

## ALDEFLUOR 使用方法 (FAQ 付き)

注:本書は簡易マニュアルです。詳細については、製品に添付されている英文マニュアルを参照ください。

### キット内容 冷蔵 (2-8°C)

- Dry ALDEFLUOR reagent, 50  $\mu$ g 活性化試薬300  $\mu$ M
- Diethylaminobenzaldehyde (DEAB), 1.5 mM in 95% ethanol, 1mL ←揮発性高いため注意!
- 2N HCl, 1.5mL
- Dimethylsulphoxide (DMSO), 1.5mL
- ALDEFLUOR Assay Buffer, 4 bottles of 25 mL each
- ALDEFLUOR Quick Reference Guide

### 他に用意するもの

- 1-1000  $\mu$ L に対応するマイクロピペットとチップ
- フローサイトメーター用チューブ (12×75 mm、フタ付き)
- 低速遠心器 (250×g に対応するもの)
- 37°Cインキュベーター
- 赤血球溶血試薬 (界面活性剤、固定化剤等含まないもの) (#ST-07800)
- フローサイトメーター (↓必要なスペック)

励起波長 (アルゴンレーザー)	発光波長 (フィルター)	検出器 (BD、BC の場合)	使用している 蛍光色素
488 nm	515-545 nm	FL1 チャンネル	Bodipy

### 試薬プロトコル

試薬操作は、クリーンベンチの中で無菌下で行ってください。

#### 試薬の調整 (キットを最初に使用する時のみ行う)

1. 必要な物を準備し、キット試薬は使用前に室温 (18-22°C) に戻す。
2. ALDEFLUOR 試薬 (基質) の活性化:
  - a. 25  $\mu$ L の DMSO を乾燥 ALDEFLUOR 試薬のバイアルに加え、よく混合する。
  - b. 一分間室温で静置する。
  - c. 2N の HCl を 25  $\mu$ L 加えて、よく混合する。
  - d. この混合物を室温で 15 分間インキュベーションする (30 分を超えてはいけない)
3. 360  $\mu$ L の ALDEFLUOR Assay Buffer をバイアルに加え、混合する。  
注: Assay Buffer の添加により、溶液が少し濁るかもしれないがアッセイパフォーマンスに影響はない。
4. 使用中、活性化済み ALDEFLUOR 試薬は 2-8°C で保管する。

5. 残った活性化済み ALDEFLUOR 試薬は分注し、 $-20^{\circ}\text{C}$ 以下で冷凍保存する（1年間は安定）。

#### サンプルの調整

1. サンプルタイプ毎の標準手順に従い、フレッシュもしくは凍結サンプルを調整する。
2. 血液を含むサンプルの赤血球：白血球の比が2：1以上であるサンプルを使用する場合、界面活性剤もしくは固定液を含まない塩化アンモニウムバッファー溶液で溶血する。
3. 溶血後、サンプルを  $250 \times g$  で 5 分間遠心し、上清を取り除いたら、細胞を 1mL の ALDEFLUOR Assay Buffer で懸濁する。
4. セルカウントを行う（Ex. Trypan blue）。
5.  $1 \times 10^6$  cells / mL になるように Assay Buffer でサンプル濃度を調整する（方法については付録参照）。  
注：ヒト末梢血もしくはアフレーシスサンプルで本 ALDH assay を行うときは、最適な RBC：WBC 比は 2：1 以下とする。

