

マイトファジーを 簡便に見る

マイトファジー検出キット Mitophagy Detection Kit

キットコンポーネント
Mtphagy Dye を
単品発売開始！

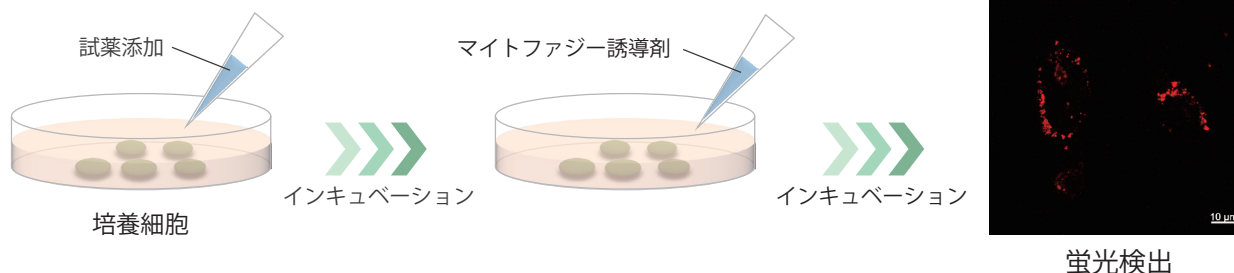
マイトファジー 同仁

検索

DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.

