

はじめに

ミトコンドリアはエネルギー産生の場として知られ、細胞内で重要な機能を持つオルガネラの一つです。近年では、アルツハイマー病やパーキンソン病の原因の一つに不良化したミトコンドリアの蓄積が報告され、マイトファジーがその中で重要な役割をもった機構であることが明らかになってきています。マイトファジーは酸化ストレスやDNA損傷等により不良化したミトコンドリアを選択的に除去するシステムであり、不良ミトコンドリアはオートファゴソームにより隔離され、リソソームと融合し消化されます。本キットはマイトファジーを検出する Mtpagy Dye と Lyso Dye で構成されています。Mtpagy Dye は細胞内の正常なミトコンドリアに集積し、化学結合により固定化されますが、その状態では蛍光強度は低くなっています。一方、マイトファジーが誘導されミトコンドリアがリソソームと融合すると、Mtpagy Dye の蛍光強度が増大します。またリソソーム選択的な染色色素である Lyso Dye との共染色により、マイトファジーを検出することが可能です。

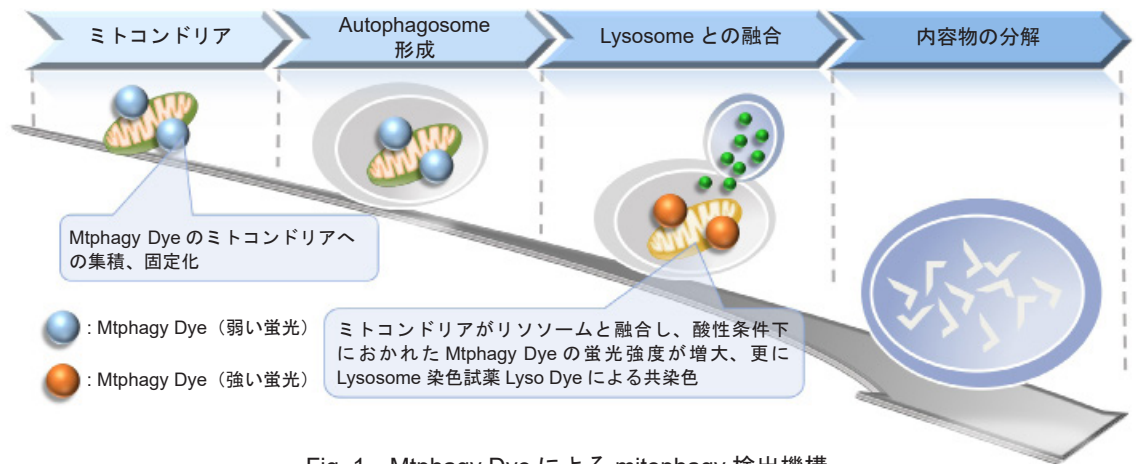


Fig. 1 Mtpagy Dye による mitophagy 検出機構

内容

Mtpagy Dye 5  $\mu\text{g}$  x 1  
Lyso Dye 30  $\mu\text{g}$  x 1

保存条件

遮光、0-5°Cにて保存してください。

必要なもの

- Dimethyl sulfoxide (DMSO) - Hanks' HEPES buffer or serum-free medium - Micropipettes

溶液調製

### 100 $\mu\text{mol/l}$ Mtpagy Dye DMSO stock solution の調製

Mtpagy Dye 5  $\mu\text{g}$  を含むチューブに 50  $\mu\text{l}$  の DMSO を加えピペッティングにより溶解する。  
※調製後は -20°C で保存してください。調製後 1 か月間安定です。

### 1 mmol/l Lyso Dye DMSO stock solution の調製

Lyso Dye 30  $\mu\text{g}$  を含むチューブに 55  $\mu\text{l}$  の DMSO を加えピペッティングにより溶解する。  
※調製後は -20°C で保存してください。調製後 1 か月間安定です。

### 100 nmol/l Mtpagy Dye working solution の調製

最終濃度が 100 nmol/l になるように Mtpagy Dye DMSO stock solution を Hanks' HEPES buffer または血清不含培地で希釈する。  
※本色素は血清成分と干渉するため、血清不含培地または Hanks' HEPES buffer で希釈してください。

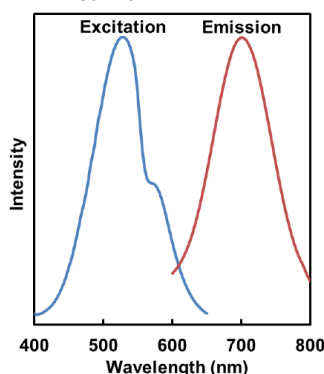
### 1 $\mu\text{mol/l}$ Lyso Dye working solution の調製

