

IncuCyte を用いた細胞傷害解析

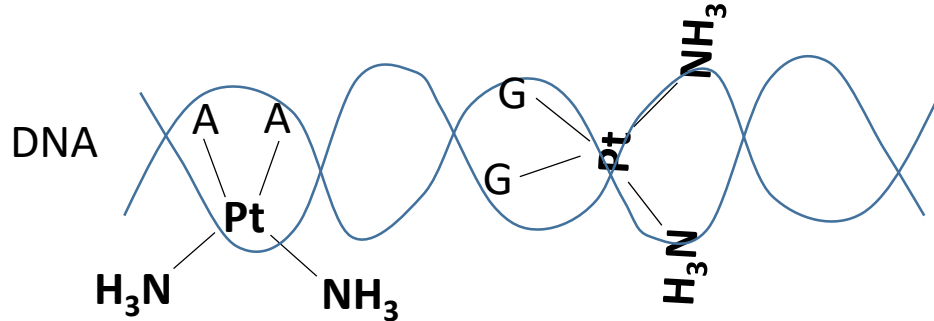
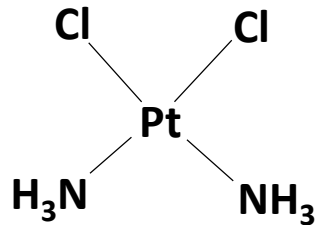
口腔癌(舌癌)由来細胞株 HSC-3 のシスプラチンによる細胞死の解析

1. シスプラチンの作用機序とカスパーゼの活性化
2. 細胞死(アポトーシス)に伴うカスパーゼの活性化
3. 細胞内カスパーゼ活性化検出用試薬 (IncuCyte caspase3/7) によるカスパーゼ活性化検出原理
4. 本日の実習手順

研究創出支援センター/高度研究機器部門

鈴木 進

シスプラチンの作用機序とカスパーゼの活性化



シスプラチン

[Cisplatin (CDDP)]

CDDP;

