

Apoptosis 연구 관련제품

Apoptosis Detection A to Z

아포토시스(apoptosis)란 개체의 생명 유지를 위해서 불필요한 세포 혹은 위험한 세포를 스스로 죽게 하도록 유전자를 개입시켜 제어된 메커니즘이다. 아포토시스는 세포의 발생, 분화, 면역 등의 생리학적 현상에 깊게 관련되고 있어 암 세포의 발생 과정, 약제나 방사선에 의한 암세포 처리 과정 및 분화 유도 과정에 중요하며, 암 치료의 연구 분야에서도 매우 주목받고 있다. 여기서는 Takara Bio 및 Clontech에서 개발한 아포토시스 해석 관련 제품들을 검출 방법별로 소개한다.

■ 현미경 관찰이나 flow cytometry에 의한 검출

***in situ* Apoptosis Detection Kit 및 ApoAlert™ DNA Fragmentation Assay Kit**
 아포토시스(apoptosis)를 일으킨 세포의 특징 중 하나는 핵 DNA의 단편화이며, 상기 제품은 단편화된 핵 DNA를 검출하는 방법을 채택한 것이다. 상기 제품은 TUNEL 법(Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling)을 이용하여 단편화된 DNA의 3' -OH 말단에 fluorescein-dUTP를 결합시킨 후 fluorescein으로 표지한 DNA를 형광 현미경 또는 flow cytometry에 의해 검출한다. 또, *in situ* Apoptosis Detection Kit에 포함되는 HRP 표지 FITC 항체를 이용하는 것으로 광학 현미경으로의 검출도 가능하다.

in situ Apoptosis Detection Kit에는 컨트롤용으로 랫트 유선 조직(파라핀 포매 절편)의 Control Slide가 포함되어 있다. 본 키트를 이용한 검출예를 그림 2에 나타내었다.

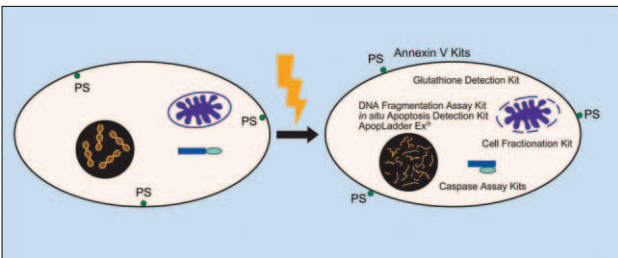
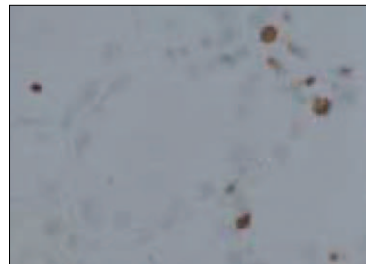


그림 1. 아포토시스(apoptosis) cascade의 여러가지 단계에서 아포토시스 해석

① 포르말린 고정 · 파라핀 절편에서 검출(DAB 염색)
 샘플 : 랫트 유선 Control Slide (대 20배)



② 세포에서 형광 검출
 샘플 : Anti - Fas 첨가 8시간 후의 U937 세포

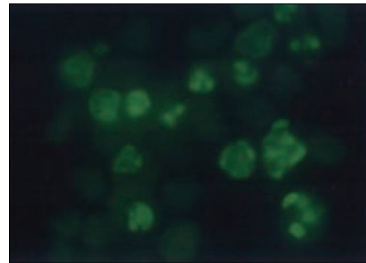


그림 2. *in situ* Apoptosis Detection Kit를 이용한 검출예

ApoAlert™ Bid Vectors : pDsRed2-Bid

아포토시스가 유도되면 통상 세포질내에 존재하고 있는 Bid(Bcl-2 패밀리에 속하는 22 kDa의 아포토시스 유도 단백질)가 즉시 미토콘드리아로 이동해 cytochrome C의 방출을 촉진한다. 본 제품은 Bid와 형광단백질 DsRed2가 융합단백질로 코딩되어 있어, 배양 세포에 도입해 아포토시스 유도제를 처리하면 DsRed2-Bid가 미토콘드리아의 표면으로 이동하는 모습을 살아있는 세포에서 형광 현미경으로 직접 관찰할 수 있다. Bid 의존성 아포토시스 경로에 관여하는 아포토시스 유도제의 검토에 유효하다. 또, 다른 재조합 벡터와 함께 세포에 도입하고, 다른 단백질이나 단백질 도메인과의 관련성을 추적하는 것도 가능하다.

