 650 および CytoTell™ Red 590 を使用すると、最大 8 世代の細胞を可視化することができます。またこれら色素は、標識した細胞の長期追跡にも使用できます。

CytoTell™ Red 650 は、630nm に励起ピークを持ち、633nm の赤色レーザーラインで良好に励起することが可能です。660nm に発光ピークを持ち、660/20nm のバンドパスフィルターで検出可能 (APC、Alexa Fluor® 647、Cy5® と同等) なので、GFP や FITC 抗体を用いたマルチカラーの細胞解析を行うアプリケーションに適合します。

CytoTell™ Red 590 は、570 nm に励起ピークを持ち、黄色 (561 nm) のレーザーラインによって励起されることが可能です。ピーク発光は 590 nm で、610/20 バンドパスフィルターで検出することができ、マルチカラー細胞解析のために GFP または FITC 抗体を利用するアプリケーションと互換性があります。

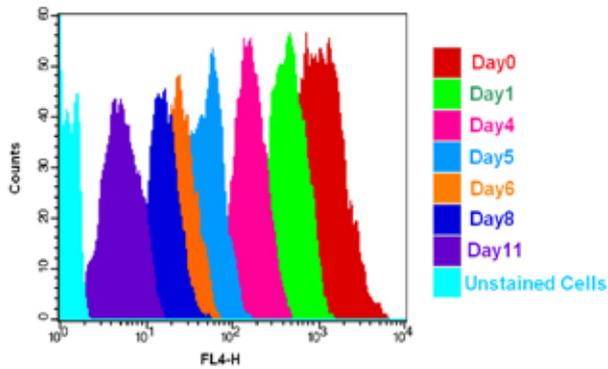


図 3.9. CytoTell™ Red 650 (品番 22255) を用いた細胞追跡アッセイ
Jurkat 細胞 (~ 2×10^6 細胞/mL) を 0 日目に CytoTell™ Red 650 (2 μ M) で染色した。11 日間、1:1 の比率で細胞を連続的に継代した。蛍光強度は、継代翌日に FACS Calibur™ フローサイトメーター (BD, San Jose, CA) を用いて FL4 チャンネルで測定した。連続した世代は異なる色で表現した。

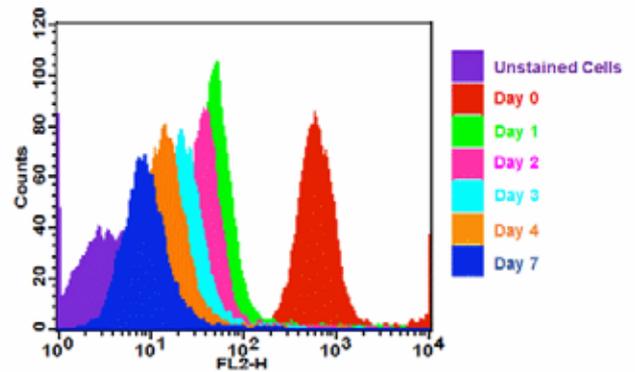


図 3.10. CytoTell™ Red 590 (品番 22261) を用いた細胞追跡アッセイ
Jurkat 細胞 (~ 2×10^6 細胞/mL) を 0 日目に CytoTell™ Red 590 で染色した。この細胞を 1:1 の比率で 7 日間連続的に継代した。蛍光強度は、FACS Calibur フローサイトメーターで FL2 チャンネルで測定した。連続した世代は異なる色で表現した。

表 3.2 細胞増殖プローブ

品番	品名	包装	Ex (nm)	Em (nm)	希望販売価格
22022	CFSE [5-(and 6)-carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester] *Mixed Isomers*	25 mg	494	521	¥22,000
22251	CytoTell™ Blue	500 tests	403	454	¥22,000
22252	CytoTell™ Blue	2 x 500 tests	403	454	¥34,000
22253	CytoTell™ Green	500 tests	511	525	¥22,000
22254	CytoTell™ Green	2 x 500 tests	511	525	¥34,000
22257	CytoTell™ Orange	500 tests	542	556	¥22,000
22258	CytoTell™ Orange	2 x 500 tests	542	556	¥34,000
22248	CytoTell™ Violet 500	500 tests	415	499	¥34,000
22249	CytoTell™ Violet 500	2 x 500 tests	415	499	¥46,000
22261	CytoTell™ Red 590	500 tests	573	588	¥34,000
22262	CytoTell™ Red 590	2 x 500 tests	573	588	¥57,000
22255	CytoTell™ Red 650	500 tests	628	643	¥22,000
22256	CytoTell™ Red 650	2 x 500 tests	628	643	¥34,000
22240	CytoTell™ UltraGreen	500 tests	492	519	¥22,000
22241	CytoTell™ UltraGreen	2 x 500 tests	492	519	¥34,000
22028	ReadiUse™ CFSE [5-(and 6)-Carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester]	5 x 500 μ g	494	521	¥22,000

