

DOJIN NEWS

ドージンニュース

Review

糖化反応中間体3-deoxyglucosoneの特異的測定法

楠 仁美・宮田 哲

Topics on Chemistry

NOの次はH₂O₂?

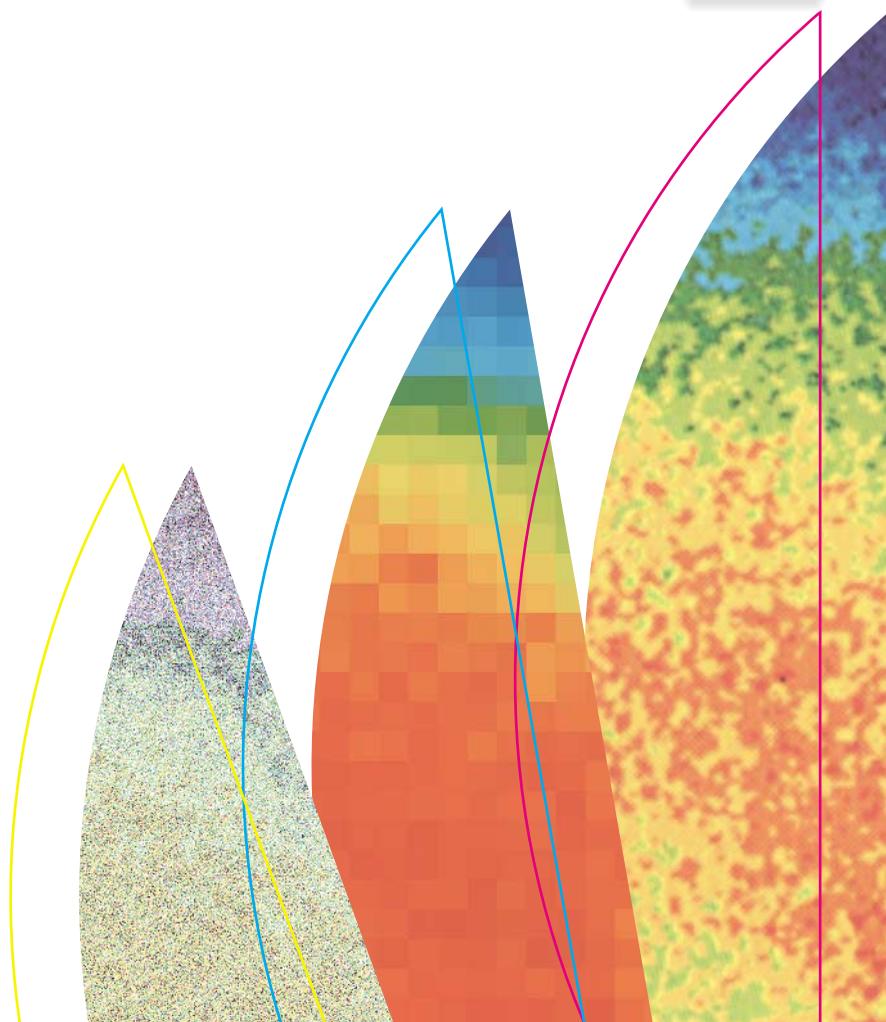
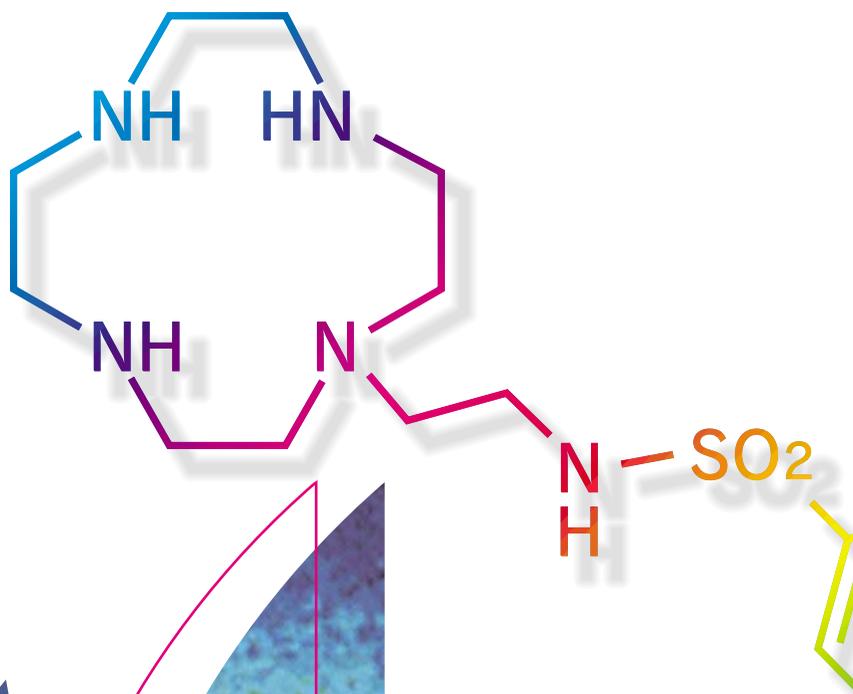
- シグナル伝達分子としての過酸化水素 -

佐々本一美

連載

実用的蛍光誘導体化8

山口政俊・能田 均



目次

Review

糖化反応中間体 3-deoxyglucosone の特異的測定法 神戸大学医学部 楠 仁美、宮田 哲	1
実用的蛍光誘導体化 8 福岡大学薬学部 山口 政俊、能田 均	4

Topics on Chemistry

NO の次は H ₂ O ₂ ? - シグナル伝達分子としての過酸化水素 -	9
---	---

Commercial

Q&A Total Glutathione Quantification Kit	6
---	---

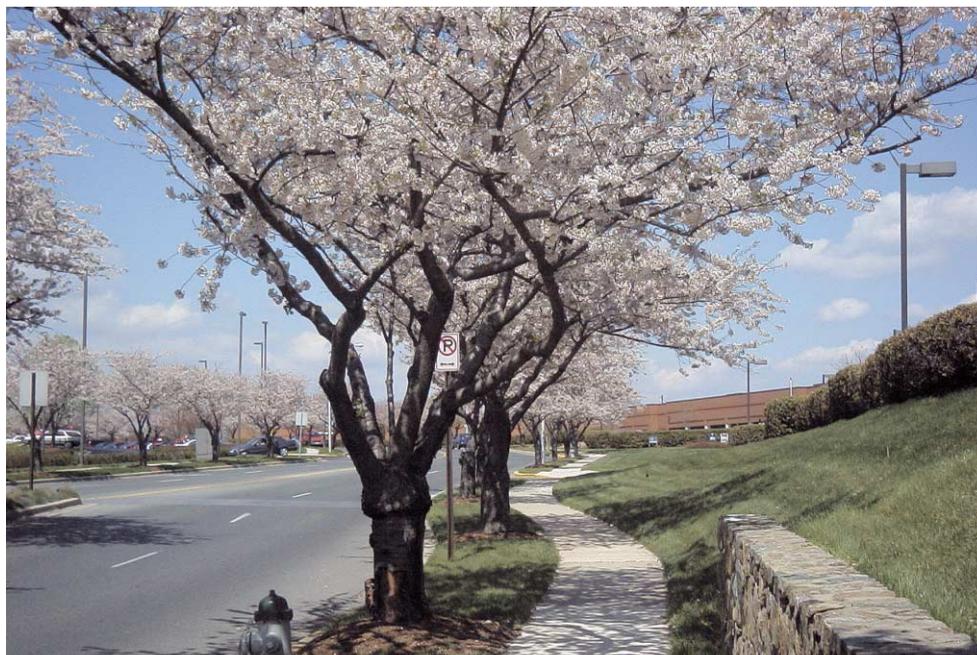
新製品

膜電位感受性色素 DiBAC ₄ (3)	12
HTS 用 Cell Counting Kit	12
HTS 関連試薬	14
近日発売予定 DNA 抽出キット - <i>NucleoPure</i> -	10

新製品案内

容量、価格は下記ページをご覧ください。

膜電位感受性色素 DiBAC ₄ (3)	12
HTS 用 Cell Counting Kit	13
HTS 関連試薬	14



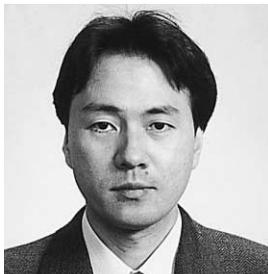
Dojindo Molecular Technologies, Inc. (MolTech) 付近の桜

ポトマック川岸の桜は、日米の友好の架け橋として有名ですが、弊社現地法人 MolTech のある米国メリーランド州ゲイザースパークの地でもご覧のように桜の花が満開となり、春爛漫を告げます。

糖化反応中間体 3-deoxyglucosone の特異的測定法 (A specific assay of 3-deoxyglucosone, an intermediate of the glycation.)



