



Application

放射線照射によるiPS細胞等のDNA損傷応答の免疫蛍光観察 (核内における修復タンパク質のフォーカス形成の観察)

製品名

マイクロスライド イビトリート
 μ -slide 8well, ibiTreat, sterilized (ib80826)

メーカー名

イビディ
ibidi 社

下記フィードバックは、東京工業大学 科学技術創成研究院 先端原子力研究所 島田 幹男様の御厚意により掲載させていただきました。ここに深く感謝申し上げます。

実験概要

電離放射線は細胞内のゲノムDNAに損傷を引き起こす。特にDNA二本鎖切断は細胞死に至る重篤な損傷であるが、ほとんどの生物ではこれらを修復するDNA二本鎖切断修復機構と呼ばれている分子機構が備わっている。DNA二本鎖切断修復機構は多くのタンパク質によって複雑に制御されている上、細胞腫によっても異なる活性を持つ。本実験では幹細胞におけるDNA二本鎖切断修復機構を解析するためにヒトiPS細胞を用いて免疫染色法によりDNA修復タンパクの損傷部位への集積を検討した。

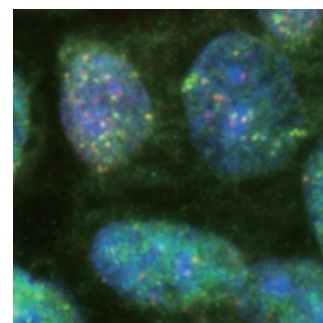
今回はiPS細胞など3種類のヒト培養細胞を用い、主要なDNA損傷応答タンパク質である53BP1および γ H2AXに対する免疫染色を実施し、核内における修復タンパク質のフォーカス形成の蛍光観察を行った。

実験材料

細胞名	: U2OS (ヒト骨肉腫細胞)、NB1RGB (ヒト新生児皮膚線維芽細胞)、NB1RGB C2 (NB1RGB由来iPS細胞)
顕微鏡・撮影装置	: IX-71 (オリンパス)
細胞培養容器	: ibidi μ -Slide 8 well コーティング ibiTreat (ib80826)
コーティング	: iMatrix511 (NB1RGB C2 (iPS細胞) の培養時)
培地 (組成)	: DMEM (ナカライテスク)+10% BCS (Hyclone) (U2OSおよびNB1RGBの培養時) NutriStem XF/FF (Stemgent) (NB1RGB C2 (iPS細胞) の培養時)
使用染色試薬および抗体	: DAPI (細胞核染色のため)、53BP1 1次抗体、 γ H2AX 1次抗体、その他

アッセイプロトコール

1. 細胞に γ 線0.5Gyを照射し、DNA損傷を誘発させる。
2. 放射線照射後30分後に以下の操作を開始する。
3. PBSで洗浄 2回
4. 4%PFA固定処理 室温10分
5. PBSで洗浄 2回
6. 0.5% Triton-X100/PBSで処理 4℃ 5分
7. PBSで洗浄 2回
8. 1%BSA/PBS-Tでブロッキング処理 室温30分
9. 1次抗体53BP1 (Bethyl rabbit polyclonal 1000倍希釈) γ H2AX (Merck Millipore mouse monoclonal 1000倍希釈) /1%BSA/PBS-T溶液で反応させる。室温4時間
10. PBS-Tで洗浄 3回
11. 2次抗体Alexa488 (rabbit) Alexa594 (mouse) 1000倍希釈およびDAPI/1%BSA/PBS-T溶液で反応させる。室温1時間
12. PBS-Tで洗浄 5回
13. PBSを加え、乾かないようにする。
14. 蛍光顕微鏡で観察と写真撮影。