#### ALDEFLUOR アッセイ

1. テストする個々のサンプルに対して、“Test”と“Control”とラベルしたチューブ（ $12 \times 75$  mm）を一本ずつ用意する。各 Test チューブに調整した細胞懸濁液をそれぞれ 1mL ずつ入れる。
2. 最初のサンプルから始める。
  - a.  $5 \mu\text{L}$  の DEAB 溶液を Control チューブに加える。Control チューブと DEAB バイアルはすぐ蓋をする。  
注：DEAB は 95%エタノールで供給されているので、揮発を防ぐため、すぐにキャップをしてください。
  - b. 細胞懸濁液 1 mL に対して  $5 \mu\text{L}$  の活性化済み ALDEFLUOR 試薬を最初のサンプルの Test チューブに加える。
  - c. 混合し、即座に 0.5mL（半量）を、相当する DEAB Control チューブに移す。  
注：ALDH 酵素反応は、細胞懸濁液に活性化済み ALDEFLUOR 試薬を添加するとすぐに始まります。一定量の ALDEFLUOR 反応細胞を DEAB Control チューブにも遅れることなく加えてください。
3. テストするそれぞれのサンプルに対して上記 step 2 を繰り返す。
4. Test サンプルと Control サンプルを  $37^{\circ}\text{C}$ 、30～60 分間インキュベートする。（60 分を超えないこと）  
注：ALDH assay に加えて、免疫染色による Immunophenotyping も行う場合、step 4 の後に抗体を加えてインキュベートする
5. インキュベーションに続いて、全てのチューブを  $250 \times g$  で 5 分間遠心分離し、上清を取り除く。細胞ペレットを 0.5mL の ALDEFLUOR Assay Buffer で懸濁する。

6. サンプルをすぐに解析しない場合、サンプルにキャップをし、氷上もしくは冷蔵庫内に置いておく。サンプルは 2-8°C で 24 時間安定である。反応サンプルを室温で保つ場合、測定は 2 時間以内に完了しなければならない。
7. フローサイトメーターを下記の方法に従ってセットアップし、それぞれサンプルのデータ測定をする。1 つのサンプルに対して少なくとも R1 を 100,00 event カウントする。

### フローサイトメーター測定

#### Acquisition Template の作成

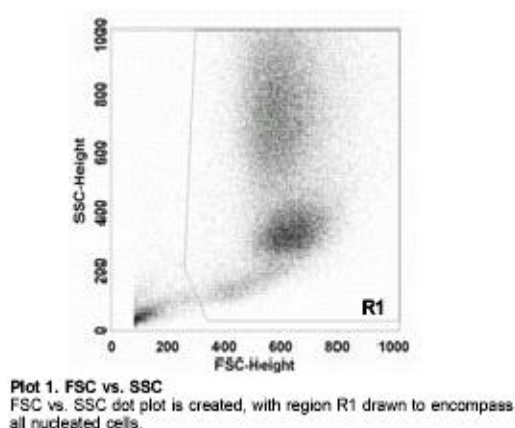
パラメーターの設定：

検出器	モード
FSC	Lin
SSC	Lin
FL1	Log

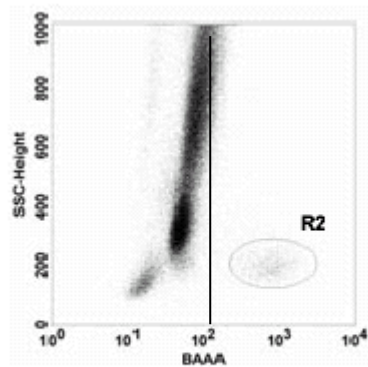
1. FSC/SSC ドットプロットを作成し、R1 を設定する。
2. FL1/SSC ドットプロットを作成し、R1 集団を展開する。

#### フローサイトメーターの設定と測定

1. Setup mode で DEAB control サンプルを流す。FSC/SSC ドットプロットで、FSC および SSC の Voltage または Gain を調整して、メインの集団が中央に来るようにし、有核細胞に R1 ゲートをかける (Plot.1 参照)。

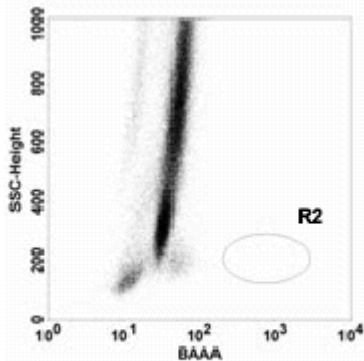


2. FL1/SSC ドットプロットで、FL1 チャンネルの PMT voltage を調整し、縦長の集団の右端が 10<sup>2</sup> の付近に来るように感度を設定する (Plot.2 参照)。設定できたらチューブを外す。



**Plot 2. FL1 vs. SSC with test sample**  
 FL1 vs. SSC dot plot gated on R1 is created. With test sample data, region 2 is drawn to include all ALDH<sup>+</sup>SSC<sup>+</sup> cells.

