

Product Information

PKH67 Green Fluorescent Cell Linker Kit

一般的な細胞膜標識用

製品番号 MINI67, MIDI67, PKH67GL

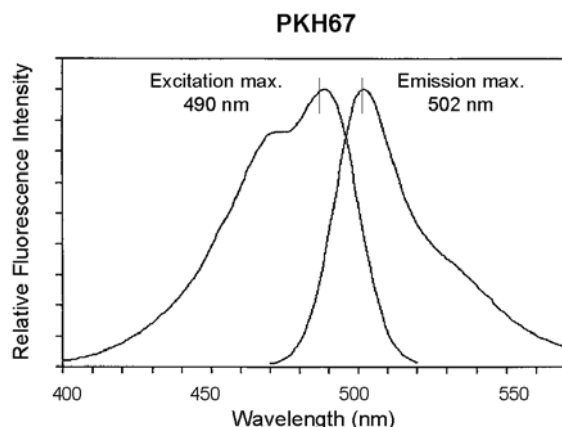
室温保管

TECHNICAL BULLETIN (使用説明書)

製品概要

PKH67 蛍光細胞リンカーキットは、特許の膜標識技術を用い、長鎖脂肪族末端を持つ緑色の蛍光色素(PKH67)を細胞膜の脂質領域に安定に組み込みます¹。本キットに付属する標識媒体 (Diluent C) は、細胞生存性を維持するように作られた水溶液であると同時に、標識中に色素の溶解性と染色効率を最大に高めるように作られています。Diluent C は界面活性剤や有機溶媒を含まない哺乳動物細胞用の等張液ですが、生理的塩およびバッファーを含んでいません。標識する細胞のタイプや標識後に起こる膜内部移行による拡散の影響によって、標識されたラベルは非常に強く光る状態から点状やまだら状など不均一な状態になることがあります²⁻⁵。しかし、PKH67 の蛍光は生理的範囲内の pH には依存せず、細胞毎の蛍光強度は色素の局在パターンに通常影響を受けません⁴。

図 1. PKH67 励起・発光スペクトル



PKH67 は、緑色蛍光細胞リンカー色素 (図 1) で、*in vitro* および *in vivo* 細胞トラッキングについて以前述べられた他の 2 種類の緑色色素である PKH1 および PKH2 よりも長い脂肪族炭素末端を持っています^{4,5}。長い末端長から予測されるように、自社研究では、PKH67 の細胞間移動は PKH2 に比べて減少することが一貫して示されています⁶。PKH67 を PKH26 の代わりに使用すると、シングルレーザーシステムにおいて、ヨウ化プロピジウム、7-アミノアクチノマイシン D などの生別判定プローブ、あるいは R-フィコエリトリンなどのその他のオレンジ-赤色蛍光を用いた T 細胞や NK 細胞の

細胞毒性のアッセイに必要な色素補正の量が大幅に減少します⁷⁻¹¹。また、PKH67 は細胞増殖のモニターや前駆細胞頻度の評価によく用いられ¹²⁻¹⁴、細胞-細胞膜移動輸送のモニターにも有用であることが示され^{15,16}、エキソソーム取り込み¹⁷、抗原提示¹⁶⁻¹⁸、および *in vivo* 細胞輸送研究¹⁹⁻²¹ にも使用されています。

PKH1 および PKH2 を用いた *in vivo* 研究では、ゆっくりとした蛍光の消失が観察されています^{22, 23}。この挙動は緑色細胞リンカー色素に特徴的ですが、赤色細胞リンカー色素には特徴的でないことから、PKH67 も同様の性質を示すと考えられ、非分裂細胞における *in vitro* 細胞膜保持率と *in vivo* 蛍光半減期との相関から、PKH67 の *in vivo* 蛍光半減期が 10-12 日であることが予測されます²⁴。これは PKH1 と PKH2 の *in vivo* における半減期と同様で、PKH1 と PKH2 は *in vivo* におけるリンパ球およびマクロファージ輸送を 1~2 ヶ月間のモニターすることに成功しています^{22, 23}。従って、PKH67 は緑色の細胞結合色素が必要な中短期での *in vivo* 研究のほか、*in vitro* の細胞毒性、細胞増殖、抗体提示やその他の共培養アッセイにもお勧めです⁷⁻²¹。また、長期間の *in vivo* 研究を必要とされる場合は、非常に安定的な蛍光性のある細胞リンカー色素 PKH26 を選択肢として考慮することができます。

