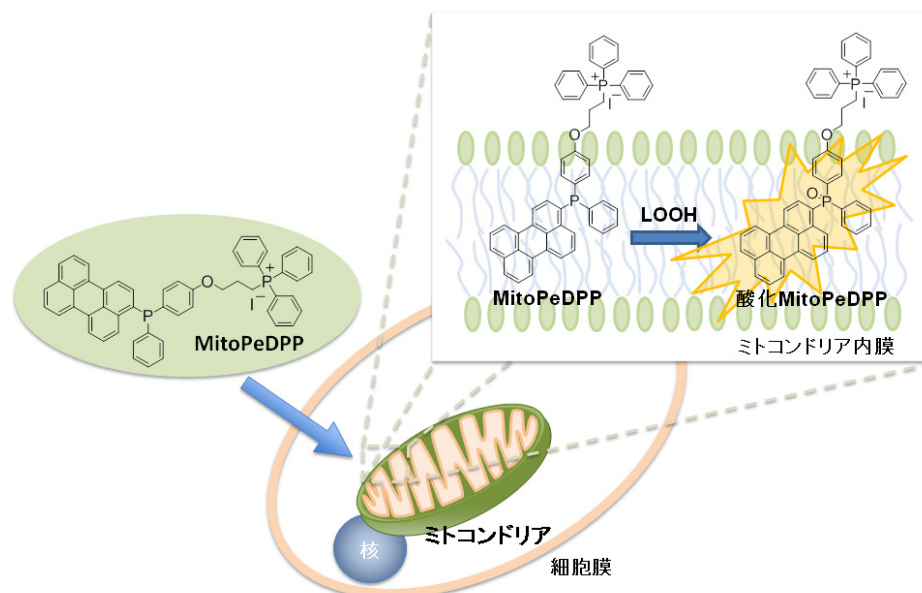


はじめに

MitoPeDPP は、分子内にミトコンドリアに局在化するトリフェニルホスホニウム基を持つため、細胞膜を透過してミトコンドリアに集積します。ミトコンドリアに集積した MitoPeDPP は、膜中の脂溶性過酸化物によって特異的に酸化され蛍光を発します。酸化 MitoPeDPP の励起および蛍光波長はそれぞれ 452 nm、470 nm で、測定試料への光によるダメージや試料由来の自家蛍光の影響を軽減できることから、蛍光顕微鏡を用いた脂溶性過酸化物のイメージングが可能です。

本製品は福岡大学理学部の塩路准教授らにより開発された製品です。



内容

MitoPeDPP 5 μg x 3

*** 注意 ***

内容物が少量のため目視では確認しにくい場合があります。MitoPeDPP の DMSO 溶液が黄色になることをご確認ください。

保存条件

遮光、0-5°Cにて保存してください。

*** 注意 ***

アルミラミジップ開封後、未使用の MitoPeDPP はアルミラミジップに入れたままチャックをしっかりと閉め、0-5°Cで保存してください。

必要なもの

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

溶液調製

- 0.1 mmol/l MitoPeDPP DMSO solution の調製

MitoPeDPP 5 μg を含むチューブに 50 μl の DMSO を加えピペティングにより溶解する。

※ MitoPeDPP (DMSO) 溶液は不安定のため、調製後は遮光して、その日のうちにご使用ください。

- MitoPeDPP working solution の調製

最終濃度が 0.1-0.5 $\mu\text{mol/l}$ になるように MitoPeDPP DMSO solution を Hanks' HEPES buffer 等で希釈する。

※細胞の状態を維持するため Hanks' HEPES buffer をお勧めします。

※ MitoPeDPP は自動酸化を受けやすいので working solution は細胞試料に添加する直前に調製してください。

操作

- 1) 細胞を準備する。
- 2) 培地を取り除き、Hanks' HEPES buffer または PBS で 2 回洗浄する。
- 3) 調製した MitoPeDPP working solution を添加する。

培養器材	working solutionの量
35-mmディッシュ	2000 μl
96 wellプレート	100 μl

4) 遮光下で 37°C、15 分間インキュベートする。

5) 上澄みを除去し、Hanks' HEPES buffer または PBS で 2 回洗浄する。

6) 刺激剤を含む Hanks' HEPES buffer または PBS を加え蛍光顕微鏡で観察する。

※ Filter (wavelength/band pass): 470/40 (Ex), 525 /50 (Em)

※細胞種または刺激剤等により脂溶性過酸化物の生成時間が異なるため、刺激剤添加後は MitoPeDPP の蛍光強度の変化を継続的に観察してください。

注意点

一般的な使用方法を記載しております。MitoPeDPP の終濃度、刺激剤添加後の暴露時間など最適条件をご検討ください。

● Rotenone を用いた脂溶性過酸化物の検出例

HeLa 細胞を μ -slide 8 well (Ibidi) に播種し 37°C、CO₂ インキュベーターにて一晚培養した。培地を取り除き、200 μ l の Hanks' HEPES buffer で細胞を 2 回洗浄後、Hanks' HEPES buffer で希釈した 0.1 μ mol/l の MitoPeDPP を添加し 37°C で 15 分インキュベートした。上澄みを除き、Hanks' HEPES buffer で 2 回洗浄した後、200 μ l の Hanks' HEPES buffer を加え蛍光顕微鏡にセットした。Hanks' HEPES buffer で希釈した 2 μ mol/l の Rotenone 溶液を 200 μ l 加え、蛍光顕微鏡で 3 時間経時撮影した (終濃度 1 μ mol/l)。