3. ALDH Test サンプルを流す。ALDH (BAAA) <sup>br</sup> SSC<sup>lo</sup> の細胞集団に R2 ゲートをかける（上記 Plot.2 参照）。
4. 実際のサンプル測定の際は、Setup mode を解除し、DEAB Control サンプル（Plot.3 参照）と ALDH Test サンプルのそれぞれにつき R1 を 100000 events 測定する（両者は必ず同じ設定で測定）。



**Plot 3. FL1 vs. SSC with DEAB sample**  
 FL1 vs. SSC dot plot gated on R1. R2 should be adjusted so that few or no events appear in the R2 region.

## データ解析

1. FSC/SSC ドットプロットを作成し、R1 を設定する。
2. FL1/SSC ドットプロットを 2 画面作成し、R1 集団を展開する。
3. FSC/SSC ドットプロットで ALDH Test サンプルのファイルを開き、R1 が有核細胞をきちんと囲むよう位置を調整する。
4. 1つ目の FL1/SSC ドットプロットで、ALDH<sup>br</sup> SSC<sup>lo</sup> の細胞集団に R2 を設定する。
5. 2つ目の FL1/SSC ドットプロットで、上記 ALDH Test サンプルとペアの DEAB Control サンプルのファイルを開き、R2 の位置が正しいか確認する。すなわち DEAB control サンプルでは、R2 内に細胞がないことを確認する。
6. プロット上に、% population など必要な数値を表示させる。

7. R2 の%が、ALDH<sup>br</sup> SSC<sup>lo</sup> の細胞集団となる。

## 付 録 1

1×10<sup>6</sup> cells/mL の細胞懸濁液を調整するための計算方法。

1. WBC と RBC をそれぞれカウントする。
2. もし、ヒト末梢血またはアフェレーシスのサンプルで、初回溶血後の WBC : RBC ratio が 2 : 1 より大きい場合は、再度溶血操作をしてから、カウントを行う。
3. トータルボリューム 1mL のケースを例に考える。
4. 必要な細胞懸濁液の μL 数 (A)  
= Cell concentration required (1×10<sup>6</sup> cells/mL) × 1000 / Current cell concentration
5. 必要なアッセイバッファの μL 数 = 1000 - A

### 【実際の計算例】

$$\text{WBC} = 17.2 \times 10^6$$

$$\text{必要な細胞懸濁液の } \mu\text{L 数 (A)} = 1 \times 10^6 / 17.2 \times 10^6 = 0.058 \times 1000 = \boxed{58 \mu\text{L}}$$

$$\text{必要なアッセイバッファの } \mu\text{L 数} = 1000 - 58 = \boxed{942 \mu\text{L}}$$

6. もともとのサンプル中の ALDH<sup>br</sup> SSC<sup>lo</sup> 細胞濃度 (cells/mL)  
= WBC × ALDH<sup>br</sup> SSC<sup>lo</sup> (R2) の%