楠 仁美
(Hitomi Kusunoki)
神戸大学医学部第二内科



宮田 哲
(Satoshi Miyata)
神戸大学医学部第二内科

[Summary]

Nonenzymatic glycation has been proposed as one of the major mechanisms via which hyperglycemia mediates diabetic microangiopathy. In fact, several studies demonstrated that the formation of advanced glycation end products (AGEs) was accelerated in diabetic patients. It is therefore important to clarify the pathway involved in the formation of AGEs. *In vitro* experiments had shown that 3-deoxyglucosone (3-DG) was a highly reactive intermediate and a potential precursor of AGEs detected *in vivo* such as pyrraline and imidazolone compound. In addition, several lines of evidence have suggested the possibility that free 3-DG *per se* affects cell functions in vascular tissues. Thus, it seems important to determine 3-DG level *in vivo* for elucidating the mechanisms underlying diabetic complications. We here report a specific assay of 3-DG in blood samples. Since it was difficult to detect free 3-DG as the substance was unstable, we attempted to convert 3-DG to a stable compound, 2-(2,3,4-trihydroxybutyl)benzo[g]quinoxaline, by reacting with 2,3-diaminonaphthalene. The derivative had a characteristic UV absorbance and fluorescence, making it possible to use the results of HPLC analysis at a later stage. This specific determination of 3-DG seems a good tool to investigate mechanisms of diabetic complications.

キーワード :

3-deoxyglucosone、グリケーション、糖尿病合併症、HPLC

1. 緒言

糖尿病細小血管症は、持続する高血糖のために発症進展する病態で、多くの糖尿病患者の予後を決定している。その成因の一つとして、蛋白質の糖化反応(メイラード反応)の関与が指摘され、糖化反応終末産物(AGEs: advanced glycation end products)と糖尿病性腎症などの糖尿病合併症との関連について報告がなされてきた。つまり、AGEsで修飾された組織蛋白質は、本来の構造や機能に変化をきたし、さらにAGEs修飾蛋白質が細小血管構成細胞に作用してサイトカインなどの分泌を介して組織障害を誘引することが提唱されている。このAGEs形成に至る糖化反応後期段階では、反応性の高い中間体が生成することが知られており、3-deoxyglucosone(3-DG)はその代表的物質の一つである。この中間体が、再び蛋白質と反応することによってAGEs形成を促進する。AGEsの中で糖尿病患者の血中濃度増加や腎組織に蓄積していることが確かめられたpyrraline¹⁾やイミダゾロン化合物²⁾は3-DGと蛋白質の反応で形成する³⁾。また、3-DGは、これらのAGEs形成を介して血管組織を傷害するだけでなく、freeの3-DG自体が直接、血管壁構成細胞に作用する可能性も指摘されている。その作用機序の一つとして、細胞内の抗酸化酵素を不活性化することによって細胞内酸化ストレスを惹起することなどが示唆されている⁴⁾。

これらの研究成果を考慮すると、生体内の3-DGを定量することが、糖尿病血管合併症の成因解析に必須と考えられたが、3-DGのようなジカルボニル化合物は非常に不安定であったことがその定量を困難にしていた。そこで、今回紹介するように3-DGをまず安定な誘導体に変換し、それを定量する方法を導入することによって生体由来サンプルの3-DG特異的定量を可能にした。

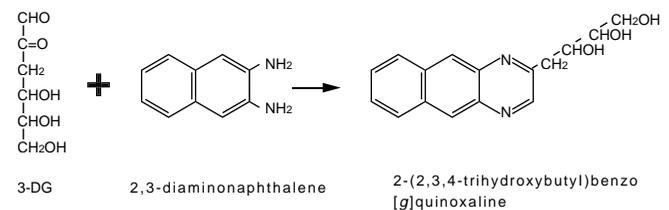


Fig.1 Derivatization of 3-DG with 2,3-diaminonaphthalene

2. 3-DG の誘導体化反応と検出原理⁵⁾

3-DGを2,3-diaminonaphthaleneと反応させると安定な2-(2,3,4-trihydroxybutyl)benzo[g]quinoxaline (Fig.1)が形成する。この安定誘導体は特異的な吸光度特性および蛍光特性を有するので、UV検出器あるいは蛍光検出器によって検出できる。生体由来サンプルの場合は、他の物質との分離を要するので、HPLCやgas chromatographyなどを利用して定量することになる^{6,7)}。以下に、我々の採用しているHPLCを利用した標準的な定量法を述べる。

3. 検体と2,3-diaminonaphthaleneの反応生成物の調整

検体(血清、血漿など)1mlに内部標準として0.005% 2,3-pentanedione 0.05 mlを加えた後、6%過塩素酸1mlを加えて脱蛋白する。遠心(3000rpm、20分間)によって得た上清に飽和炭酸水素ナトリウム2mlを加えて中和した後0.1% 2,3-diaminonaphthalene 0.1 mlと4 でover nightで反応させる。それに酢酸エチル4mlを加えて反応生成物を抽出し、蒸発乾固した後0.2mlメタノールにて再溶解したものをHPLC解析に供する(Fig.2)。

サンプル(血清あるいは3-DG standard)1 ml

内部標準物質添加

0.005% pentanedione 0.05 ml

脱蛋白

6% perchloric acid 1 ml

遠心分離: 3000 rpm、20分間

上清を中和

sodium hydrogen carbonate 2 ml

誘導体化反応

0.1% 2,3-diaminonaphthalene と反応(4、16h)

抽出

ethyl acetate 4 ml

有機層を乾固

0.2 ml メタノールにて再溶解後 HPLC にて解析

Fig.2 Sample preparation

4. HPLC 解析⁵⁾

HPLC カラムは TSK ODS-80TM4.6 × 250 mm を使用した。移動相として、A液(50 mM リン酸:アセトニトリル:メタノール=70:15:15)およびB液(50 mM リン酸:アセトニトリル:メタノール=20:40:40)を作製し、30分から35分にかけて溶液Bを0%から100%に増量させる gradient法を用いた。流速は1.0 ml/分、検出波長 UV268 nm、蛍光検出では503 nm(励起波長271 nm)で分離した。

UVおよび蛍光のいずれの検出においてもFig.3に示すように同じ溶出時間に単一ピークが出現した。このラット血漿由来のピークが本当に3-DG由来であることを確認する目的でこのピークを分取しGC/MSにて解析したところ、Fig.4に示すように2-(2,3,4-trihydroxybutyl)benzo[g]quinoxalineの構造を示唆するものであり、3-DG標準物質を誘導体化した検体から分取したパターンと一致した。

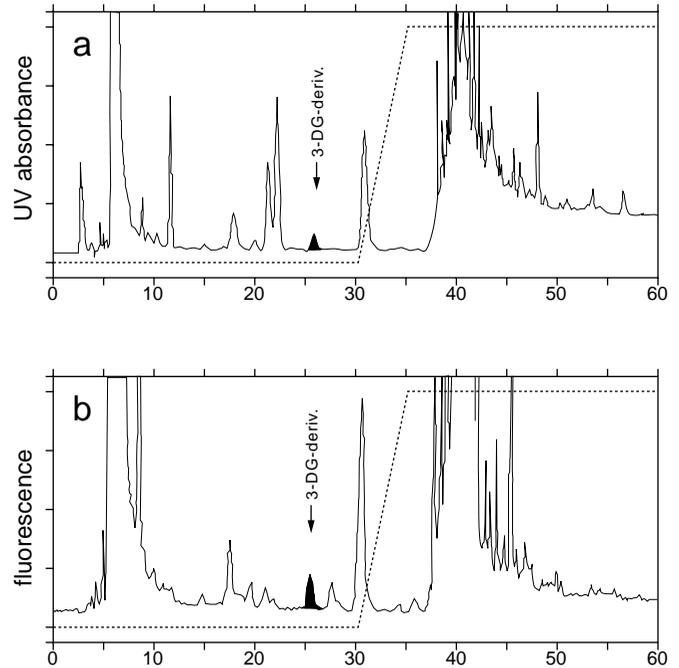


Fig.3 HPLC analysis for 3-DG in rat plasma
a:UV detection, b: fluorescence detection.

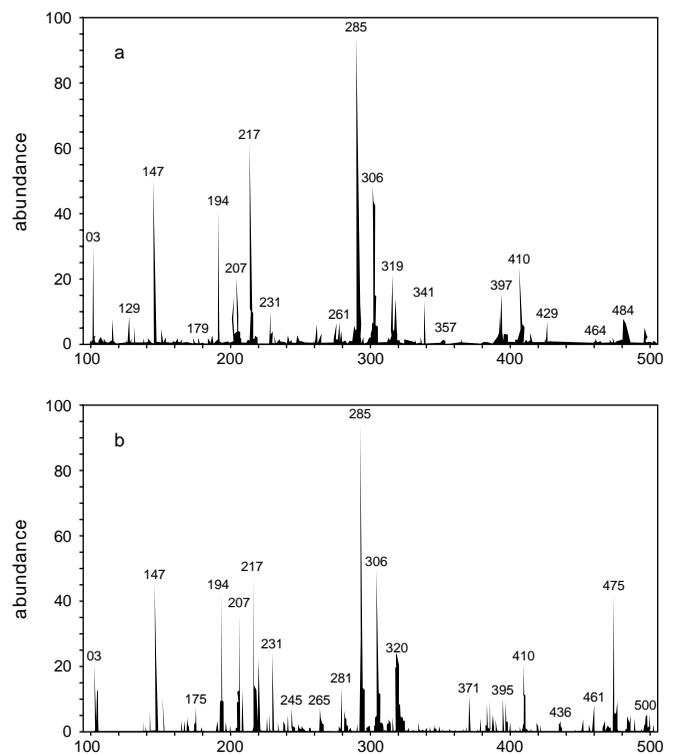


Fig.4 Mass spectra of the derivatives from authentic 3-DG and rat plasma.
a:authentic 3-DG, b:rat plasma. Each derivative was isolated by HPLC and applied to GC/MS.