cis-diamminedichloro-platinum

シス-ジアミンジクロロ白金

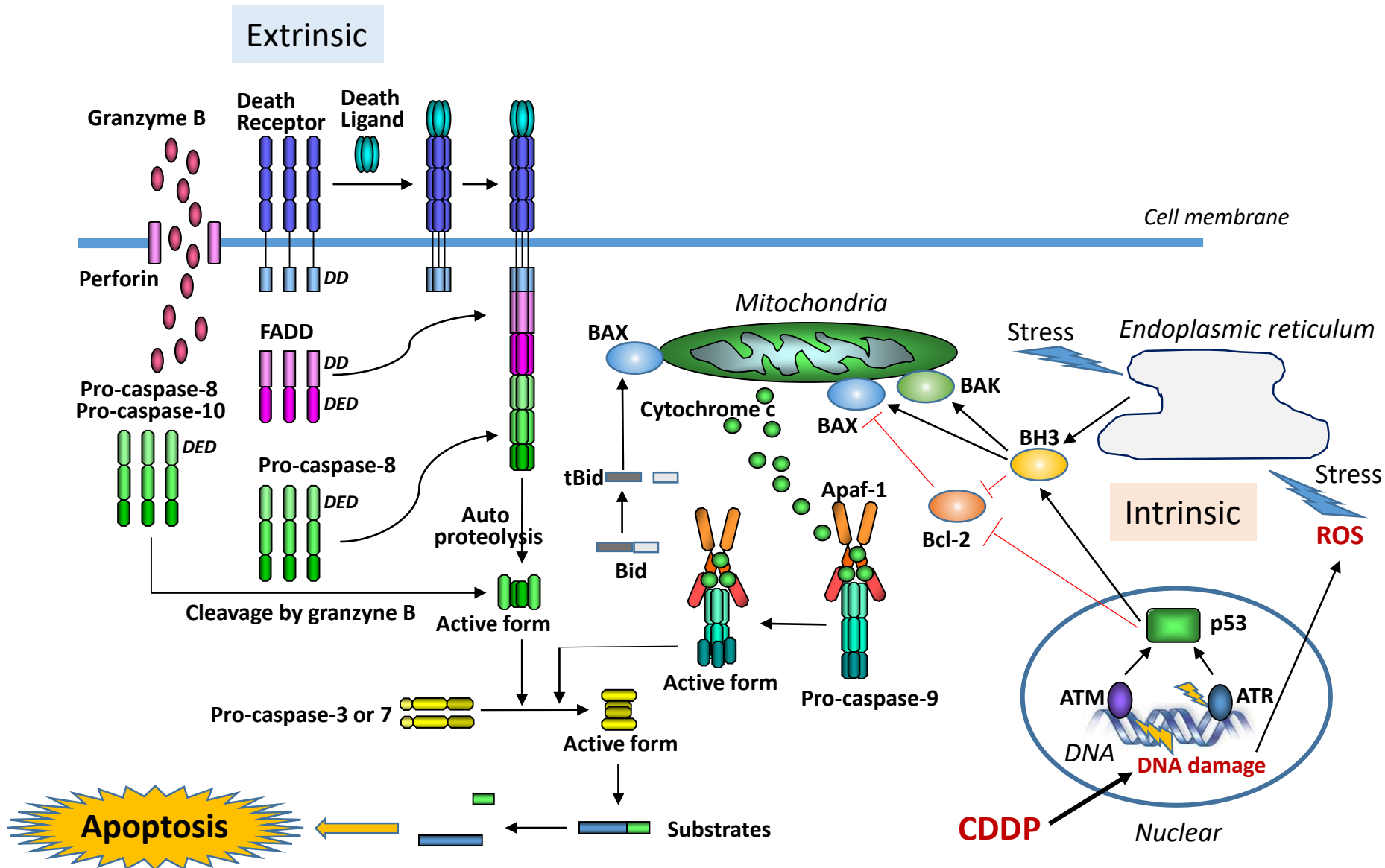
DNA二重らせんを架橋し、DNAの複製を阻害する

Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) の活性化に伴い活性酸素の産生を亢進する

カスパーゼの活性化

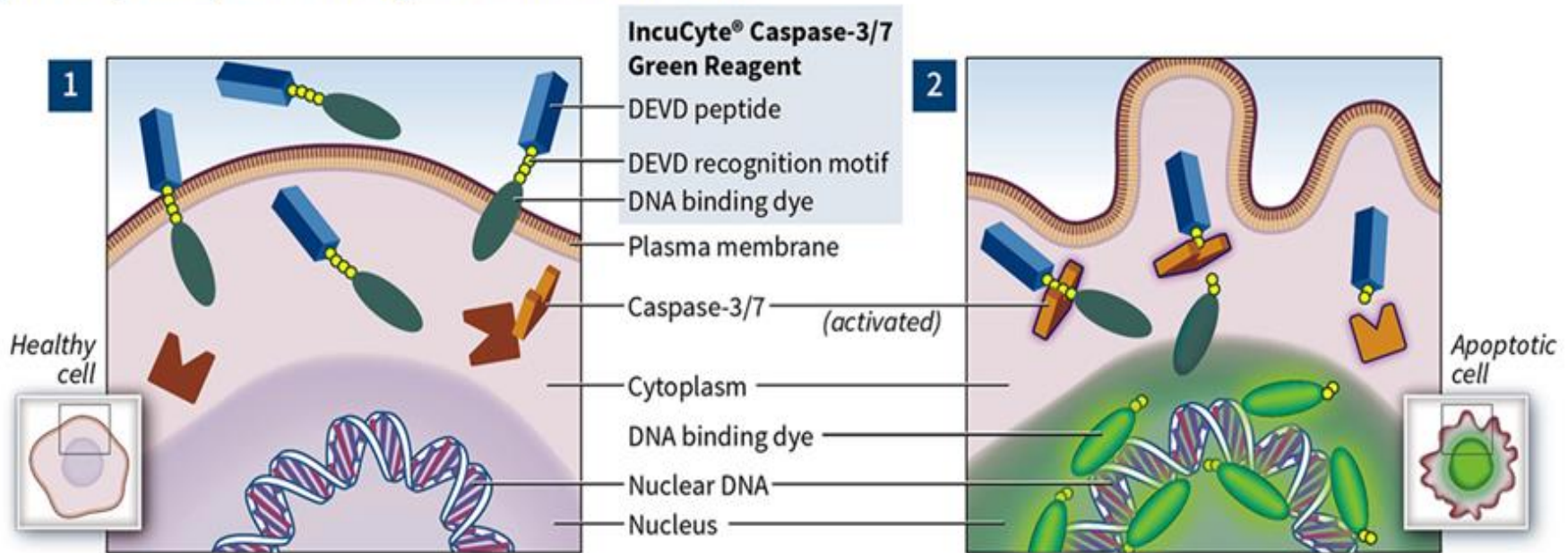
細胞死(アポトーシス)

細胞死(アポトーシス)に伴うカスパーゼの活性化



IncuCyte® Caspase-3/7 Green Apoptosis Assay Reagent によるカスパーゼ活性化検出原理

IncuCyte® Caspase-3/7 Green Reagent Overview Schematic



IncuCyte™ Caspase-3/7 Green Reagent Added to Media

No fluorescence in the presence of healthy cells. The Caspase-3/7 Reagent freely crosses the cell membrane and is non-fluorescent and non-DNA binding.