ApoAlert™ Annexin V-FITC Apoptosis Kit

아포토시스의 유도 직후에 일어나는 phosphatidylserine(PS)의 세포막 안쪽(세포질)으로부터 세포막 외측(세포 표면)으로의 이동을 검출한다. PS가 세포막 외면에 드러나면 PS에 강한 특이적 친화성을 나타내는 표지 Annexin V의 결합이 가능하게 되어, 간단하게 아포토시스 세포를 염색할 수 있다. 본 제품은 접착세포 및 부유세포 양쪽 모두 살아있는 세포에 염색해 형광 현미경을 이용한 관찰이나 flow cytometry에 의한 검출이 가능하다.

■ 전기영동으로 검출

ApopLadder Ex®

아포토시스를 일으킨 세포의 핵내에서는 nucleosome 단위로 chromosomal DNA가 절단되는 것이 알려져 있다. 본 제품은 특수한 계면활성제를 포함한 Lysis buffer, 효소 시약, DNA 침전제, Loading buffer로 구성되어 있고, 단편화된 DNA를 배양 세포로부터 선택적으로 추출할 수 있다(에탄올 침전 처리까지 2.5시간 소요). 본 제품을 사용하면 해석의 방해가 되는 intact chromatin의 혼입을 최소화하여 고감도의 DNA ladder 검출이 가능하다. 또, ApopLadder Ex® 와 형광 색소(GelStar® ; TaKaRa Code 50535, SYBR® Green I ; TaKaRa Code 50512, 50513)을 조합하면 단편화 DNA의 정량도 가능하다.

■ Western blot

ApoAlert™ Cell Fractionation Kit

아포토시스가 유도되면 세포질(cytosol) 내에 존재하고 있는 Bid가 즉시 미토콘드리아로 이동하고, 미토콘드리아 내막과 외막의 사이에 국재하는 cytochrome C를 세포질로 방출한다. 본 제품은 미토콘드리아에서 방출된 cytochrome C가 세포질 분획에 존재하는지를 쉽게 검출할 수 있다. 초원심 분리 없이 일반적인 2회의 원심 조작으로 간편하게 세포질에서 고농도 미토콘드리아 분획을 분리한 후, cytochrome C 항체를 이용한 western blot에 의해 미토콘드리아로부터 cytochrome C의 방출 유무를 판정해, 아포토시스에 미토콘드리아의 관여를 검출할 수 있다.

■ 형광 광도계에 의한 검출

ApoAlert™ Caspase Assay Kits

대부분의 caspase(Caspase ; Cystein-aspartic acid-protease)는 아포토시스의 유도에 관여하는 cascade형 cysteine protease이며, 활성 부위의 cysteine 잔기를 이용하여 기질 단백질의 aspartic acid 잔기 부위를 절단한다. Initiator caspase (Caspase-8, Caspase-9 등)는 아포토시스 초기에 관여되어 있어 시그널 전달 경로의 상류로부터 개시 시그널을 받아 활성화된다. 불활성형의 effector caspase(Caspase-3 등)는 initiator caspase 등에 의해 활성화되어 세포내의 다른 단백질을 분해하고 아포토시스로 진행한다.

본 제품은 cell lysate를 더하는 것만으로 형광을 이용해 caspase · protease 활성을 간편하게 검출할 수 있는 편리한 키트이다. 비색 검출(colorimetric method)을 할 수 있는 색소 타입도 있다.

ApoAlert™ Caspase Profiling Plate

아포토시스가 유도되면 복수의 caspase가 활성화된다. 본 제품은 미리 특정의 caspase에 특이적인 형광 기질이 96well plate에 고정되고 있어 cell lysate를 well에 첨가하는 것만으로 신속히 caspase 활성을 평가할 수 있다.

ApoAlert™ Glutathione Detection Kit

배양 세포로의 아포토시스 초기의 지표인 cytosol 중의 glutathione 농도의 저하를 검출하는 정량 어세이 키트이다.