5. 検量線

種々の既知濃度の3-DG標準液を作製し、上記に従ってHPLCを行う。3-DG由来誘導体のピーク高と内部標準由来のピーク高の比は、元の3-DG濃度と正比例する(Fig.5)。この検量線を利用して、検体中の3-DG由来ピーク高と内部標準のピーク高の比から検体の3-DG濃度を求める。従って、検量線を得るための既知濃度3-DG標準液の誘導体化反応およびHPLC解析は、実験ごとに測定検体と同時に行う必要がある。

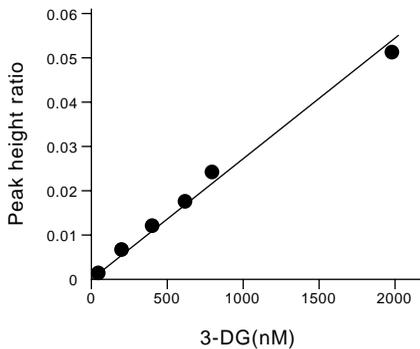


Fig.5 Linear relationship of 3-DG concentration vs peak height ratio(3-DG-derivative/internal std.-derivative).

6. 糖尿病における3-DG測定意義

3-DGはグルコースと蛋白質の非酵素的糖化反応により形成される以外に、フルクトース経路の産生経路も存在する。糖尿病患者においては、血中グルコースの増加とともにポリオール経路を介したフルクトース形成も増加するため3-DG産生は亢進状態にあると考えられる。一方、生体内には3-DGを非活性物質に代謝する防御機構が存在し、中でもアルデヒド還元酵素の重要性が指摘されている。これに関連して、糖尿病ラットを用いた実験で、このアルデヒド還元酵素自身が糖化を受けてその活性が低下していることが報告されている⁸⁾。このように糖尿病では、3-DGの産生亢進と代謝低下により組織内3-DG濃度は上昇することが考えられる。今回紹介した方法を用いて測定した我々の結果でも糖尿病患者の血清3-DG値は、コントロール群に比較して有意な上昇を認めている(Fig.6)。現在、糖尿病合併症の発症・進展と3-DG濃度の関連および3-DGの作用についての検討を続けている。

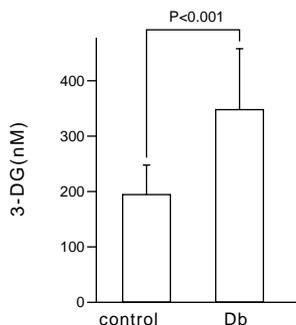


Fig.6 3-DG level in human serum

参考文献

- 1) S. Miyata and V. Monnier, *J. Clin. Invest.* **89**, 1102 (1992).
- 2) T. Niwa, T. Katsuzaki, S. Miyazaki, T. Miyazaki, Y. Ishizaki, F. Hayase, N. Tatemichi and Y. Takei, *J. Clin. Invest.*, **99**, 1272 (1997).
- 3) F. Hayase, R. H. Nagaraj, S. Miyata, F. G. Njoroge and V. M. Monnier, *J. Biol. Chem.*, **264**, 3758 (1989).
- 4) W. Che, M. Asahi, M. Takahashi, H. Kaneto, A. Okado, S. Higashiyama and N. Taniguchi, *J. Biol. Chem.* **272**, 18453 (1997).
- 5) H. Yamada, S. Miyata, N. Igaki, H. Yatabe, Y. Miyauchi, T. Ohara, M. Sakai, H. Shoda, M. Oimomi, and M. Kasuga. *J. Biol. Chem.*, **269**, 20275 (1994).
- 6) H. Odani, T. Shinzato, Y. Matsumoto, J. Usami and K. Maeda, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **256**, 89 (1999).
- 7) S. Lal, F. Kappler, M. Walker, T. J. Orchard, P. J. Beisswenger, B. S. Szwegold and T. R. Brown, *Arch. Biochem. Biophys.*, **342**, 254 (1997).
- 8) M. Takahashi, Y. B. Lu, T. Myint, J. Fujii, Y. Wada and N. Taniguchi, *Biochemistry*, **34**, 1433 (1995).

著者紹介

氏名 楠 仁美 (Hitomi Kusunoki)

神戸大学医学部第二内科

出身大学 高知医科大学 (1992年卒)

現在の研究テーマ 糖尿病合併症の成因解明

氏名 宮田 哲 (Satoshi Miyata)

神戸大学医学部第二内科

出身大学 神戸大学医学部 (1984年卒)

現在の研究テーマ 糖尿病合併症の成因解明

連絡先 〒650-0017 神戸市中央区楠町7-5-1

TEL(078)382-5861 FAX(078)382-2080

品名	容量	価格(¥)	メーカーコード
3-Deoxyglucosone	10mg	14,000	D535
3-Deoxyglucosone	Detection Reagents		
	Set	18,500	D536

実用的蛍光誘導体化

8

福岡大学薬学部

山口政俊・能田 均

9. 糖類の蛍光誘導体化

糖類の蛍光誘導体化試薬は、大きくポストカラム用とプレカラム用に分けられる。

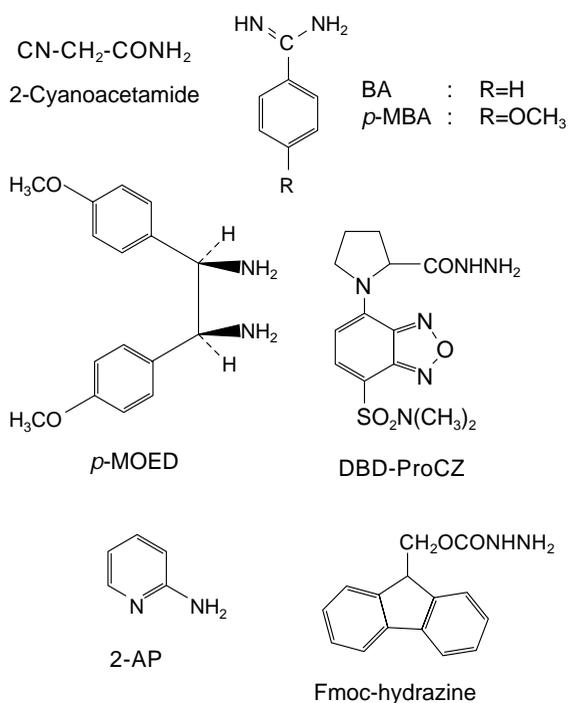


Fig.1 Fluorescence reagents for carbohydrates.

9.1. ポストカラム誘導体化試薬

還元糖に対する試薬として、エチレンジアミン、2-エタノールアミン、2-シアノアセタミド、アルギニン、アリルアミン類、メソ-1,2-ジアリルエチレンジアミン類など多数のものが使用されている。これらの試薬では、誘導体化はアルカリあるいは中性条件下、加熱することにより進行する。これらの試薬の中で、2-シアノアセタミド、BA、*p*-MBA、*p*-MOED (Fig. 1) は、還元糖、アミノ糖、ウロン酸、シアル酸に対し高感度である。2-シアノアセタミドは最も広く使用されている (検出限度、0.1-4.2 nmol) が、反応に際し糖の2位の水酸基が関与するため、2-デオキシ糖とは誘導体を与えない。BA、*p*-MBA、*p*-MOED は、還元糖と迅速に反応 (100、3分間) する (検出限度、2-63 pmol)。グアニジンは、還元糖のみならず非還元糖とも反応する。非還元糖との反応は、過ヨウ素酸ナトリウム存在下、アルカリ性で進行する (検出限度、5-10 pmol)。

9.2. プレカラム誘導体化試薬

DBD-ProCZ、ANS、2-AP、Fmoc-ヒドラジン (Fig. 1) などが還元糖の試薬として開発されている。いずれも、試薬のアミノあるいはヒドラジノ基と糖のアルデヒドあるいはケト基との縮合反応に基づいている (Fig. 2)。

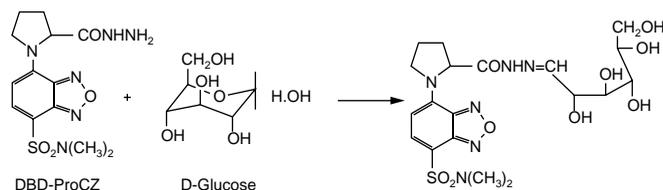


Fig.2 Fluorescence labeling reaction of carbohydrate with DBD-ProCZ

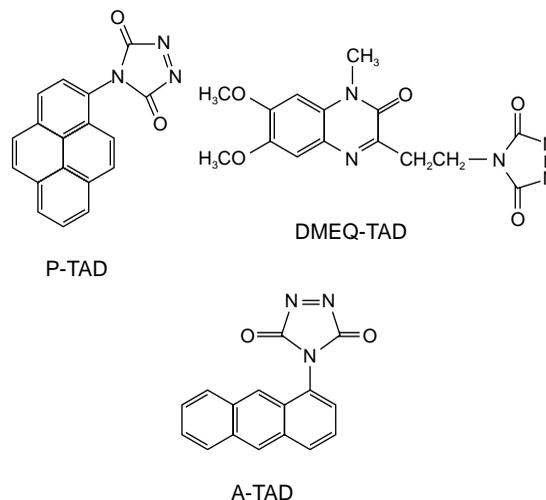


Fig.3 Cookson-type fluorescence labeling reagents for dienes.