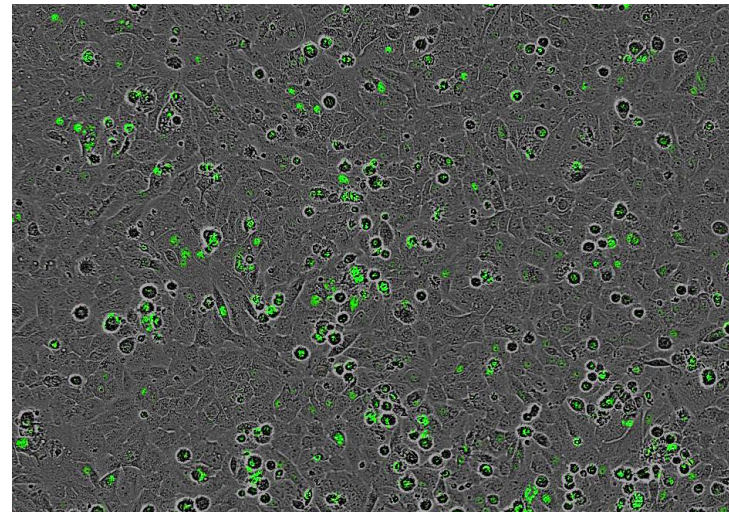
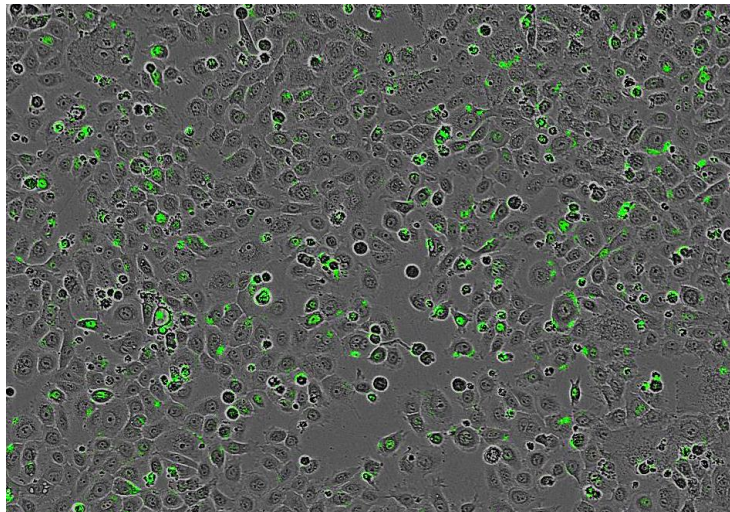
Apoptotic Cell Death and Caspase-3/7 Cleavage

Activated caspase-3/7 cleaves the Caspase-3/7 Green Reagent at the DEVD recognition motif, releasing a DNA binding dye that fluorescently labels the nuclear DNA of apoptotic cells.

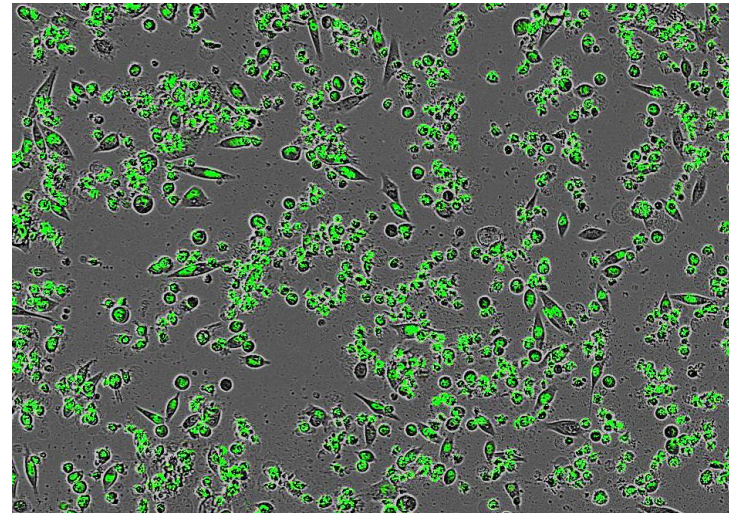
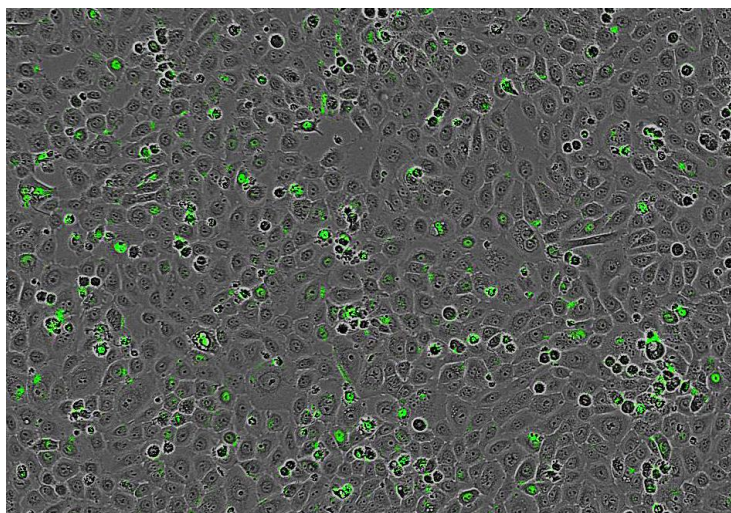
0 hr.