表 3.3 その他関連プローブ

品番	品名	包装	Ex (nm)	Em (nm)	希望販売価格
22003	Calcein, AM *UltraPure grade* *CAS# 148504-34-1*	1 mg	495	515	¥34,000
22007	Calcein Blue, AM *CAS# 168482-84-6*	1 mg	360	445	¥18,000
21902	Calcein Deep Red™	1 mg	646	659	¥46,000
22008	Calcein Orange™, Sodium Salt	1 mg	525	550	¥46,000
21900	Calcein Red™, AM	1 mg	560	574	¥46,000
21908	Calcein UltraBlue™, AM	10 x 50 µg	360	445	¥46,000
22012	CytoCalcein™ Violet 450 *Excited at 405 nm*	1 mg	408	450	¥46,000
22013	CytoCalcein™ Violet 500 *Excited at 405 nm*	1 mg	410	500	¥46,000
22017	CytoTrace™ Green CMFDA	1 mg	494	521	¥46,000
22014	CytoTrace™ Orange CMTMR *CAS# 323192-14-9*	10 x 50 µg	541	565	¥46,000
22016	CytoTrace™ Red CFDA	1 mg	560	574	¥46,000
22015	CytoTrace™ Red CMTPIX	10 x 50 µg	577	602	¥46,000
21800	CytoTrace™ Ultra Green	1 mg	494	521	¥57,000

3.3 BrdU DNA 合成アッセイ

細胞周期の S 期 (DNA 合成) において、BrdU は新しく合成された DNA に取り込まれ、抗 BrdU 特異抗体によって検出が可能です。DNA 量の増加に加えて、特定のタンパク質のレベルも細胞増殖の結果として上昇します。例えば、Ki67 は分裂細胞の核に発現し、細胞周期の G0 期では検出されません。Ki67 は、BrdU や CytoTell 細胞染色などの他の増殖マーカーと組み合わせることで、より信頼性を高めることができます。また、これらのマーカーを細胞表面や他の種類のマーカーと組み合わせることで、細胞サブセットやそのシグナル伝達経路に関する追加情報を得ることができます。

このように DNA 合成と細胞倍加の間には密接な関係があるため、DNA 合成の測定は細胞増殖の評価にとって非常に魅力的なデータになります。標識化 DNA 前駆体を細胞培養に加えると、分裂しようとしている細胞が標識ヌクレオチドを DNA に取り込みます。従来、これらアッセイでは、放射性標識ヌクレオチド、特にトリチウム化チミジンを使用し、取り込まれたトリチウム化チミジンの量は、液体シンチレーションカウンティングによって定量されていました。