본 제품에서는 glutathione에 결합했을 때에 침색의 형광을 발하는 MCB(monochlorobimane) 색소를 사용하고 있어, 형광 광도계 또는 형광 플레이트 리더를 이용해 검출할 수 있다.

■ 그 외

Apoptosis cDNA Panels

다른 아포토시스 조건하의 유전자 발현을 신속히 스크리닝하기 위한 2 종류의 제품이 있다. 각각은 아포토시스 유도제로 처리한 세포로부터 얻을 수 있던 total RNA로부터 합성된 1st strand cDNA 세트이다. HeLa Apoptosis cDNA Panel은 iron chelator desferrioxamine 또는 TNF- α 를 처리한 세포에서 유래하는 cDNA가 포함되어 있고, MCF7 Apoptosis cDNA Panel은 dominant negative형 p53을 발현하는 MCF7 세포 또는 DNA 합성 저해제 doxorubicin으로 처리한 MCF7 세포로부터 유래한 cDNA가 포함되어 있다.

Human TNF- α

TNF 수용체와 상호작용하여 아포토시스를 유도한다.

Caspase Inhibitors

절단 반응을 받지 않는 caspase (ICE-family protease) 기질 아날로그의 합성 펩타이드로 세포 투과성을 갖고 있다.

PARP Monoclonal Antibody

Poly (ADP-ribose) polymerase(PARP)는 CPP32/caspase-3 (ICE-family protease)의 기질이다. PARP Monoclonal Antibody는 western blot 분석에서 PARP 절단을 검출하는데 사용할 수 있고, 초기 아포토시스에 대한 유용한 마커이다.

■ 관련제품

제품명	Size	TaKaRa Code
단편화 chromatin 검출		
<i>in situ</i> Apoptosis Detection Kit	20회	MK500
ApopLadder Ex [®]	24회	MK600
ApoAlert™ DNA Fragmentation Assay Kit	25회	630107
	100회	630108
Bid 단백질 형광 관찰		
ApoAlert™ Bid Vectors : pDsRed2-Bid	20 µg	632419
세포외 phosphatidylserine(PS) 검출		
ApoAlert™ Annexin V-FITC Apoptosis Kit	50회	630109
	200회	630110
ApoAlert™ Annexin V-FITC	500회	630201
ApoAlert™ 10 × Annexin V Binding Buffer	100 ml	630202
Caspase 활성 검출		
ApoAlert™ Caspase-3 Colorimetric Assay Kit	25회	630216
	100회	630217
ApoAlert™ Caspase-3 Fluorescent Assay Kit	25회	630214
	100회	630215
ApoAlert™ Caspase-8 Fluorescent Assay Kit	25회	630218
	100회	630219
ApoAlert™ Caspase-8 Colorimetric Assay Kit	25회	630220
	200회	630221
ApoAlert™ Caspase-9/6 Fluorescent Assay Kit	25회	630211
	100회	630212
ApoAlert™ Caspase-3 Assay Plate	1 plate	630223
	5 plates	630224

제품명	Size	TaKaRa Code
Caspase Profiling		
ApoAlert™ Caspase Profiling Plate	1 plate	630225
	5 plates	630226
Cytosol Glutathione 정량		
ApoAlert™ Glutathione Detection Kit	25회	630103
아포토시스 조건하에서 유전자 발현 스크리닝		
HeLa Apoptosis cDNA Panel	10회	636754
MCF7 Apoptosis cDNA Panel	10회	636755
Caspase 저해제		
ApoAlert™ Caspase Inhibitor, VAD-fmk(1 mM)	100 µl	630208
ApoAlert™ Caspase-1 Inhibitor, YVAD-cmk(1 mM)	100 µl	630205
ApoAlert™ Caspase-3 Inhibitor, DEVD-CHO(1 mM)	100 µl	630204
ApoAlert™ Caspase-3 Inhibitor, DEVD-fmk(1 mM)	100 µl	630207
ApoAlert™ Caspase-8 Inhibitor, IETD-fmk(1 mM)	100 µl	630209
아포토시스 유도제		
Human TNF-α	10 µg	630203
PARP 절단 검출		
PARP Monoclonal Antibody(IgG1, C-2-10)	50 µl	630210
미토콘드리아 분획 및 cytochrome C 검출		
ApoAlert™ Cell Fractionation Kit	100회	630105

※ License Notice : [21]