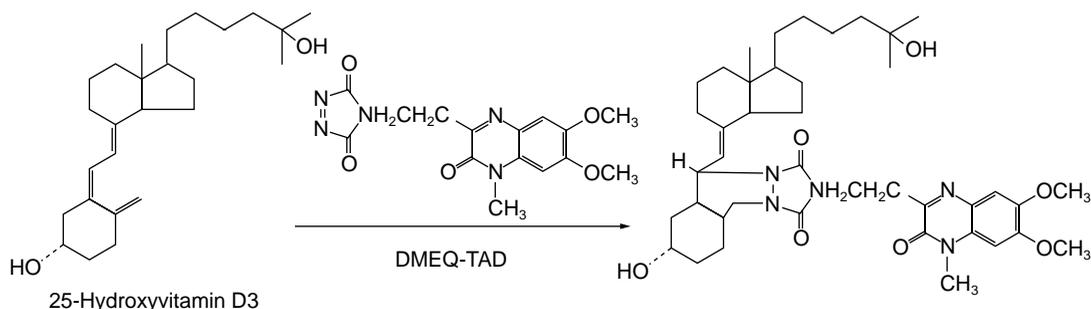


Fig.4 Fluorescence labeling reaction of 25-hydroxyvitamin D₃ with DMEQ-TAD.

10. ジエン類の蛍光誘導体化試薬

P-TAD、DMEQ-TAD、A-TAD (Fig. 3) などの Cookson 型試薬が開発されており、ビタミン D 関連物質の計測に利用されている (Fig. 4)。

11. 核酸関連物質の蛍光誘導体化試薬

核酸はポリヌクレオチドで、それを構成するモノヌクレオチドは核酸塩基とデオキシリボース (または、リボース) 及びリン酸からなる。従って、核酸関連物質の計測には、核酸塩基、糖あるいはリン酸をそれぞれ認識する蛍光試薬が利用されている。

11.1. リン酸

5'-ジメチルアミノナフタレン-1-[N-(2-アミノエチル)スルホンアミド] (DNS-EDA) が、モノ、ジ、トリグアニンヌクレオチド及び2'-デオキシグアニンヌクレオチド-5'-リン酸のラベル化剤として報告されている。これらの核酸との反応は、グアニンヌクレオチドのリン酸との反応に基づいており、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド (WSC または EDAC) の存在下で行われる (Fig. 5) (検出限度、5-20 pmol)。

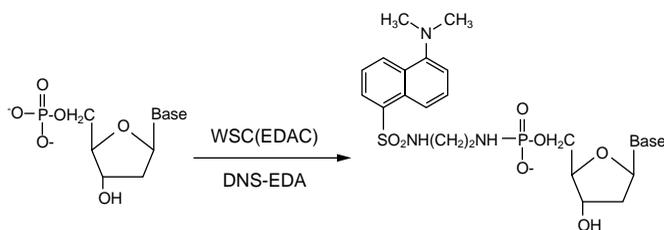


Fig.5 Fluorescence labeling reaction of 2'-deoxynucleoside 5'-monophosphate with DNS-EDA

11.2. 糖

ヌクレオチ(シ)ド糖部の高選択的蛍光試薬として、還元糖の選択的蛍光試薬である *p*-MOED (Fig. 1) が利用できる。本試薬は過ヨウ素酸化したりボースに対して発蛍光し、リボヌクレオチ(シ)ド類のポストカラム用試薬として使われている (検出限度、4-6 pmol)。この試薬は、デオキシリボヌクレオチ(シ)ドとは反応しない。

ヌクレオチ(シ)ドの糖部 5'-水酸基の蛍光ラベル化試薬として、アルコールの蛍光誘導体化試薬である OMB-COCl が使用できる。本試薬はベンゼン溶液中で少量のピリジン (反応促進剤) 存在下、アルコールと反応 (100、40 分間) して蛍光性エステルを与える。この方法はヌクレオチ(シ)ド及びモノ-からテトラヌクレオチドを高感度に計測できる。しかし、それより長いヌクレオチドについては反応収率が低くなる。反応液にアジ化ナトリウムを加えておくとラベル化が進行しやすい。

11.3. アデニンヌクレオチ(シ)ド

クロロアセトアルデヒドやブロモアセトアルデヒドが、この試薬として報告されている。これらは、アデニン残基と反応し、安定な蛍光物質を与える (Fig. 6)。反応は、弱酸性 (pH4.5) の水溶液中、80-100、10-30 分間の加熱で行い、プレカラム誘導体化による。プロモアセトアルデヒドはポストカラム誘導体化にも利用できる。

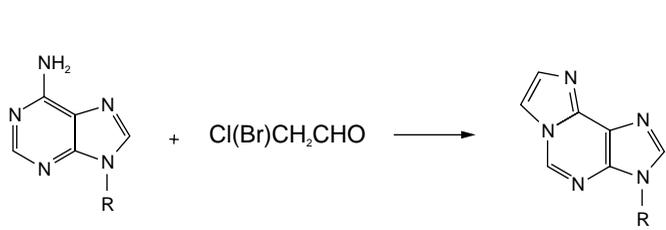


Fig.6 Fluorescence derivatization reaction of adenine - containing compounds with chloro(bromo)acetaldehyde.

Q & A

Total Glutathione Quantification Kit

11.4. グアニンヌクレオチ(シ)ド

フェニルグリオキサール (PGO) は、グアニン及びそのヌクレオチ(シ)ド類に対して、マレイン酸塩緩衝液 (pH3-5) 中で加熱すると、蛍光性物質を与える (Fig. 7)。この条件下では、アデニン、シトシン、チミン、ウラシルなどの他の核酸塩基やそれらのヌクレオチ(シ)ド類には蛍光性を与えない。PGO のアルコキシ体である 3,4-ジメトキシフェニルグリオキサールなどが、さらに高感度なグアニンの試薬として開発されている。また、緩衝で迅速な反応条件 [リン酸緩衝液 (pH7.0) 中、37 °C、5 分間] により、グアニンヌクレオチ(シ)ドを誘導体化できる。

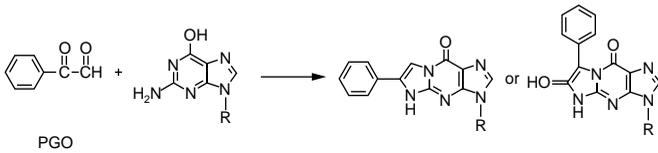


Fig.7 Fluorescence derivatization reaction of guanine-compounds with PGO

11.5. ピリジンヌクレオチ(シ)ド

フェナシルブロミドがシトシン含有化合物の蛍光試薬として、開発されている (Fig. 8)。

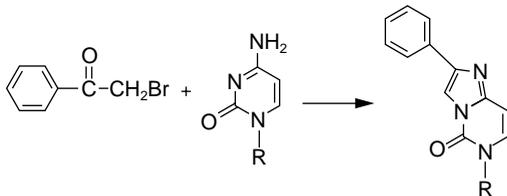


Fig.8 Fluorescence derivatization reaction of cytosine-containing compounds with phenacyl bromide

Br-DMEQ、Br-MMC はウリジン、デオキシウリジン、チミンなどの活性イミノ基を有するヌクレオチドと蛍光反応する (Fig. 9)。

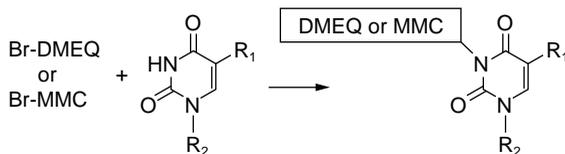
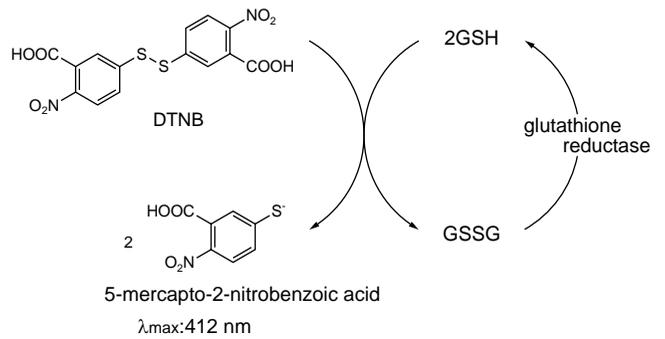


Fig.9 Fluorescence labeling reaction of pyrimidine related compounds with Br-DMEQ or Br-MMC .