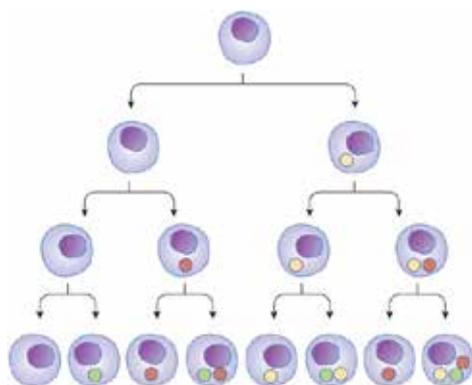


図 3.11. 細胞増殖における DNA 合成と細胞倍加の密接な関係

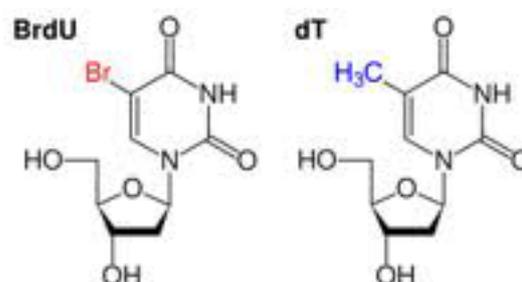


図 3.12. チミジン (左) と 5-ブロモ-2'-デオキシウリジン (右) の構造類似性

実験により、チミジンアナログである 5-ブロモ-2'-デオキシウリジンがチミジンのように細胞内 DNA に取り込まれることが明らかになりました。増殖アッセイに BrdU を使用することで、放射性化合物であるトリチウムチミジンに伴う欠点を回避することができます。

表 3.4 BrdU 細胞増殖プローブ

品番	品名	包装	Ex (nm)	Em (nm)	希望販売価格
17030	BrdU [5-Bromo-2'-deoxyuridine]	25 mg			¥18,000
17031	BrdUTP [5-Bromo-2'-deoxyuridine 5'-triphosphate] *10 mM in TE buffer*	100 µL			¥46,000
17032	BrUTP [5-Bromouridine 5'-triphosphate] *10 mM in TE buffer*	100 µL			¥46,000

細胞生存と細胞毒性

4.1 細胞膜の完全性アッセイ

細胞膜の完全性は、細胞毒性をモニターするための最も信頼性が高い便利な方法です。細胞膜の完全性をモニタリングする、Cell Meter™ 細胞生存アッセイは、蛍光マイクロプレートや顕微鏡による細胞機能研究に対する効果的なツールセットです。本キットは、増殖・非増殖細胞のいずれにも使用可能です。独自の細胞生存色素は疎水性化合物であり、無傷の生細胞を透過し、蛍光は増強されます。

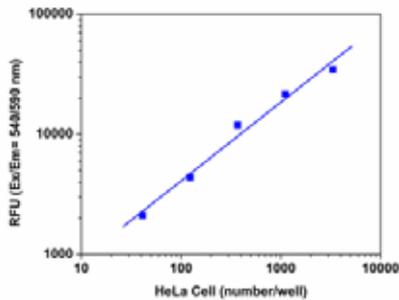


図 4.1. Cell Meter™ Cell Viability Assay Kit (品番 22783) を用いた HeLa 細胞の生存数測定

0～3,000 細胞/ウェル/100 μL の HeLa 細胞を 96 ウェル Costar 黒色壁/透明底プレートに一晩播種した。この細胞を 100 μL/ウェルの CytoCalcein™ Red 色素溶液とともに 37°C で 30 分間インキュベートした。蛍光強度は、Flexstation (Molecular devices 社製) を用いて、Ex/Em = 540/590 nm (cutoff at 570 nm) でボトムリードモードで測定した。

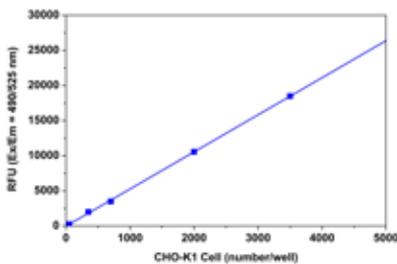


図 4.2. Cell Meter™ Cell Viability Assay Kit (品番 22786) を用いた CHO-K1 細胞の生存数測定

0～5,000 細胞/ウェル/100 μL の CHO-K1 細胞を 96 ウェル Costar 黒色壁/透明底プレートに一晩播種した。この細胞を 100 μL/ウェルの CytoCalcein™ Green 色素溶液とともに 37°C で 30 分間インキュベートした。蛍光強度は、Ex/Em = 490/525 nm で測定した。

Cell Meter™ 細胞生存アッセイキットには、200 アッセイ (96 ウェルフォーマット) または 800 アッセイ (384 ウェルフォーマット) を実施するのに十分な試薬が付属し、細胞生存率解析に必要なすべての構成成分と最適化されたプロトコールが提供されます。増殖・非増殖細胞のいずれにも使用可能なアッセイで、細胞接着、走化性、多剤耐性、細胞生存率、アポトーシス、細胞毒性など、さまざまな研究にお役にください。