構成

	PKH Dye※ (P7333)	Diluent C (G8278)
MINI67	1 × 0.1 mL	1 × 10 mL
MIDI67	2 × 0.1 mL	6 × 10 mL
PKH67GL	1 × 0.5 mL	6 × 10 mL

※1×10⁻³ M エタノール溶液

MINI67 キットは少量の実験や予備実験に、MIDI67 キットは *in vitro* の細胞増殖や細胞毒性研究に、PKH67GL キットは *in vivo* 研究にお勧めです。

本キット以外に必要な器具および試薬など

- 組織培養液で均一に懸濁した単一の細胞懸濁液
- 血清を含む組織培養液
- Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、血清を含まない組織培養液または緩衝塩溶液（ダルベッコ PBS、ハンクス BSS など）
- 血清、アルブミン、またはシステムに適合するその他のタンパク質
- ポリプロピレン製コニカル遠心チューブ（4～15 mL）
- 温度コントロールできる遠心機（0～1,000 x g）
- 蛍光分析用装置（蛍光プレートリーダー、蛍光顕微鏡が共焦点蛍光顕微鏡、フローサイトメーターなど）
- 層流フード
- 血球計算盤または細胞計数器
- スライドとカバースリップ

ご使用前の注意と免責事項

弊社の製品は試験研究用のみを目的として販売されています。医薬品、家庭用その他試験研究以外の用途には使用できません。危険性や安全な取り扱いに関しては化学物質安全データシート (MSDS) をご覧ください。

保存/安定性

PKH67 色素エタノール溶液（製品番号 P7333）は室温または冷蔵で保存します。蒸発による色素の濃縮を防ぐため、短時間で使用し、使用時以外は色素エタノール溶液のキャップをしっかりと締めて下さい。色素溶液は必ず直射日光を避け、使用直前に結晶が生じていないことを観察します。結晶が見られる場合、37 °C のウォーターバスで少し温め、超音波処理やボルテックスによって結晶を再溶解させます。

Diluent C は室温または冷蔵で保存します。冷蔵する場合は、細胞と色素の懸濁液を準備（手順 A5）する前に室温に戻して下さい。Diluent C は無菌溶液として販売しています。保存料や抗菌剤を含まないため、無菌状態で保管してください。Diluent C で希釈する色素の使用溶液は、使用直前に調製します。色素を Diluent C に希釈したまま保存しないで下さい。

手順

A. 一般的な細胞膜標識

標識は脂溶性の色素が細胞膜に入り込むことで起こります。標識強度は色素濃度と細胞濃度の両方が作用し、飽和反応ではありません。そのため、組み込みに利用できる色素の量を制限することが必要です。細胞を過剰に標識すると、膜が不完全になり、細胞の回復率が減少する可能性があります。

以下の手順によって、*in vitro* や *ex vivo* で幹細胞、リンパ球、単核球、内皮細胞、その他の細胞タイプに対して細胞膜の脂質領域に標識することができます。また、*in vivo* での標識

により適した別の方法が用いられることもあります²⁷⁻²⁹。血小板（またはリポソーム）標識にもこれを改変した手順が必要とされます²。

モノクローナル抗体の染色をする場合、細胞の標識を必ず先に行ってください。この細胞追跡プローブは 4°C のモノクロー抗体染色中に安定です。もし抗体標識に続けて常温で細胞標識を行ってしまうと、モノクローナル抗体のキャッピングが起こりやすくなります。

以下の手順に示す細胞と色素の濃度は開始時の濃度を表しています。これはさまざまな細胞の種類に幅広く適用されています。染色後の細胞生存性（ヨウ化プロピジウム排除など）、蛍光強度、染色の均一性や、目的とする細胞機能が失われていないか評価するため、細胞の種類や実験目的に応じて、最適な色素濃度と細胞濃度を決定する必要があります^{4, 25}。

注意: PKH67 による染色と同時にアジ化物や代謝毒は用いないで下さい。

以下の手順は、最終的に染色時の容量が 2 mL、最終濃度として PKH67 色素が 2×10^{-6} M、細胞が 1×10^7 個/mL となります。

1. 最適な結果を得るため、付着細胞または結合細胞は染色前にタンパク分解性酵素（トリプシン/EDTA など）を用いて剥がし、単一の細胞の懸濁液にします。
注意: 付着細胞は接着したままでも標識は可能ですが、細胞を懸濁液にしたほうがより均一な染色が得られます。

