

マイトファジーを検出したい

使用製品

Mitophagy Detection Kit [MD01]

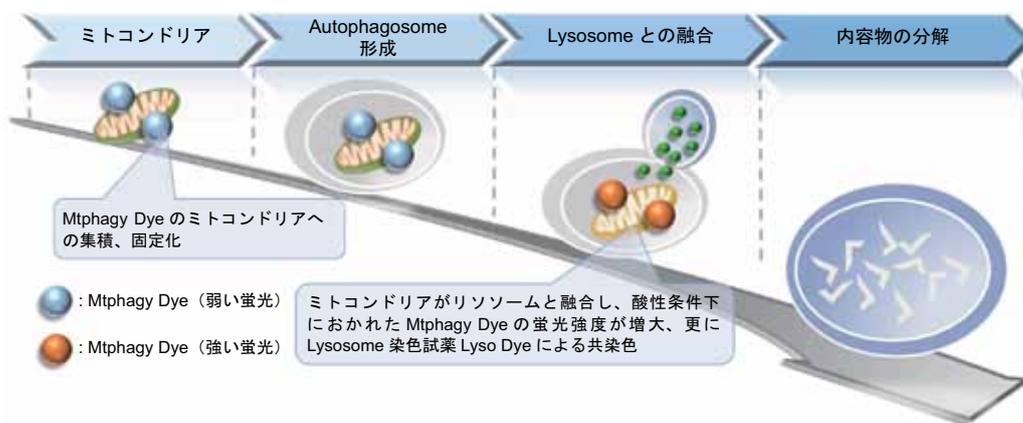
解析装置



I 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 Mtpthagy Dye と Lyso Dye で構成されています。Mtpthagy 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、Mtpthagy 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試薬である 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。



II 製品以外に必要なもの

- Dimethyl sulfoxide (DMSO)
- Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) 又は無血清培地 (フェノールレッド不含)
- マイクロピペット

III マイトファジーの検出

(1) 溶液調製

100 μmol/l Mtpthagy Dye DMSO stock solution の調製

Mtpthagy Dye 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。

※ 調製後は -20℃で保存する。調製後 1 か月間安定。

1 mmol/l Lyso Dye DMSO stock solution の調製

Lyso Dye 30 μg を含むチューブに 55 μl の DMSO を加えピペティングにより溶解する。

※ 調製後は -20℃で保存する。調製後 1 か月間安定。

100 nmol/l Mtpthagy Dye working solution の調製

最終濃度が 100 nmol/l になるように Mtpthagy Dye DMSO stock solution を Hanks' HEPES buffer または無血清培地 (フェノールレッド不含) で希釈する。

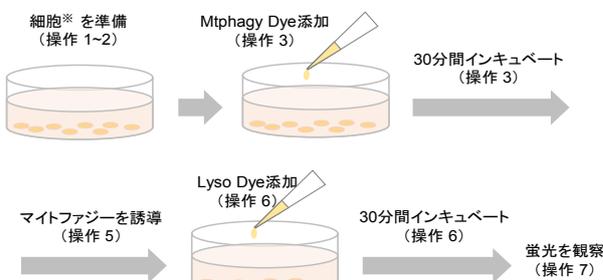
※本試薬は血清成分と干渉するため、無血清培地または Hanks' HEPES buffer で希釈する。

1 μmol/l Lyso Dye working solution の調製

最終濃度が 1 μmol/l になるように Lyso Dye DMSO stock solution を Hanks' HEPES buffer または無血清培地 (フェノールレッド不含) で希釈する。