最終濃度が 1  $\mu\text{mol/l}$  になるように Lyso Dye DMSO stock solution を Hanks' HEPES buffer または血清不含培地で希釈する。  
※本色素は血清成分と干渉するため、血清不含培地または Hanks' HEPES buffer で希釈してください。

蛍光特性

## Mtpagy Dye と Lyso Dye の励起、蛍光スペクトル

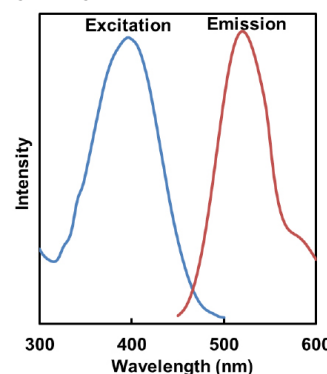
### Mtpagy Dye



$\lambda_{\text{ex}}$  : 530 nm  
 $\lambda_{\text{em}}$  : 700 nm

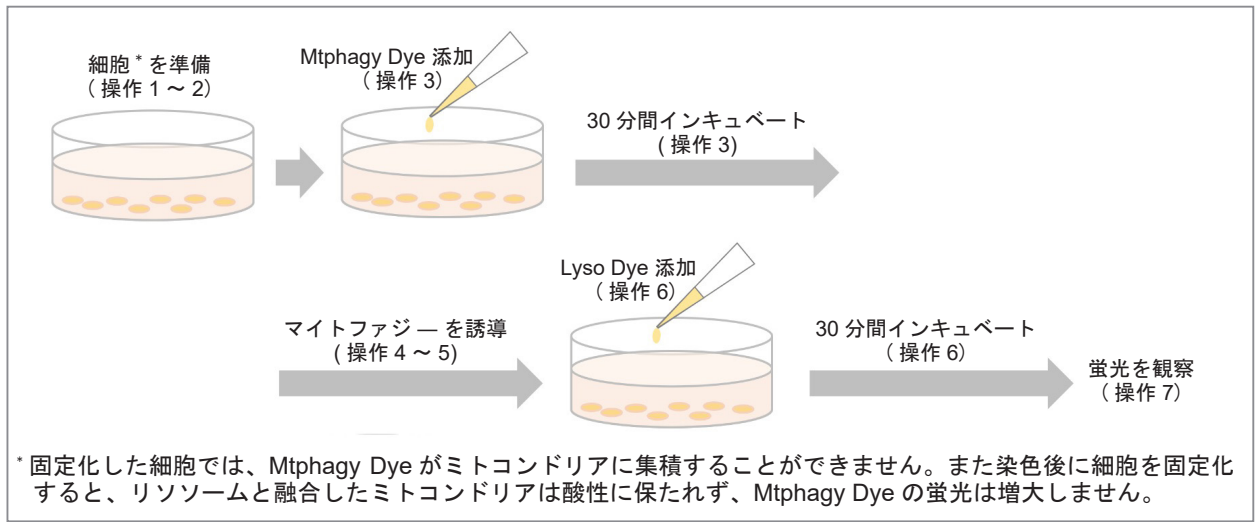
<推奨フィルター>  
励起 : 500 ~ 560 nm  
蛍光 : 670 ~ 730 nm

### Lyso Dye



$\lambda_{\text{ex}}$  : 398 nm  
 $\lambda_{\text{em}}$  : 525 nm

<推奨フィルター>  
励起 : 350 ~ 450 nm  
蛍光 : 500 ~ 560 nm



1. 細胞をディッシュに播種し培養する。
2. 培地を除去後、Hanks' HEPES buffer または血清不含培地で 2 回洗浄する。
3. 調製した 100 nmol/l Mtpagy Dye working solution を添加し、37°C で 30 分間インキュベートする。
4. 上澄みを除去後、Hanks' HEPES buffer または血清不含培地で 2 回洗浄する。
5. マイトファジー誘導刺激剤を含む培地を加え 37°C で適切な時間インキュベートする。  
蛍光顕微鏡にて誘導を確認する。
6. Mtpagy Dye と Lysosome の共局在を観察するため、1 μmol/l Lyso Dye working solution を加え 37°C で 30 分間インキュベートする。
7. 上澄みを除去後、Hanks' HEPES buffer または血清不含培地で 2 回洗浄し、蛍光顕微鏡にて観察する。