## 付 録 2 (Immunophenotyping)

ALDEFLUOR アッセイは、免疫染色による Immunophenotyping も同時に行うことができます。

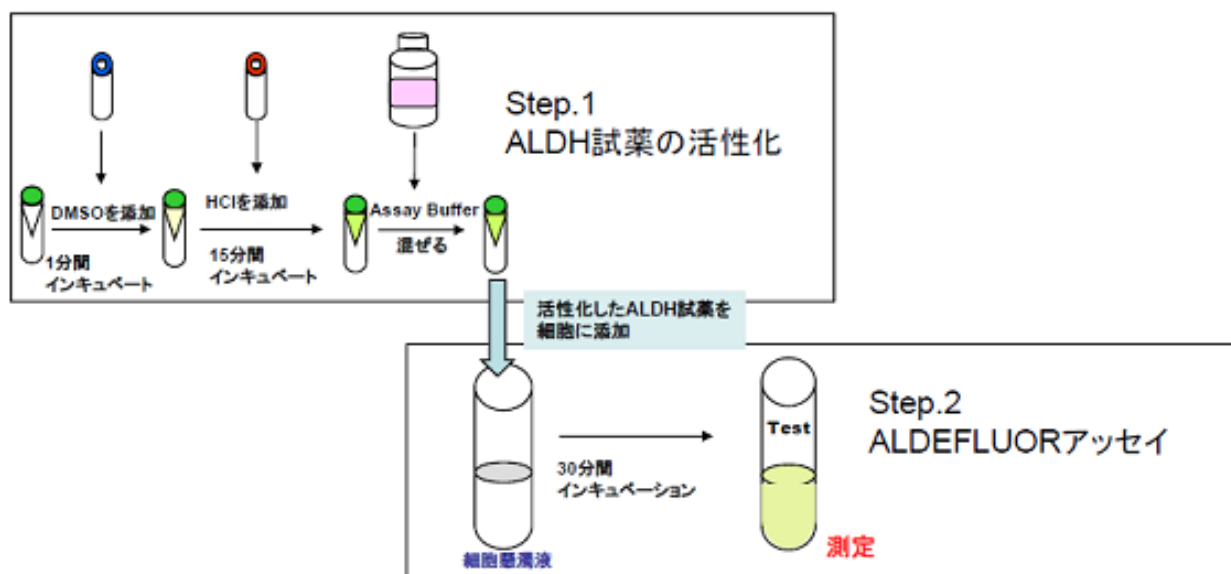
1. 細胞を ALDEFLUOR 試薬と反応させた後、その一部をとって標識抗体の入った別のチューブに加える。
2. 2-8°C で 15-30 分間インキュベートする。
3. DEAB Control チューブを含むすべてのチューブを 250×g で 5 分間遠心し、上清を除く。
4. ALDEFLUOR アッセイバッファ 0.5mL で細胞を懸濁し、「ALDEFLUOR アッセイ」の項の Step.6 に戻る。

Immunophenotyping は、ALDEFLUOR アッセイとは別のアッセイのため、別の適切なコントロールを実験に含める必要があります。しかし、ALDEFLUOR 陽性細胞は、蛍光バックグラウンドを確立するための対照 Control チューブにも含まれているはずではありません (詳細は、Technical Note TSB05 をご参照ください)。

### 付 録 3 (その他 Tip)

- ALDEFLUOR は、新鮮、凍結サンプルいずれにも使えます。
- サンプルは  $1 \times 10^6$  cells/mL の濃度に調整して 1 mL をアッセイに使用しますが、 $5 \times 10^6$  cells/mL の濃度で 1 mL までは ALDEFLUOR 試薬の量を変えなくてもアッセイができることが確認されています。
- 小分け凍結した ALDEFLUOR 試薬を解凍した際、ペレットが見えることがありますが、よく懸濁してご使用いただければ問題ありません。
- 本説明書中のデータは、ヒト血液のアフェレーシスサンプルを使用しています。骨髄・臍帯血などサンプルの種類によって、データの見た目は異なります。
- ALDEFLUOR キットの試薬は抗生物質を含んでいません。そのため操作を無菌下で行います。

## ALDEFLUOR Assay概要



株式会社ベリタス 105-0013 東京都港区浜松町 1-10-14 住友東新橋ビル 3 号館 5 階

TEL 03-5776-0078 FAX 03-5776-0076

技術的なお問い合わせは：TEL 03-5776-0040 E-mail [techservice@veritastk.co.jp](mailto:techservice@veritastk.co.jp)

## ALDEFLUOR® ; FAQ

### サンプル種 :

#### **ALDEFLUOR assayに最適化されているサンプルソースにはどういったものがありますか？**

本Assayは、末梢血およびLeukapheresisサンプルでの使用に最適化されています。

これらのサンプルは、正常ドナー、サイトカインおよび増殖因子を処置され動員されたドナー、および、幹細胞が化学療法または他の薬剤により動員された患者から得られたものについて使用可能です。ALDEFLUOR assayは、骨髄および臍帯血サンプルにも互換性があります。