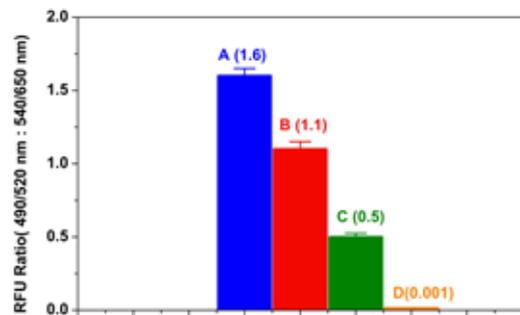


図 4.3. Cell Meter™ Cell Viability Assay Kit (品番 22783) を用いた HeLa 細胞の生存数測定

0～3,000 細胞/ウェル/100 μL の HeLa 細胞を 96 ウェル Costar 黒色壁/透明底プレートに一晩播種した。この細胞を 100 μL/ウェルの CytoCalcein™ Red 色素溶液とともに 37°C で 30 分間インキュベートした。蛍光強度は、Flexstation (Molecular devices 社製) を用いて、Ex/Em = 540/590 nm (cutoff at 570 nm) でボトムリードモードで測定した。

4

細胞生存率と細胞毒性

表 4.1 細胞生存アッセイキット

品番	品名	包装	Ex (nm)	Em (nm)	希望販売価格
22785	Cell Meter™ Cell Viability Assay Kit *Blue Fluorescence*	500 tests	360	445	¥46,000
22784	Cell Meter™ Cell Viability Assay Kit *Blue Fluorescence with 405 nm Excitation*	500 tests	405	450	¥46,000
22786	Cell Meter™ Cell Viability Assay Kit *Green Fluorescence*	500 tests	495	515	¥46,000
22787	Cell Meter™ Cell Viability Assay Kit *NIR Fluorescence Optimized for Fluorescence Microplate Reader*	200 tests	646	659	¥46,000
22783	Cell Meter™ Cell Viability Assay Kit *Red Fluorescence*	200 tests	560	574	¥69,000
22789	Live or Dead™ Cell Viability Assay Kit *Green/Red Dual Fluorescence*	200 tests	492/540	515/620	¥46,000

4.2 細胞核酸の検出

一般的に使用されるカルセイン AM 色素に加えて、核染色色素も細胞毒性をモニターするために使用されています。核は動物で最も大きな細胞小器官です。哺乳類細胞では、核の平均直径は約 6 μm で、全細胞容積の約 10% を占めています。核には、細胞の遺伝物質のほとんどが含まれており、複数の長い直鎖状の DNA 分子が、ヒストンなどの多種多様なタンパク質と複合体を成して染色体を形成しています。この染色体の中にある遺伝子が、細胞の核ゲノムです。核の機能は、これら遺伝子の完全性を維持し、遺伝子発現を制御することで結果的に細胞活動を制御します。核は言わば細胞のコントロールセンターと言えます。核を構成する主な構造物は、オルガネラ全体を包み込み、その内容物を細胞質から隔離する二重膜である核膜と、核骨格です。タンパク質や RNA などの大きな分子が細孔を通して移動することは、遺伝子発現と染色体の維持の両方に必要です。

生細胞の核標識

Hoechst 33258 (品番 17520) と Hoechst 33342 (品番 17530) はいずれも水に非常に溶けやすく、比較的無毒です。細胞膜透過性のマイナーグループ結合型 DNA 染色剤で、DNA に結合すると鮮やかな青色蛍光を発します。Hoechst 33342 は、Hoechst 33258 よりも膜透過性がわずかに高くなっています。これらの Hoechst 色素は、アルゴンイオンレーザーの紫外スペクトル線や従来のほとんどの蛍光励起源で励起でき、比較的大きなストークスシフト (Ex/Em : $\sim 350/460 \text{ nm}$) を示すため、マルチカラー標識実験に適しています。Hoechst 34580 は、405 nm のバイオレットレーザーでよりよく励起させることができます。

DAPI (品番 17510) は水に非常に溶けやすい一方で、PBS への溶解性は限られています。AAT Bioquest 社では、DAPI の塩化物と乳酸塩の両方を提供しています。DAPI は優れた核対比染色色素であり、染色体に明確なバンドパターンを示します。蛍光イメージングやフローサイトメトリーと組み合わせる、生細胞核染色の最も一般的な核色素の 1 つです。DAPI は DNA に結合すると青色の蛍光を示し、水銀ランプやアルゴンイオンレーザーの紫外線ラインで励起することができます。DAPI を dsDNA に結合させると、DAPI とマイナーグループの両方から水分子が移動するため、蛍光が 20 倍程度に増強されます。