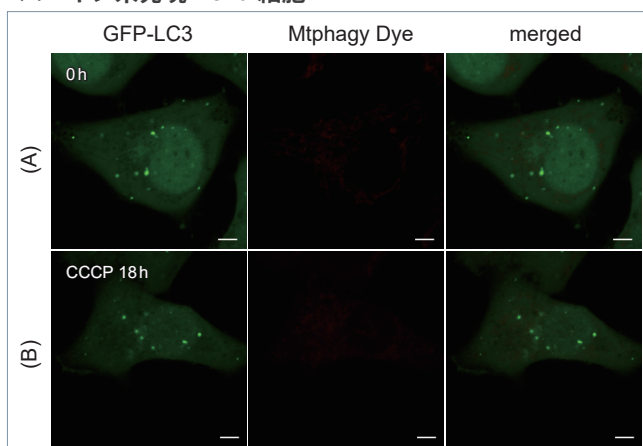
操作は試薬の添加だけ

準備した細胞に試薬を添加するだけの簡単な操作で蛍光イメージングを実現します。

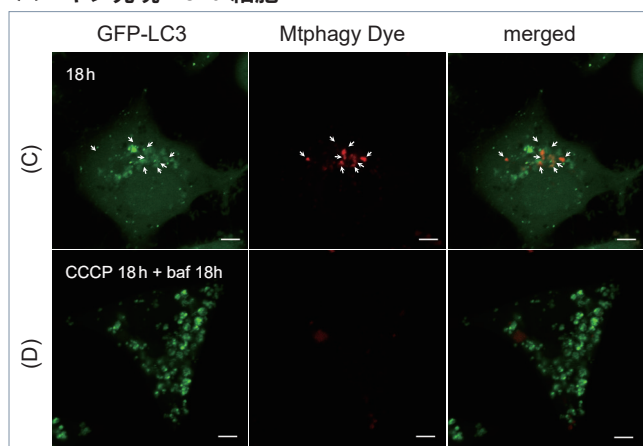


オートファジーマーカーとの比較

パーキン未発現 HeLa 細胞



パーキン発現 HeLa 細胞

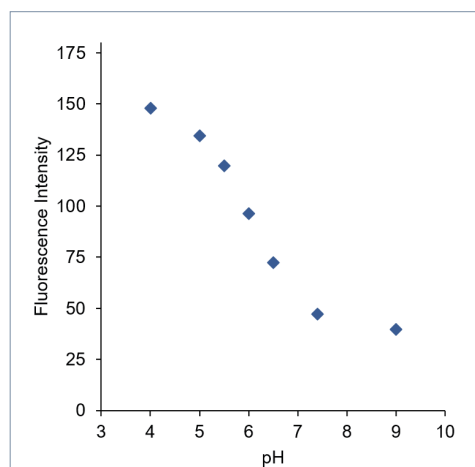
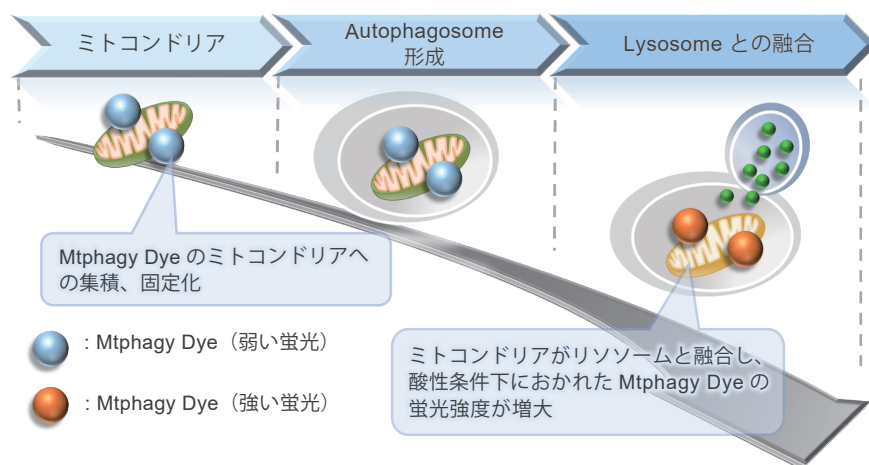


パーキン未発現および発現 HeLa 細胞に CCCP (carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone) を添加してマイトファジーを誘導した。CCCP 添加直後のパーキン未発現細胞 (A)、発現細胞 (データ非表示) および CCCP 添加 18 時間後のパーキン未発現細胞 (B) では、Mtphagy Dye の蛍光はみられなかった。

一方、CCCP 添加 18 時間後のパーキン発現細胞 (C) では Mtphagy Dye の蛍光が増大し、オートファジーマーカー (GFP-LC3) の Puncta (斑点) と共局在することを確認できた。またオートファジー阻害剤であるバフィロマイシン (baf) を添加した細胞 (D) では、リソソーム内の pH が上昇するため、酸性環境で蛍光を発する Mtphagy Dye の蛍光は消失することも確認できている。

マイトファジー検出キット Mitophagy Detection Kit

マイトファジーにより蛍光が増大



pH による Mtpagy Dye の蛍光強度変化

pH 依存的に蛍光強度が変化する Mtpagy Dye は、pH4-5 付近で強い蛍光を示します。

培養細胞に試薬 (Mtpagy Dye) を添加すると、ミトコンドリアに Mtpagy Dye が集積しますが、この状態では蛍光強度は弱い状態です。その後、マイトファジーが誘導されミトコンドリアがオートファゴソームに内包され、リソソームと融合すると酸性条件下となり Mtpagy Dye の蛍光が増大します。さらに、本キットに付属するリソソーム染色試薬 (Lyso Dye) と共染色することができます。

Mitophagy Detection Kit の原理・実績を説明した論文が公開されました。

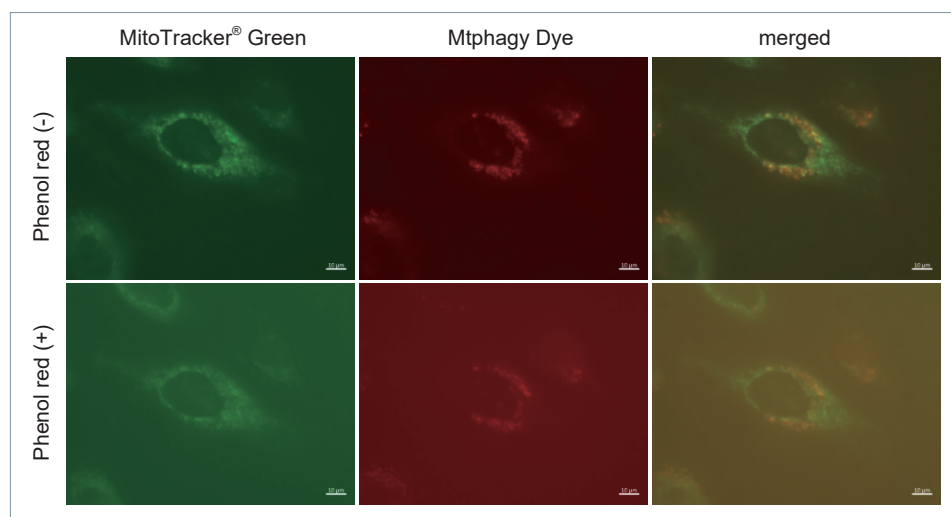
H.Iwashita, S.Torii, N.Nagahora, M.Ishiyama, K.Shioji, K.Sasamoto, S.Shimizu, and K.Okuma, "Live Cell Imaging of Mitochondrial Autophagy with a Novel Fluorescent Small Molecule", *ACS Chem. Biol.*, **2017**, 12, 2546-2551.