以下すべての手順は常温（20～25°C）で行って下さい。

2. 懸濁した約 2×10^7 個の単一細胞をポリプロピレン製コニカルチューブに入れ、血清を含まない培養液で 1 回洗います。
注意: 血清のタンパク質と脂質も色素に結合するため、細胞膜標識に利用できる色素濃度が減少します。従って、最良の結果を得るために、Diluent C による懸濁（ステップ 5）の前に、血清を含まない培地かバッファーで一度洗浄すること（ステップ 2）が重要です。
3. 細胞を 5 分間遠心（400 x g）し、緩いペレット状にします。
注意: PKH67 色素エタノール溶液を細胞ペレットに直接添加しないで下さい。細胞生存性が低下します。
4. 細胞の遠心後、細胞を取り除かないように注意しながら、25 μL 以上の上清が残らないよう上清を吸引します。
注意: 再現性のある結果を得るため、培地またはバッファーの残存量を最小限にして、次の Diluent C による細胞の懸濁を行うことが重要です。
5. 細胞ペレットに Diluent C（製品番号 G8278）を 1 mL 加え、細胞を穏やかなピペティングによって完全に分

散させて懸濁させます。これが 2x 細胞懸濁液です。**ボルテックスは行わないで下さい。Diluent C 中に細胞を長時間置かないで下さい。**

注意：生理的塩が存在すると色素はミセルを形成し、染色効率が低下します。そのため、Diluent C で懸濁しているときに培地や緩衝塩溶液を加えないようにすることが重要です。

6. ポリプロピレン遠心チューブに 1 mL の Diluent C を入れ、染色の直前に、4 μ L の PKH67 色素エタノール溶液（製品番号 P7333）を添加し、拡散するようによく混ぜます。これが 2x 色素使用溶液 (4×10^{-6} M) です。

注意：細胞生存性に対するエタノールの影響を最小限に抑えるため、ステップ 6 で加える色素量はステップ 7 完了時のエタノール濃度が 1~2% 以下になるようにして下さい。

最終色素濃度を 2×10^{-6} M 未満で使用する場合は、再現性の高い結果を得るために、PKH67 色素エタノール溶液を 100% エタノールで希釈して色素ストック溶液を用意します。

7. ステップ 6 で調製した 2x 色素使用溶液 1 mL に 2x 細胞 1 mL (ステップ 5) を素早く加え、**直ちに**サンプルをピペティングによって混合します。混合後の最終濃度は細胞が 1×10^7 cells/mL、PKH67 色素が 2×10^{-6} M になります。激しい混合やボルテックスは行わないで下さい。**注意：**染色は即座に起こります。従って、**均一に標識するために、細胞と色素を迅速で一様に混合することが重要です。**望ましい結果を得るヒントとして、以下の注意点が知られています。

- 2x 細胞懸濁液 (ステップ 5) と 2x 色素使用溶液 (ステップ 6) を等量混ぜます。Diluent C による 2x 細胞懸濁液に PKH67 色素エタノール性溶液を直接添加しないで下さい。
- 染色の際、2x 細胞と 2x 色素は少なすぎず (<100 μ L)、多すぎない (>5 mL) ように調節して下さい。
- 細胞と色素の混合にはピペットマンか同等の器具を用いて下さい。血清ピペットは遅いため均一性の低い結果になります。
- 細胞と色素の両方とも分注する量と濃度をできるだけ正確にすることで、サンプル間や実験間で再現性が得られやすくなります。

生存性低下を最小限にするため、望ましい染色強度を得るために必要とされる最小限の時間で細胞を色素溶液および Diluent C にさらします。Diluent C は生理的塩を含まないため、細胞の種類によっては長時間の接触で生存性の低下が起こります。希釈液のみによるコントロールや色素ではなくエタノールを用いた擬似染色コントロールで、疑わしい影響を確かめることもあります。