※本試薬は血清成分と干渉するため、血清不含培地または Hanks' HEPES buffer で希釈する。

(2) 染色操作



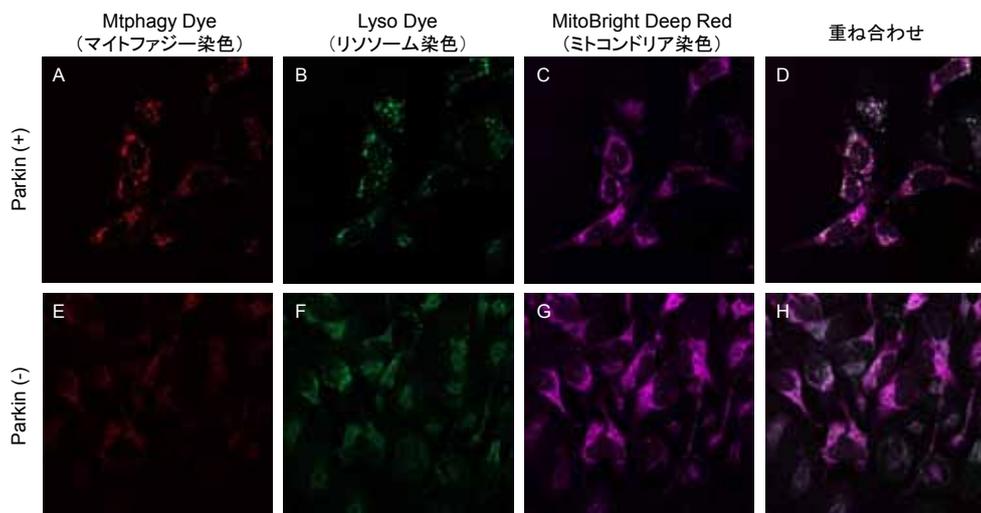
※ 固定化した細胞では、Mtpthagy Dye がミトコンドリアに集積することができません。また染色後に細胞を固定化すると、リソソームと融合したミトコンドリアは酸性に保たれず、Mtpthagy Dye の蛍光は増大しません。

- 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 Mtpthagy Dye working solution を添加し、37℃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℃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) Mtpthagy 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℃で 30 分間インキュベートする。
- 7) 上澄みを除去後、Hanks' HEPES buffer または無血清培地で 2 回洗浄し、蛍光顕微鏡にて観察する。

IV Parkin 発現および未発現の HeLa 細胞での マイトファジー検出例

- 1) μ -slide 8 well (ibidi) に HeLa 細胞を播種し 37°C、CO₂ インキュベーターにて一晩培養した。
- 2) HilyMax (Code:H357) を用いて Parkin プラスミドを細胞に導入し、さらに一晩培養した。
- 3) Hanks' HEPES buffer で 2 回洗浄後、100 nmol/l MitoBright Deep Red (Code:MT08) を含む Mtpahgy Dye working solution を添加し 30 分インキュベートした。

- 4) Hanks' HEPES buffer で 2 回洗浄後、10 μ mol/l CCCP (carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone) を含む培養培地で 24 時間培養した。
- 5) 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 μ mol/l Lyso Dye working solution を加え 30 分インキュベートした。
- 6) Hanks' HEPES buffer で 1 回洗浄後、共焦点レーザー顕微鏡で測定した。



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) Mtpahgy 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
 ・ Mtpahgy 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)

V 飢餓誘導条件下での検出例

- 1) μ -slide 8 well (ibidi) に HeLa 細胞を播種し 37°C、CO₂ インキュベーターにて一晩培養した。
- 2) Hanks' HEPES buffer で 2 回洗浄後、100 nmol/l Mtpahgy Dye working solution を添加し 30 分インキュベートした。
- 3) Hanks' HEPES buffer で 2 回洗浄後、各飢餓誘導条件下にて 6 時間培養した。

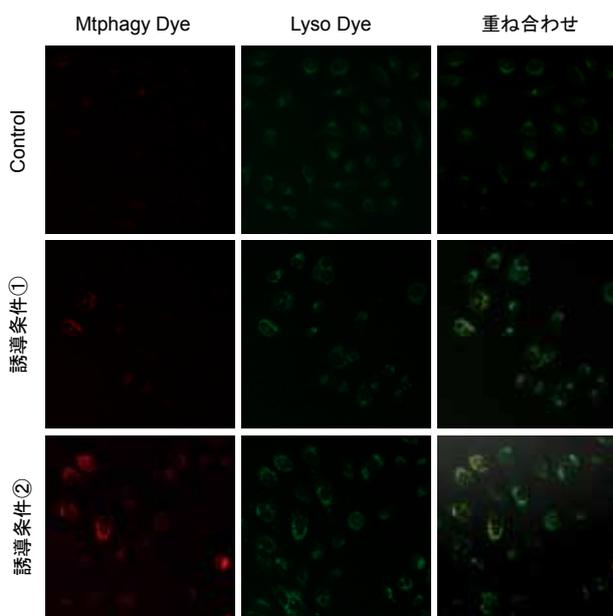
誘導条件①:

Krebs' Buffer (Pepstatin A 及び Glucagon 含有)
 Krebs-Ringer-HEPES buffer (pH=7.4) (115 mmol/l NaCl, 5 mmol/l KCl, 1 mmol/l KH₂PO₄, 1.2 mmol/l MgSO₄, 2 mmol/l CaCl₂, 25 mmol/l HEPES) に 1.0 μ mol/l Glucagon, 7.5 μ mol/l Pepstatin A を添加する (表示は終濃度)。

誘導条件②:

DMEM (アミノ酸不含、Pepstatin A 及び E-64d 含有)
 DMEM (和光純薬工業、code: 048-33575) に 7.5 μ mol/l Pepstatin A、1.0 μ mol/l E-64d を添加する (表示は終濃度)。

- 4) 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、1 μ mol/l Lyso Dye working solution を加え 30 分インキュベートした。
- 5) Hanks' HEPES buffer で 1 回洗浄後、共焦点レーザー顕微鏡で測定した。



HeLa 細胞の飢餓誘導条件下での検出例
 ・ Mtpahgy Dye: 561 nm (Ex)、LP 650 nm (Em)
 ・ Lyso Dye: 488 nm (Ex)、502-554 nm (Em)

細胞
増殖/毒性
酸化
ストレス
分子
生物学
細胞内
蛍光プローブ
細胞
染色
ミトコンドリア
関連試薬
細菌研究用
試薬
膜タンパク質
可溶化剤
ラベル
化剤
二価性
試薬
イオン
電極
その他
機能性
有機材料

細胞
増殖/毒性
酸化
ストレス
分子
生物学
細胞内
蛍光プローブ
細胞
染色
ミトコンドリア
関連試薬
細菌研究用
試薬
膜タンパク質
可溶化剤
ラベル
化剤
二価性
試薬
イオン
電極
その他
機能性
有機材料

参考文献

- 1) J. Koniga, C.Otta, M. Hugoa, T. Junga, A. L. Bulteaub, T. Grunea and A. Hohna, "Mitochondrial contribution to lipofuscin formation", *Redox Biology.*, **2017**, *11*, 673.
- 2) Kazuhisa Kameyama, "Induction of mitophagy-mediated antitumor activity with folate-appended methyl-β-cyclodextrin", *International Journal of Nanomedicine.*, **2017**, *12*, 3433-3446.
- 3) E. F. Fang, T. B. Waltz, H. Kassahun, Q. Lu, J. S. Kerr, M. Morevati, E. M. Fivenson, B. N. Wollman, K. Marosi, M. A. Wilson, W. B. Iser, D. M. Eckley, Y. Zhang, E. Lehrmann, I. G. Goldberg, M. S. Knudsen, M. P. Mattson, H. Nilsen, V. A. Bohr, and K. G. Becker., "Tomatidine enhances lifespan and healthspan in *C. elegans* through mitophagy induction via the SKN-1/Nrf2 pathway", *Scientific Reports.*, **2017**, *7*, 46208, DOI: 10.1038/srep46208.
- 4) 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* (10), 2546.

FAQ

- Q: 既存法に対する利点を教えてください
- A: pH センサー Keima タンパク質を用いた検出方法と比較して、本キットは低分子蛍光試薬を用いるため、蛍光タンパク質を発現させる必要がありません。また、一般的なライブセルイメージング用の蛍光試薬と同様の操作方法で染色、観察することができます。
- Q: 蛍光顕微鏡の推奨フィルターを教えてください。
- A: 各試薬に応じて以下のフィルターを推奨します。
 Mtphagy Dye: 励起 (500-560nm)、蛍光 (670-730nm)
 Lyso Dye: 励起 (350-450nm)、蛍光 (500-560nm)
- Q: 染色前に細胞を固定化できますか？
- A: 染色前に固定化すると、試薬のミトコンドリア集積能が失われるため、固定化はできません。

最新の測定データやアプリケーション、論文情報を小社 HP にて掲載。ご興味のある方は、小社 HP にて最新情報をご確認下さい。

Mitophagy 同仁