Si-DMA for Mitochondrial Singlet Oxygen Imaging

Technical Manual

はじめに

活性酸素種の一つであり非常に強い酸化力を持つ一重項酸素は、皮膚のシミやシワの原因となることが知られており、化粧品分野ではこの一重項酸素を消去する化合物の探索が進められております。一方、医学分野、特に癌の治療においては、光感受性物質とレーザー照射により発生した一重項酸素の酸化力により癌細胞を破壊する光線力学的治療の研究が進められており、細胞内における一重項酸素レベルをモニターできる試薬が望まれております。しかしながら既存の一重項酸素検出試薬は細胞膜を透過しない為、細胞内の一重項酸素を検出できません。

真嶋らが開発した一重項酸素検出試薬 Si-DMA は、silicon rhodamine(SiR) 骨格を蛍光団とし、一重項酸素反応部位としてアントラセンを有した構造を持つ蛍光プローブです [1)]。この Si-DMA は、容易に細胞膜透過しミトコンドリアに集積後、選択的に一重項酸素と応答して強い蛍光を発します (図 3)。また、Si-DMA は 5- aminolevulinic acid (5-ALA) で処理した細胞内のミトコンドリアで生成されるプロトポルフィリン IX 由来の一重項酸素をイメージングすることが可能です (図 4)。このことから Si-DMA は、細胞内一重項酸素のイメージングが可能な蛍光色素として今後の研究への応用が期待されます。

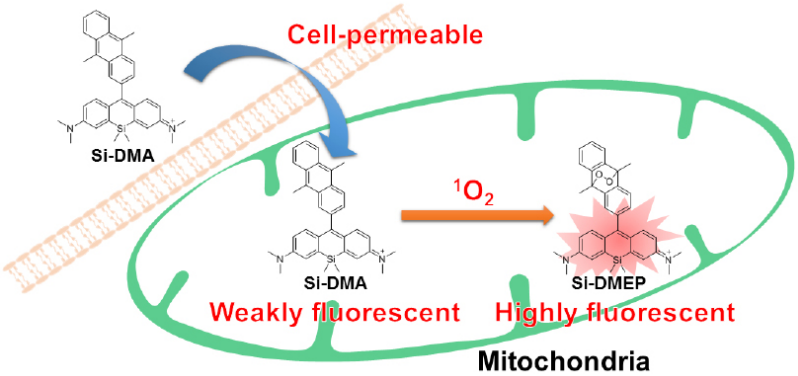

図 1 Si-DMA の細胞染色原理

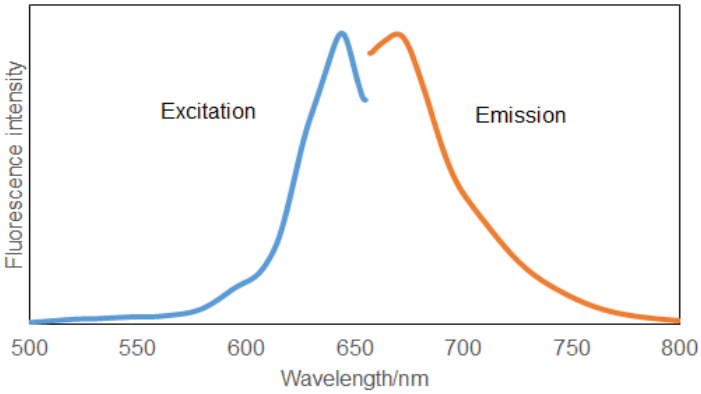

図 2 一重項酸素と反応後の Si-DMA の励起・蛍光スペクトル

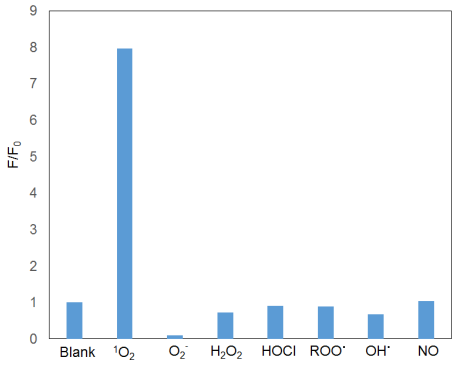

図 3 Si-DMA の一重項酸素反応特異性
(Excitation 640 nm/Emission 665 nm)

内容

Si-DMA 2 μg x 1

保存条件

遮光、-20 ℃にて保存してください。

＊注意＊
Si-DMA は光により劣化します。使用時以外はアルミラミジップに入れ、チャックをしっかりと閉め、
-20 ℃以下で保存してください。

必要なもの

- Dimethyl sulfoxide (DMSO)
- Hanks' HEPES buffer または HBSS
- マイクロピペット

溶液調製

100 μmol/l Si-DMA DMSO stock solution の調製
Si-DMA 2 μg を含むチューブに 36 μL の DMSO を加え、ピペッティングにより溶解する。
※ Si-DMA DMSO stock solution は遮光し、-20 ℃以下で保存してください。
この条件で保存を行うと、一ヶ月間安定であることを確認しております。

Si-DMA working solution の調製
濃度が 25-100 nmol/L になるように、Si-DMA DMSO stock solution を Hanks' HEPES buffer 等で希釈する。
※ Si-DMA working solution は、遮光し、その日の内にご使用ください。

注意点

Si-DMA working solution の濃度は 25-100 nmol/L での使用を推奨いたします。Si-DMA の使用濃度が 1 μmol/L 以上の場合、Si-DMA がミトコンドリア以外へ集積する可能性があります。また、Si-DMA の使用濃度が 5 μmol/L 以上の場合には、細胞毒性を示す場合がございます (HeLa 細胞)。