72 hr.

CDDP
(0 μ M)



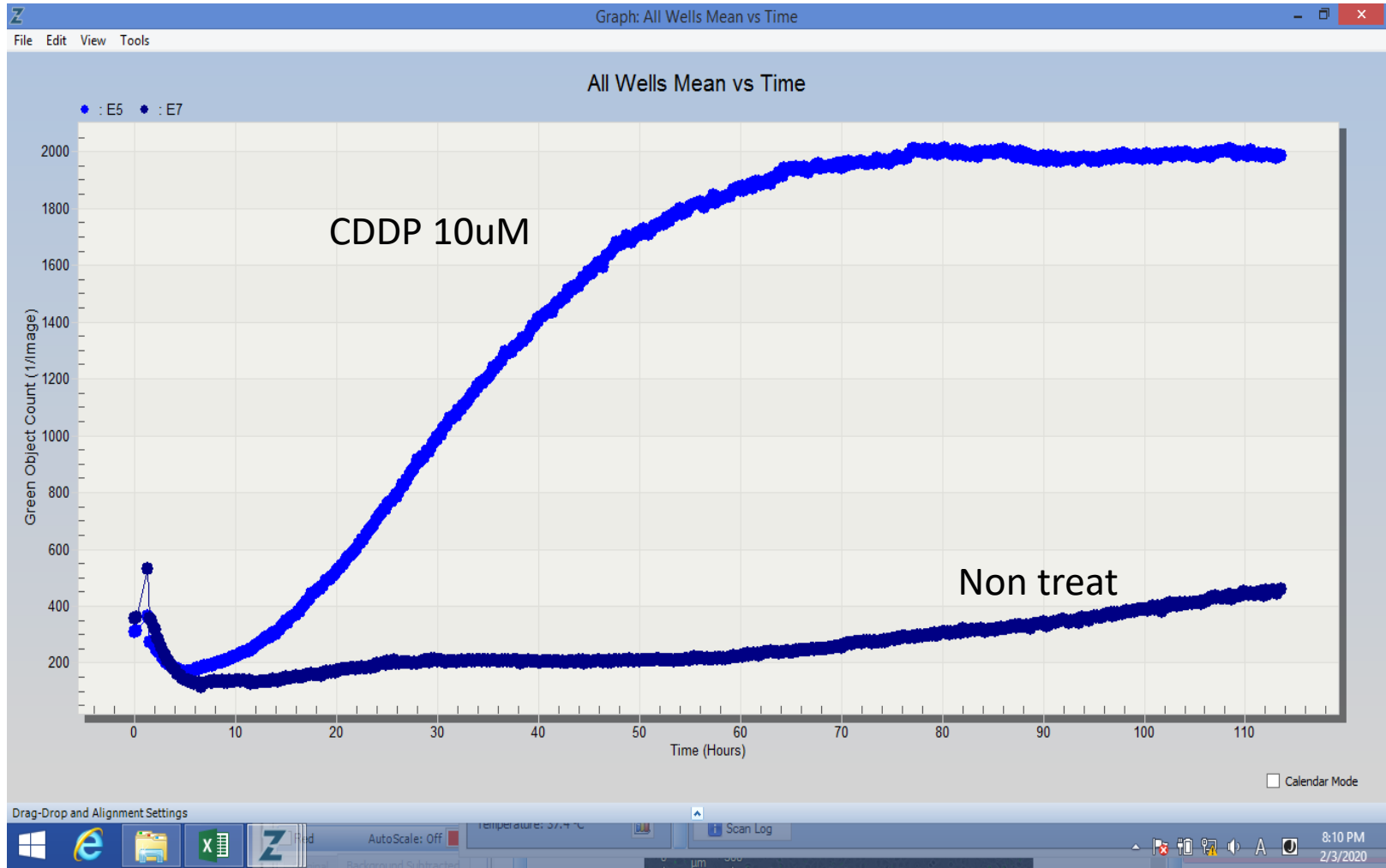
CDDP
(10 μ M)



HSC-3 (舌癌由来細胞株)

