

mtSOX Deep Red - Mitochondrial Superoxide Detection

Technical Manual

はじめに

ミトコンドリアは好気呼吸における ATP 産生の際として重要な細胞小器官です。ミトコンドリアでは ATP 産生に伴い、反応性の高い活性酸素種 (ROS) が酸化還元反応により生成されます。生成された ROS は通常、superoxide dismutase (SOD) 等の抗酸化酵素により消去され細胞内で酸化ストレスが起こらないよう制御されています。しかしながら、発生量が多くなり抗酸化酵素による制御ができなくなると DNA やタンパク質に対し酸化剤として作用することで様々な疾病や老化を引き起こす要因となります。

mtSOX Deep Red はミトコンドリアに集積し、スーパーオキシド選択的に酸化され発光する色素であるため、ミトコンドリアのスーパーオキシドを検出することが可能です。

内容 mtSOX Deep Red 100 nmol×1

保存条件 0–5°C にて保存して下さい。

必要なもの (キット以外)

- 蛍光検出器 (蛍光顕微鏡、蛍光プレートリーダーもしくはフローサイトメーター)
- インキュベーター (37°C) – マイクロピペット (100–1000 µl, 0.5–10 µl)
- コニカルチューブ – Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)
- Dimethyl sulfoxide (DMSO)

使用上のご注意

- キット中の試薬は使用前に室温に戻してからご使用下さい。
- 輸送中の振動等により、内容物がスクリーキャップマイクロチューブ壁面やキャップ裏面に付着している場合がありますので、開封前に内容物を底面に落としてからご使用ください。
- 検出器毎の推奨測定波長は表 1 を参照してください。

表 1 検出器別の推奨測定波長

検出器	蛍光プレートリーダー	蛍光顕微鏡	フローサイトメーター
測定波長	Ex: 535–565 nm Em: 660–690 nm	(共焦点レーザー顕微鏡) • Ex/Em: 561/640–700 nm (単染色の場合) • Ex/Em: 633/640–700 nm (* 赤色蛍光色素と多重染色の場合) (落射型蛍光顕微鏡) • TxRed フィルター	APC フィルター

* mtSOX Deep Red と赤色蛍光色素を多重染色する場合は蛍光波長の漏れこみを防ぐため、mtSOX Deep Red を 633 nm で励起して下さい。

溶液調製

10 mmol/l mtSOX Deep Red DMSO stock solution の調製

mtSOX Deep Red 100 nmol を含むチューブに 10 µl の DMSO を加えピペッティングにより溶解する。

※ mtSOX Deep Red はチューブにフィルム状で付着しており、目視では確認しづらい状態となっております。

調製後は -20°C で保存して下さい。調製後 1 か月間安定です。

mtSOX Deep Red working solution の調製

mtSOX Deep Red 10 mmol/l DMSO stock solution を培養培地もしくは HBSS で 1000 倍希釈し、10 µmol/l working solution を調製する。

※ working solution は保存できません。調製したその日之内にご使用ください。

容器ごとの必要量は表 2 を参照してください。

表 2 容器別 mtSOX Deep Red working solution の推奨使用量

容器	35-mmdish	ibidi 8-well plate	96-well black plate (clear bottom)	Sample tube (Flow Cytometer)
必要量	2 ml/dish	200 µl/well	100 µl/well	0.5 ml/sample

操作

1. 表 3 を参考に細胞をディッシュまたはプレートに播種し、5% CO₂ 存在下、37°C 設定のインキュベーター内で一晚培養する。

表 3 検出器別 細胞播種容器

検出器	蛍光プレートリーダー	蛍光顕微鏡	フローサイトメーター
容器	96-well black plate (clear bottom)	96-well black plate (clear bottom) ibidi 8-well plate 35 mm dish	6-well plate

2. 培地を取り除き、培養培地を用いて細胞を洗浄する。
3. 上澄みを液を除去し、調製した mtSOX Deep Red working solution を添加し、インキュベーター (37°C, 5% CO₂ 存在下) で 30 分間インキュベートする。
4. working solution を除去し、HBSS を用いて細胞を 2 回洗浄する。
5. 上清除去後、薬剤等で処理して検出器で蛍光を測定する。
※操作 5. の薬剤処理時間は実験系により最適化して下さい。細胞から色素が漏れ出る可能性がありますので必要ならば薬剤処理後は洗浄操作なしで測定して下さい。