#### **どのAldehyde Dehydrogenase酵素についてALDEFLUORは最適化されていますか？**

ヒトAldehyde Dehydrogenase スーパーファミリーには17のアイソザイムが属しています(Sládek NE. [J Biochem Mol Toxicol 17: 7-23, 2003](#))。これらの酵素はそれぞれ、組織の分布および対応する基質が異なります。ALDEFLUORキットは、ヒトALDH 1A1との相互作用について最適化されており、ヒトスーパーファミリーに属する他の酵素または、他の種でのパフォーマンスは決定されていません。ほとんどの主要な組織はいくつかのALDH型を発現していますが、発現されたALDHがALDEFLUORの基質を酸化しないことがあります。

#### **ALDEFLUOR試薬は、非造血組織または他の種からの幹細胞の同定に使用可能ですか？**

ALDEFLUORは、ヒトの細胞を使い最適化されており、他の種由来の細胞についての性能は評価を行っていません。StemCell technologies社の提供するプロトコルは、ヒト血液からALDH<sup>+</sup>細胞の同定の為に最適化されています。しかしながら、ALDEFLUORが認識するものとして以下のような報告がございます：

- マウス骨髄におけるPrimitiveな造血前駆細胞(Armstrong *et al.* [Stem Cells 22: 1142-1151, 2004](#); Juopperi *et al.* [Exp Hematol 35: 335-341, 2007](#))
- 胎生ラットにおける多能性神経細胞 (Cai *et al.* [J Neurochem 88: 212-226, 2004](#))
- マウス脳および脊椎からの神経幹細胞 (Corti *et al.* [Stem Cells 24: 975-985, 2006](#), Corti *et al.* [Hum Mol Genet 15: 167-187, 2006](#), Louis *et al.*, [Society for Neuroscience 2005](#))
- 内皮および間葉系前駆細胞 (Gentry *et al.* [Cytotherapy 9: 259-274, 2007](#))
- 正常および悪性乳腺前駆細胞 (Ginestier *et al.* [Cell Stem Cell 1: 555-567, 2007](#))
- 被囊類*Botryllus*由来の幹細胞(Laird *et al.* [Cell 123: 1351-1360, 2005](#))

ALDEFLUOR assayを行う前に、サンプルから幹細胞を濃縮することによって不均一な細胞懸濁液からのALDH<sup>+</sup>細胞の同定及び単離を容易にすることが可能です。Lineage-specificマーカーに対する抗体のカクテルで成熟細胞を除去することによって幹細胞を濃縮することをお勧めします。マウス骨髄からの幹細胞の濃縮用カクテルはArmstrongらによって報告されています([Stem Cells 22: 1142-1151, 2004](#))。また、臍帯血幹細胞濃縮用カクテルは、Hessらによって報告されています([Blood 104:1648-1655, 2004](#))。細胞分離に関するご質問は[細胞分離相談窓口](#)をご利用ください。

株化細胞からのALDH<sup>+</sup>細胞と血液からのALDH<sup>+</sup>細胞とでは、側方散乱光および緑色蛍光におけるプロファイルが異なります。株化細胞からのALDH<sup>+</sup>細胞は、しばしば、血液のALDH<sup>+</sup>細胞と比較して側方散乱光がより高く不均一なプロファイルを示し、緑食蛍光については広く不明瞭なプロファイルを示

すことがあります。株化細胞で試験される時は、ALDH<sup>+</sup>細胞を緑色蛍光でゲーティングする前に、Propidium Iodideのような生細胞マーカーを使い死細胞除去する方法が有効です。加えて、サンプルを希釈し、高いALDH活性を持つことが知られている株化細胞と混ぜることも有効です。(Moreb *et al.* *Cytometry B Clin Cytom* 72: 281-289, 2007, Storms *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 9118-9123, 1999)。

#### **ALDEFLUOR基質濃度を高くすることで、ALDH<sup>+</sup>細胞群の識別を向上できますか？**

非血液を染色する際は、ALDEFLUOR基質の最適濃度を決定するために滴定する必要があるかもしれません。

その場合、標準濃度より5倍から10倍以上の濃度範囲を検討することを推奨します。滴定の間、活性化したALDEFLUOR試薬の10倍のモル濃度でDEAB濃度を維持する必要があるため、基質を滴定する際はDEABの量も調整する必要があります。

#### **ALDEFLUORバッファーは、非造血組織または他の種からの細胞においても流出を妨ぎますか？**

ALDEFLUOR assayバッファーは、ヒト血液においてALDH-positive (またはALDH<sup>+</sup>)細胞の検出を最適にするようデザインされています。