Q1 どのような原理で測定するのでしょうか。

A1 glutathioneは、下図に示した酵素リサイクリング法によって高感度に検出されます。5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB)はジスルフィドを分子内に含有し、glutathioneを酸化すると同時に自身は5-mercapto-2-nitrobenzoic acidに還元されます。このチオール吸光度($\lambda_{max}=412\text{ nm}$)より glutathione を定量することができます。



Q2 キット以外には何を準備すればいいのでしょうか？

A2 測定にはキット以外に下記の物が必要になります。

- プレートリーダー (405 nm、もしくは 415 nm フィルター)
- 96 well プレート
- 20 μl と 200 μl のマルチチャンネルピペット
- インキュベーター
- 5-スルホサリチル酸 (SSA)

Q3 マルチチャンネルピペットが無い場合は使えないのですか？

A3 Substrate working solutionを加えるとすぐに発色が始まりますので、well間のタイムラグをできるだけ少なくするためにマルチチャンネルのピペットの使用をお勧めします。無い場合には、できるだけwell間のタイムラグの無いように添加してください。

Q4 5-スルホサリチル酸 (SSA) は何のために使うのでしょうか？ SSAの代わりに使える試薬はありますか？

A4 「除蛋白」と「GSHの安定化」の目的で使用します。また、除蛋白剤として通常用いられる酸(トリクロロ酢酸、過塩素酸、メタリン酸等)では、SSAとピクリン酸がGSHの酸化を防ぐ効果が高いと言われていますので、SSAもしくはピクリン酸の使用をお勧めします。ただし測定の際には、トリエタノールアミン等でpH7程度に中和するか、酸濃度が1%程度以下になるように希釈してから測定して下さい。

Q & A

Total Glutathione Quantification Kit

Q5 測定に影響を与えるような物質はありますか？

A5 アスコルビン酸、β-メルカプトエタノール、ジチオスレイトール(DTT)のような還元物質やシステイン、またSH基と反応するような化合物(マレイミド等)は測定に影響があります。これらの化合物は前処理の段階で除くようにして下さい。

Q6 測定可能な濃度範囲はどれくらいでしょうか？

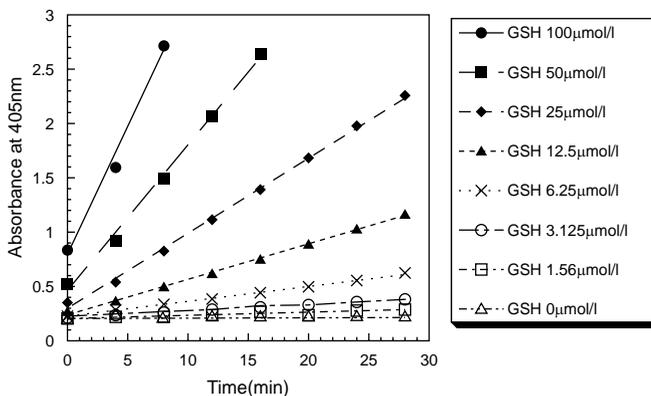
A6 total glutathione濃度が1 ~ 100 μmol/lの範囲で測定可能です。

Q7 試料にどのくらいの濃度のglutathioneが入っているかわからない場合は、どのように測定すればよろしいのでしょうか？

A7 測定試料中のtotal glutathioneの濃度が分からない場合は、測定試料を希釈したものを数種類調製してから測定を行ってください。

Q8 試料中のglutathioneの濃度と発色時間、吸光度の関係を教えてください。

A8 各濃度のGSHにおけるDTNB発色のタイムコースを下記に示します。



横軸はSubstrate working solutionを添加してからの時間(分)

Q9 溶解したCoenzymeはどのくらい使えるのでしょうか？

A9 溶解後のCoenzymeは氷浴中で保存して下さい。ただし徐々に失活しますので、Coenzymeは溶解したその日のうちにお使い下さい。Coenzymeはキットに2本入っておりますので、一度に50well以上測定しない場合には、1本のみ溶解するようにして下さい。

Q10 測定試料の前処理方法について教えてください。

A10 細胞、組織、血漿、赤血球の前処理方法について下に記します。また、測定試料中のSSAの濃度が1%を超えると測定に影響がありますので、濃度が0.5 ~ 1%になるよう測定前に希釈して調製してください。

- ・細胞(付着細胞 : 5x10⁵ cells, 白血球細胞 : 1x10⁶ cells)
 - 1) 200xgで10分間、4にて遠心し、上清を捨てる。
 - 2) 300 μlのPBSで洗浄し、再度200xgで10分間、4にて遠心し、上清を捨てる。
 - 3) 10 mmol/lのHClを80 μl加え、凍結と溶解を2回繰り返して細胞膜を破壊する。
 - 4) 5% SSAを20 μl加え、8000xgで10分間遠心する。
 - 5) 上清を測定試料とする。

- ・組織 (100 mg)
 - 1) 十分に脱血後、5% SSA 0.5 ~ 1 ml中で組織をホモジナイズする。
 - 2) 8000xgで10分間遠心する。
 - 3) 上清を測定試料とする。

- ・血漿
 - 1) 抗凝固剤を加えた血液を、1000xgで10分間、4にて遠心する。
 - 2) 上清を新しいチューブに移し、半量の5% SSAを加える。
 - 3) 8000xgで10分間、4にて遠心する。
 - 4) 上清を測定試料とする。

- ・赤血球
 - 1) 抗凝固剤を加えた血液を、1000xgで10分間、4にて遠心する。
 - 2) 上清を捨てる。
 - 3) 4倍量の5% SSAで溶血する。
 - 4) 8000xgで10分間、4にて遠心する。
 - 5) 上清を測定試料とする。

Q11 このキットで酸化型(GSSG)還元型(GSH)の測り分けはできますか？

A11 2-vinylpyridineによりGSHのSH基をマスクしてGSSGのみを検出し、total glutathione(GSH+GSSG)量から差し引くことでGSH, GSSGのそれぞれを定量することができます。

Q12 GSSGの濃度測定のために2-vinylpyridine処理してから測定するようですが、その際に注意することはありますか？

Q & A

Total Glutathione Quantification Kit

A12 2-vinylpyridineを高濃度で用いたり、そのままプレートに入れたりするとプレートが腐食します。下記のような方法にて測定してください。

【2-vinylpyridine を用いたマウス血清中 GSSG の測定例】
約 700 μ l のマウスの全血に対し、25 μ l の EDTA (500mmol/l) を加え、1.5分遠心します。上清を取り、上清に対し半量の10% SSA と混合し、更に遠心します。上清から 100 μ l 取り、2 μ l の 2-vinylpyridine と 6 μ l の トリエタノールアミン (45 μ mol) を加えて混合します(トリエタノールアミンは pH 調製のため。最終 pH は 7 ~ 7.5 程度)。これを測定試料として GSSG の測定を行います。

Q13 N-ethylmaleimide を用いて酸化型 (GSSG) のみを測定することは可能ですか？

A13 基本的に 2-vinylpyridine と同様に用いることは可能ですが、あまりお勧めはできません。N-ethylmaleimide は、還元型の glutathione との反応は非常に早いのですが、ある一定の濃度を超えると、その後の glutathione reductase を用いた酵素サイクリングの反応を阻害するとの報告例があります。[M. E. Anderson, *Methods in Enzymol.*, **113**, 548 (1985).]

Q14 他社のキットとはどのように違うのですか？

A14 O社のキット(¥59,000/100 tests)は 1 アッセイ当たりのボリュームが大きく 96 穴のプレートでの測定ができないため、同時に多検体の測定を行う場合には向いていません。また、C社のキット(¥29,800/96 well)は 96 穴のプレートでの測定は可能ですが、測定範囲が 0 ~ 16 μ mol/l と狭く、測定試料が限られたり前処理の操作が増えることが考えられます。

本キットは測定範囲が 1 ~ 100 μ mol/l と広く、また 96 穴プレートでの測定が可能で操作もインキュベートの時間を含めても 40 分 ~ 1 時間程度で終了するため、同時に多検体を短時間で測定することができます。

Q15 実際の操作を教えてください。

A15

- 1) Substrate (DTNB) に 1.2 ml, Coenzyme に 7 ml Buffer solution を加えて溶解する (Substrate working solution, Coenzyme working solution)
- 2) Standard GSH に測定サンプルと同じ酸性溶液 (例 : 0.5 ~ 1% 5-sulfosalicylic acid:SSA) を 2 ml 加えて溶解し、順次希釈する (Standard GSH solution)
- 3) Enzyme solution を Buffer solution で 200 倍希釈する (Enzyme working solution)
- 4) Coenzyme working solution を 140 μ l, Enzyme working solution を 20 μ l 各 well に添加し、30 で 5 分間インキュベートする。

- 5) Standard GSH solution、もしくは測定試料 20 μ l を添加し、30 で 10 分間インキュベートする。
- 6) Substrate working solution を 20 μ l 添加し、室温で 10 分間インキュベートする。
- 7) プレートリーダーで吸光度 (405 nm もしくは 415 nm) を測定する。

Q16 total glutathione 濃度の求め方を教えてください。

A16 得られた吸光度より、total glutathione 濃度は下に示す end-point method でも kinetic method のどちらの計算式でも求めることができます。

Pseudo-endpoint method:

$$\text{Total glutathione (GSH+GSSG)} \\ = (\text{O.D.}_{\text{sample}} - \text{O.D.}_{\text{blank}}) / \text{検量線の傾き}$$

Kinetic method:

$$\text{Total glutathione (GSH+GSSG)} \\ = (\text{傾き}_{\text{sample}} - \text{傾き}_{\text{blank}}) / \text{検量線の傾き}$$

