

DOJIN NEWS

ドージンニュース

Review

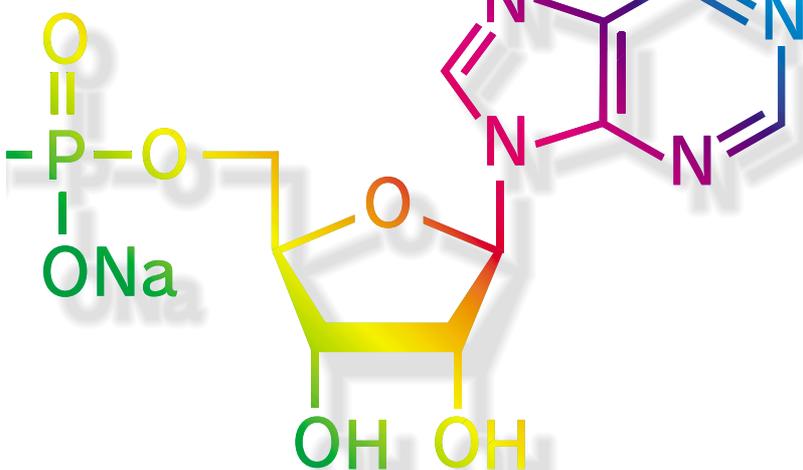
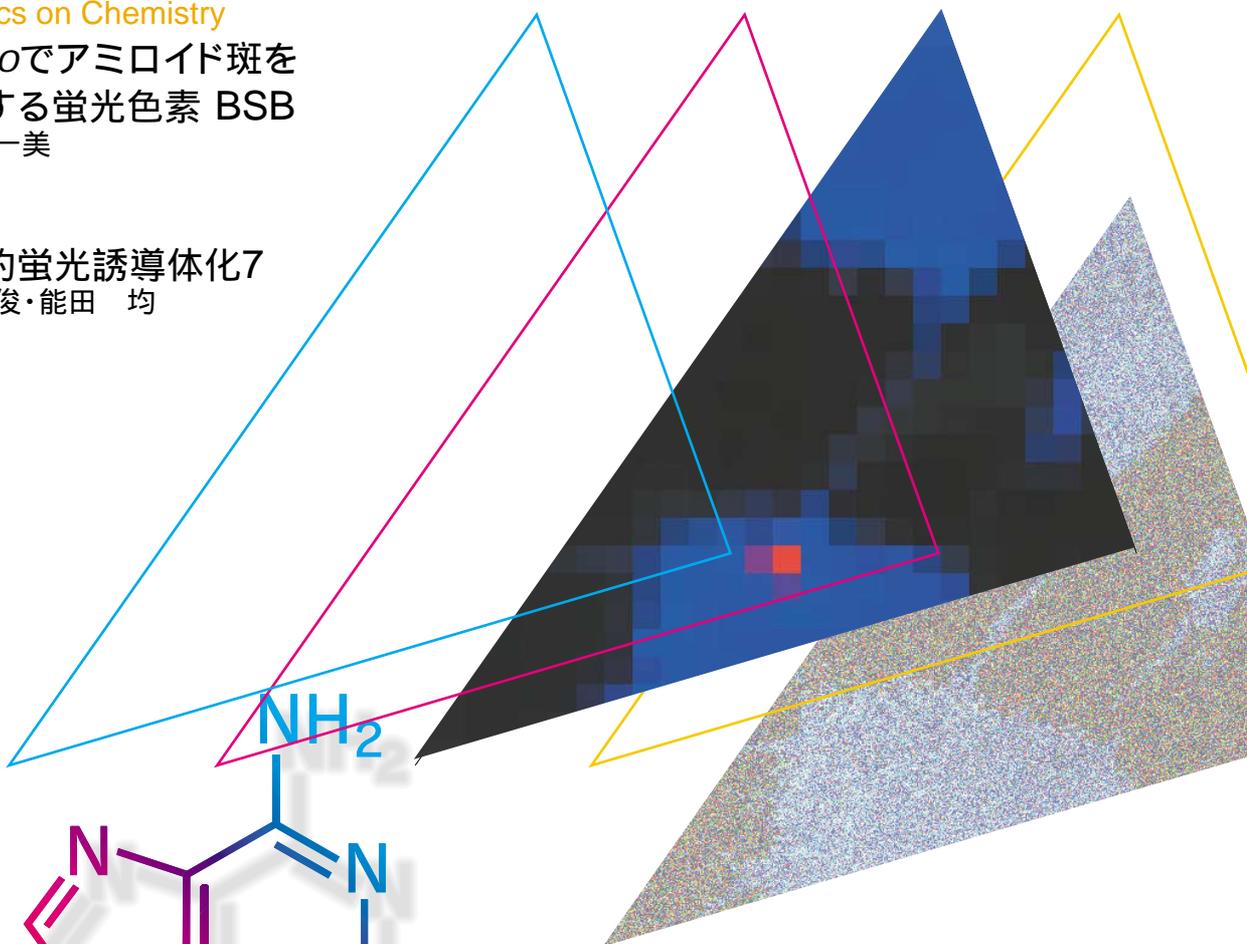
新規のプラスミド構築及び変異、欠失導入法：
CLIP(Cross-linked Primer)法の原理
小原健志

Topics on Chemistry

*In vivo*でアミロイド斑を
染色する蛍光色素 BSB
佐々本一美

連載

実用的蛍光誘導体化7
山口政俊・能田 均



目次

Review

新規のプラスミド構築及び変異、欠失導入法 :

CLIP(Cross-linked Primer)法の原理

熊本大学医学部 小原 健志

実用的蛍光誘導体化 7

福岡大学薬学部 山口 政俊、能田 均

Topics on Chemistry

In vivo でアミロイド斑を染色する蛍光色素 BSB

Commercial

生物発光用発光物質

Nitrosothiol Assay Kit 改良タイプ

細胞染色用色素

お知らせ

販売中止のご案内

第 11 回フォーラム・イン・ドージン開催報告

新製品案内

容量、価格は下記ページをご覧ください。

生物発光用発光物質

Nitrosothiol Assay Kit 改良タイプ

細胞染色用色素



11th フォーラム・イン・ドージン オーガナイザーと演者の先生方

新規のプラスミド構築及び変異、欠失導入法： CLIP(Cross-linked Primer)法の原理



小原 健志
(Kenshi Obaru)
熊本大学医学部第二内科

[Summary]

At present, the sequence analyses of the human genome were completed, and the function of a large number of the genes is being cleared. It is getting practical to grant the novel function to the cells using these information of the genomes. However, it was difficult to construct the plasmid which has the multiple function. Although it is indispensable to recombine a number of the genes into a single plasmid, it is difficult to construct the plasmid using the methods of digestion by restriction enzymes or recombinase and ligation, since it is required to restrict one or two restriction enzyme site or *LoxP* site in the plasmid. However the CLIP methods described here shows possibility of construction the plasmid using the cross-linked primers (CLIP). This method enables any construction of the plasmid DNA. Here, we describe the principle of the CLIP method.

キーワード：クローニング、PCR、クロスリンク、プライマー

要約

現在ヒト全遺伝子の塩基配列の解析が終わり、多くの遺伝子の機能が解明されつつある。これらの情報を利用し、細胞や大腸菌などに複雑な機能を付与することが可能となってきた。しかし、これ迄の技術では、複雑な高度の機能をもつプラスミドを構築するのは不可能に近かった。複数の遺伝子を一つのプラスミドに組み換えたプラスミドの構築が必要だが、制限酵素や *LoxP* などの特異的塩基配列を切断し結合する構築法では、特異的塩基配列をプラスミド内に一つまたは二つに限定していく必要があったため構築が困難であった。しかし、ここに紹介する新規のプラスミド構築法では、クロスリンクしたプライマー (CLIP; Cross-linked Primer) を用いる事により、そのような特異的塩基配列を殆ど必要とせず、自由にプラスミドを構築できるため、極めて高度で複雑なプラスミド構築が可能となってきた。また、この方法では、変異の導入、欠失が簡単に行なえるようになった。ここでは、この革新的 CLIP 法の原理を紹介する。

緒言

バイオテクノロジーの最も基本的な技術の一つがプラスミドの構築であり、分子生物学の発展の中でプラスミドの構築が重要であった事は、言及する迄もない。しかし、バイオテクノロジーの中でもプラスミドの構築は、手間と時間のかかるステップであり、プラスミドの構築は制限酵素切断部位の有無により制約されている。トポイソメラーゼ、ligation independent cloning (LIC)、リコンビネースを使う方法が開発されてきたが、特定の塩基配列に制約されてしまう。また、PCR産物のクローニング法として多くの技術が開発された。PCRプライマーに制限酵素切断部位をいれる方法¹⁾、blunt-endクローニング^{2,3)}、TAクローニング^{4,5)}、ligation independent cloning (LIC)⁶⁻¹⁰⁾、*in vivo*クローニング^{11,12)}。これらの方法では、PCR産物またはベクターの酵素処理が必要であり^{1,4-7,9,10,13)}、PCRプライマーが特別な塩基を含む必要があり^{8,13)}、特別なベクターあるいは細菌株^{3,12)}が必要である。また、最近ではCre-*LoxP*を利用した系も開発されているが、*LoxP* (32bp)の特異的塩基配列が必要であり、組み換える事ができる遺伝子が一つに限定されるなど高度化されていくプラスミド構築において限

界があることは、明瞭である。いずれの方法でも、ベクターを改変しオリジナルなプラスミドを作成しようとする大変困難なものになってしまう。

そこで、酵素による切断、結合が不要で、しかも特異的塩基配列が不必要な方法がないかを検討した。ここで一番の問題は環状化する方法である。直鎖状のプラスミドは、大腸菌をトランスフォームできないが、環状のプラスミドは、大腸菌をトランスフォームすることができる。すなわち、プラスミドを大腸菌に導入するには環状化する必要がある。DNAを環状化するためにはライゲース、トポイソメラーゼ、リコンビネース等の酵素または特殊なプライマーが使用されてきた。しかし、単純に2本のプライマーを結合してPCRをすると環状化されるはずである。このことを調べるためにクロスリンクしたプライマーを用いてPCRし、大腸菌をトランスフォームするかを検討したところ、大腸菌のコロニーを得る事ができた。また、組換え及び変異、欠失の導入も容易にできるようになった。

ここで紹介するCLIP法は、酵素等の特異的塩基配列の呪縛から逃れ自由なプラスミド構築を可能とする事により、ポストゲノム時代における増大する遺伝情報を利用した多様な機能を発現させるための高度なプラスミド構築を可能としている。

材料と方法

クロスリンクしたオリゴヌクレオチドの作成

プライマーの設計；オリゴヌクレオチドは、二本のオリゴヌクレオチドの5'末端が相補的であり、3'末端が突出するように設計する。ブソラレンでクロスリンクする場合、この相補鎖のなかに5'-TA-3'を含むようにする。この5'-TA-3'において、二つのオリゴヌクレオチドがブソラレンによりクロスリンクされる¹⁴⁾。