IncuCyte を用いたアポトーシス細胞数の経時的測定

Green Object Count

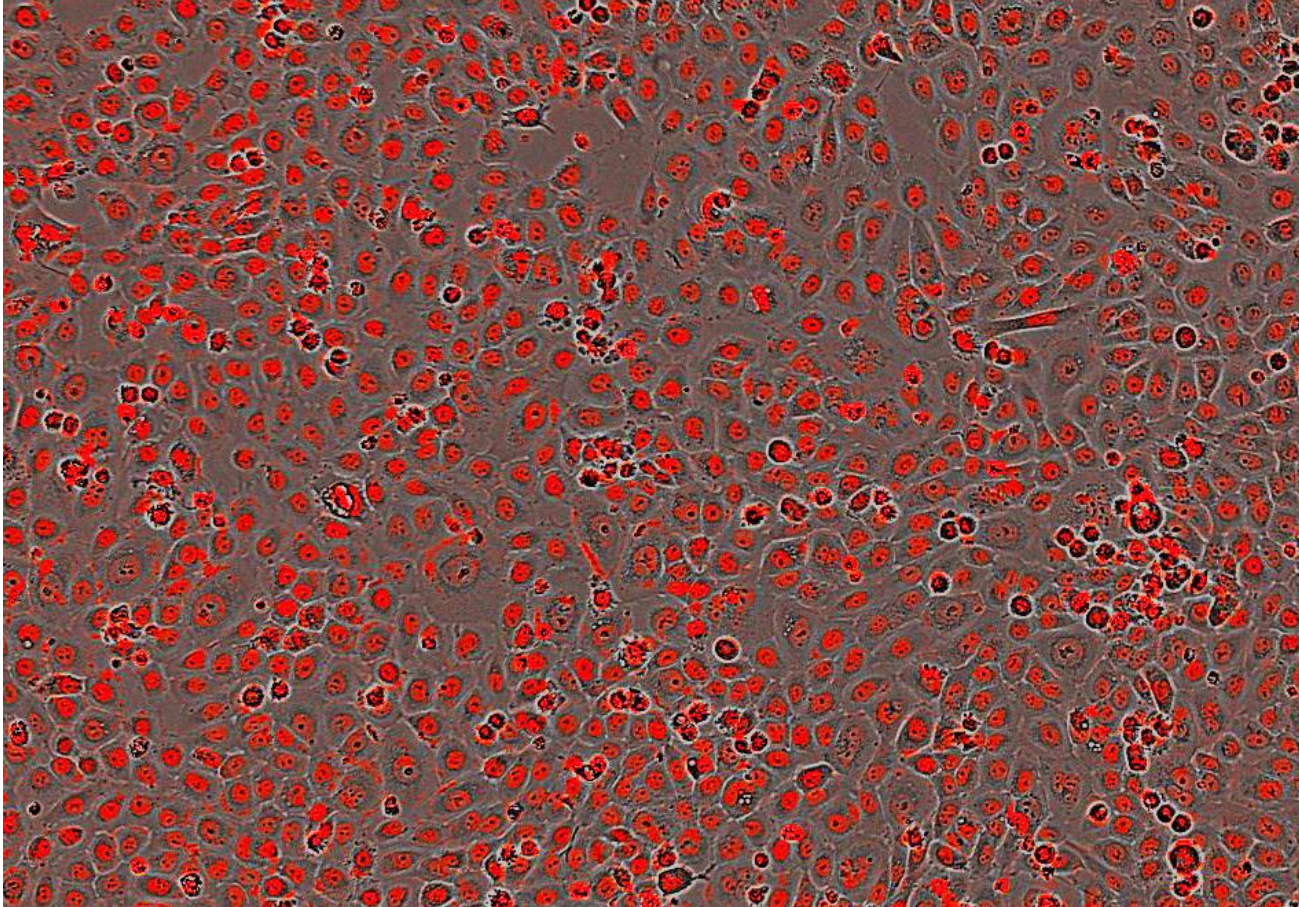


Time (hours)

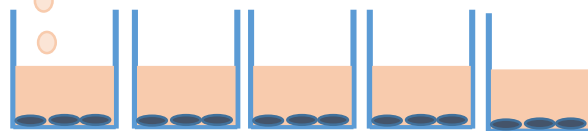
本日の実習手順

1. HSC-3 (舌癌由来細胞株) にレンチウイルスベクターで TOMATO (赤色蛍光蛋白) を強制発現させた HSC-3 TOMATO を 2×10^5 /ml in ALyS505N(10% FCS) に調製し、100 ul ずつ 96ウェルプレートに撒き、24時間培養する。
2. 50 ul ずつ培地を抜き、シスプラチンの入った培地 (0, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0 uM) を 50 ul ずつ加え、シスプラチンの終濃度が 1.25, 2.5, 5.0, 10.0 uM となるように調製する。
3. IncuCyte Caspase 3/7 試薬を 1 ul ずつ分注する。
4. Incucyte にプレートをセットし、撮影を開始する。
5. 3日間培養しながら10分おきに撮影し、細胞死をモニターする。
6. 3日後、細胞死を解析する。