※その他の使用論文は、本社製品 HP にて紹介しています。

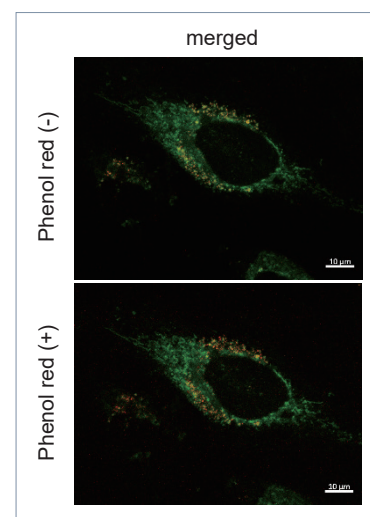
フェノールレッドの影響

落射型顕微鏡ではフェノールレッドによるバックグラウンドの上昇が顕著にみられましたが、フェノールレッドを不含にすることでバックグラウンドを低減することができました。一方、共焦点レーザー顕微鏡ではフェノールレッドの有無によるバックグラウンドの差はみられませんでした。

落射型蛍光顕微鏡

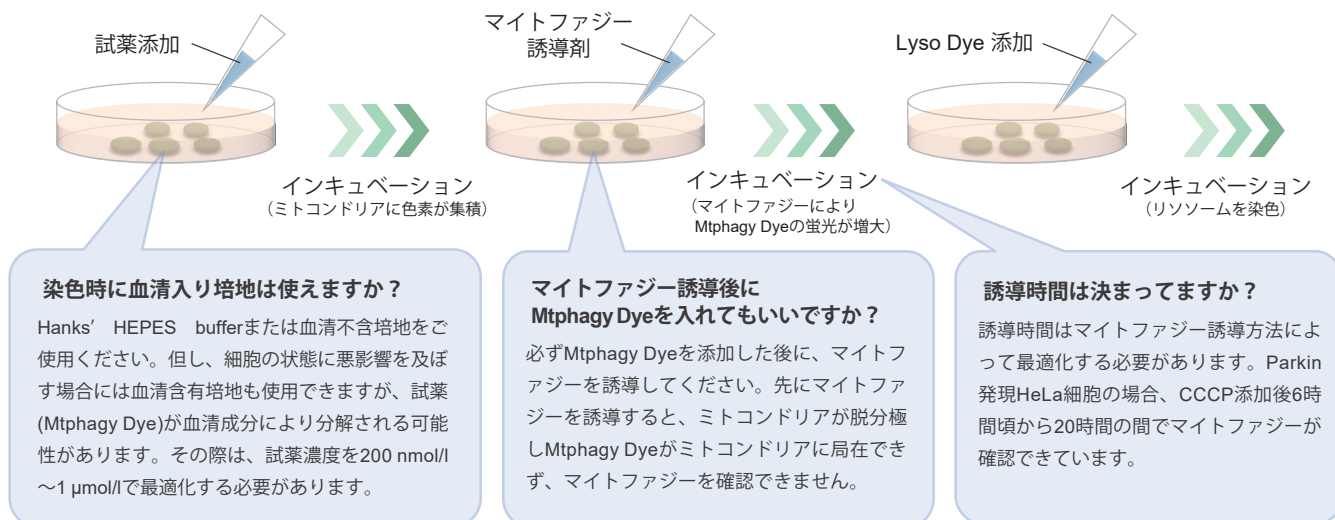


共焦点レーザー顕微鏡



よくあるご質問

操作上の注意点、コツはありますか？



固定化した細胞は使用できますか？

実験では生細胞を使う必要があります。理由は、ミトコンドリアに対して静電相互作用で Mtpthagly Dye が集積する性質を利用しているためです。そのため固定化細胞やミトコンドリアが脱分極した状態では、Mtpthagly Dye がミトコンドリアに集積できなくなります。また染色後に細胞を固定化した場合には、マイトファジーが起きているオートリソソーム内の pH が固定液等で中性となり、Mtpthagly Dye の蛍光が失われてしまいます。

観察に適した励起・蛍光フィルターは？

各試薬の推奨フィルターは以下の通りです。

Mtpthagly Dye : 励起 (500 ~ 560 nm)、蛍光 (670 ~ 730 nm) ※ 共焦点顕微鏡の場合、488 nm 励起でも検出できた実績があります。