8. ステップ 7 の細胞/色素懸濁液を 2~5 分間インキュベートし、定期的にチューブを穏やかに混合して下さい。長時間の染色は細胞をより明るく染色します。

注意：染色反応の停止前に、細胞を Diluent C 中で遠心しないで下さい。

9. 血清または適合するタンパク質溶液 (1% BSA など) を等量 (2 mL) 加えて染色反応を停止させ、1 分間インキュベートすることで余剰の色素が結合しないようにします。

Diluent C で希釈しないで下さい。

注意：血清が推奨されます。

10. 細胞を $400 \times g$ で 10 分間、25 $^{\circ}$ C で遠心し、細胞を取らないように注意深く上清を取り除きます。チューブ表面に付着して残存する色素の持ち越しを最小限にするため、細胞ペレットを 10 mL の完全培地 (血清含む) で再懸濁し、滅菌した新しいコニカルプロピレンチューブに移し、 $400 \times g$ で 5 分間、25 $^{\circ}$ C で遠心して洗浄します。この 10 mL の完全培地による細胞ペレットの洗浄をさらに 2 回以上行い、結合していない色素を完全に除去して下さい。

注意：血清タンパク質やアルブミンが停止溶液と洗浄溶液に入っていることで洗浄の効率が上がります。染色後、最初の懸濁液を新しいチューブに移すことも効率向上につながります。洗浄に Diluent C を用いないで下さい。

11. 最後の洗浄後、細胞ペレットに完全培地 10 mL を加えて懸濁し、細胞数をカウントして生存性を確認します。細胞の回復と生存性を確認後、遠心と再懸濁によって細胞を望ましい濃度 にします。

注意：染色した細胞は 2% パラホルムアルデヒドで固定することができ、サンプルを遮光して保管した場合、蛍光強度は 3 週間安定です。

染色したサンプルは細胞回復、細胞生存性、蛍光強度を確認する必要があります (図 2)。一般的にバックグラウンド自己蛍光の 100~1,000 倍の明るさです。染色した CV は細胞のタイプによって異なりますが、蛍光強度の分布はできるだけシンメトリックで均一であることが望まれます。

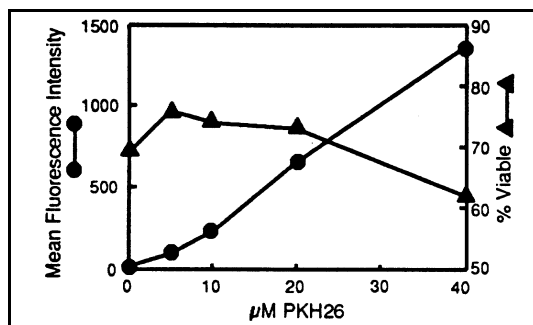


図 2. PKH 色素の染色最適化

PKH67 染色濃度は、PKH26 と同様の方法を用いて最適化できます。MC-38 TIL は、PKH26 色素の指定濃度で染色し、最終濃度は 1×10^7 個/mL としました。生存性(▲)はトリパンプブルー排除で測定し、平均蛍光強度(●)はフローサイトメトリーヒストグラムで測定しました。

American Association for Cancer Research の許可を得て転載。
出典: Cancer Research, 53, 2360 (1993)

B. 組織染色

PKH26 で標識した組織内の脂肪細胞を標準的なパラフィン包埋切片による観察の成功が確認されています²⁶。この方法は有機溶媒を用いるため、細胞脂質と脂溶性色素が部分的から完全に溶解するリスクがあります⁴。

従って、脂溶性の膜色素で標識した細胞を含む組織の組織学的研究には、組織学的な対比染色で見られる色素の吸収による蛍光の消光を避けるためにも、凍結連続切片がより一般的に用いられます²⁵。単一の切片でイメージングを行う場合には、対比染色を行う前に蛍光顕微鏡による観察を行ってください。

以下の手法は Pittsburgh Cancer Institute の Drs. Per Basse と Ronald H. Goldfarb によって PKH26 色素での使用を目的として開発されましたが、PKH67 で標識した細胞を含む組織にも利用できると考えられます。

凍結切片の蛍光イメージング:

1. 切片化する組織を切除し、直ちにドライアイスで凍結します。
2. 切片化前に組織を -70°C で保存します。
3. 凍結組織を O.C.T. 化合物 (Tissue-Tek; Miles, Inc.) もしくは同等品を用いてマウントします。
4. 組織切片を作製します。
5. スライドを室温で 1 時間以上自然乾燥します。
6. シアノアクリレートエステルグルーを 1~2 滴用いて、カバースリップをマウントします。(以下のブランドのシアノアクリレートエステルグルーを使用して、良好な結果が得られています: Elmer's Wonder Bond, Archer Instant Bonding Adhesive, Bondo Super Glue, Duro

Super Glue, Scotch Instant Glue and Instant Krazy Glue)

7. 適切なフィルター設定 (PKH67 には FITC など) を用いて、切片を分析または撮影します。

切片の対比染色:

1. スライドをアセトンに 24~48 時間浸してカバースリップを取り除きます。
2. スライドを蒸留水で洗い、アセトンを除去します。
3. 色素を選択して切片を対比染色します。Mayer's や Harris ヘマトキシリンで、良好な結果が得られています。
4. AS/AP 永久水性マウント培地 (Bio/Can America, Inc., Portland, ME) や同等品を用いてスライドをマウントします。

参考文献

1. Horan, P.K., and Slezak, S.E., Nature, 340, 167-168 (1989).
2. Horan, P.K. et al., Methods Cell Biol., 33, 469-490 (1990).
3. Poon, R.Y. et al., in: In Living Color: Flow Cytometry and Cell Sorting Protocols, Diamond, R. A., and DeMaggio, S., (eds.), Springer-Verlag, (New York, NY: 2000) p.302-352.
4. Wallace, P.K., and Muirhead, K.A., Immunol. Invest., 36, 527-562 (2007).
5. Rousselle, C. et al., In Vitro Cell. Dev. Biol. – Animal, 37, 646-655 (2001).
6. Unpublished data. Zynaxis, Inc. and Sigma-Aldrich, Inc.
7. Derby, E., et al., Immunol. Lett., 78, 35-39 (2001).
8. Fischer, K. et al., J. Immunol. Meth., 259, 159-169 (2002).
9. Mahajan, S.D. et al., Biol. Proced. Online, 5, 182-188 (2003).
10. Martinelli, E. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 104, 3396-3401 (2007).
11. Jenne, L. et al., Cancer Res., 60, 4446-4452 (2000).
12. Givan, A.L., Immunol Invest., 36, 563-580 (2007).
13. Schwaab, T. et al., Immunol Invest., 36, 649-664 (2007).
14. Waters, W.R., and Sacco, R., Immunol Invest., 36, 887-908 (2007).
15. Gertner-Dardenne, J. et al., Immunol. Invest., 36, 665-686 (2007).
16. Megjugorac, N. et al., Immunol. Invest., 36, 739-761 (2007).
17. Morelli, A.E. et al., Blood, 104, 3257-3266 (2004).
18. Dhodapkar, K.M. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 102, 2910-2915 (2005).
19. Ito, M. et al., Clin. Exper. Immunology, 141, 54-61 (2005).

20. Askenasy, N. et al., Immunol Invest., 36, 713-738 (2007).
21. Ledgerwood, L.G., Nature Immunol., 9, 42-53 (2008).
22. Melnicoff, M.J. et al., J. Leuk. Biol., 44, 367-375 (1988).
23. Teare, G. et al., Cell Immunol., 134, 157-170 (1990).
24. Unpublished data. Zynaxis, Inc.
25. Wallace, P.K. et al., Cancer Res., 53, 2358-2367 (1993).
26. Rieck, B., Cell Biol. Inter., 27, 445-447 (2003).
27. Mitchell, E.A., et al., Eur. J. Immunol., 28, 3086-3074 (1998).
28. Maus, U. et al., Am J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol., 280, L58-L68 (2001).
29. Albertine, K.H., and Gee, M.H.J., J. Leukoc. Biol., 59, 631-638 1996).

US 特許番号 5,665,328
Phanos Technologies 配布

KAA,MAM 05/09-1

Sigma ブランド製品は Sigma-Aldrich, Inc.を通じて販売されています。

Sigma-Aldrich, Inc.は同社製品がこの文書およびその他の Sigma-Aldrich 発行文書に含まれる情報に合致していることを保証します。お客様の個別の用途と製品の適合性についてはお客様にてご判断ください。掲載の品目、製品情報、価格などは予告なく変更される場合がございます。納品伝票または同梱の内容明細書の裏面をご覧ください。