実験例

**Parkin 発現 HeLa 細胞を用いた carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone (CCCP) によるマイトファジー誘導**

μ-slide 8 well (Ibidi) に細胞を播種し 37°C、CO<sub>2</sub> インキュベーターにて一晚培養した。HilyMax [Code#:H357] を用いて Parkin プラスミドを細胞に導入し、さらに一晚培養した。Hanks' HEPES buffer で 2 回洗浄後、100 nmol/l MitoBright Deep Red [Code#:MT08] を含む 100 nmol/l Mtpagy Dye working solution を添加し 30 分間インキュベートした。Hanks' HEPES buffer で 2 回洗浄後、10 μmol/l CCCP 含む培養培地で 24 時間培養した。蛍光顕微鏡でマイトファジーが起きていることを確認後、CCCP 含有培地を取り除き、1 μmol/l Lyso Dye working solution を加え 30 分間インキュベートした。Hanks' HEPES buffer で 2 回洗浄後、共焦点レーザー顕微鏡で Mtpagy Dye、Lyso Dye、MitoBright Deep Red が染色されている事を確認した。

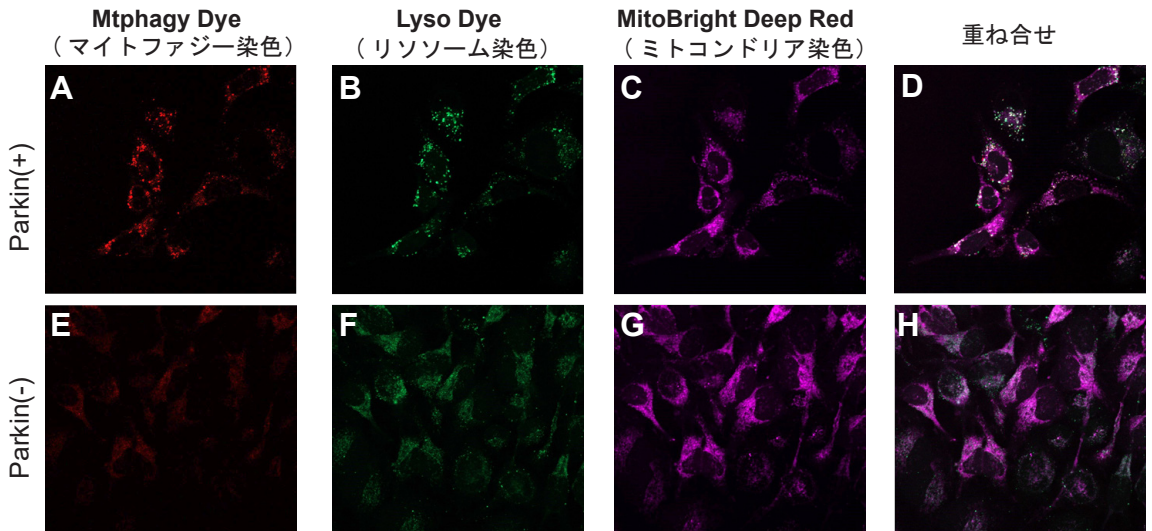


Fig. 2. Parkin 発現 HeLa 細胞 (上段写真) と未発現 HeLa 細胞 (下段写真) を用いたマイトファジー観察  
A, E) Mtpagy Dye の蛍光画像、B, F) Lyso Dye の蛍光画像、C, G) MitoBright Deep Red の蛍光画像、D, H) 共染色蛍光画像  
- Mtpagy Dye: 561 nm (Ex)、LP 650 nm (Em)  
- Lyso Dye: 488 nm (Ex)、502-554 nm (Em)  
- MitoBright Deep Red: 640 nm (Ex)、656-700 nm (Em)

Mtpagy Dye および Lyso Dye は特許出願中です。  
ご質問・ご要望は下記までお問い合わせください。

<開発元>  
Dojindo Molecular Technologies, Inc.  
30W Gude Dr, Suite 260, Rockville, Maryland, 20850 U.S.A.  
Tel: +1-301-987-2667, Fax: +1-301-987-2687  
URL: www.dojindo.com

<委託製造元>  
株式会社 同仁化学研究所  
熊本県上益城郡益城町田原 2025-5 〒 861-2202  
Tel:096-286-1515 Fax:096-286-1525 URL:www.dojindo.co.jp/  
ドージン・イースト (東京) Tel:03-3578-9651 Fax:03-3578-9650