*これらの計算式によって求められた値は、調製した測定試料溶液中の glutathione の総量になります。細胞や組織中の正確な glutathione の濃度を求めるには、除蛋白剤の量や測定試料の希釈倍率等を考慮して更に計算が必要となります。

品名	容量	価格(¥)	メーカーコード
Total Glutathione Quantification Kit	100tests	25,000	T419

お知らせ

春の学会展示ご案内

下記学会において、試薬新製品の展示を行います。皆様のご来場をお待ちいたしております。

- ・ 第 74 回日本薬理学会
3 月 21 日(水) ~ 23 日(金) パシフィコ横浜 (横浜)
- ・ 第 1 回日本 NO 学会学術集会
5 月 26 日(土) ~ 27 日(日) アクロス福岡 (福岡)

Topics on Chemistry

NO の次は H_2O_2 ? - シグナル伝達分子としての過酸化水素 -

(株) 同仁化学研究所 佐々本 一美

血管は弛緩と収縮とのバランスによって、その緊張性を調節・維持している。血管内皮から産生される血管弛緩因子(EDRF)の存在と、その本体が一酸化窒素(NO)であることを突き止めた功績に対して、1998年のノーベル医学生理学賞が Drs. Furchgott, Ignarro, Murad の3人に与えられたことは記憶に新しい。血管は、内側を裏打ちしている内皮細胞にあるNO合成酵素(eNOS)によって常にNOを産生している。NOは外側を取りまく血管平滑筋細胞に拡散し、cyclic GMP合成酵素(sGC)のへム部分に結合し、この酵素を活性化する。血管の弛緩は、cyclic GMP濃度の上昇によって引き起こされる。

実はこれ以外にも細胞膜の過分極による血管平滑筋の弛緩メカニズムが知られており、内皮細胞由来の過分極因子(endothelium-derived hyperpolarizing factor = EDHF)の存在が提唱されてきた。特に、細い血管になるほど血管弛緩におけるEDHFの寄与が大きくなると言われている。例えば、以前からニトロ剤が大きな冠状動脈にしか作用せず、細い冠状動脈には作用しにくいことが知られており、NO以外の弛緩因子(メカニズム)の存在が疑われていたが、用いる血管の種類や種によっても結果が異なるため、EDHFの本体はこれまで謎につつまれていた。

EDHFはNOと同様、 Ca^{2+} /Calmodulin 依存的に血管内皮で産生・遊離され、血管平滑筋のカリウムチャンネルを開口させることによって弛緩を引き起こすと言われている。NOはNOSによってアルギニンから産生されるが、アルギニンやNOSの補酵素が存在しない状態では、EDHFがNOに代わって血管弛緩を起こすことが知られており、EDHFとNOは補完的に作用し合っていると考えられている。1980年代後半にはEDRFイコールNOであることが実証され、その後も飛躍的にNOに関する研究が進化したのと対照的に、EDHFは同時期にその存在が提唱されたにもかかわらず、これまで同定されずにきた¹⁾。

幾つかのEDHF候補分子が報告されており、例えばBusseらのグループはアラキドン酸カスケード中のcytochrome P450 monooxygenaseによって産生されるepoxyeicosatrienoic acids (EETs)がEDHFの本体であると主張している²⁾。また、Edwardsらはラットの肝動脈ではカリウムイオンがその本体であると結論している³⁾。さらには、そのような内皮細胞由来の因子が存在するのではなく、内皮と血管平滑筋とのgap junctionを介して過分極が伝播するという説もある⁴⁾。

このような中、最近になって下川らのグループによりEDRFの本体が過酸化水素であるという論文が出され注目されている^{5),6)}。彼らはeNOSノックアウトマウスの腸管膜動脈を用いる実験で、eNOSがsuperoxide anion(O_2^-)を産生すること、さらにそれがSODによって還元され H_2O_2 を発生し、血管平滑筋に移行してカリウムチャンネルを開口させ、弛緩を惹起することを実証した(図1)。eNOSはNOと同時に O_2^- を産生しているが、これらは互いに反応してperoxynitrite($ONOO^-$)を産生する。NO/ O_2^- の産生のバランスは、血管の種類や状態によっても左右さ

れるが、反応場としてはheterogeneousである細胞内の局所では O_2^- がNOによる捕捉を免れ、SODによって H_2O_2 に還元されると考えられる。

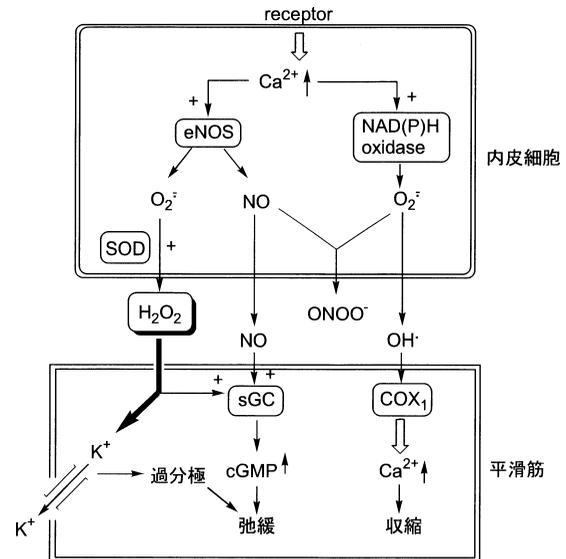


図1. 過酸化水素を介する血管弛緩メカニズム(文献6より改変)

活性酸素の一種である過酸化水素はNOと同様、シグナル伝達分子としての機能が注目されつつあるが、ここでも内皮-血管平滑筋間の細胞間シグナル伝達分子として機能していることが示された。NOと H_2O_2 とは血管弛緩に関しては補完的に作用し合っており、全体像の解明にはこれらに特異的な可視化プローブ分子の開発が欠かせない。

参考文献

- 1) この分野の第一人者は、フランスのP. M. Vanhoutteである。以下の彼の文献が参考になる。Vanhoutte, P.M., editor. 1998. *Endothelium-derived hyperpolarizing factor*. Harwood Academic Publishers. Amsterdam, The Netherlands. 335 pp; Vanhoutte, P.M., editor. 1999. *Endothelium-dependent hyperpolarizations*. Harwood Academic Publishers. Amsterdam, The Netherlands. 433 pp.
- 2) Fisslthaler, B. Popp, R., Kiss, L., Potente, Harder, D. R., Fleming, I., and Busse, R., *Nature*, **401**, 493-497 (1999); Fleming, I., Michaelis, U. R., Brendenkotter D., Fisslthaler, B., Dehghani, F., Brandes, R. P., and Busse, R., *Circ. Res.*, **88**, 44 - 51 (2001).
- 3) Edwards, G., Dora, K. A., Gardener, M. J., Garland, C. J., and Weston, A. H., *Nature*, **396**, 269-272 (1998).
- 4) Yamamoto, Y., Fukuta, H., Nakahira, Y., and Suzuki, H., *J. Physiol.*, **511**, 501-508 (1998); Edwards, G. Thollon, M., Gardener, M. J., Feletou, M., Vilaine, J. -P., and Vanhoutte, P. M., *Br. J. Pharmacol.*, **129**, 1145-1154 (2000).
- 5) Matoba, T., Shimokawa, H., Nakashima, M., Hirakawa, Y., Mukai, Y., Hirano, K., Kanaide, H., and Takeshita, A., *J. Clin. Invest.*, **106**, 1521 - 1530 (2000).
- 6) Vanhoutte, P.M., *J. Clin. Invest.*, **107**, 23 - 25 (2001).

近日発売予定

DNA 抽出キット (-NucleoPure-)

DNA Extraction Kit (for Agarose Gels)

特長

- ・高純度 DNA を高回収率で得ることができる。
- ・遠心フィルターや担体を使用しないので、各種のスケールに対応することができる。
- ・各種の DNA 溶液を調製することが可能である。
- ・各アガロース濃度のゲルに使用することができる。
- ・各断片長の DNA の精製が可能である。

特定のDNA断片を単離精製するために、アガロースゲル電気泳動を用いたDNAの分離回収は広く行われており、簡便な操作で、高回収率、高純度のDNAが得られる方法が望まれています。

本キットはゲルを溶解させるためのGel SolubilizerとPrecipitation Solutionの2種類の溶液によって構成されており、この2種類の溶液によって簡単にゲルを溶解し、効率的に目的DNAを回収できます。DNA回収ステップを以下に簡単に示します。

- 1) アガロースゲルを用いて電気泳動させた後、目的のDNAフラグメントを含んだ部分を切り出す(ゲルスライス)。
- 2) Gel Solubilizerをゲルスライスに加え、加温し溶解させる。
- 3) Precipitation Solutionを加えDNA以外の物質を沈殿させる。
- 4) 遠心分離により上澄みを取る。
- 5) エタノール沈殿によって上澄みからDNAを回収する。

一方、従来のアガロースゲルからのDNAの回収は、透析膜を用いた電気泳動濃縮法、低融点アガロースを用いた方法、またアガラゼ等の分解酵素を用いた方法、およびシリカベースの担体へのDNAの吸着を利用した方法が用いられています。中でも、シリカベースの担体を用いたキットが多数市販されています。この方法の概要を以下に示します。