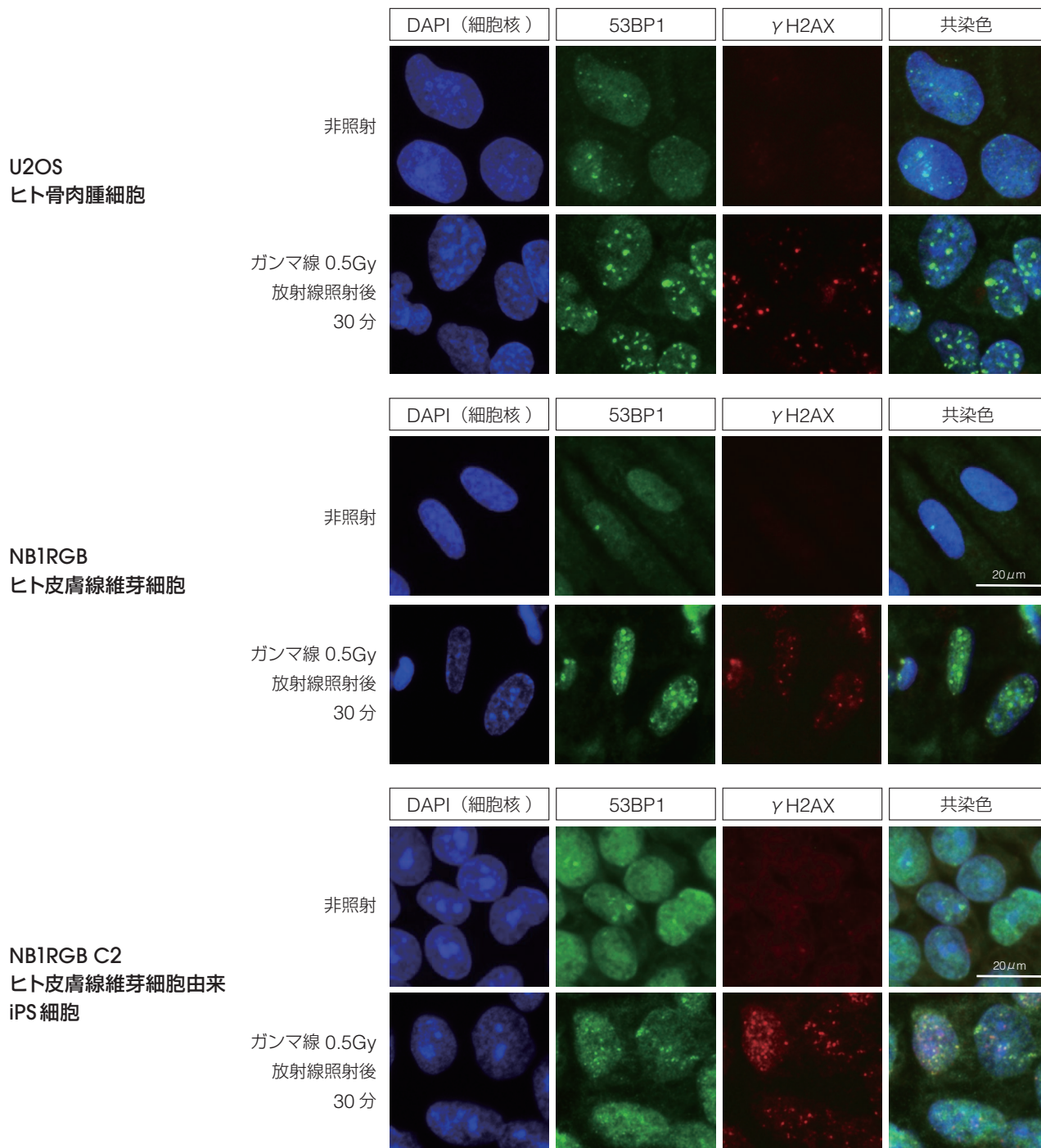
ibidi μ -Slide 8 well コーティング ibiTreat* (Cat No.ib80826)

- 一体成型なので液漏れがありません (解体は不可)
- 細胞を移し換えることなく免疫蛍光染色やFISHが可能
- Culture-Insertを使った、創傷治癒 (細胞間相互作用) 研究も可能
- ibidi社独自のプラスチックフィルムを使用 (ガラスと同等の光学性能、低い自家蛍光)
⇒ 倒立顕微鏡で底面側から直接観察可能



*細胞接着用親水化処理

結果データ



ヒト骨肉腫細胞 U2OS、ヒト皮膚線維芽細胞 NB1RGB、ヒト皮膚線維芽細胞由来 iPS 細胞 NB1RGB C2 いずれの細胞種においても放射線照射後に DNA 二本鎖切断マーカーである 53BP1 および γ H2AX のフォーカス形成が確認された。一方でネガティブコントロールとして実施した非照射の実験では 53BP1、 γ H2AX のフォーカスが形成されていない。また、 μ -slide 8 well ibiTreat を用いることにより通常のスライドガラスではフィーダーフリーの細胞培養が難しかった iPS 細胞でも鮮明な染色画像が得られた。



お客様のコメント

iPS細胞を用いて免疫染色実験を行いたかったが、通常のスライドガラスではコーティングを用いてもiPS細胞が接着しなかったので本製品を使用するきっかけとなった。本製品は細胞接着性も非常によく免疫染色し、蛍光顕微鏡で観察した際も鮮明に見えるので素晴らしいと感じた。