オリゴヌクレオチドのクロスリンク；二本のオリゴヌクレオチドを各々に蒸留水を加えて100pmol/μlにする。20μlずつ加え混和しブソラレン飽和液(ブソラレン1mg(Sigma)を140μlの100%エタノールに溶解した。)を1μl加え20μlずつ分注する。100mMのNaClを加え1、2、4、8mM NaClにする。95℃で3分間加熱しその後室温で30分以上放置し自然光(昼間)の紫外線または

365nmの紫外線照射によりクロスリンクする¹⁴⁾。塩濃度は式1より二本のオリゴヌクレオチドの相補鎖の部分の T_m 値を計算し、 T_m 値が室温より高くなるように塩濃度を設定する。

$$T_m = 81.5 + 16.6 \times \log_{10} [S] + 0.41 \times (\%GC) - 500/N \quad (\text{式 1})$$

[S]は塩濃度(M)、%GCは相補鎖の部分のG、C含量(%), Nは相補鎖の部分のヌクレオチド数¹⁵⁾

PCR ; プライマー(T7pBR4287c:5'-GAATTCCTATAGTGAGTCGTATTACGTCAGGTGGCACCTTTTCGGG-3',T7pBR2347:5'-TAATACGACTCACTATAGGGGAATTCGGCGCTCTCCGCTTCCTCG-3')を使いPCRを行った。PCRは、PreMix ExTaq (宝酒造)を利用した。TaKaRa PCR Thermal Cycler Personal (宝酒造)を使用し、以下のプログラムを使用した: 94 で熱変性を3分間行い、94 50秒、53 50秒、72 3分を30サイクル行った後、最後に72 15分間行った。

大腸菌へのトランスフォーメーション ;

PCR産物をDH5αのコンピテント細胞に加え氷上で30分静置し、42 で40秒加温後LB培地を200μl加え37 で1時間加温し、アンピシリン添加LB寒地培地に播き一晚37 で加温する¹⁶⁾。翌日コロニー数を計測する。

結果と考察

CLIP (Cross-linked Primer) 法の原理

プラスミドを大腸菌にトランスフォーメーションするには、環状化する必要がある。通常のPCR反応では、直鎖状のDNAになってしまうため、大腸菌のoriをそのDNAが持っている大腸菌をトランスフォーメーションできない(図1-1)。しかし、この2本のプライマーを何らかの方法でクロスリンク(CLIP ; Cross-linked Primer)してPCRを行うとPCR産物は開環状(open circular DNA)になる(図1-2)。開環状DNAは、大腸菌をトランスフォーメーションできるので⁶⁾、クロスリンクした部位が大腸菌内で修正されるならばトランスフォーマントが得られるはずである。もう少しPCR反応を具体的に考察してみよう(図2)。直鎖状のDNAのA領域、B領域に対して相補の配列を持つCLIPは、熱変性後A領域または、B領域にアニーリングする(ステップ1)。次にCLIPから伸長反応が起こる(ステップ2)。伸長反応生成物は、熱変性後、CLIPとアニーリングする(ステップ3)。次にCLIPから伸長反応が起こる(ステップ4)。この伸長反応は、CLIPのクロスリンクした塩基を越える事ができない¹⁴⁾。CLIP間のPCR反応により各々一つのCLIP構造をもつ2種類の生成物が産生される(ステップ5)。各々のCLIP生成物はself-annealingにより伸長反応が起きself-circularizationするか(ステップ6、7)。2分子のCLIP生成物がアニーリングし伸長反応が起きCLIPの両側が伸長され、熱力学的に安定なself-annealingをして、環状化される(ステップ8、9、10、11)。このようにCLIPを使いPCRを行うと開環状DNAが得られると思われる。

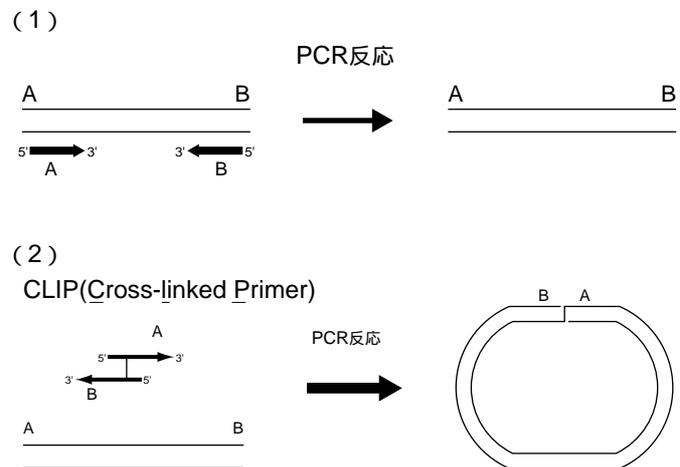


図1 CLIP(Cross-linked Primer)法の原理

- (1) 通常のPCR反応では、直鎖状のDNAになってしまうため、大腸菌のoriをそのDNAが持っている大腸菌をトランスフォーメーションできない。
- (2) しかし、この2本のプライマーを何らかの方法でクロスリンク(CLIP ; Cross-linked Primer)してPCRを行うとPCR産物は開環状(open circular DNA)になる。

CLIPの作成

オリゴヌクレオチドをクロスリンクする方法には、ナイトロゲンマスタード¹⁷⁾、α-bromomethylketone¹⁸⁾、iodoacetamidopropyl moiety¹⁹⁾、N⁶,N⁶-ethanoadenine or N⁴,N⁴-ethanocytosine alkylates²⁰⁾ ethyldisulfide or a propyl disulfide linkage²¹⁾、psoralen-derivatized methyl phosphonate oligonucleotides²²⁾、9-aminoellipticine²³⁾ 1,2-dideoxy-D-ribofuranose and butane 1,3-diol²⁴⁾ などを利用する方法があるが、最も簡便にできるプソラレンを用いた方法によりクロスリンクを行った。プソラレンは、365nmでthymidine塩基にクロスリンクされ、反対側のDNA鎖にthymidine塩基があると、それともクロスリンクされ、2本のDNA鎖がクロスリンクされる。そのため5'-TA-3'の塩基配列があると2本のDNA鎖がクロスリンクされる¹⁴⁾。

オリゴヌクレオチドは、図3のように、二本のオリゴヌクレオチドの5'末端が相補的であり、3'末端が突出するように設計する。プソラレンでクロスリンクする場合、この相補鎖のなかに5'-TA-3'を含むようにする。この5'-TA-3'において、二つのオリゴヌクレオチドがプソラレンによりクロスリンクされる。これを98 3分間加熱し3%の低融点アガロースゲルで電気泳動するとクロスリンクしたオリゴヌクレオチド(CLIP)は、電気泳動度が遅いバンドとして検出される(図3-2)。

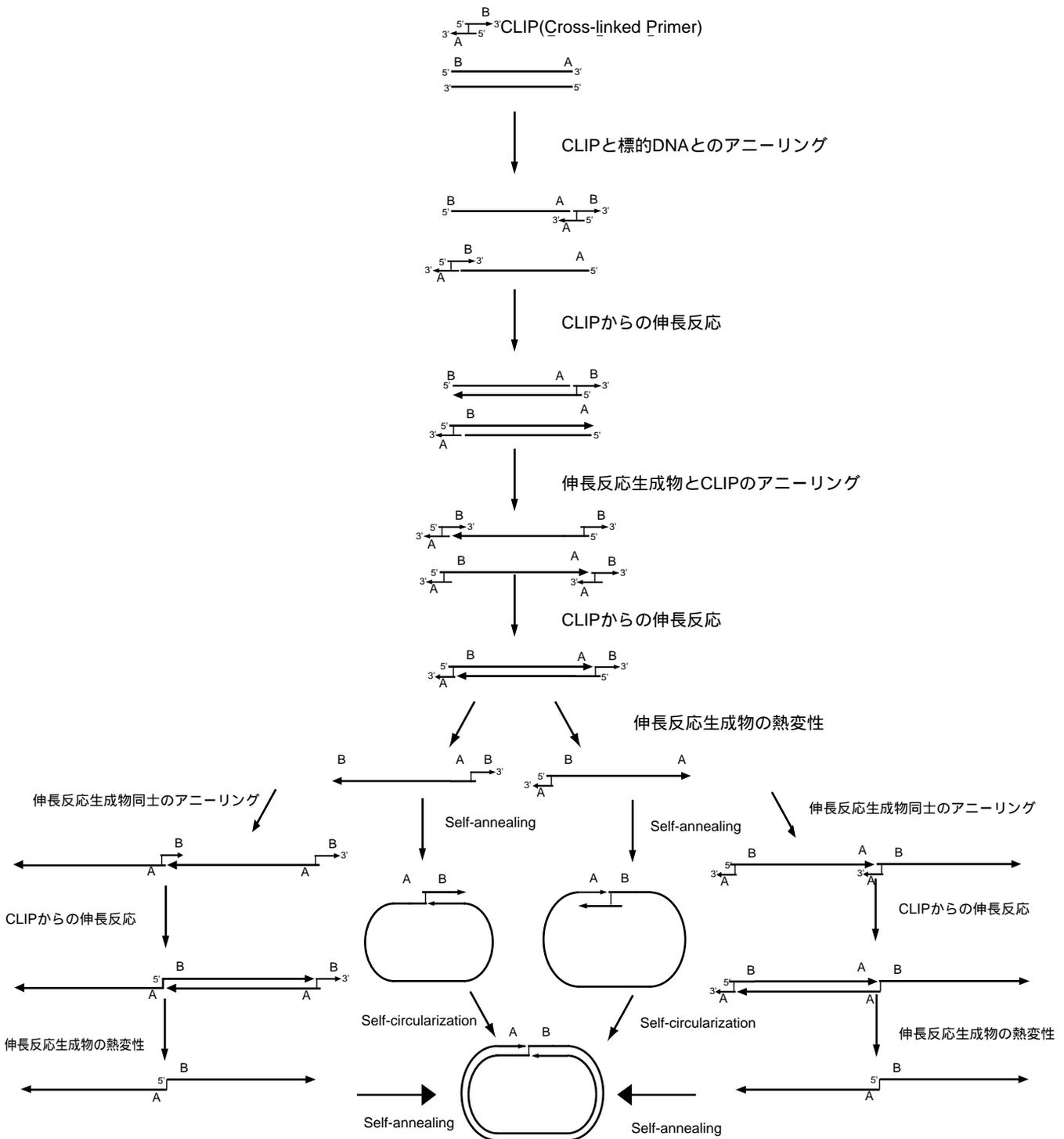


図2 CLIPによるPCRの詳細な説明

直鎖状のDNAのA領域、B領域に対して相補の配列を持つCLIPは、熱変性後A領域または、B領域にアニーリングする(ステップ1)。次にCLIPから伸長反応が起こる(ステップ2)。伸長反応生成物は、熱変性後、CLIPとアニーリングする(ステップ3)。次にCLIPから伸長反応が起こる(ステップ4)。この伸長反応は、CLIPのクロスリンクした塩基を越える事ができない。CLIP間のPCR反応により各々一つのCLIP構造をもつ2種類の生成物が産生される(ステップ5)。各々のCLIP生成物はself-annealingにより伸長反応が起きself-circularizationするか(ステップ6、7)、2分子のCLIP生成物がアニーリングし伸長反応が起きCLIPの両側が伸長され、熱力学的に安定なself-annealingをして、環状化される(ステップ8、9、10、11)。

