

## Product Information

## PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit

一般的な細胞膜標識用

製品番号 PKH26GL

## TECHNICAL BULLETIN (使用説明書)

## 製品概要

PKH26GL 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 (PKH26) を持つ蛍光色素を細胞膜の脂質領域に安定に組み込みます<sup>1</sup>。本キットで提供される標識媒体 (Diluent C) は、等浸透圧性の水溶液で、生理的塩やバッファー、界面活性剤、有機溶媒を含まず、色素溶解度と染色効率を最大化する一方で細胞生存性を維持できるようにデザインされています。染色パターンは、標識される細胞の種類と細胞の膜によって異なります<sup>2,3</sup>。PKH26、赤色蛍光細胞リンカー (図 1) は、さまざまなシステムにおいて特徴が明らかにされ、*in vitro* および *ex vivo* 細胞標識<sup>2,3</sup>、*in vitro* 細胞増殖研究<sup>4,5</sup>、*in vitro* および *in vivo* 細胞トラッキングに有用であることが明らかになっています<sup>2-8</sup>。

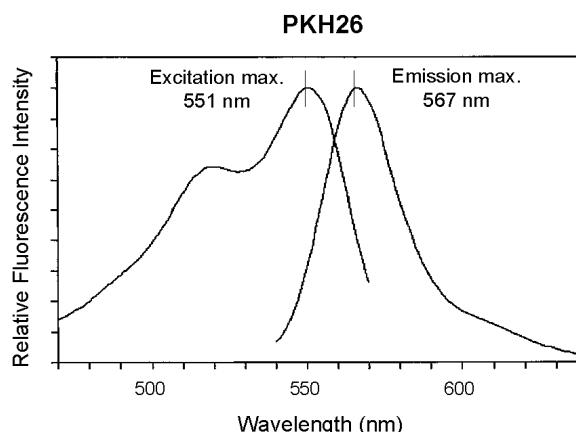
## 構成

- PKH26 Cell Linker in ethanol 0.5 mL  
1 × 10<sup>-3</sup> M エタノール溶液  
(製品番号 P9691)
- Diluent C 6 × 10 mL  
(製品番号 CGLDIL)

## 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
- 血清を含まない組織培養液または Dulbecco's PBS (Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>を含まない)
- 血清、アルブミン、またはシステムに適合する他のタンパク質源
- ポリプロピレン製コニカル遠心チューブ
- 温度コントロールできる遠心機 (0~1,000 × g)
- 蛍光分析用装置 (蛍光測定器、蛍光顕微鏡、フローサイトメーター、または蛍光画像分析装置)
- 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

図 1 PKH26 の励起・発光スペクトル



## 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) をご覧下さい。

## 保存/安定性

- Dye stock は室温または冷蔵で遮光保存し、使用前に結晶の有無を調べます。Dye stock に結晶が認められれば、37 °C のウォーターバスで軽く温め、超音波処理して結晶を再溶解します。色素はエタノールに溶解されているので、蒸発を防ぐため、Dye stock をすぐに使用しないときは**しっかりと蓋をして下さい**。
- Diluent C は室温または冷蔵で保存します。ただし、保存料や抗菌剤を含まないため、無菌状態のまま保存して下さい。
- 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 で希釈したまま保存しないで下さい。

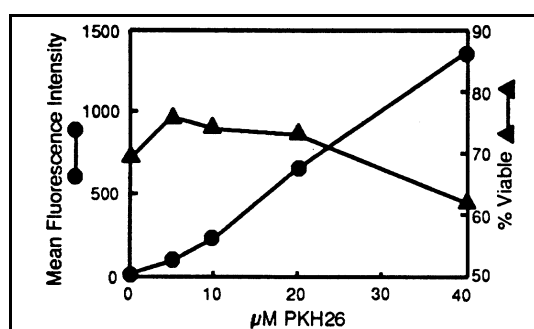
## 手順

### 一般的な細胞膜標識

標識された細胞の外観は、明るく均一に標識されたものから点状でまばらな外観までさまざまです。標識は飽和反応ではなく、色素と細胞濃度の両方が作用するため、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、膜が不完全になったり、細胞の回復率が減少したりする可能性があります。

この手順で示すサンプルの細胞と色素の濃度は、さまざまな細胞の種類に幅広く適用できる濃度です。細胞 1 個あたりの蛍光を最大化するため、細胞の種類や実験目的に応じて、最適な色素/細胞濃度を決定する必要があります (図 2 参照)。また、細胞生存性 (例: ヨウ化プロピジウム排除)、蛍光強度、蛍光ピークの変動係数、染色の均一性を評価する必要があります<sup>9</sup>。