操作

Si-DMA による細胞染色

1. 細胞をディッシュまたはチャンバーに播種し、培養する。
2. 培地を取り除き、Hanks' HEPES buffer で 2 回洗浄する。
3. 調製した Si-DMA working solution を添加する。
4. 5%CO_2 インキュベーター (37 ℃) にて 45 分間インキュベートする。
5. 上澄みを除去し Hanks' HEPES buffer で 2 回洗浄する。
6. Hanks' HEPES buffer を加え蛍光顕微鏡で観察する。

実験例

5-aminolevulinic acid (5-ALA) で処理した HeLa 細胞を用いた一重項酸素の検出

1. 200 µL の HeLa 細胞 (2.4×10^5 cells/mL) を µ-slide 8 well (ibidi) に DMEM 培地 (10% fetal bovine serum、1% penicillin-streptomycin) で播種し、5%CO_2 インキュベーターで 37 ℃、一晩培養した。
2. 培地を取り除き、200 µL の Hanks' HEPES buffer で細胞を 2 回洗浄した。
3. Hanks' HEPES buffer で溶解した 150 µg/mL の 5-ALA 溶液を 200 µl 添加し、5%CO_2 インキュベーター (37 ℃) にて 4 時間インキュベートした。
4. 上澄みを除去し、200 µL の Hanks' HEPES buffer で 2 回洗浄した。
5. Si-DMA working solution (40 nmol/L) 200 µL を添加し、5%CO_2 インキュベーター (37 ℃) にて 45 分間インキュベートした。
6. 上澄みを除去し、200 µL の Hanks' HEPES buffer で 2 回洗浄した。
7. 200 µL の Hanks' HEPES buffer を加え、蛍光顕微鏡で観察した。

Filter (wavelength/band pass)
蛍光イメージング : 600/50 nm (Ex), 685/50 nm (Em)

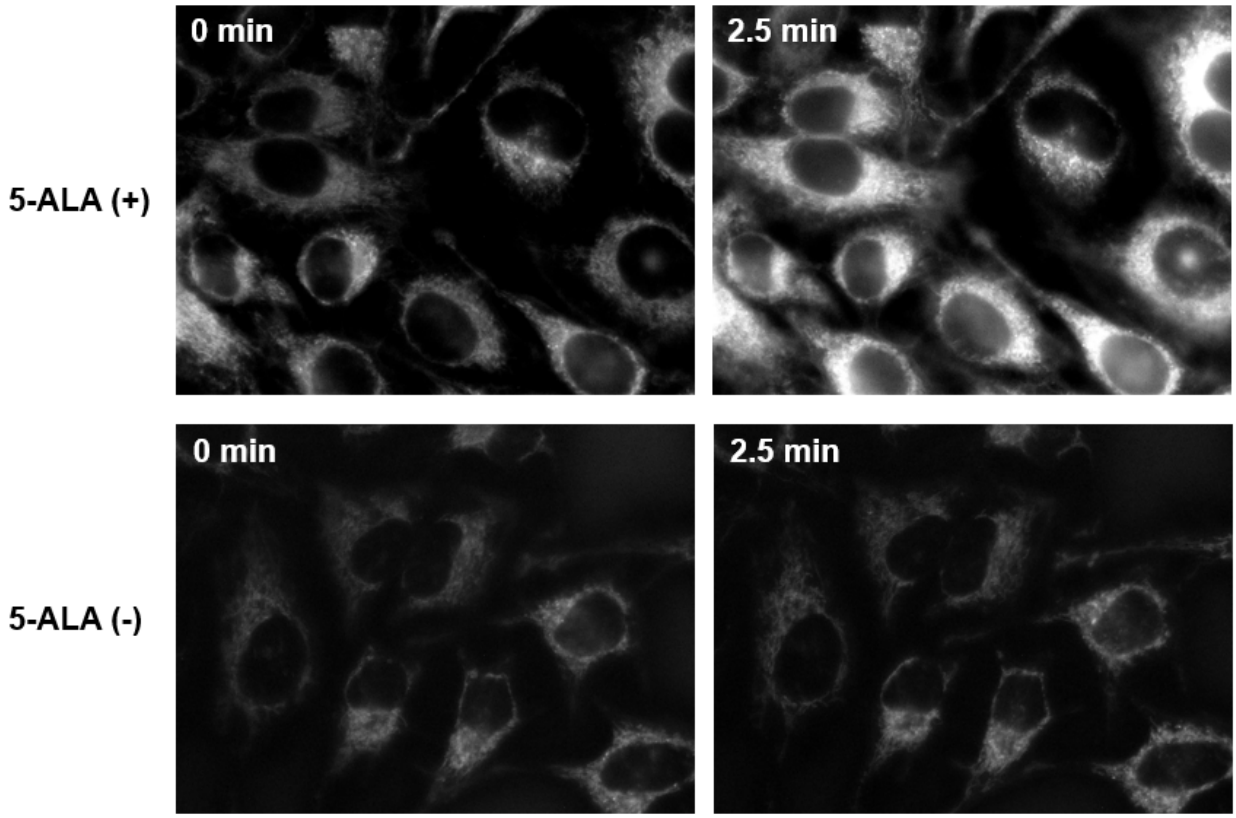

図 4 5-ALA で処理した HeLa 細胞の Si-DMA による一重項酸素の検出

蛍光イメージングの結果、観察光の照射により、5-ALA で処理した HeLa 細胞で蛍光強度が増大した。よって、Si-DMA は 5-ALA により生成したプロトポルフィリン IX に観察光が照射したことにより発生する一重項酸素の検出が可能である。

参考文献

1) S. Kim, T. Tachikawa, M. Fujitsuka, T. Majima, "Far-Red Fluorescence Probe for Monitoring Singlet Oxygen during Photodynamic Therapy", *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, *136* (33), 11707-11715.

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