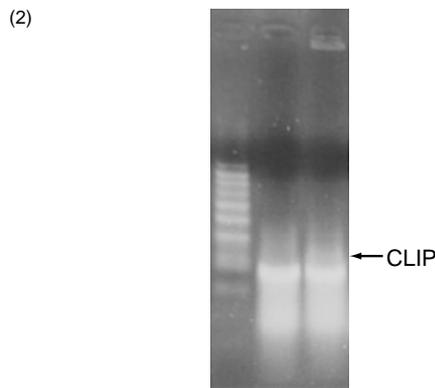
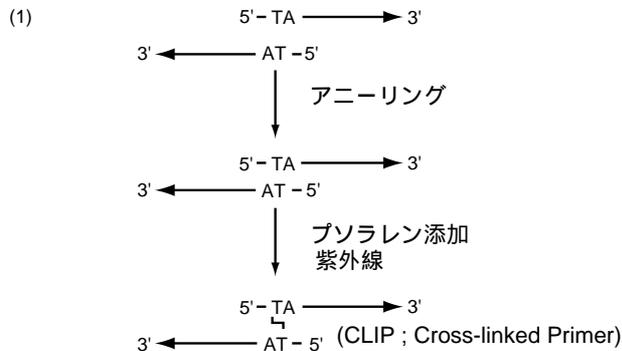


図3 CLIPの作成原理

(1) オリゴヌクレオチドは二本のオリゴヌクレオチドの5'末端が相補的であり、3'末端が突出するように設計する。プソラレンでクロスリンクする場合、この相補鎖のなかに5'-TA-3'を含むようにする。(2) クロスリンクしたオリゴヌクレオチド(CLIP)を3%の低融点アガロースゲルで電気泳動する。クロスリンクしたオリゴヌクレオチド(CLIP)は、電気泳動度が遅いバンドとして検出された。

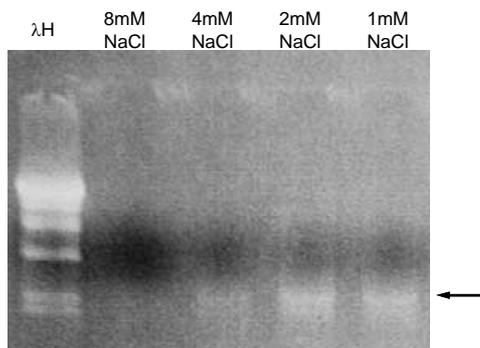


図4 CLIPを用いたPCR

1、2、4、8mM NaClでクロスリンクしたCLIPを用いてPCR反応を行った後、0.8%のアガロースで電気泳動した。矢印でPCR産物が示されている。2mM NaClで最も良く増幅されている。

CLIPを用いたPCR

2本のオリゴヌクレオチドを混和した溶液にNaCl溶液を加え1、2、4、8mM NaClにする。95℃で3分間加熱しその後室温で30分以上放置し、プソラレン添加後、自然光(昼間)の紫外線または365nmの紫外線照射によりクロスリンクする。pBR322をEcoRIで切断した直鎖状のDNAをテンプレートとして10ng用い、各塩濃度でクロスリンクしたCLIPとPreMix ExTaq (TaKaRa)を加えPCRを行う。PCR終了後、反応液を0.8%のアガロースで電気泳動する。1、2、4、8mM NaClでクロスリンクした場合、2mM NaClで最も良く増幅されている(図4)。

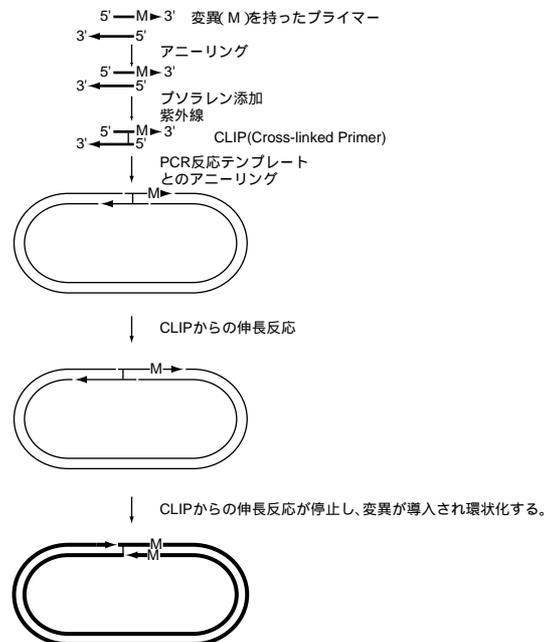


図5 CLIPを用いた変異の導入法

CLIP内に標的DNAに変異(M)を導入したCLIPを作成し、PCRを行うと変異(M)を持ったDNAが環状化される。

2mM NaClでの相補鎖の部分の T_m 値は、33℃であり、室温より8℃高い状態であった。高い塩濃度では、非特異的にアニールしたDNAが増加した事により非特異的クロスリンクが増加しPCR反応が阻害されたと思われる。

これらのPCR産物をDH5αのコンピテント細胞でトランスフォーメーションしアンピシリン添加LB寒天培地に播き一晩37℃で加温し、翌日コロニー数を計測した。コロニー数は2mM NaClで最高となっており、PCRの結果とよく相関している(表1)。

表1

NaCl(mM)	8	4	2	1	コントロール
コロニー数	3	27	68	21	0

プライマーをクロスリンクしないでPCRを行った場合(コントロール)コロニーは得られなかった。このことは、CLIPを用いたPCRによりDNAが環状化され、大腸菌をトランスフォーメーションすることが可能であることを示している。

CLIPによる変異の導入

CLIPを用いることにより標的DNAを環状化することができ、大腸菌にも導入可能である事が示された。そこで、CLIP内に標的DNAに変異(M)を導入したCLIPを作成し、PCRを行うと変異(M)を持ったDNAが環状化され、大腸菌にトランスフォーメーションされる(図5)。このようにして得られたコロニーの90%以上が変異を持っていた。

CLIPによる欠失

次に、欠失させる部位に近接したA及びB領域にそれぞれ相補鎖をもつCLIPによりPCRを行うと線状のDNAが生成され、次にCLIPの残りの一方から伸長反応が起こりABが連結された環状DNAが生成される(図6)。大腸菌にトランスフォーメーションすると得られたコロニーの90%以上が欠失を持っていた。

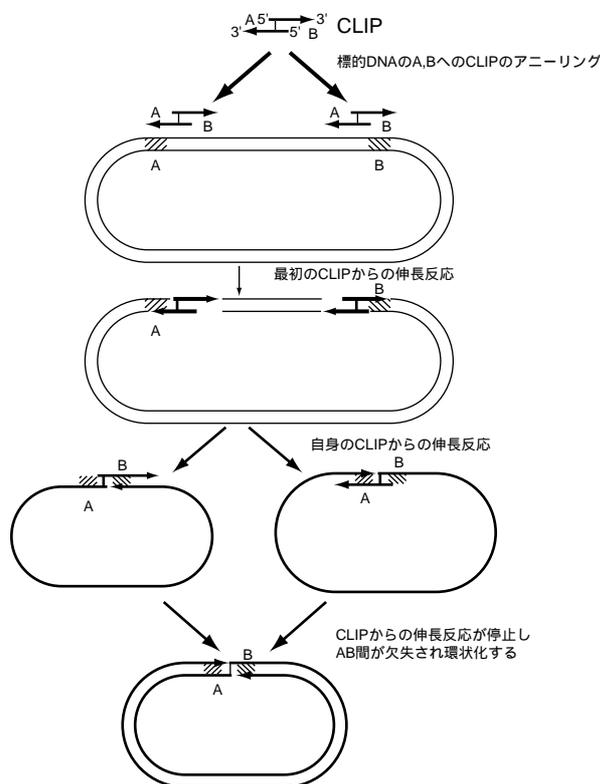


図6 CLIPを用いた欠失の導入法

欠失させる部位に近接したA及びB領域にそれぞれ相補鎖をもつCLIPによりPCRを行うと線状のDNAが生成され、次にCLIPの残りの一方から伸長反応が起こりABが連結された環状DNAが生成される。

CLIPを用いた標的DNAのサブクローニング

標的DNA、ベクターと相補な部分とプライマー同士が相補な部分を含むクロスリンクしたプライマー(CLIP1とCLIP2)を用いてベクターとアニーリングする(図7)。Taq DNAポリメラーゼを用いてCLIP1とCLIP2からベクターDNAをPCRで増幅する。増幅されたDNAは、標的DNAに対して相補なプライマー部分が残されているため、標的DNAを加えてPCRすると、ベクターから標的DNAの伸長反応が起こり環状化される。この環状DNAを大腸菌にトランスフォームすると、得られたコロニーの90%以上が標的DNAを持っていた。

このようにCLIPを用いる事により、サブクローニング、変異、欠失が容易に行なえる事が明らかとなった。この原理は、既存のクローニング系のプラスミドに平易に利用可能であり、応用範囲は、広いと思われる。

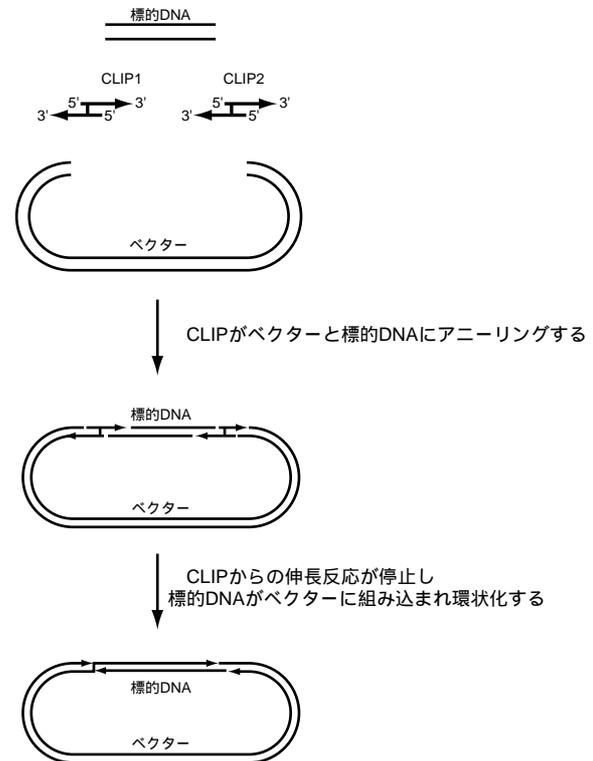


図7 CLIPを用いた標的DNAのサブクローニング

標的DNAとベクターと相補な部分を含むクロスリンクしたプライマー(CLIP1とCLIP2)を用いてベクターと標的DNAにアニーリングする。CLIP1とCLIP2からベクターDNAと標的DNAをPCRで増幅する。増幅されたDNAはベクターと標的DNAを含み環状化される。