- 1) アガロースゲルを用いて電気泳動させた後、目的DNAフラグメントを含んだ部分を切り出す(ゲルスライス)。
- 2) 高濃度NaI水溶液を加え、加温しながらゲルスライスを溶解させる。
- 3) シリカベースの担体を加え吸着させる。
- 4) 遠心フィルター等を用いてDNAを吸着した担体を分離する。
- 5) 担体に吸着させたまま、バッファーで洗浄する。
- 6) 溶解バッファーでDNAを担体から溶かし出す。

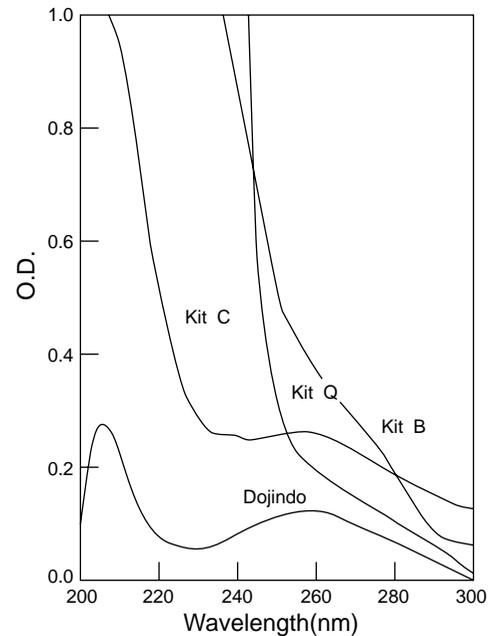


Fig.1 Spectra of DNA after extraction using various kits.

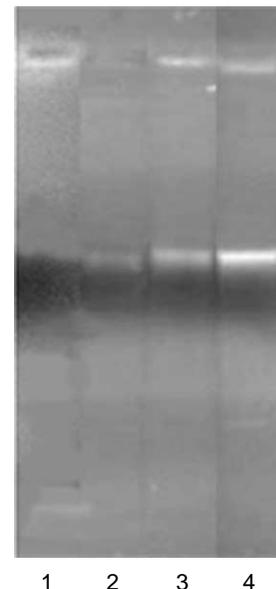


Fig.2 Recovery of Calf thymus DNA using various Kits
1: Kit C, 2: Kit Q, 3: Dojindo, 4: Standard DNA (0.5 ug DNA)

シリカゲルベースのキットは吸着担体の懸濁液、分離用フィルター、各種バッファーをセットにしたもの、あるいは、シリカベースのメンブランフィルターを組み込んだ遠心チューブと各種バッファーをセットにしたものです。しかしながらいずれも担体を分離するためのフィルターを利用するため、一度に精製できる量が制限されてしまいます。

本キットで実際に抽出したDNAと上市されている他社キットを用いて抽出したDNAの吸光スペクトルの比較をFig.1に、また、各キットで分離精製したDNAをアガロースゲル電気泳動しエチジウムブロマイドで染色した結果をFig.2に示します。

精製された純度の高いDNAフラグメントであれば、260 nm付近に極大吸収を持つスペクトルとなりますが、Fig.1のスペクトルデータから、他社キットを用いた場合は260 nm付近に明瞭な極大吸収がなく、アガロース由来の多量の不純物を含んでいる事がわかります。また、Fig.2に示すように吸着担体を使ったキットで回収したDNAフラグメントの蛍光量は回収前のDNAフラグメントや本キットで回収したDNAフラグメントに比べ弱く、回収率が低い事がわかります。

以上のことから、シリカゲルベースの担体を用いたキットでは、実際にその製品のマニュアルに述べられている純度や回収率を達成することは難しいといえます。

その他のDNAフラグメント単離精製方法として、特殊なフィルターを用いてゲルとDNAを分離させる方法や、透析膜の付いたカプセルに切り出したゲルを入れ、短時間で電気泳動させ、カプセルの透析膜側にDNAを濃縮する方法があります。しかし、これらの方法も純度や収量がばらつき、アガロースゲルからのDNA回収キットとして高い信頼性を持っているとは言えません。

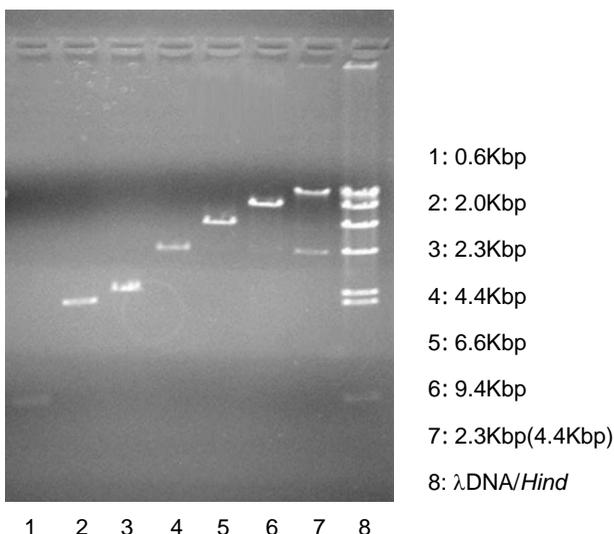


Fig.3 Recovery of different size DNA fragments of λ DNA/*Hind* III

DNA マーカーとして用いられています λ DNA / *Hind* の各フラグメントを本キットを用いて分離し、再び電気泳動した結果をFig.3に示します。この図から、それぞれの長さのDNAフラグメントがきれいに分離回収されていることがわかります。

なお、 λ DNA / *Hind* の 23 Kbp のフラグメントと 4.4 Kbp の DNA フラグメントが一部ハイブリダイズするため、回収した 23 Kbp DNAフラグメントを泳動したレーンでは 2 本のバンドが見られます。

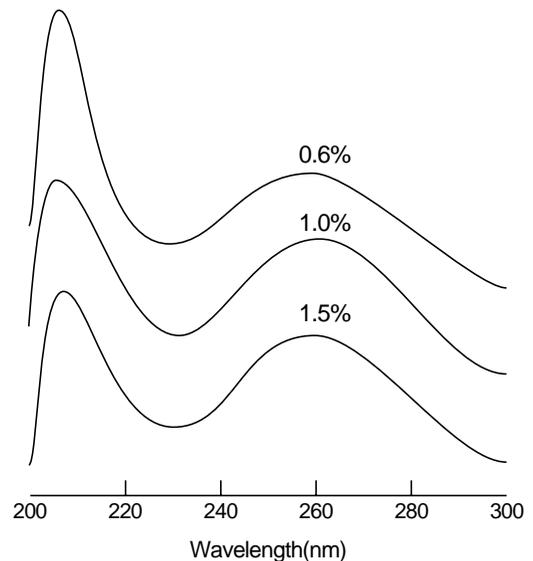


Fig.4 Comparing of the spectra of extracted DNA with various gel concentrations.

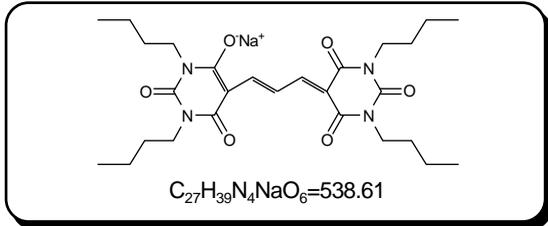
Fig.4には各アガロース濃度のゲルから抽出したDNAのスペクトルを示します。アガロース由来の成分の混入を示す短波長域の吸収も無く、高純度のDNAが抽出されていることがわかります。

本キットを用いてアガロースゲルからDNAフラグメントを回収するのに要する時間は約 40 分程度で、吸着担体を使用する他のキットに比べ時間を要しますが、コンスタントに高純度のDNAフラグメントを分離回収する事ができます。また、DNAをペレットとして得ることができるために、長期保存も可能で、各種バッファー溶液や高濃度のDNA溶液を調製することが可能です。加えて、スケールアップが容易なため、大量にDNAフラグメントをアガロースゲルから回収する事が必要な場合にも有効なキットとなります。

新製品

膜電位感受性色素

DiBAC₄(3)



<特長>

- Ar レーザー(488 nm)を励起光源として利用可能である。
- 膜電位変化に対し、高感度な蛍光変化を示す。
- 蛍光特性(メタノール中) $\lambda_{ex} = 493 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 516 \text{ nm}$

DiBAC₄(3)は、Bis-oxonol型のアニオン性膜電位感受性色素です。細胞外液に添加してインキュベートすると、膜電位に応じた細胞内外の分布を示します。刺激によって細胞膜が脱分極すると、その電位変化を受け、細胞中の存在率が高くなります。細胞質中では、細胞内タンパク質や細胞内膜に結合し、その蛍光が増強します¹⁾。このような機構により、蛍光強度変化から、膜電位の変化を検出することができます。

DiBAC₄(3)は、DiBAC₄(5)やDiSBAC₂(3)などの他の Bis-oxonol 型や、スチリル系の di-4-ANNEPS、シアニン系の DiOC₆(3)などの膜電位感受性色素に比べ、高い電位応答性を持っています²⁾。Braunerらは、BICR/M1R-k細胞(ラット乳癌細胞)において、-25 ~ -90 mVの膜電位範囲で約1%/mVの蛍光強度変化が得られることを報告しています²⁾。電位変化に伴う応答は1次の速度式に従い、その速度定数は0.1 ~ 0.8 /minと報告されています²⁾。カルシウムイオン濃度と膜電位の相関解析³⁾、抗生物質に対する細胞の生存率の分析⁴⁾、ATP感受性カリウムイオンチャネルの活性評価⁵⁾などの研究に応用されています。