バッファー中には、ATP-binding cassette (ABC) トランスポーターインヒビターが含まれており、これらの細胞からALDEFLUOR産物の能動的な流出を抑制する働きがあります。このトランスポーターインヒビターは、他の組織または他の種からの流出を抑制しない可能性もございます。

従って、血液以外のサンプルを使うときは、37°Cで活性化したALDEFLUOR試薬でインキュベーション後、反応した細胞は流出による蛍光の減少を抑えるため2-8°Cに維持しておかなければなりません。なお、ALDEFLUORバッファーに添加可能な流出インヒビターにつきましては、FAQ下部の細胞染色反応の項目をご参照下さい。

#### **DEABは、非造血組織または、他の種からの細胞におけるALDH活性も抑制しますか？**

非ヒトおよび非血液で発現した特異的ALDH遺伝子産物は、DEABにより抑制されない可能性があります。テストサンプルとネガティブコントロールサンプルにおいて違いが見受けられない場合、インヒビターの効果がなかったのか、もしくは、テストサンプルの細胞にALDH活性がないということを示している可能性があります。動態研究（反応時間中におけるネガティブコントロールチューブのALDEFLUOR蛍光の進行性の増加）は、これら2つの選択枝を区別するのに役立ちます。他のALDHインヒビターが、アイソフォームを発現した酵素に適宜使用可能です。例えば、Disulfiramは、いくつかの哺乳類ALDH遺伝子産物を抑制します。

#### **ALDEFLUORは、凍結保存した細胞で使えますか？**

ALDEFLUOR assayは、患者および、動員されたドナーからの凍結保存した臍帯血、末梢血、Leukapheresisサンプルで広範囲に試験されています。凍結保存および解凍を正しく行えば細胞のバイアビリティーおよび、ALDH<sup>+</sup>細胞の蛍光強度の減少はありません。生細胞のみが、ALDEFLUOR反応産物を維持することができますので、バイアビリティーの減少は、ALDH<sup>+</sup>細胞の割合の減少および、



ヨウ化プロピジウムまたは他のバイアビリティー染色で検出された死細胞の割合の増加として反映されます。

### サンプル調整：

どの抗凝固剤が、サンプルを回収するために使用可能ですか？

末梢血およびLeukapheresisサンプルでは、acid-citrate dextrose (ACD)、ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)、ヘパリンナトリウムで抗凝固することで最適なパフォーマンスが得られます。臍帯血ユニットは、citrate phosphate dextrose (CPD) 抗凝固剤で回収可能です。

赤血球は、Assayを妨げますか？

末梢血、アフエレーシス収集物、骨髄、臍帯血サンプル中における多数の赤血球の存在は、ALDEFLUOR基質のための幹細胞/前駆細胞と競合することがございます。赤血球を溶血するためにサンプルを塩化アンモニウム処理することが、Assayを最適に行う為に有効です。細胞数または、血液量に対するLysis bufferの割合は、最適にする必要があります（サンプルに対し10～40の割合のバッファー）、また、インキュベーションの時間（10～30分）および温度（室温または2～8℃）は、各Lysis bufferおよびサンプル種についてコントロールしなければなりません。

赤血球を溶血するためにどの溶液を使用可能ですか？

最適な赤血球の溶血のために、以下のバッファーが使用可能です

- 塩化アンモニウム (e.g. 0.17 M NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM Tris HCl, 0.25 mM EDTA),
- 1X ABC Lysis Buffer (eBioscience, San Diego, CA)
- VitaLyse® (BioE, St Paul, MN).

固定液を含む以下の溶液やそれ以外の溶液の使用は生育不能な細胞を与えるため推奨しません。

- CyLyse® (Partec GMBH, Munster, Germany)
- FACS™ Lysing solution (BD Biosciences, San Jose, CA.)