LDS 751 (品番 17561) は、dsDNA 上で $\sim 543 \text{ nm}$ に励起ピークを示します。488nm のアルゴンイオンレーザーで励起することができ、長波長の蛍光極大 ($\sim 712 \text{ nm}$) を持つため、特にマルチカラー分析に有効です。LDS 751 と dsDNA の結合により、蛍光が 20 倍程度増強されます。細胞透過性の核酸染色剤で、無傷の有核・無核細胞や損傷した有核細胞の識別、フローサイトメトリーによる好中球、白血球、単球の混合集団における細胞タイプの識別に使用されています。

Nuclear Green™ LCS1 (品番 17540), Nuclear Orange™ LCS1 (品番 17541), Nuclear Red™ LCS1 (品番 17542), Nuclear Yellow (品番 17539) は、生細胞内の DNA 含有量を分析するための蛍光性、

DNA 選択性、細胞透過性の蛍光色素です。これらの色素は、DNA と結合することで蛍光が著しく増強されます。蛍光イメージング、マイクロプレート、フローサイトメトリーなどのアプリケーションに使用できます。生細胞のマルチカラー分析の使用も期待できます。

Nuclear Blue™ LCS1 (品番 17543) は、生細胞内の DNA 含有量を分析するための蛍光性、DNA 選択性、細胞透過性の蛍光色素です。DNA に結合すると青色蛍光が著しく増強されます。蛍光イメージング、マイクロプレート、フローサイトメトリーアプリケーションに使用できます。405nm のバイオレットレーザーで良好に励起され、 $\sim 440 \text{ nm}$ に蛍光極大を持つブルー/シアン色の蛍光を放出し、405nm のバイオレットレーザー光源を装備したフローサイトメーターに適しています。この DNA 結合色素は、Pacific Blue™ と BD Horizon™ V450 のフィルターセットを用いて、生細胞のマルチカラー解析に使用することができます。

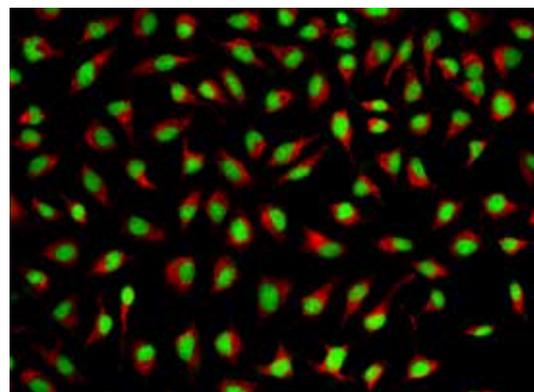


図 4.4. Nuclear Green™ LCS1 (品番 17540) で染色した生きた HeLa 細胞の画像
生きた HeLa 細胞のミトコンドリアは、赤色蛍光 Cell Navigator™ Mitochondrion Staining Kit (品番 22668) で染色した。

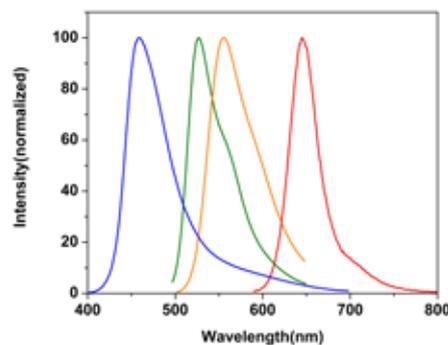


図 4.5. 仔牛胸腺 DNA に結合した Nuclear Blue™ LCS1 (Ex/Em = 401/459 nm、品番 17543)、Nuclear Green™ LCS1 (Ex/Em = 503/526 nm、品番 17540)、Nuclear Orange™ LCS1 (Ex/Em = 514/555 nm、品番 17541)、および Nuclear Red™ LCS1 (Ex/Em = 622/645 nm、品番 17542) の規格化された発光スペクトル比較