参考文献

- 1) S. J. Scharf G. T. Horn and H. A. Erlich, *Science*, **233**, 1076 (1986).
- 2) S. J. Scharf in "PCR Protocols", Eds. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White, *Academic Press, New York*, pp.84 (1990).
- 3) G.L. Costa, A. Graftsky and M. P. Weiner, *PCR Methods Appl.*, **3**, 338(1994).
- 4) T. A. Holton, and M. W. Graham, *Nucleic Acids Res.*, **19**, 1156 (1991) .
- 5) D. Marchuk, M. Drumm, A. Saulino and F. S. Collins, *Nucleic Acids Res.*, **19**, 1154 (1991).
- 6) C. Aslanidis, and P. J. de Jong, *Nucleic Acids Res.*, **20**, 6069 (1990).
- 7) A. R. Shuldiner, L. A. Scott and J. Roth, *Nucleic Acids Res.*, **18**, 1920 (1990).
- 8) S. Kaluz and A. P. F. Flint, *Nucleic Acids Res.*, **22**, 4845 (1994).
- 9) Y.-S. Yang, W. J. Watson, P. W. Tucker and J. D. Capra, *Nucleic Acids Res.*, **21**, 1889 (1993).
- 10) K. Hsiao, *Nucleic Acids Res.*, **21**, 5528 (1993).
- 11) P. Bubeck, M. Winkler and W. Bautsch, *Nucleic Acids Res.*, **21**, 3601 (1993).
- 12) J. D. Oliner, K. W. Kinzer, and B. Vogelstein, *Nucleic Acids Res.*, **21**, 5192 (1993).
- 13) P. Nisson, A. Rashtchian and P. Watkins, *PCR Methods Appl.*, **1**, 120 (1991).
- 14) D. W. Ussery, R. W. Hoepfner and R. R. Sinden, *Methods in Enzymology*, **212**, 242 (1992) .
- 15) J. Meinkoth and G. Wahl, *Anal. Biochem.*, **138**, 267 (1984).
- 16) H. Inoue, H. Nojima and H. Okayama, *Gene*, **96**, 23 (1990).
- 17) Grineva and Karpova, *FEBS Letter*, **32**, 351 (1973)
- 18) J. Summerton and P. A. Bartlett, *J. Mol. Biol.*, **122**, 145 (1978)
- 19) Meyer *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 8517 (1989)
- 20) M. D. Matteucci and T. R. Webb, *Nucleic Acids Res.*, **14**, 7661 (1986).
- 21) Ferentz, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 4000 (1991).
- 22) B. L. Lee, A. Murakami, K. R. Blake, S. B. Lin, and P. S. Miller, *Biochemistry*, **27**, 3197 (1988).
- 23) J. J. Vasseur, C. Gauthier, B. Rayner, J. Paoletti and J. L. Imbach, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **152**, 56 (1988).
- 24) R. P. Iyer, B. Uznanski, J. Boal, C. Storm, W. Egan, M. Matsukura, S. Broder, G. Zon, A. Wilk, M. Koziolkiewicz *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, **18**, 2855 (1990).

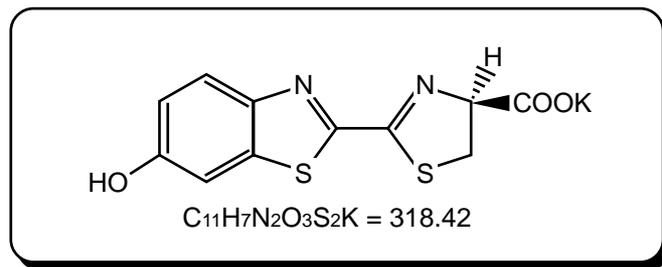
著者紹介

氏名 小原 健志 (Kenshi Obaru)
 熊本大学医学部第2内科
 出身大学 熊本大学医学部
 学位 医学博士
 専門 内科学
 連絡先 〒860-0811 熊本市本庄 1-1-1
 Tel: 096-373-5156, Fax: 096-363-5265
 メールアドレス: obar@kaiju.medic.kumamoto-u.ac.jp

新製品

生物発光用発光物質

D-Luciferin K salt



特長

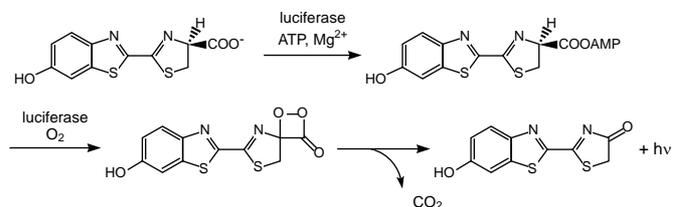
- ・量子収率の高い発光分析試薬である。
- ・カリウム塩であり水溶性が高い。

発光分析は、発光物質が高エネルギー状態から分解される際に、光を発生することを利用した分析方法です。

発光分析には、非酵素系の化学発光や、発光の際に触媒として酵素を必要とする生物発光が用いられています。luminolに代表される化学発光は非酵素系で行なうことができるため、操作が簡便に行なうことができるという利点があります。一方、ホタルやトビイカなど自然界に見られる生物発光では、この酸化の過程、もしくは酸化体の分解の過程に酵素が関与することにより、非常に高い量子収率で発光させるという利点があります。

D-luciferinはホタルの発光基質であり、このD-luciferinを用いた生物発光では、luciferase、ATP、マグネシウム存在下で発光量子収率が0.88であり、化学発光物質として代表的なluminolの20倍以上です。

D-luciferinの発光機構は、下に示すように luciferase により ATP と反応した後、再び luciferase を触媒として酸素分子により酸化されペルオキシドが生成し、脱炭酸分解の過程で発光するものです¹⁾。

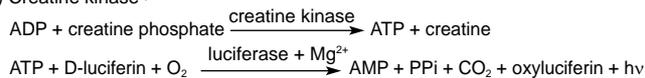


また、coenzyme A や ADP の添加等による発光の長寿命化が図られるなどして、D-luciferin—luciferase 発光はその応用が広がっています²⁾。

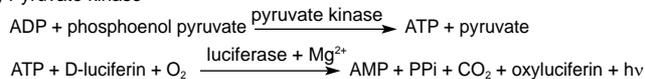
全ての細胞の活動はATPの代謝を基盤として成り立っていることから、ATPに依存したD-luciferin—luciferase発光は細胞の活性を表わします。このため、細胞増殖や細胞毒性のアッセイに利用されています³⁾。また、細菌の数に比例することから汚染の度合を表わす指標としても用いられています。

この、D-luciferin—luciferase発光を利用したアッセイ法は、ATP量の測定⁴⁾のみならず、ATPを産生する酵素の活性を測定する種々のアッセイにも応用されています。以下にその例を示します。

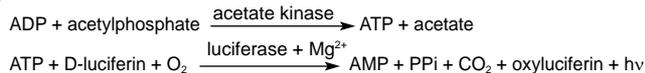
1) Creatine kinase⁵⁾



2) Pyruvate kinase



3) Acetate kinase⁶⁾



また、近年、遺伝子工学の分野に、D-luciferin—luciferase発光が用いられています。例えば、組み変えた遺伝子プロモーターの発現効率を見る際に、ルシフェラーゼタンパク質を産生するベクターを同時に組み込むことで、発現量に応じてD-luciferin—luciferase発光が見られます⁷⁾。このことから、遺伝子発現効率をモニターする手法として用いられて、レポーター・ジーン・アッセイに利用されています⁸⁾。

今回、弊社では水溶性を高めたD-Luciferin K saltを用意いたしました。D-luciferin フリー体は純水中にはほとんど溶解しません(1mmol/l以下)が、これをカリウム塩とすることで約150mmol/lの溶解性もちます。

このようにD-Luciferin K saltはD-luciferinの溶解性を高めたもので、さらに扱いやすいものです。今後、様々な測定に用いられることが期待されます。

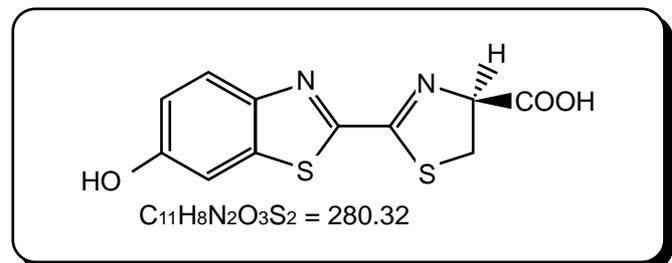
参考文献

- 1) 鈴木喜隆, 化学と生物, 18, 169 (1980).
- 2) S. R. Ford, F. R. Leach, *Methods Mol. Biol.*, **102**, 3 (1998)
- 3) S. P. M. Crouch, R. Kozolowski, K. J. Slater, J. Fletcher, *J. Immunol. Methods*, **160**, 81 (1993).
- 4) J. J. Lemasters, C. R. Hackenbrock, *Methods Enzymol.*, **57**, 36 (1978).
- 5) A. Lundin, *Methods Enzymol.*, **57**, 56 (1978).
- 6) 辻章夫, 前田昌子, Dojin News, No.65, p11 (1993).
- 7) V. T. Nguyen, M. Morange, O. Bensaude, *Anal. Biochem.*, **171**, 404 (1988).
- 8) J. Alam, J. L. Cook, *Anal. Biochem.*, **188**, 245 (1990).