固定化した細胞をこのAssayで使用することは可能ですか？

いいえ。ALDEFLUOR試薬は、Aldehyde Dehydrogenase酵素に対する基質で、ALDEFLUORの基質は生細胞に取り込まれ、触媒され、保持されるバイアビリティーマーカーです。赤血球のLysisに使う試薬に固定液が含まれていないことを確かめることが重要です。

### DRY ALDEFLUOR試薬の活性化：

試薬を受け取った時、キット内の試薬は、凍っていました。これは、問題がありますか？

いいえ、キット内の試薬は、冷凍で安定です。Assayのパフォーマンスに影響はございません。

様々な試薬の分子量は、いくつですか？

BODIPY®-aminoacetaldehyde diethyl acetal (BAAA-DA)の分子量は407.27です。

BODIPY®-aminoacetaldehyde (BAAA) の分子量は、334.15です。

BODIPY®-aminoacetate (BAA)の分子量は、349.14です。

**ALDEFLUOR試薬の活性化は、30分上経っても大丈夫ですか？**

はい、室温が22°Cを上回らなければ、反応を6時間まで進行させてもAssayに影響しません。

**37°Cで、試薬をインキュベーションすることで活性化反応を速めることはできますか？**

これは、推奨しません。37°Cの活性化反応のインキュベーションは、反応速度を上げません。温度を上げることで活性化基質の分解がより早く起こります。

**冷蔵（2 - 8°C）温度で活性化反応は進行しますか？**

はい。2 - 8°Cでインキュベーションしたとき、十分な活性には、少なくとも8時間かかるでしょう。Assayへの影響なしで、反応は、24時間まで続けることが可能です。

**ALDEFLUOR試薬は、活性化後どのように保存すべきですか？**

ALDEFLUOR試薬は、2 - 8°Cで保存するとき1週間活性を維持するでしょう。長期保存のためには、一定量に試薬を分注し-20°C以下で保存します。活性化したALDEFLUOR試薬は、冷凍保存で1年間安定です。

### 細胞染色反応：

**染色反応が30分を上回っても大丈夫ですか？**

反応は、37°Cで1時間まで進行させることはできますが、1時間を超えるインキュベーションは、Assayのバラツキの増加を招きます。

**室温(15 - 25°C)での染色反応は、できますか？**

はい。染色時間は、室温に依存しますが、反応の完了までおよそ2 - 4時間かかるでしょう。

**冷蔵（2 - 8°C）温度で染色反応は、進行しますか？**

はい。しかし、十分な染色には、少なくとも3 - 4時間かかるでしょう。染色反応は、Assayへの影響なしで、2 - 8°C、24時間まで続けることができます。

**なぜALDEFLUOR assayバッファーは、染色およびその後のすべてのステップで使わなければならないのでしょうか？**

幹細胞および前駆細胞は、高いABCトランスポーター活性を持っており、ALDEFLUOR 反応産物は、これら流出ポンプの基質です。

Assayバッファーは、ALDH<sup>+</sup>細胞の最適な識別のために考案されており、流出ポンプインヒビターを含んでいます。この流出ポンプインヒビターの取り込みによりシグナルの安定性を最大限にします。細胞は、低温 (on ice) で維持し、ALDEFLUOR assayバッファーは、Immunophenotyping、Side Population assayおよびセルソーティングのようなALDH染色後に実施される全ての操作で使用することをお勧めします。ALDEFLUOR assayバッファーを使用しないと、染色した細胞が保たれる時間と温度に比例して、Assayシグナルのロスが予想されます。

### **ALDEFLUOR assayバッファーへ他の流出インヒビターを加えることができますか？**

はい。活性化したALDEFLUOR試薬および反応産物の流出を防ぐために、個別に組み合わせて、加えることが可能です。結果は、サンプル種により変化しますが、これらの試薬もALDH<sup>+</sup>集団の識別を改善することができます。

- 50 - 100  $\mu$ M verapamil
- 2.5 mM probenecid
- 100 mM 2-deoxy-D-glucose
- 1 mg/ml sodium azide (0.1%) 注: アジ化ナトリウムは、細胞に対して毒性があるかもしれません。