死細胞の核標識

ヨウ化プロビジウム (PI) は細胞不透過性で、細胞集団中の死細胞の同定やマルチカラー蛍光法の対比染色として一般的に使用されています。また、ネクローシス細胞、アポトーシス細胞、正常細胞の識別にも使用されることがあります。PIの蛍光は、核酸との結合により20～30倍に増強されます。蛍光の励起極大は30-40nm赤色シフトし、蛍光の蛍光極大は15nm程度青色シフトします。

7-アミノアクチノマイシン D (7-AAD、品番 17501) は、非生存細胞を識別するために使用できる非透過性色素です。7-AADは、通常フローサイトメーターで使用されます。原形質膜が損傷している細胞や、細胞代謝が障害されている細胞、または細胞代謝が行われていない細胞は、色素の細胞内への流入を防ぐことができません。細胞内に入ると、色素は細胞内DNAと結合し、高蛍光の付加物を生成し、細胞を生存不能と識別します。7-AADはアルゴンレーザーの488nmのレーザーラインで励起され、650nm以上の蛍光が検出されます。7-AADの発光強度はPIより低いですが、発光波長が長いので、FITCやPEなど他の488nm励起蛍光色素と組み合わせたマルチプレックスアッセイに有効です。

Nuclear Green™ DCS1 (品番 17550)、Nuclear Orange™ DCS1 (品番 17551)、Nuclear Red™ DCS1 (品番 17552) は、死細胞、固定細胞、アポトーシス細胞のDNA量を分析するための蛍光性、DNA選択性、細胞不透過性の蛍光色素です。LCS1 試薬と同様に、DCS1色素の蛍光は、DNAに結合することで著しく増強されます。蛍光イメージング、マイクロプレート、フローサイトメトリーなどのアプリケーションに使用することができます。これらのDNA結合色素は、適切なフィルターセットを用いて、死細胞、固定細胞、アポトーシス細胞のマルチカラー分析に使用することができます。

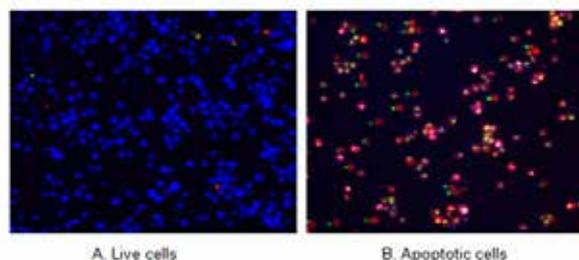


図 4.6. Jurkat 細胞における Apopxin™ Deep Red のホスファチジルセリンへの結合活性
蛍光画像から、生細胞 (青) は CytoCalcein™ Violet 450 (品番 22012) で、アポトーシス細胞 (赤) は Apopxin™ Deep Red で、壊死細胞 (緑) は Nuclear Green™ DCS1 (品番 17550) で染色された。アポトーシスは 1 μM staurosporine で 3 時間誘導した。細胞の蛍光画像は、それぞれバイオレット、Cy5、FITC チャンネルを用いてオリンパス蛍光顕微鏡で撮影した。A: 非誘導コントロール細胞; B: スタウロスポリン誘導細胞の三重染色。

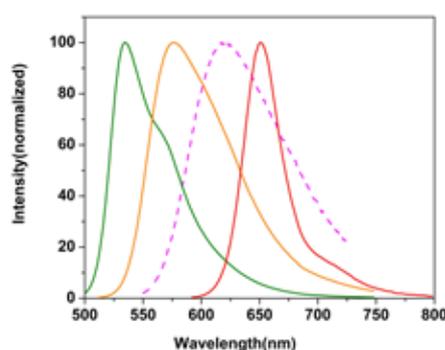


図 4.7. 仔牛胸腺 DNA 存在下での Nuclear Green™ DCS1 (Ex/Em = 503/526 nm、品番 17550)、Nuclear Orange™ DCS1 (Ex/Em = 514/555 nm、品番 17551)、Nuclear Red™ DCS1 (Ex/Em = 622/645 nm、品番 17552) の正規化発光スペクトル比較。点線は、DNA に結合したヨウ化プロビジウム (Ex/Em = 535/617 nm、品番 17515) の発光スペクトル