品名	容量	価格(¥)	メーカーコード
D-Luciferin K salt	25mg	18,000	L226

関連商品

D-Luciferin



品名	容量	価格(¥)	メーカーコード
D-Luciferin	25mg	14,000	L221

溶解性データ

	D-Luciferin	D-Luciferin K salt
純水中	1mmol/l 以下	約 150mmol/l
Tris Buffer (100mmol/l,pH7.8)	約 20mmol/l	約 150mmol/l
Tricine Buffer (100mmol/l,pH7.8)	約 20mmol/l	約 150mmol/l

実用的蛍光誘導体化

7

福岡大学薬学部
山口政俊・能田 均

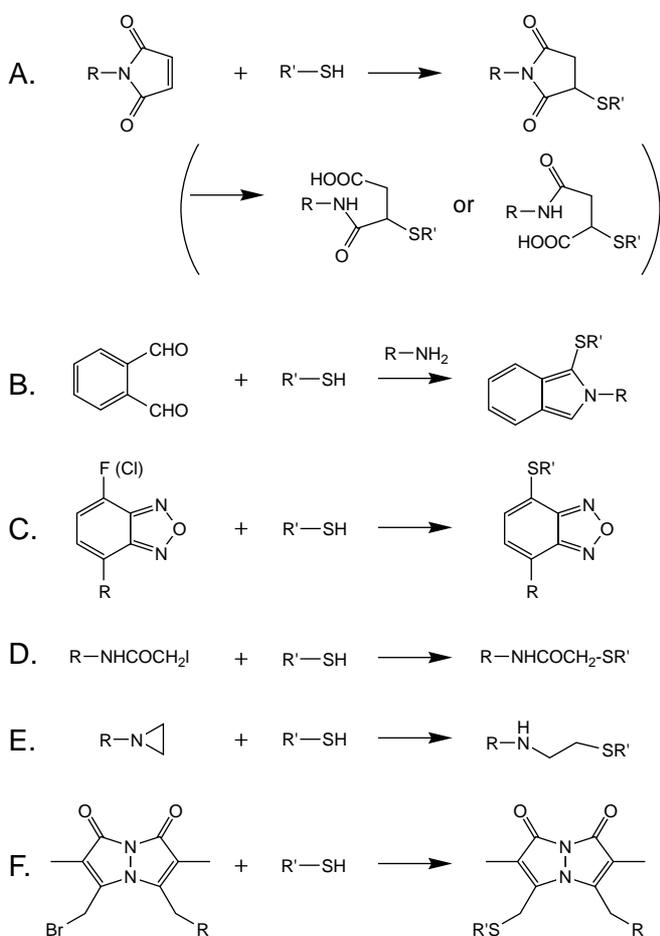


Fig.1 Fluorescence derivatization of thiols

6. チオール類の蛍光誘導体化

チオール基を有する生体成分にはシステイン、ホモシステイン、グルタチオン、補酵素Aなどの低分子やシステインを含んだペプチド・タンパク質があり、それぞれ重要な機能に關与している。また、チオール基を有する薬品やチオール類を含む食品も多い。チオール基は反応性が比較的高いので、しばしば蛍光誘導体化の対象となる場合が多く、アミノ基と並んで他種類のチオール基用誘導体化試薬が市販されている。生体試料の分析においては、一般にアミノ基を含む化合物よりチオール基を含む化合物の方が少ないので、チオール基を誘導体化する方が選択性は高くなる。チオール基は酸化されやすく、容易にジスルフィド(-S-S-)体に変化するので、還元剤を加えて全てチオール基とした後に定量する場合もある。また、蛍光誘導体化反応中の酸化を抑えるために酸化防止剤を加えて誘導体化することも多い。特に酸化されやすいチオールを定量する場合や酸化性物質を含む試料を分析する場合には十分な注意が必要である。

チオール基の蛍光誘導体化反応は、Fig.1に示す7種に分類できる。それぞれ特徴があり、チオール化合物や測定試料の性質に応じて最適な反応を用いる必要がある。詳細は総説¹⁾を参照されたい。

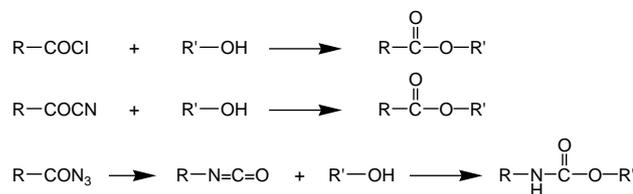
6.1. N-置換マレイミド(Fig. 1 A)

N-置換マレイミドがチオールと容易に反応して、図のような付加物を与えることは古くから知られていた。このRに蛍光性基(2-フェニルベンゾイミダゾール)を導入すると、試薬自身は無蛍光性となり、チオールと反応して生成した誘導体は蛍光性となることが見いだされ、それ以降様々な蛍光性基を導入した試薬が開発された。本反応は緩和な条件(室温、pH5~9)で数分以内に進行するので、熱に弱いチオール(ペプチドやタンパク質)の蛍光誘導体化に汎用される。ただし、蛍光誘導体はさらに加水分解を受けるので(図の括弧内の反応)、プレカラム誘導体化HPLCにおいて複数のピークを与えることがある。反応温度を高くしたり、時間を延長して加水分解反応を完結させた後に分析すると一本のピークとなることが多い。低分子のチオール類に適用される市販試薬 *N*-[4-(6-dimethylamino-2-benzofuranyl)phenyl]maleimide を用いた応用例がDOJINDOのカタログ(<http://www.dojindo.co.jp/wwwroot/productsj/info2/07/dbpm.html>)にある。

高分子(ペプチド、タンパク質)用の試薬としては、フルオレッセイン、各種ローダミン、シアニン色素等を蛍光性基として導入したマレイミド試薬が市販されており、蛍光標識高分子の調製に用いられる。これらの試薬はそれ自身も蛍光性を有するものが多く、緩和な条件で蛍光誘導体化したのちにゲル濾過等で試薬と標識高分子を分離する必要がある。一例としてシアニン色素-マレイミドをIgGの蛍光標識に利用した例がDOJINDOのカタログ(<http://www.dojindo.co.jp/wwwroot/productsj/info2/07/ic3-m.html>)にあるので参照されたい。これらの試薬は励起波長が長いので、レーザー光源を使った高感度化が可能である。

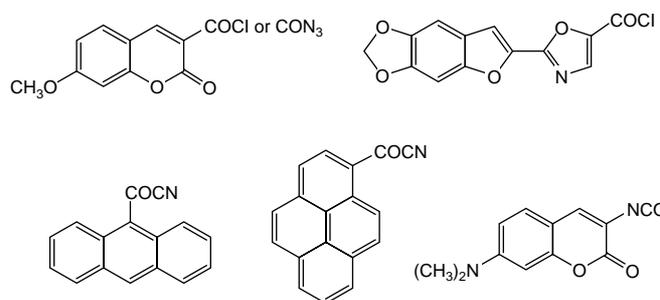
6.2. オルトフタルアルデヒド(OPA)と第一アミン(Fig. 1 B)

OPAはアミン及びアミノ酸の誘導体化試薬として汎用されるが(本連載2.1.参照)、図に示すようにOPAと第一アミンを試薬として用いることにより、チオールの蛍光誘導体化が可能となる。本誘導体化反応は緩やかな条件で1分程度で完了するので、プレカラム誘導体化のみならずポストカラム誘導体化にも用いることが出来る。生成する誘導体はやや不安定であるので、ポストカラム誘導体化の方が高い精度を得やすいが、感度は低くなる。高感度と高精度を同時に達成するために、プレカラム誘導体化を自動化した測定法²⁾も報告されている。



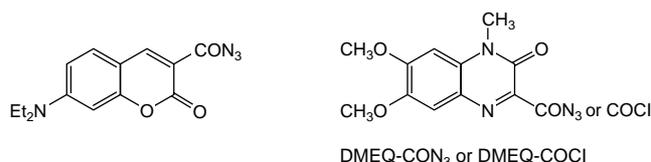
6.3. ベンゾフラザン(ベンゾオキサジアゾール)誘導体 (Fig. 1 C)

Rとしては、 $-NO_2$ 、 $-SO_3^-NH_4^+$ 、 $-SO_2NH_2$ 及び $-SO_2N(CH_3)_2$ がある。このうち反応速度が大きく、蛍光誘導体が最も安定な4-フルオロ-7-スルファモイルベンゾフラザン(ABD-F)が有用で、HPLCにおけるプレレベル誘導体化試薬として汎用されている。反応は、50℃で5分間以内に完結する(応用例: DOJINDOのカatalog、<http://www.dojindo.co.jp/wwwroot/products/info2/07/abd-f.html>)。ABD-Fを用いてホモシステイン等をプレカラム誘導体化し、キャピラリー電気泳動-レーザー誘起蛍光検出により、試料の微量化と高感度化が達成されている。³⁾



6.4. ヨードアセトアミド (Fig.1 D)

緩やかな条件下(室温、中性~弱アルカリ性)で、長時間(1~12時間)かけて反応させる場合が多い。Rとしては、クマリン色素、ピレン、フルオレッセイン及びローダミン色素類が用いられ、主に高分子の蛍光標識に用いられる。マレイミド試薬に比べて反応は遅いが、生成した誘導体は安定である。



6.5. アジリジン (Fig.1 E)

市販試薬にダンシルアジリジンがある。反応は弱アルカリ性(pH8.2)下、60℃で1時間の加熱を要する。反応はマレイミド試薬と同様に選択性が高く、生成した誘導体は安定で、かつ200nmに及ぶ長いストークスシフトを特徴とする(励起波長338nm、発光波長540nm)。

6.6. モノプロモピマン (Fig.1 F)

この試薬は、比較的緩やかな条件下(室温、中性~弱アルカリ性)で数分間で反応が完結する。試薬自身は無蛍光性であるが分解しやすく、その分解物はHPLCにおいて複数のピークを与えるので、それらが定量を妨害する場合がある。

7. アルコール

アルコール性水酸基を有する化合物は生体や食品中に多いが、この官能基は極めて反応性に乏しい。従って、蛍光誘導体化試薬には高い反応性が要求され、一般にカルボン酸クロライドあるいはその類縁物質が用いられる(Fig.2)。反応は一般に高温(80-120℃)で長時間(30-60分)加熱する必要がある。試薬はいずれもその高い反応性故にアミン、チオール、水なども反応し、蛍光性物質(分解物)を与えるので、試料の前処理や試薬溶液等の調製時には留意する必要がある。試薬およびその分解物はアルコールの

蛍光誘導体と同様の蛍光特性をもつ場合が多いので、蛍光誘導体化は専らプレレベル反応に用いられる。

7.1. ヒト表皮脂質中7-デヒドロコレステロール(7-DHC)の定量⁴⁾

7-DHCは皮膚表面に存在し、光化学的にビタミンD₃に変換される。加齢とビタミンD₃生合成能の関連を研究するため、皮膚中7-DHCが測定される。しかし、その濃度は極めて低いので、従来は切除した皮膚組織を有機溶媒抽出し、その抽出液を試料とする必要があった。より被験者の負担が軽いヒト表皮脂質(皮膚を切除することなく、皮表から直接脂質を抽出)を試料として分析することが望ましい。

本法は、表皮脂質を特殊な抽出装置(Fig.3)を用いて抽出し、これに含まれる7-DHCをDMEQ-CON₃を用いて蛍光誘導体化し、HPLC検出する。本法により初めて表皮脂質中7-DHCの定量が可能となり、加齢とともに同7-DHC濃度が低下することを実証した。

Fig.2 Fluorescence derivatization of alcohols

Chart 1 Procedure for the determination of 7-dehydrocholesterol in human skin surface

Human skin surface (2.25 cm²)

Extract with n-hexane-ethanol (1:1, v/v)(30ml) by an extraction device

Extract

Evaporate under N ₂ gas	
Reconstitute with acetone mix	
Evaporate under N ₂ gas	
2.0 mmol/l DMEQ-CON ₃	0.2ml
Heat at 120 for 60 min	
Dilute with methanol mix	1.8ml
Apply onto HPLC (10μl)	

HPLC conditions

Column: TSK gel ODS-120T(250 × 4.6mm i.d.; 5μm)(50)
Mobile phase: aqueous 90%(v/v) acetonitrile
Flow rate: 1.0 ml/min
Fluorescence detection: Ex.360nm Em.440nm

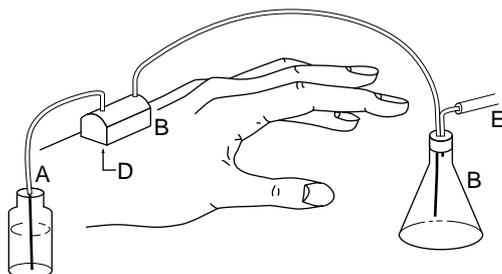


Fig.3 Diagram and use of the lipid extraction device. A, inlet (solvent); B, outlet (collector); C, Filter paper; D, teflon cell; E, aspirator.