図 2. PKH 色素の染色最適化



MC-38 TIL は、PKH26 色素の指定濃度で染色し、最終濃度は  $1 \times 10^7$  個/mL としました。生存性 (▲) はトリパン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)

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* 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<sup>7,8,10</sup>。血小板標識にもこれを改変した手順が必要とされます<sup>2</sup>。

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℃ のモノクローナル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りやすくなります。

**注意:** PKH26 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 PKH26 色素が  $2 \times 10^{-6}$  M、細胞が  $1 \times 10^7$  個/mL となります。無菌的な状態で実験を進めて下さい。

1. 接着細胞または結合細胞はタンパク分解性酵素 (トリプシン/EDTA など) を用いて始めに取り剥がし、単一の細胞の懸濁液にします。

**注意:** 均一な染色を得るために単一の細胞懸濁液を用いることが重要です。

2. 以下すべての手順を 25℃ で行います。計約  $2 \times 10^7$  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 ( $400 \times g$ ) し、緩いペレット状にします。

**注意:** PKH26 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、ペレットに 25 μL 以上の上清が残らないよう上清を慎重に吸引します。

**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 CGLDIL) を 1 mL 加え、細胞を穏やかなピペッ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、色素を添加する際に Diluent C で懸濁しているとき、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、**染色直前**に 4 μL の PKH26 色素エタノール溶液 (製品番号 P9691) 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 ( $4 \times 10^{-6}$  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  $2 \times 10^{-6}$  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、PKH26 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 細胞懸濁液 1 mL (ステップ 5) を素早く加え、**直ちに**サンプルをピペッ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  $1 \times 10^7$  cells/mL、PKH26 色素が  $2 \times 10^{-6}$  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 PKH26 色素エタノール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  $\mu$ 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、望ましい染色強度が得られるの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：染色反応を停止する前に、Diluent C 中の細胞を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. 血清で停止させたサンプルを等量の完全培地で希釈します。Diluent C を**使用しない**で下さい。
11. 細胞を  $400 \times g$  で 10 分間、25 °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 °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。

洗浄ステップで Diluent C を用いないで下さい。

12. 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。

蛍光顕微鏡、フローサイトメトリー、または蛍光画像分析を用いて細胞を調べます。染色サンプルは細胞回復率、細胞生存性、蛍光強度を確認する必要があります。染色は均一になり、一般的に明るさはバックグラウンドの自己蛍光の 100~1,000 倍です。

#### 組織染色

PKH 標識細胞を含むスライドの作製と保存には、凍結した組織切片と特殊なマウント技術が必要です。Drs. Per Basse と Ronald H. Goldfarb (Pittsburgh Cancer Institute, Pittsburgh, PA) は、PKH 蛍光細胞リンカー色素での使用を目的として、以下の手法を開発しました。

凍結切片の蛍光イメージング：

- 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。
- 切断前に組織を -70 °C で保存します。
- 凍結組織を O.C.T. 化合物 (Tissue-Tek; Miles, Inc.) を用いてマウントします。
- 4~5 ミクロンの組織切片を作製します。

5. スライドを室温で1時間以上自然乾燥させます。
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 Crazy Glue)
7. FITC (PKH2、PKH67) または TRITC (PKH26) に対する標準的なフィルター設定を用いて、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外します。
2. スライドを蒸留水でリンスし、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 ヘマトキシリンを用いて、良好な結果が得られています。
4. AS/AP 永久水性マウント液 (Bio/Can America, Inc., Portland, ME) を用いてスライドをマウントします。

注意: 有機溶媒は PKH 色素を抽出し、対比染色は蛍光を吸収する可能性があるため、PKH 蛍光細胞リンカー色素と組織染色の同時解析は実行されていません。連続する切片を用いるか、単一の切片を用いる場合は脱マウントするか、または対比染色前に蛍光顕微鏡による観察を実施します。

#### 参考文献

1. Horan, P. and Slezak, S., 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., DeMaggio, S. eds.). New York: Springer-Verlag, p. 302-352 (2000).
4. Batard, P. et al., J. Cell Sci., **113**, 383-390 (2000).
5. Givan, A.L., et al., J. Immunol. Meth., **230**, 99-112 (1999).
6. Lee-MacAry, A.E., et al., J. Immunol. Meth. **252**, 83-92 (2001).
7. Mitchell, E.A. Eur. J. Immunol., **28**, 3066-3074 (1998).
8. Maus, U., et al., Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol., **280**, L58-68 (2001).
9. Wallace, P.K., et al., Cancer Res., **53**, 2358-2367 (1993).
10. Albertine, K.H., Gee, M.H. J. Leukoc. Biol., **59**, 631-638 (1996).

AH,PHC 08/10-1

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下さい。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。