Antimycin 処理した HeLa 細胞のミトコンドリアスーパーオキシド検出

1. 96 well Black plate もしくは 6 well plate に HeLa 細胞 (1×10^5 cells/ml, MEM, 10% fetal bovine serum, 1% penicillin-streptomycin) を播種し、インキュベーター内 (37°C、5% CO₂ 存在下) で一晩培養した。
2. 培地を取り除き HBSS で細胞を 2 回洗浄した。
3. 上清を取り除き 10 μmol/l 濃度の Antimycin を含んだ mtSOX Deep Red working solution を添加し、インキュベーター内 (37°C、5% CO₂ 存在下) で 30 分間インキュベートした。
4. 各検出器で測定した。

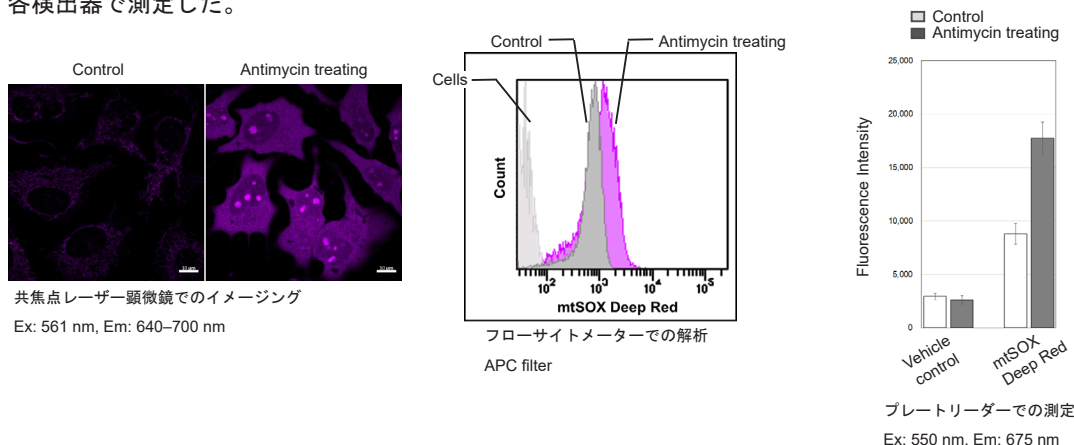


図 1 各検出器による HeLa 細胞のミトコンドリアスーパーオキシドの検出

Antimycin 処理した HeLa 細胞のミトコンドリア量、ミトコンドリア膜電位、ミトコンドリアスーパーオキシドの同時解析

1. ibidi 8 well plate に HeLa 細胞 (3×10^4 cells/ml, DMEM, 10% fetal bovine serum, 1% penicillin-streptomycin) を播種し、インキュベーター内 (37°C、5% CO₂ 存在下) で一晩培養した。
2. 培地を取り除き、HBSS で細胞を 2 回洗浄した。
3. Hoechst33342, MitoTracker™ Green FM, Tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE) を混合した working solution を添加し、インキュベーター内 (37°C、5% CO₂ 存在下) で 30 分間インキュベートした (Hoechst33342: 1μg/ml, MitoTracker™ Green FM: 100 nmol/l, TMRE: 150 nmol/l)。
4. working solution を取り除き HBSS で細胞を 2 回洗浄した。
5. 上清を取り除き 10 μmol/l 濃度の Antimycin を含んだ mtSOX Deep Red working solution を添加し、インキュベーター内 (37°C、5% CO₂ 存在下) で 30 分間インキュベートした。
6. 共焦点レーザー顕微鏡で細胞を観察した。