表 4.2 細胞核染色

品番	品名	包装	Ex (nm)	Em (nm)	希望販売価格
17501	7-AAD [7-Aminoactinomycin D]	1 mg	546	647	¥18,000
17510	DAPI [4,6-Diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride] *UltraPure grade*	10 mg	358	461	¥18,000
17520	Hoechst 33258 *UltraPure grade*	100 mg	352	461	¥22,000
17530	Hoechst 33342 *UltraPure grade*	100 mg	350	461	¥22,000
17537	Hoechst 34580 *UltraPure grade*	5 mg	368	437	¥34,000
17561	LDS 751	25 mg	543	712	¥85,000
17543	Nuclear Blue™ LCS1	0.5 mL	401	459	¥22,000
17550	Nuclear Green™ DCS1	0.5 mL	503	526	¥22,000
17540	Nuclear Green™ LCS1	0.5 mL	503	526	¥22,000
17551	Nuclear Orange™ DCS1	0.5 mL	528	576	¥22,000
17541	Nuclear Orange™ LCS1	0.5 mL	514	555	¥22,000
17552	Nuclear Red™ DCS1	0.5 mL	631	651	¥22,000
17542	Nuclear Red™ LCS1	0.5 mL	622	645	¥22,000
17515	Propidium iodide *UltraPure grade*	25 mg	535	617	¥22,000

AAT Bioquest, Inc. (Former ABD Bioquest, Inc.) メーカー略号: ABD

4.3 細胞毒性アッセイ

細胞毒性をモニタリングすることは、細胞機能を研究する上で最も重要な作業の一つです。Cell Meter™ 比色細胞毒性キット (品番 22780) は、細胞の還元により吸収スペクトルが変化する独自の水溶性色素を使用しています。吸収率の変化は、生細胞数に正比例します。本キットは、成分の予備混合が不要で、テトラゾリウム系比色アッセイ (MTT, XTT など) よりも高感度です。

Cell Meter™ 細胞毒性キットは、MTT などの他のアッセイに比べ、細胞増殖や細胞毒性に対してより高感度です。キットの成分は非常に安定で細胞毒性も少ないため、必要に応じて長めのインキュベーション時間 (24 ~ 48 時間など) が可能です。高感度 (< 100 CHO 細胞)、非放射性、無洗浄法という特徴から、本キットは様々な化合物に対する細胞増殖や細胞毒性のハイスループットスクリーニングに適しています。アッセイは、便利な 96 ウェルおよび 384 ウェルのマイクロタイタープレートフォーマットで実施できます。

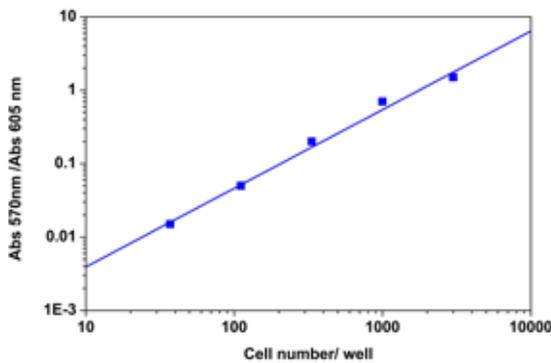


図 4.8. Cell Meter™ Colorimetric Cell Cytotoxicity Assay Kit (品番 22780) を用いた CHO-K1 細胞の細胞毒性測定
0 ~ 10,000 細胞/ウェル/100 μ L の CHO-K1 細胞を 96 ウェル Costar 黒色壁/透明底プレートに一晩播種した。細胞を 20 μ L/ウェルの Component A とともに 37°C で 3 時間インキュベートした。SpectraMax plus (Molecular Devices 社製) を用いて、吸光度を 570 nm および 605 nm で測定した。OD570/OD605 の比は、示した細胞数に比例する。

Cell Meter™ 蛍光細胞毒性アッセイキット (品番 22781) は、生細胞を蛍光的に検出するための、迅速、簡便、正確かつ均質なアッセイを提供します。このアッセイは、酸化された非蛍光青色レザズリンが、生細胞のミトコンドリア呼吸鎖から電子を受け取ることによって赤色蛍光色素 (レゾルフィン) に還元されることに基いています。生成されるレゾルフィンの量は、生細胞の数に正比例します。