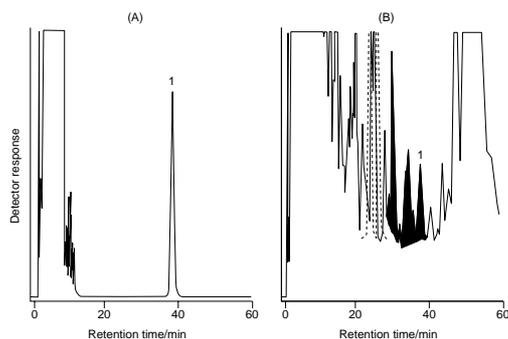


Fig.4 Chromatograms obtained with (A) a standard solution and (B) an extract of human skin (abdomen) surface. Peaks and concentrations: 1=7-DHC [A, 80.0 pmol (30.7ng); 13.8pmol (5.29ng)cm⁻² skin surface]; others=A, the reagent blank; B, the reagent blank and endogenous substances in human skin surface. The shaded areas disappeared upon oxidation and two peaks (in broken line) appeared.

8. フェノール

フェノール性水酸基を有する化合物は生体中ではカテコールアミン、セロトニン、チラミン、チロシンとがあるが、いずれもその水酸基を誘導体化のターゲットとすることは少ない。しかし、近年、環境中の内分泌攪乱物質としていくつかのフェノール類が注目されており、フェノール性水酸基用の蛍光誘導体化反応に関する研究も盛んになっている。フェノール性水酸基は比較的反応性が高く、アミノ基用の蛍光誘導体化試薬により誘導体化できる場合が多いが、その中でも反応性の高い酸クロリド類が有用である。反応条件は、アミンの場合と比べると、高温(50 ~ 60)で長時間(30 ~ 60分)を要する。また反応中における試薬の加水分解を抑えるために、反応液には出来るだけ水が入らないように前処理及び試薬溶液の調製を行う。

参考文献

- 1) K. Shimada, K. Mitamura, *J. Chromatogr. B*, **659**, 227 (1994).
- 2) S. K. Park, R. B. Boulton, A. C. Noble, *Food Chem.*, **68**, 475 (2000).
- 3) S. H. Kang, W. Wei, E. S. Yeung, *J. Chromatogr. B*, **744**, 149 (2000).
- 4) T. Iwata, H. Hanazono, M. Ymamaguchi, M. Nakamura, Y. Ohkura *Anal. Sci.*, **5**, 671(1989).

Topics on Chemistry

In vivoでアミロイド斑を染色する蛍光色素 BSB

(株) 同仁化学研究所 佐々本 一美

アルツハイマー病は中年後期に発症し、記憶障害、見当識障害などを呈する進行性の精神障害で、米国では約400万人が罹患し、その社会的なコストは年間600億ドル以上とされている。病理学的には脳（特に前頭葉、後頭葉、側頭葉）の萎縮、組織学的にはアミロイドの芯をもつ顆粒状または線維状の塊からなる老人斑（senile plaques, SP）と細胞内神経線維の変形（neurofibrillary tangle, NFT）をとを特徴とする。このSPは、アミロイドβペプチド（Aβ）とよばれる40または42個の比較的小きなペプチドからなっており、前駆体タンパク質（APP）から secretase によって切り出された後、βシート構造からなる凝集体を形成する。

この凝集体形成のきっかけとなるのは、Aβのコンホメーションがαヘリックス構造からβシート構造に変化するためであり、狂牛病などとともに最近ではタンパク質の誤った折りたたみによって引き起こされるフォールディング病という概念に分類される。

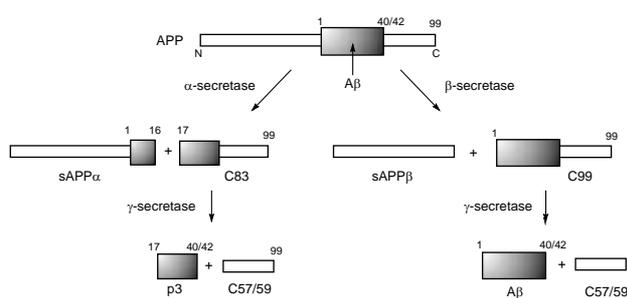


図1 APPからAβの生成

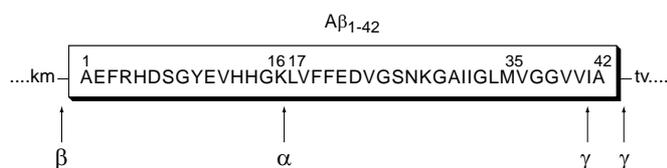


図2 Aβの構造と secretase 切断部位

アミロイド形成の過程で活性酸素ラジカルが産生され、それがAβの神経毒性の原因であると考えられているが、その詳細な機構は十分分かっていない。しかしながら、AβのフラグメントであるAβ₃₁₋₃₅も同様の神経毒性を有することなどから、35番目のメチオニン（Met35）が疑われている。Cu²⁺やFe³⁺といった金属存在下、Met35が酸化されて生じるS-カチオンラジカルは、種々のラジカル反応の引き金になり、凝集や神経毒性を引き起こすと考えられる。したがって早期のアルツハイマー病の診断には、このAβが凝集してできたSP（約10μmの大きさ）の検出が非常に重要になってくる。

しかしながら、これまでは死後の患者の脳組織を特殊な色素や抗体で染色する病理学的方法しかなかった。良く用いられる色素としては、アゾ色素の Congo red や蛍光性の Thioflavin-S であるが、これらはもちろん生きた患者のSPを検出することはできない。

このため、Klunkらは脂溶性を増して血液-脳関門を通りやすくしたCongo red誘導体であるChrysamine-G^{2,4}やX-34^{5,6}を開発しているが、実際のin vivoの系でSPを検出した報告はない。

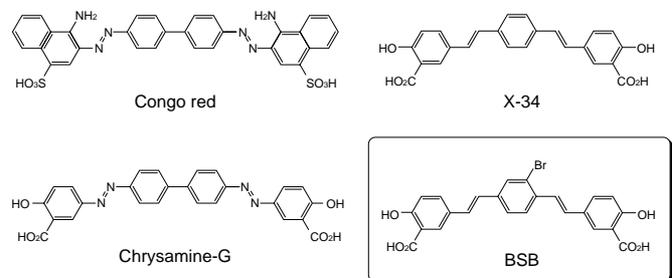


図3

BSB⁷はSkovronkyらによって最近報告された蛍光色素で、Aβに対して高い親和性（ $K_i = 0.4 \mu\text{mol/l}$ ）をもっており、SPやNFTを選択的に染色する。彼らはAPPを発現するように遺伝子改変されたマウスTg2576にBSBを静注し、18時間後の脳組織のSPに色素が集積していることを確かめた。これは、in vivoでアミロイド斑を染色した最初の例であり、今後、生体内での安定性や毒性などさらに研究が必要ではあるが、アルツハイマー病の早期診断・治療につながる大きな一歩である。

参考文献

- 1) A. Rauk, D. A. Armstrong, D. P. Fairlie, *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 9761(2000).
- 2) W. E. Klunk, M. L. Debnath, J. W. Pettegrew, *Neurobiol. Aging*, **15**, 691 (1994).
- 3) W. E. Klunk, M. L. Debnath, J. W. Pettegrew, *ibid.*, **16**, 541 (1995).
- 4) W. E. Klunk, M. L. Debnath, A. M. Koros, J. W. Pettegrew, *Life Sci.*, **63**, 1807 (1998).
- 5) S. D. Styren, R. L. Hamilton, G. C. Styren, W. E. Klunk, *J. Histochem. Cytochem.*, **48**, 1223 (2000).
- 6) W. E. Klunk, R. L. Hamilton, S. D. Styren, G. C. Styren, M. L. Debnath, C. A. Mathis, A. Mahmood, K. K. Hsiao, *Soc. Neurosci. Abstr.*, **23**, 1638(1997).
- 7) D. M. Skovronsky, B. Zhang, M.-P. Kung, H. F. Kung, J. Q. Trojanowski, V. M.-Y. Lee, *Proc. Natl. Acad. Soc.*, **97**, 7609 (2000).

Nitrosothiol Assay Kit

Nitrosothiol Assay Kit 改良タイプ発売のご案内

本キットは従来冷凍保存品でしたが、改良を加え安定性を向上させたため、冷蔵での保存が可能となりました。

ニトロソチオール(R-SNO)は、寿命の長いNO供給体であり、生体内では glutathione や L-cysteine から誘導された S-nitrosoglutathione(GSNO)やS-nitroso-L-cysteine(CysNO)等といった形で存在し、生体内での・NOドナー、あるいは生理活性物質として働いていると言われています。

本キットは、R-SNOのS-N結合を切断し、放出されるNOを、酸化されて生じるNO₂⁻として検出します。元々試料中に存在するバックグラウンドのNO₂⁻は、亜硝酸イオン消去剤により消去されるので、R-SNO由来のNO₂⁻のみを検出することが出来ます(下図)。

キット内容

1) 緩衝溶液	1本
2) 標準液	1本
3) 前処理剤	1本
4) 亜硝酸イオン消去剤	1本
5) HCl 溶液	1本
6) Tris 溶液	1本
7) 反応試薬 A	1本
8) 反応試薬 B	1本
9) Griess 試薬 A	1本
10) Griess 試薬 B	1本