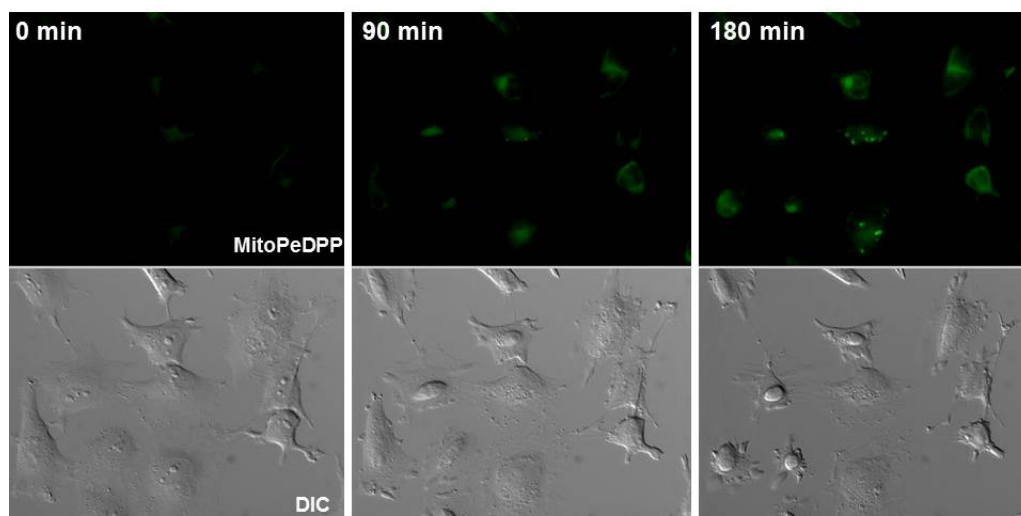


図 1 Rotenone 添加後の HeLa 細胞の蛍光画像

左) Rotenone 添加直後、中) Rotenone 添加 90 分後、右) Rotenone 添加 180 分後

● 各種 ROS (reactive oxygen species)、RNS (reactive nitrogen species) との MitoPeDPP の反応選択性

MitoPeDPP は均一系では H₂O₂、*t*-BHP、ONOO⁻ などの過酸化物と反応性を示したが、細胞内でミトコンドリアに集積した MitoPeDPP は脂溶性過酸化物により酸化を受けて蛍光を発した (図 2. A)。一方、細胞内では他の ROS、RNS との反応性は低いことが確認された (図 2. B)。

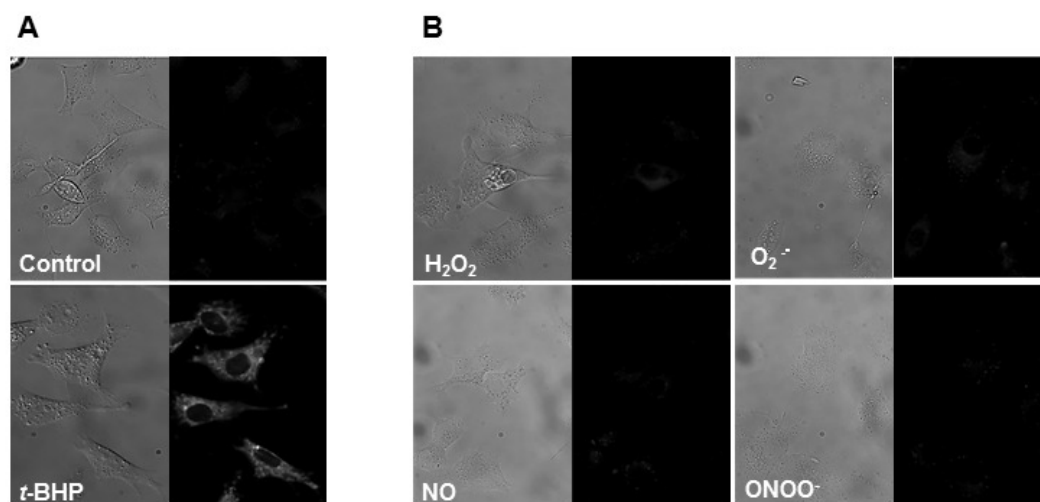


図 2.

A) HepG2 細胞中で MitoPeDPP を 15 分インキュベート後、100 μ mol/l *t*-BHP を添加。15 分インキュベート後、顕微鏡画像取得。写真は *t*-BHP を添加した系、添加していない系の位相差画像 (左) と蛍光画像 (右) を示している。

B) HepG2 細胞中で MitoPeDPP をインキュベート後、各種 ROS、RNS 発生剤を添加。H₂O₂、NO、ONOO⁻ は各発生剤の濃度を 100 μ mol/l で使用。O₂⁻ は PMA により発生させ 10 μ mol/l の濃度で使用。

**t*-BHP (*tert*-Butylhydroperoxide), PMA (Phorbol myristate acetate), SIN-1 [3-(Morpholinyl)sydnominine, hydrochloride], NOC 7 [1-Hydroxy-2-oxo-3-(*N*-methyl-3-aminopropyl)-3-methyl-1-triazene]
Filter (wavelength/band pass): 470/40 (Ex), 525 /50 (Em)

参考文献

- 1) K. Shioji *et al.*, "Synthesis and properties of fluorescence probe for detection of peroxides in mitochondria", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2010**, *20*, 3911.
- 2) K. Shioji *et al.*, "Fluorescence imaging of accumulated lipid peroxidation in mitochondria by oxidative stress", *Bioorg. Med. Chem.*, submitted.

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