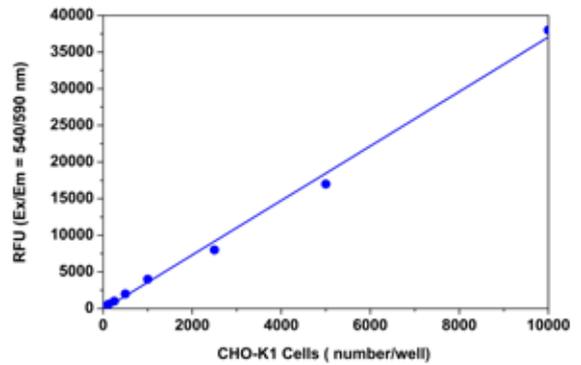


図 4.9. Cell Meter™ Fluorimetric Cell Cytotoxicity Assay Kit (Cat# 22781) を用いた CHO-K1 細胞の細胞毒性測定
0 ~ 10,000 細胞/ウェル/100 μ L の CHO-K1 細胞を 96 ウェル Costar 黒色壁/透明底プレートに一晩播種した。細胞を 20 μ L/ウェルの Component A とともに 37°C で 3 時間インキュベートした。蛍光強度は、NOVOstar 装置 (BMG Labtech) を用いて Ex/Em = 540/590 nm で測定した。蛍光強度は細胞数に対して直線的 ($R^2 = 0.998$) であった。検出限界は 60 細胞/ウェル ($n=6$)。

Cytotoxicity Assays:

細胞毒性アッセイは、化合物ライブラリーの細胞毒性をスクリーニングするために広く使用されています。細胞膜の完全性を評価することは、細胞生存率と細胞毒性効果を測定する最も一般的な方法の 1 つです。トリパンプルーやヨウ化プロピジウムなどの生体染色色素は、通常、健康な細胞内からは排除されます。しかし、細胞膜が損なわれている場合、これらの色素は自由に細胞膜を通過し、細胞内成分を染色します。また、膜の完全性は、通常は細胞内に隔離されている物質の外部への通過をモニタリングすることによって評価することもできます。乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) もよく利用されており、かなり安定した酵素であるため、組織や細胞の損傷の有無や毒性の評価に広く利用されています。

細胞毒性は、酸化還元指示薬を使用して観察することもできます。生細胞は MTS 試薬を還元して着色したホルマザン生成物を生成します。また、蛍光色素であるレザズリンを用いた酸化還元に基づくアッセイも開発されています。細胞の生存率をモニターするために酸化還元電位を示す色素を使用することに加えて、生存率のマーカーとして ATP 含有量を使用するアッセイもご紹介します。このような ATP ベースのアッセイには、ATP をルシフェラーゼ反応の限界試薬とする生物発光アッセイが含まれます。

表 4.3 細胞毒性アッセイ

品番	品名	包装	Ex (nm)	Em (nm)	希望販売価格
22780	Cell Meter™ Colorimetric Cell Cytotoxicity Assay Kit	1,000 tests	575	N/A	¥46,000
22781	Cell Meter™ Fluorimetric Cell Cytotoxicity Assay Kit	1,000 tests	571	585	¥46,000
21610	PhosphoWorks™ Luminometric ATP Assay Kit *Bright Glow*	1 plate	N/A	560	¥34,000
21612	PhosphoWorks™ Luminometric ATP Assay Kit *DTT-Free*	1 plate	N/A	560	¥34,000



取扱店

お願い / 注意事項 記載の社名・商品名等の名称は、弊社または各社の商標または登録商標です。

希望販売価格 記載の希望販売価格は 2023 年 9 月 1 日現在の価格で、予告なく改定される場合があります。また、「希望販売価格」「キャンペーン中の参考価格」は参考価格であり、販売店様からの実際の販売価格ではございません。ご注文の際には販売店様へご確認くださいませますようお願い申し上げます。表示価格に消費税は含まれておりません。

使用範囲 記載の商品およびサービスは全て、「研究用」です。人や動物の医療用・臨床診断用・食品用等としては使用しないよう、十分ご注意ください。

<https://www.cosmobio.co.jp/>



人と科学のステキな未来へ

コスモ・バイオ株式会社

— 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

— 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

本社所在地 〒135-0016 東京都江東区東陽 2-2-20 東陽駅前ビル