HSC-3 TOMATO



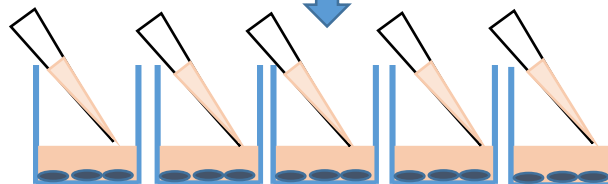
HSC-3 TOMATO ($2 \times 10^5/\text{ml}$) 100 μl



96ウェルプレート

50 μl removal

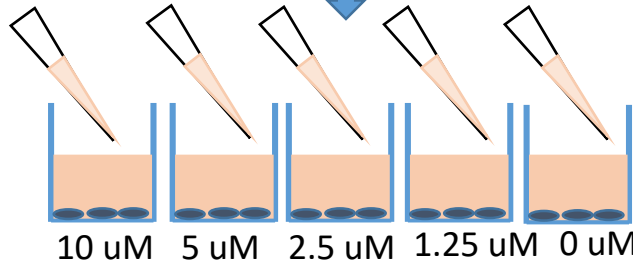
24 hr. incubation



20 μM 10 μM 5 μM 2.5 μM 0 μM

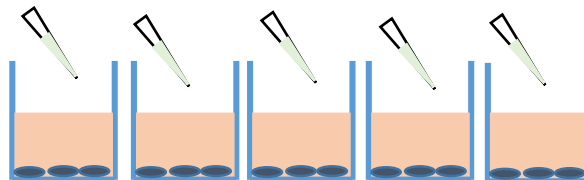
CDDP

50 μl removal add



IncuCyte Caspase 3/7

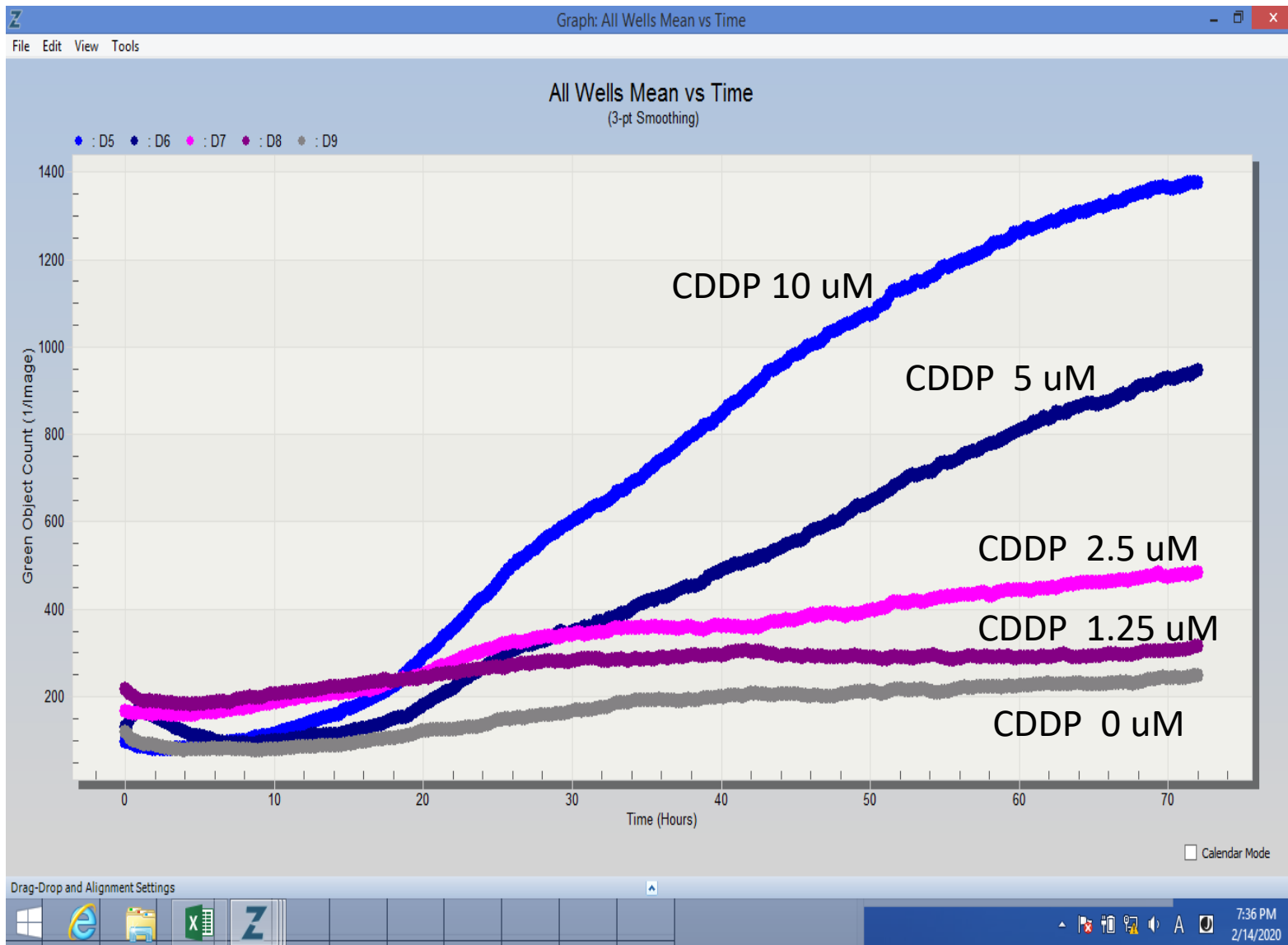
1 μl add



Incubation
with IncuCyte

実習時のデータ; 死細胞数(caspase3/7 活性)の推移

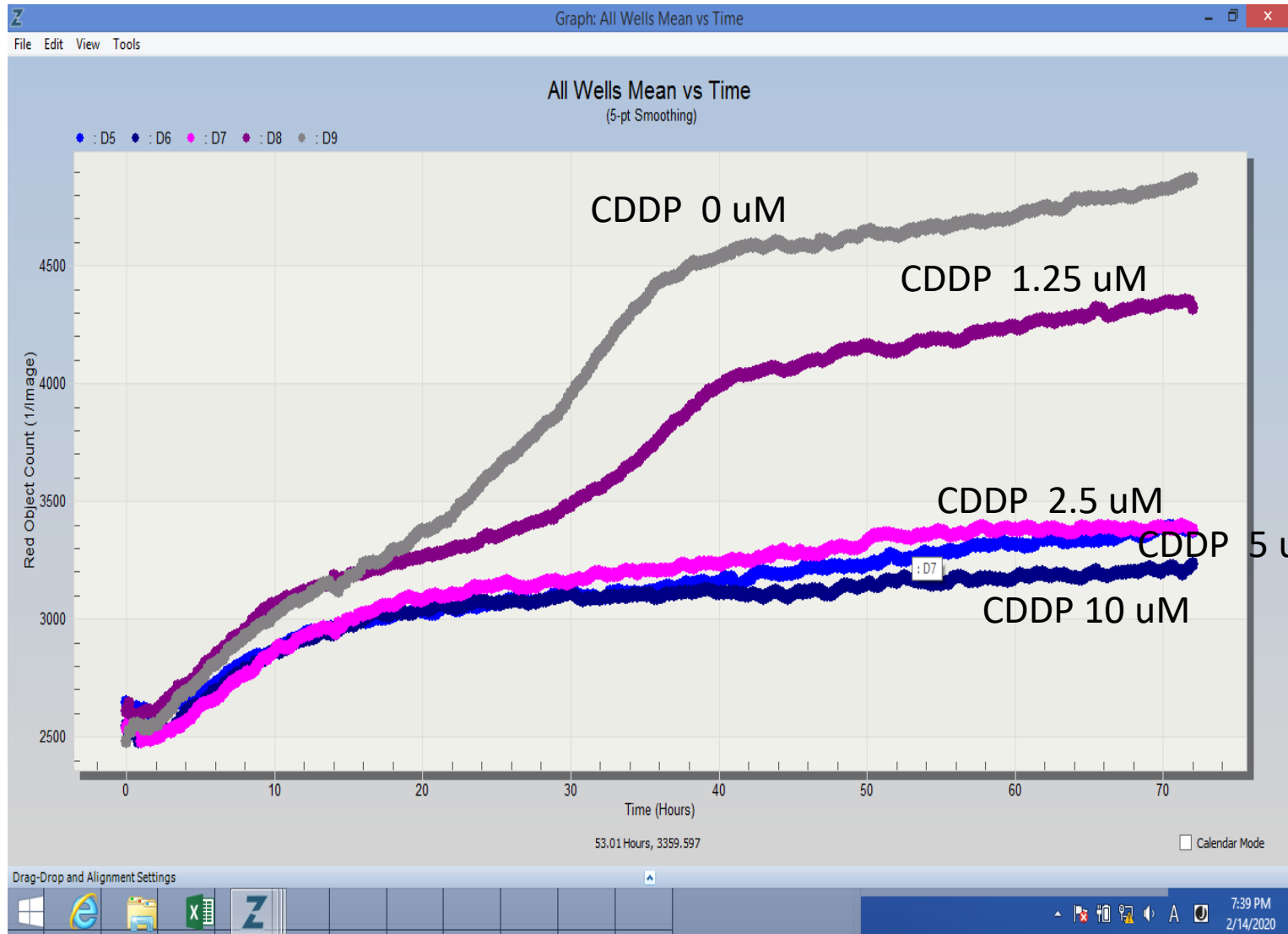
死細胞数 (green)