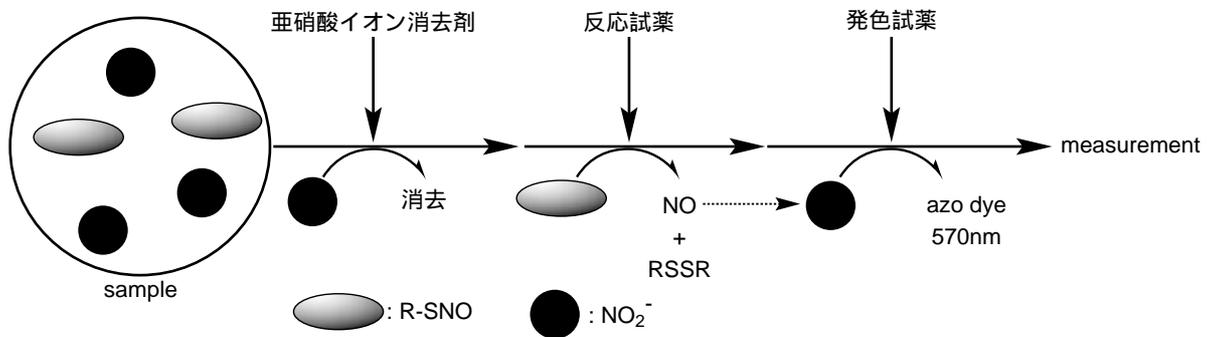


図 Nitrosothiol Assay Kit の測定原理

特長

1. 従来品に改良を加えて安定性が向上し、冷蔵保存可能である。
2. 水銀フリーで安全である。
3. バックグラウンドのNO₂⁻は完全に消去されるので、一回の測定でR-SNOのみを検出できる。
4. 1キットで28サンプル(n = 3として)測定できる。
5. 1μmol/l以上の濃度のR-SNOを検出することができる。

参考文献

- 1) P. R. Myers, R. L. Minor Jr., R. Guerra Jr., J. N. Bates, D. G. Harrison, *Nature*, **345**, 161 (1990).
- 2) Robert K. Goldman, Angelo A. Vlessis, Donald D. Trunkey, *Anal. Biochem.*, **259**, 98 (1998).
- 3) J. A. Cook, S. Y. Kim, D. Teague, M. Murali, C. Krishna, R. Pacelli, A. M. Miles, M. B. Grisham, D. A. Wink, *Anal. Biochem.*, **238**, 150 (1996).

品名	容量	価格(¥)	メーカーコード
Nitrosothiol Assay Kit	set	32,000	NK06

販売中止のご案内 1

弊社都合により下記製品の販売を中止いたしましたのでご連絡申し上げます。

品名	容量	コード	メーカーコード
5-Nitro-2-PDS	1g	340-03451	N023
Ba(II)-CHBA,(AS)	1g	341-03241	A018
Ba(II)-EDTA	25g	348-00152	E006
Benzene,(Pr)	250ml	342-00231	PR01
BHBT	10mg	349-06721	B328
BNBAC ₅ Sulfo-OSu	5mg	347-06261	B295
Caged cGMP	5mg	347-05921	CC04
Caged fluorescein-OSu	5mg	346-05751	C304
Cr(III)-AA	25g	348-00772	A047
cyclo(D-Asn(Oct) ₂ - Pro-Ala) ₂	Request	Request	C305
DBPM	Request	Request	D259
Dimethoxyethane,(Sc)	250ml	346-00991	SC05
DPS-Cl	100mg	Request	D399
Fe(III) - CHBA,(AS)	1g	349-03161	A024
H(fod)	5g	349-01341	H005
iso-Octane,(Pr)	250ml	343-02101	PR05
L-NIO	10mg	349-07181	N409
Maleimido-C ₅ -benzyl-EDTA	10mg	342-06071	M032
Methyl alcohol,(Pr)	250ml	347-01641	PR04
Methyl-EDTA	5g	342-01711	M006
MMTr-Cl	5g	343-06621	NX02
Mn(II)-AA	5g	340-01751	A039
Mn-TBAP	10mg	348-07771	M373
Ni(II)-CHBA,(AS)	1g	343-03181	A028
NIR-1	Request	Request	N368
Pr-PTA	1g	346-02331	P020
Quene 1-AM solution	1ml	342-05851	Q006
Quin 2-AM solution	1ml	340-05391	Q003
Scintisol AM-1	500ml	347-02425	SC03
SPQ	50mg	344-05671	S017
TAA	5g	348-02531	T005
TTMAPP	100mg	346-04771	T004

販売中止のご案内 2

弊社都合により下記製品の販売を6月1日より中止いたしますのでご連絡申し上げます。

ただし在庫がなくなり次第、5月末まででも中止とさせていただきます。

また6月以降も在庫あれば対応できますので、弊社および販売店までお問い合わせください。

品名	容量	コード	メーカーコード
2-Aminoperimidine HCl	Request	Request	A009
2-Hydroxy-4-dodecyloxy-4'-carboxysalicylideneaniline	Request	Request	H208
2-Iminopiperidine	100mg	346-07331	I012
2Li(EDTA · 2Li)	Request	Request	L001
3,5-DiBr-PADAP	Request	Request	D042
3-Br-7-Nitroindazole	25mg	342-07291	B350
4-Dodecyloxy-4'-(3-carboxytrimethyleneoxy)azobenzene	Request	Request	D202
4-Octyl-4'-(3-carboxytrimethyleneoxy)azobenzene	Request	Request	O201
4-Octyl-4'-(5-carboxypentamethyleneoxy)azobenzene	Request	Request	O202

品名	容量	コード	メーカーコード
4TF	100mg	340-04811	T017
6TF	100mg	347-04821	T018
7-Nitroindazole	50mg	343-07221	N408
8-Acetoxyquinoline	5g	347-00063	A002
AA	25g	344-00012	A001
Acridinium-I	10mg	347-06521	A060
ACVJ	25mg	342-07051	A313
ALOS	Request	Request	OC03
Anisidine Blue	Request	Request	A010
BBD	1g	340-03711	B022
BDC-OH	1g	340-03691	B024
BG	5g	343-00283	B007
BPR	1g	349-00361	B013
BPR	5g	345-00363	B013
BT Standard	1g	349-00383	B016
Caged cAMP	5mg	340-05891	CC03
Caged fluorescein	5mg	348-06311	C299
Caged fluorescein Sulfo-OSu	5mg	345-06321	C261
Calmagite	1g	348-00473	C004
Calmagite	5g	346-00474	C004
Carboxyarsenazo	1g	349-00523	C006
CCVJ	25mg	349-07061	C340
Ce(III)-EDTA	Request	Request	C224
Chloranilic acid	10g	341-00561	C009
Chromazurol B	1g	340-04051	C011
Co(II)-CHBA,(AS)	1g	342-03151	A020
Co(III)-AA	25g	344-00752	A036
Cr(III)-AA,(AS)	25g	348-00772	A021
DABITC	100mg	345-05101	D004
DABITC	1g	341-05103	D004
DAHP	1g	345-07301	D462
DBMC	100mg	340-06991	D398
DBPH	Request	Request	D373
Dibenzyl-bis (12-crown-4)	100mg	341-06301	D349
Didodecyl-bis (12-crown-4)	100mg	348-06291	D210
DIDS	100mg	340-05271	D032
DIDS	500mg	346-05273	D032
Dimethyl CFSE	25mg	341-06781	D352
Diphenyleneiodonium chloride	10mg	342-07171	D449
D-NMMA	10mg	342-07791	N430
Docosylpyridinium TCNQ salt	Request	Request	D204
DPMDS	Request	Request	D221
DPTBA	1g	344-05213	D036
Dy(III)-EDTA	Request	Request	D240
EDTPO	Request	Request	E030
EGS	Request	Request	E028
Eu-DPM	1g	345-01201	E019
FNPA	100mg	341-05321	F013
FTA	5g	347-01261	F003
HABT	25g	341-01362	H002
Hexanes,(Lu)	250ml	344-01411	LU11
Ins(1,3,4,5)P ₄ (synthetic)	100μg	349-05861	I008
iso-Propyl alcohol,(Lu)	250ml	349-02321	LU16
L-NNA	1g	346-07211	N410
Lumogallion	1g	345-01603	L003
MAPS	Request	Request	OC12
MBD	500mg	343-03723	M017
MBPM	10mg	341-06281	M274
Methyl-EDTA	25g	340-01712	M006
Mg(II)-CHBA,(AS)	1g	346-03171	A025
MMTr-Cl	25g	341-06622	NX02
Mn(II)-CHBA,(AS)	1g	340-04671	A026
MoO ₂ (II)-AA	5g	348-01791	A040
Na(I)-CHBA,(AS)	1g	343-03201	A027
Naphthalene	100g	344-01891	N044
Naphthol AS-MX			

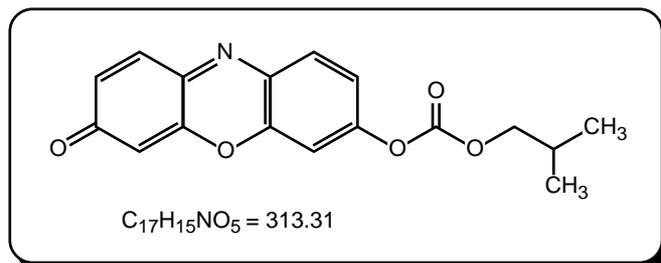
品名	容量	コード	メーカーコード
phosphoric acid	100mg	344-01911	N004
Naphthol AS-MX			
phosphoric acid	1g	340-01913	N004
Neocuproine	Request	Request	N034
Ni(II)-EDTA	25g	345-02002	E015
NIR-2	Request	Request	N369
Nitr 5	5mg	349-05741	N051
NOR 2	10mg	348-06931	N389
NOR 2	50mg	344-06933	N389
NPDE	1g	346-06731	N267
NTP	Request	Request	N017
o,o'-Dihydroxyazobenzene	1g	348-00951	D009
ODQ	10mg	345-07781	O277
PACH	Request	Request	P024
Pentacosanoic acid	Request	Request	LB22
Phenylarsonic acid	25g	344-02212	P008
Phosphododecyl-14-crown-4	50mg	341-05681	P031
PMAC	Request	Request	P214
PPKO	1g	348-02271	P011
PPKO	10g	342-02274	P011
Pr-FOD	1g	345-02301	P019
p-Terphenyl	100g	341-02641	T016
PV	1g	340-02351	P014
PV	5g	346-02353	P014
Rh(III)-AA	Request	Request	A042
SABF	Request	Request	S001
SAPH	1g	341-02381	S002
SAPH	10g	345-02384	S002
Scintillamine-OH	Request	Request	SC10
S-Ethyl-ITU	1g	341-07261	E259
Sm(III)-EDTA	Request	Request	S241
S-Methyl-ITU	1g	344-07251	M358
S-Nitroso-L-cysteine 溶液	1ml x 5	340-07351	N414
SPADNS	Request	Request	S005
Sr(II)-CHBA,(AS)	1g	347-03221	A030
Stilbazol	Request	Request	S006
Stilbene fluorescent-S	1g	343-02503	S007
STTA	1g	342-03031	S008
Thorin	1g	343-02721	T020
Thorin	5g	349-02723	T020
TMA-PTIO	10mg	342-07311	A375
TMA-PTIO	100mg	348-07313	A375
TPP	1g	342-03891	T002
TTMAPP	1g	342-04773	T004
Variamine Blue B, hydrochloride	5g	347-02903	V001
XB-II	1g	348-02933	X002
Zr(IV)-AA	5g	345-03021	A046
硬度滴定液 (A)	500ml	340-01555	K005
複合滴定液 (A)	500ml	346-01275	F004