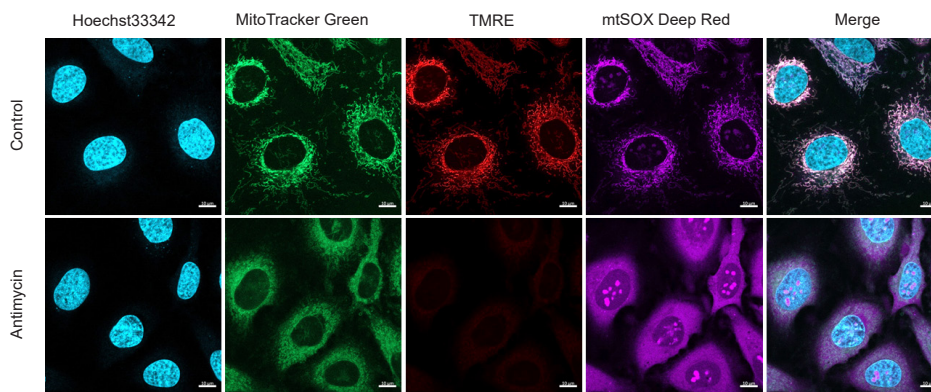


図 2 蛍光顕微鏡による Antimycin 処理した HeLa 細胞の観察

検出器：共焦点レーザー顕微鏡

(青) 細胞核染色：Hoechst33342 (Ex: 405 nm, Em: 450-495 nm)

(緑) ミトコンドリア量染色：MitoTracker™ Green FM (Ex: 488 nm, Em: 500-550 nm)

(赤) ミトコンドリア膜電位染色：TMRE (Ex: 561 nm, Em: 560-620 nm)

(紫) ミトコンドリアスーパーオキシド染色：mtSOX Deep Red (Ex: 633 nm, Em 640-700 nm)

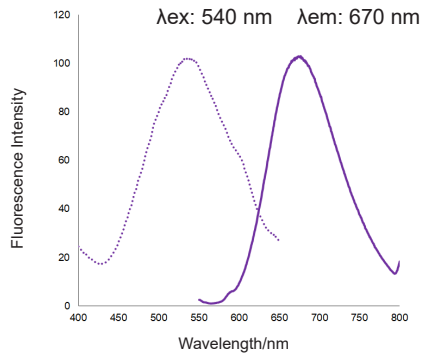


図 3 mtSOX Deep Red の励起蛍光スペクトル

mtSOX Deep Red の ROS に対する選択性

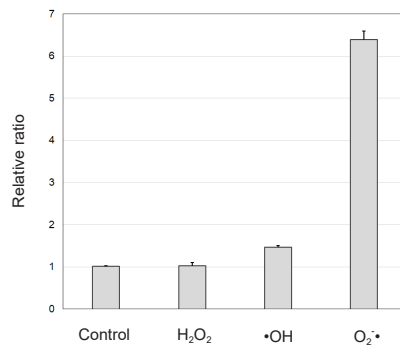


図 4 mtSOX Deep Red の ROS に対する選択性

mtSOX Deep Red と他社製品のミトコンドリアスーパーオキシドに対する感度差の比較

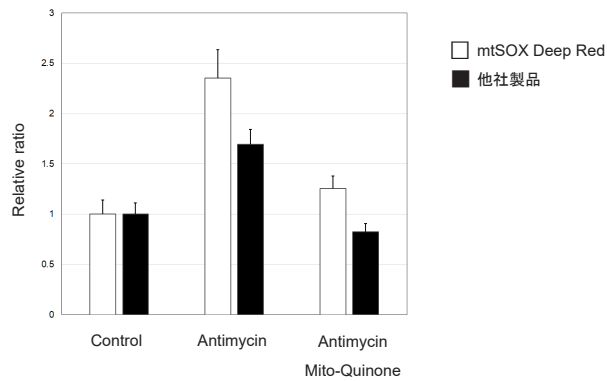


図 5 ミトコンドリアスーパーオキシドに対する感度差の比較

本製品は試験・研究用途です。臨床診断用途には使用できません。
ご質問・ご要望は下記までお問い合わせください。

DOJINDO 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
 熊本テクノリサーチパーク 〒861-2202
 Tel:096-286-1515 (代表) Fax:096-286-1525
 E-mail: info@dojindo.co.jp URL: www.dojindo.co.jp

ドージン・イースト (東京)
 東京都港区芝大門 2-1-17 朝川ビル 7F 〒105-0012
 Tel: 03-3578-9651 (代表) Fax: 03-3578-9650
 フリーダイヤル :0120-489548
 フリーファックス :0120-021557