経過時間

実習時のデータ; 総細胞数 (TOMATO発現) の推移

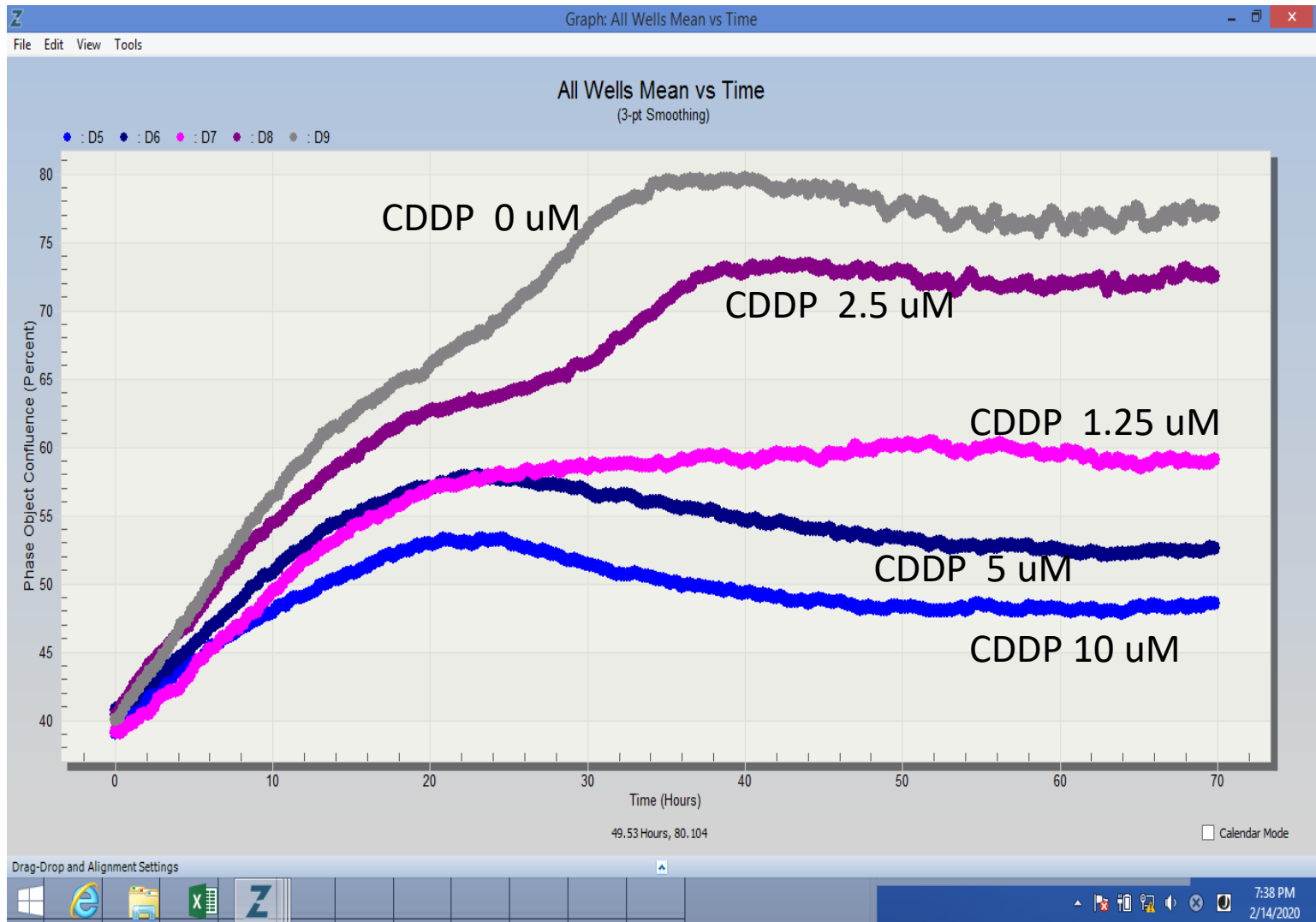
総細胞数 (Red)



経過時間

実習時のデータ;細胞占有率の推移

細胞占有率 (phase contrast)



経過時間