ALDEFLUOR assay後に細胞機能Assayを行う場合、使用しないでください。

注: 氷は、ユニバーサルな流出インヒビターです。ALDEFLUOR反応を行ったサンプルは、全てon iceまたは、2 - 8°Cに維持して下さい。

### **ALDEFLUOR試薬を使い切る前に ALDEFLUOR assayバッファーを使い切ってしまった。さらにバッファーを購入できますか？**

はい。別売でバッファー(コードNo. : ST-01701)が、購入できます。

### **多くの細胞を染色する必要があります。1 x 10<sup>6</sup> cells/mL 以上の濃度で、細胞を染色することは可能ですか？**

ヒトの血液細胞を使用する場合、推奨濃度の5倍までの細胞濃度の増加は、Assayの性能に影響しません。しかしながら、サンプルが異なる場合、異なる結果を生じる可能性があります。また、細胞濃度が推奨濃度の5倍以上に増加すると、Assayのシグナルが減少しさらに、ALDH<sup>+</sup>細胞集団が減少します。

### **ALDEFLUOR assayとSide Population assayで同時に細胞の解析を行うことは可能ですか？**

はい、Side population assayは、ALDEFLUOR<sup>®</sup> assayと一緒に行うことが可能です(Pearce and Bonnet. *Exp Hematol* 35: 1437-1446, 2007)。その場合、最初にSide Population assayを行い、その後ALDEFLUOR assayを行って頂ければと思います。両方のAssayを行う際は、ALDEFLUOR assayバッファーへ50 $\mu$ Mのverapamilを添加することを推奨します。

### **サンプル取得および解析：**

#### **なぜ、サイトグラム中のすべての細胞に、ある程度の蛍光があるのですか？**

ALDEFLUOR基質は非極性蛍光分子であり、全ての細胞中に自由に拡散します。このように、DEAB処理したコントロールおよびテストサンプルの両方に含まれる全ての細胞は、様々な蛍光値を持つこととなります。DEAB処理したコントロールにおいて、蛍光は、細胞内の基質プールのサイズを反映します。また、テストサンプル中における蛍光は、加えてALDH活性を反映します。しかしながら、ヒト幹細胞および前駆細胞は、一般的に成熟細胞より多くのALDH活性を持っており、この量的違いにより、他の細胞から幹細胞を分けることができます。

**ALDH<sup>+</sup>細胞の染色が明るすぎるため、Multiparameter flow analysisのためのコンペンセーションの調整に支障があります。コンペンセーションをより簡単にするためにはどうしたらよいですか？**

ALDEFLUOR反応の後、Multiparameter analysisを行う前に過剰の基質によるバックグラウンドの蛍光を除去するため、ALDEFLUOR assayバッファーで細胞を洗浄することをお勧めします。

ALDEFLUORは、表現型解析のための染色と併用可能です。ALDEFLUOR試薬は、512 nmのピーク発光でFITCに似た発光スペクトルを示します。650 nmより下に検出される蛍光色素とALDEFLUOR試薬とのスペクトルの重複のため、一般的に発現レベルが低い抗原については、より高い波長を放出する蛍光色素で標識した抗体を使うことをお勧めします。例えば、ALDH<sup>+</sup>細胞上のCD34共発現の研究の際は、抗体の組み合わせとしてCD45 phycoerythrin (PE), 7-aminoactinomycin D (7-AAD)および、CD34 allophycocyanin (APC)の抗体の組み合わせを使用しています。ALDEFLUOR試薬の蛍光の明るさのため、実験毎にコンペンセーションコントロールを使用することをお勧めします。

適切なコンペンセーションは、市販で利用される蛍光ビーズで行うことはできません。

以下の技術情報を参照ください。

●Immunophenotypingの技術的情報

(<http://www.stemcell.com/~media/Technical%20Resources/8/6/A/3/3/TSB0303%20June%202007.ashx>)

●フローサイトメトリーの基本的な測定方法についての動画

(<http://www.stemcell.com/en/Technical-Resources/eab21/The-Basic-FACS-About-ALDEFLUOR-A-Guide-To-Successful-Flow-Cytometry-Analysis.aspx>)

株式会社ベリタス 〒105-0013 東京都港区浜松町 1-10-14 住友東新橋ビル 3号館 5階

TEL 03-5776-0078 FAX 03-5776-0076

技術的なお問い合わせは：TEL 03-5776-0040 E-mail [techservice@veritastk.co.jp](mailto:techservice@veritastk.co.jp)