Lyso Dye : 励起 (350 ~ 450 nm)、蛍光 (500 ~ 560 nm)

※ 励起・蛍光スペクトルを、Web ページに掲載しています。

ポジティブコントロールの条件を教えてください？

マイトファジーを検出される際には、ポジティブコントロールを準備し、お持ちの検出系でマイトファジーが検出できることを確認されることをお勧めします。ポジティブコントロールとしては、下記実験で確認した実績がありますのでご参照ください。

Parkin 発現株

Parkin プラスミドを遺伝子導入した後、CCCP 添加によりマイトファジーを誘導できます。この方法によるポジティブコントロールが最も高い感度で検出できます。(実験結果は本紙裏面、操作法は取扱説明書中に掲載)

オートファジー誘導剤

オートファジー誘導剤であるエトポシドやラパマイシンにより、マイトファジー誘導を確認しています。(下記論文に詳細な実験内容と結果を掲載)

H.Iwashita, S.Torii, N.Nagahora, M.Ishiyama, K.Shioji, K.Sasamoto, S.Shimizu, and K.Okuma, "Live Cell Imaging of Mitochondrial Autophagy with a Novel Fluorescent Small Molecule", *ACS Chem. Biol.*, **2017**, *12*. 2546-2551.

飢餓培養

アミノ酸不含培地での検出実績がございます。詳細は本紙裏面の実験例をご参考にしてください。

Parkin 発現株での検出例

	Mtphagy Dye (マイトファジー染色)	Lyso Dye (リソソーム染色)	MitoBright Deep Red (ミトコンドリア染色)	merged	
Parkin (-)					<フィルター> Mtphagy Dye: 561 nm (Ex)、650 LP nm (Em) Lyso Dye: 488 nm (Ex)、502-554 nm (Em) MitoBright Deep Red: 640 nm (Ex)、656-700 nm (Em)
Parkin (+)					

Parkin 発現 HeLa 細胞 (下段) および未発現 HeLa 細胞 (上段) に CCCP(carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone) を添加した。Parkin を発現した細胞を CCCP でマイトファジーを誘導し、蛍光イメージングにより検出した。また、ミトコンドリア染色色素 (MitoBright Deep Red : MT08) と共染色することにより、リソソームに取り込まれたミトコンドリア (白色) と取り込まれていないミトコンドリア (紫色) を識別することが可能となった (写真: 右)。

飢餓培養細胞での検出例

	Mtphagy Dye (マイトファジー染色)	Lyso Dye (リソソーム染色)	merged	
control				HeLa 細胞へMtphagy Dyeを添加後、飢餓培養条件下にて6 時間インキュベート。その後Lyso Dye添加によりリソソームの共染色を行った。結果、飢餓培養したHeLa細胞において、Mtphagy Dyeの蛍光の増大がみられ、その局在はリソソームの局在とも合致した。 誘導条件 : DMEM培地 (アミノ酸不含、Pepstatin A及びE-64d含有) <フィルター> Mtphagy Dye: 561 nm (Ex)、650 LP nm (Em) Lyso Dye: 488 nm (Ex)、502-554 nm (Em)
飢餓培養				

品 名	容 量	希望納入価格	コード	メーカーコード
Mitophagy Detection Kit	1 set	¥ 36,000	344-91901	MD01
Mtphagy Dye	5 µg×3	¥ 78,000	349-92051	MT02

- 記載価格は本体価格のみで、消費税等は含まれておりません。
- 記載価格はこのパンフレット編集時(2018年10月)における希望納入価格です。予告なしに変更する場合がございますのでご注意ください。
- 試験・研究用のみに使用するものです。医療用その他の目的には使用できません。

国内販売元

富士フイルム 和光純薬株式会社

URL : ffwk.fujifilm.co.jp Free Dial : 0120-052099 Free Fax : 0120-052806

製造委託元・国内問合せ先

株式会社 同仁化学研究所

URL : www.dojindo.co.jp E-mail : info@dojindo.co.jp
 Free Dial : 0120-489-548 Tel : 096-286-1515(代表)
 受付時間 9:00 - 17:00(土日祝日を除く)

ドージン・イースト(東京)

Tel : 03-3578-9651(代表)

開発元

DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.

30 W Gude Dr. Suite 260, Rockville, MD 20850, USA
 URL : www.dojindo.com
 E-mail : info@dojindo.com

取扱店