新製品

細胞染色用色素 (-Cellstain-)

生細胞染色用蛍光色素

-Cellstain- CytoRed solution



特長

- ・生細胞の細胞質を染色する。
- ・使いやすいDMSO溶液(1mmol/l)なので、試薬を量り取ったり溶解する手間が不要である。
- ・蛍光特性 $\lambda_{em} / \lambda_{ex} = 590/535nm$

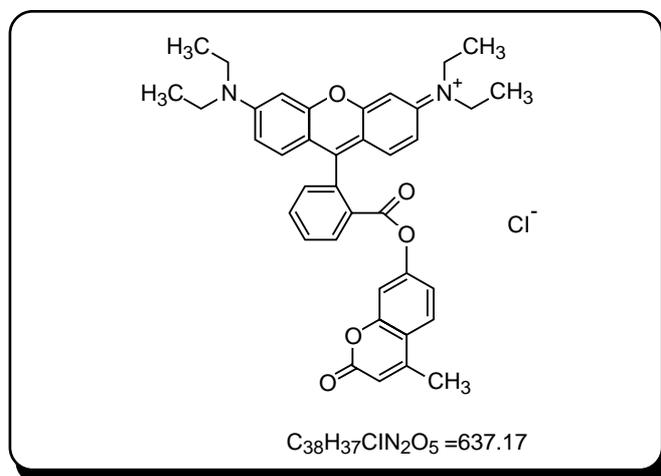
CytoRedは生細胞内に取り込まれた後細胞内のエステラーゼによって加水分解され、蛍光性のresorufinとなります。よって、生細胞を染色することができます。同様の生細胞染色色素としてCalcein-AM($\lambda_{em} / \lambda_{ex} = 515nm/490nm$)が知られていますが、CytoRedはより長波長域に比較的広い範囲での蛍光を持つため、蛍光顕微鏡下でG励起(赤色蛍光)もしくはB励起(緑色蛍光)での観察が可能です。(推奨G励起)また、Cell viability assayへの応用例も報告されています¹⁾。

参考文献

- 1) K Sasamoto, *et al.*, *Anal. Sci.*, **15**, 1025 (1999).

ミトコンドリア染色用蛍光色素

-Cellstain- MitoRed



特長

- ・ミトコンドリアを特異的に赤色に染色できる。
- ・50 μ g \times 8本, DMSO 1mlの使いやすいセット品、試薬を量り取る手間が不要である。

MitoRedは rhodamine を基本骨格とする色素で細胞に取り込まれた後ミトコンドリアに集積する特徴があり、ミトコンドリアを特異的に染色します。20 ~ 200nmol/l と非常に低濃度でかつ高感度に染色でき、ミトコンドリア選択性に優れた蛍光プローブです。MitoRedは $\lambda_{em}/\lambda_{ex}=580nm/560nm$ の蛍光特性を持ち、蛍光顕微鏡 G 励起下で細胞内のミトコンドリアが赤色に染色されている様子が観察できます。

染色プロトコール

下記に HeLa 細胞を用いた例を示す。

(細胞の種類、観察条件、固定の有無によって試薬濃度、染色条件等の検討が必要ですのでご注意ください。)

〔試薬〕

- ・ MitoRed
- ・ DMSO

〔ストック溶液の調製〕

MitoRed 50 μ g (1本分)を DMSO 78 μ l で溶解し、ストック溶液を作成する(1mmol/l)。ストック溶液は冷蔵で保存する。

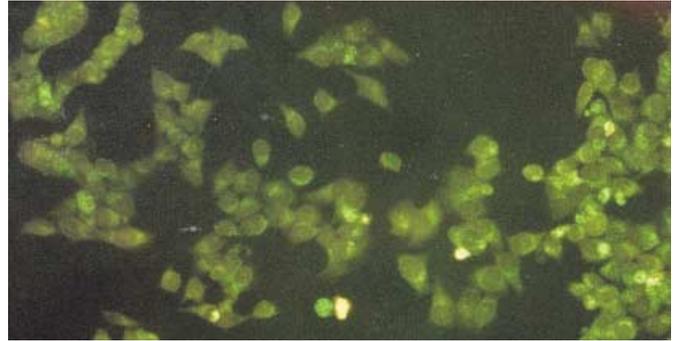
〔染色〕

1. チャンバースライドに適当な細胞密度になるように細胞を培養する。($1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ cells/ml)
2. 培地を除き、軽く洗浄する。(培地、PBS、Hank's 溶液等)
3. 1mmol/l MitoRed ストック溶液を、培地を用いて最終濃度が 20 ~ 200nmol/l になるように希釈する。(細胞に加える前に、あらかじめ37 に保温しておいたほうが良い。)ウェルに希釈した MitoRed 溶液を加え、培養条件下で 30 分 ~ 1 時間インキュベートする。
4. MitoRed 溶液を除き、培地を加える。
5. 蛍光顕微鏡 G 励起下で観察する。
(MitoRed; $\lambda_{em}/\lambda_{ex}=580/560nm$)

細胞の固定を行う場合は、3. に続いて以下の操作を行う。

4. MitoRed 溶液を除き、洗浄する。
(serum free の培地、PBS、Hank's 溶液等)
5. 10% 中性ホルマリン緩衝液で 15 ~ 20min 固定する。
6. PBS で洗浄する。
7. 蛍光顕微鏡下で観察する。

(a)



(b)

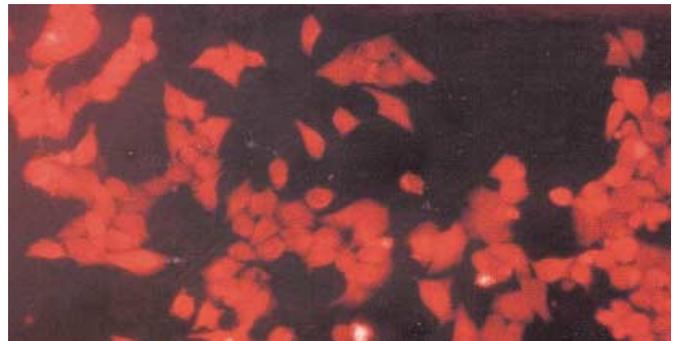


図1 CytoRed による生細胞染色

(a) HeLa 細胞, G 励起 (b) HeLa 細胞, B 励起

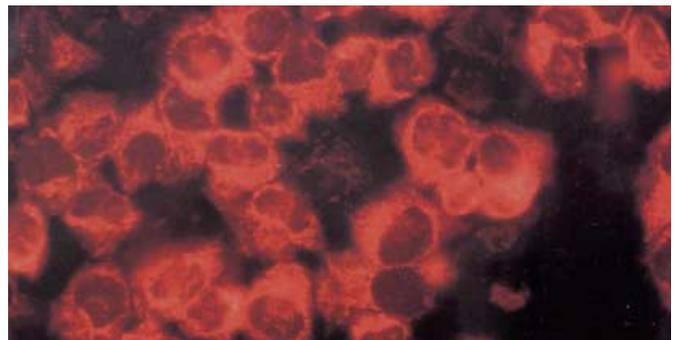


図2 MitoRed によるミトコンドリア染色

HeLa 細胞, G 励起

品名	容量	価格(¥)	メーカーコード
-Cellstain- CytoRed Solution	1ml	9,800	C410
-Cellstain- MitoRed (DMSO(1ml)添付)	50 μ g \times 8	11,000	R237

第11回フォーラム・イン・ドージン開催報告

「自然免疫の分子基盤」

フォーラム・イン・ドージンも回を重ね、今年で11回目を迎え11月24日、秋晴れのなか、熊本県立劇場で開催することができました。今年は岩永 貞昭先生(九州大学名誉教授)のご指導により、「自然免疫の分子基盤」というテーマで、この分野の第一線で活躍されている先生方に講演いただきました。オーガナイザーは岩永先生の他、先生のお弟子さんにあたる川畑 俊一郎先生(九大院・理)、牟田 達史先生(九大院・医)それに第一回目からお世話いただいている山本 哲朗先生(熊本大院・医)の4名の先生方で、演者構成も例年になく若手中心になりました。その分、討論も非常に活発で、レベルの高いシンポジウムになったのではないかと自負しています。この分野は日本が世界をリードしており、自然免疫の仕組みがどこまで分かっているか、また、どのような分子がそれを担っているかといった点について、本フォーラムでは明らかにできました。これも岩永先生をはじめとするオーガナイザーの先生方の意向が強く反映された結果だと思えます。



講演はまず最初に、倉田先生(東北大院・薬)が主にショウジョウバエの抗菌ペプチドの発現誘導を例に、自然免疫を制御するシグナル伝達カスケードについて述べられました。広く生物界において自然免疫が非常に有効な生体防御システムであることがよく理解できた講演でした。次に、オーガナイザーでもある川畑先生は、カプトガニの生体防御レクチンによる異物認識について講演されました。講演ではタキレクチン-2とタキサイチンの糖鎖認識機構を中心に紹介されました。前田先生(熊本大・医)は、セリンプロテアーゼインヒビターの種類である $\alpha 1$ プロテアーゼインヒビターの生体防御における役割について、特にNOによるニトロソ化との関連で講演されました。このタンパク質は炎症初期に多く血中に出現し、同時に発生するNOによってニトロソ化を受け、多彩な生理作用を持つようになるといった興味深い内容でした。次の藤田先生(福島県立医大)の講演は、生体防御に

おける補体レクチン経路の重要性について、ヒトのフィコリンが補体レクチン経路を活性化していることを示されました。さらに野中先生(東大院・理)の講演も補体系に関するものでしたが、マボヤ補体系を例に、分子進化の面からの考察をされました。

つづくセッションは哺乳類の自然免疫にフォーカスをあて、まず最初に改正先生(阪大微生物研)が、自然免疫の病原体認識に關与する膜タンパクファミリーである Toll-like receptors (TLR) について講演されました。TLR は最近注目を集めていますが、その機能についてはまだまだ不明なところも多いようです。赤司先生(佐賀医科大)は TLR と会合する MD タンパク質によるエンドトキシン認識機構について最近の知見を紹介されました。

最後に泥谷先生(大分医科大)によって、LPS の上流に位置するタンパク質 CD14 の機能についての紹介がありました。

自然免疫は、下等生物から哺乳動物まで生物が基本的に備えている免疫システムで、その重要性がストレスや疾病との関連で最近注目されつつあります。そこで働く分子も、ほぼ役者が出そろった感があります。本フォーラムは、それらについて現時点でどこまで解明されたかについて第一線からの報告と集中的な議論の場となり大変有意義だったと思います。なお、講演要旨集の残部が若干ございますのでご希望の方は、小社マーケティング部・斉藤までご連絡下さい。(佐々本 一美)



ホームページアドレス

URL : [http:// www. dojindo. co. jp/](http://www.dojindo.co.jp/)
E-mail : info@dojindo.co.jp

フリーファックス 0120-021557
フリーダイヤル 0120-489548