Ar レーザー(488 nm)で励起可能なことから、フローサイトメトリー⁴⁾、共焦点レーザー顕微鏡観察⁶⁾などで利用可能です。最近では、High-Throughput Screening(HTS)での細胞応答検出に最も頻繁に使用されている膜電位感受性色素です⁷⁾。

参考文献

- 1) D. E. Epps, M. L. Wolfe, V. Groppi, *Chem. Phys. Lipids*, **69**, 137 (1994).
- 2) T. Brauner, D. F. Hulser, R. J. Strasser, *Biochim. Biophys. Acta*, **771**, 208 (1984).
- 3) T. T. Rohn, A. Sauvadet, C. Pavoine, F. Pecker, *Am. J. Physiol.*, **273**, C909 (1997).
- 4) D. J. Mason, R. Allman, J. M. Stark, D. Lloyd, *J. Microsc.*, **176**, 8 (1994).
- 5) U. Langheinrich, J. Daut, *J. Physiol.*, **502**, 397 (1997).
- 6) V. Dall'Asta, R. Gatti, G. Orlandini, P. A. Rossi, B. M. Rotoli, R. Sala, O. Bussolati, G. C. Gazzola, *Exp. Cell Res.*, **231**, 260 (1997).
- 7) K. S. Schroeder, B. D. Neagle, *J. Biomol. Screening*, **1**, 75 (1996).

品名	容量	価格(¥)	メーカーコード
DiBAC ₄ (3)	25mg	27,000	D545

新製品

HTS用 Cell Counting Kit

Cell Counting Kit-WR (for HTS)

Cell Counting Kit-HS (for HTS)

特長

- High-Throughput Screening (HTS)用に調製した細胞増殖アッセイキットである。
- 希釈の必要がなく、直接384ウェルプレートへ添加できるので操作が簡単である。
- 1液系なのでHTS用測定機器への組み込みが容易である。
- 高水溶性なので、MTTアッセイと違い溶解操作が不要である。
- Wide Range用(WR)とHigh Sensitivity用(HS)で測定系に合わせて使い分けできる。

Wide Range用 : 0 ~ 25,000 cells/well

High Sensitivity用 : 0 ~ 5,000 cells/well

弊社では細胞増殖試験あるいは細胞毒性感受性試験において生細胞数を測定するキットとして、これまで Cell Counting Kit、Cell Counting Kit-8など市販しており多くの研究者に使用され好評を得ております。

弊社の市販するCell Counting Kit-8は、高感度水溶性ホルマザンを生成するテトラゾリウム塩、WST-8を発色基質として採用しており、ホルマザンを溶解する操作を必要することなく、簡便に生細胞数の高感度測定が可能です。WST-8は、Fig.1に示すように細胞内脱水素酵素によりメディエーターである1-methoxy-PMSを介して還元され450 nmに吸収を持つ水溶性のホルマザンに変換されるので、その吸光度の変化量を測定することにより直接生細胞数を計測することが可能です。



Fig.1 測定原理

最近では短時間に多くのサンプルを測定する技術、High-Throughput Screening (HTS)を導入した生化学あるいは分子生物学的研究が盛んに行なわれていますが、その一つとして細胞増殖試験、細胞毒性感受性試験などにおいてもHTSの手法を用いた研究が進められております。

新製品

HTS用 Cell Counting Kit

弊社では、HTS用細胞増殖試験、細胞毒性感受性試験用のCell Counting Kitとして、Cell Counting Kit-WR (for HTS)、およびCell Counting Kit-HS (for HTS)を用意いたしました。Cell Counting Kit-WR (for HTS)はWide Range用として、0から25,000 cells/wellの細胞数測定に、またCell Counting Kit-HS (for HTS)は高感度用として、0から5,000cells/wellの細胞数測定に適しております。それぞれ測定系に合わせてお使い分け下さい。

キット内容

WST-8、1-methoxy PMS 混合水溶液 400ml
(384 ウェルプレート 26 枚分)

操作方法

1 細胞増殖試験

- 1) 対数増殖期にある細胞懸濁液を384-wellマイクロプレートに35 µlずつ播種する。
- 2) プレートにCO₂インキュベーター内で2-3時間インキュベーションする。
- 3) 凍結しているCell Counting Kit-HS (またはWR)を融解させる(37 以下の温水を使用してもよい)。
- 4) Cell Counting Kit-HS (またはWR) 35 µlを各wellに添加する。
- 5) プレートにCO₂インキュベーター内で1-4時間インキュベーションする。
- 6) マイクロプレートリーダーで450 nmの吸光度を測定する。

2 細胞毒性試験

- 1) 細胞懸濁液(1000-2000 cells/well)を384-wellマイクロプレートに35 µlずつ播種する。
- 2) プレートにCO₂インキュベーター内で24-48時間インキュベーションする。
- 3) 試料の薬剤溶液 5 µlを各wellに添加し、CO₂インキュベーター内で24-48時間インキュベーションする。
- 4) Cell Counting Kit-HS(またはWR) 35 µlを各wellに添加する。
- 5) プレートにCO₂インキュベーター内で1-4時間インキュベーションする。
- 6) マイクロプレートリーダーで450 nmの吸光度を測定する。

取扱い上の注意

本キット溶液は-20 で保存して下さい。
 解凍は室温に放置するか、37 以下の温水で行って下さい。
 解凍後頻繁に使用する場合は、遮光して4 で保存し、なるべく早くお使い下さい。
 凍結融解操作はなるべく行なわないようにして下さい。

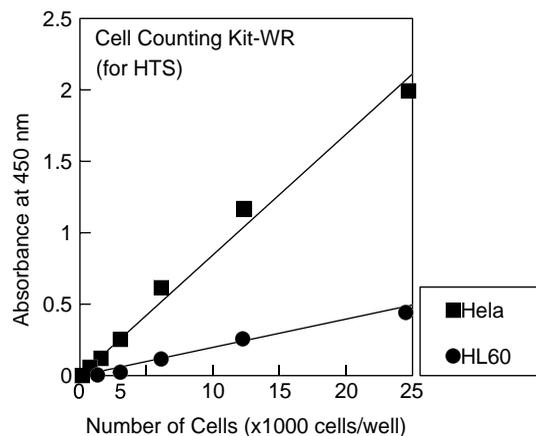
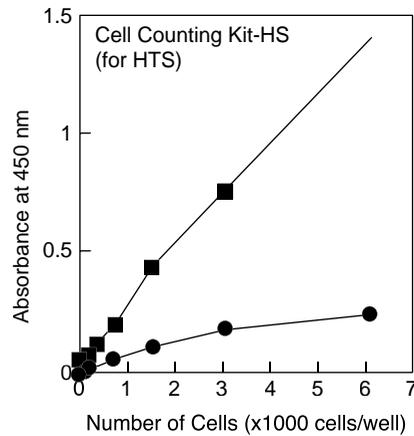


Fig.2 Cell proliferation assay using Cell Counting Kit (for HTS)
 Staining: 37 , 5% CO₂, 1h (Hela)
 37 , 5% CO₂, 4h (HL60)
 Detection: 450 nm

品名	容量	価格(¥)	メーカーコード
Cell Counting Kit-WR (for HTS)	10000 回用	46,000	CK07
Cell Counting Kit-HS (for HTS)	10000 回用	46,000	CK08

新製品

Reagents for High-Throughput Screening(HTS)

今回発売しました DiBAC₄(3), Cell Counting Kit (for HTS)以外に、HTS に用いられる製品を多数揃えております。記載されている容量以外の包装も承りますのでお気軽にお問い合わせください。

1. 細胞内カルシウムイオン測定用試薬

Fura 2

- 1) 励起波長がシフトし(362nm 335nm) ratiometry が可能。
- 2) ratiometry により、プローブ濃度等の影響を避けられる。

Fluo 3

- 1) 可視光励起であるため、細胞損傷の影響が少ない。
- 2) Ar レーザー(488nm)を励起光源として利用可能。

Rhod 2

- 1) 可視光励起であるため、細胞損傷の影響が少ない。
- 2) Kr、He-Ne レーザーを励起光源として利用可能。

Fura 2-AM, Fluo 3-AM, Rhod 2-AM

- 1) AM 化することにより、脂溶性が向上している。
- 2) 細胞外液に添加するだけで細胞内に導入可能。

Coelenterazine-WS

- 1) 細胞内のカルシウム濃度を発光で測定可能。
- 2) 包接化合物の添加による、中性領域での高い水溶性。

2. 細胞内塩化物イオン測定用蛍光試薬

MQAE

- 1) λ_{ex}=355nm、λ_{em}=458nm。
- 2) 塩化物イオンの上昇により蛍光強度が減少。
- 3) 高い水溶性と膜透過性を有し、細胞に容易に導入できる。

3. 細胞内 pH 測定用蛍光試薬

BCECF, BCECF-AM

- 1) pH6.4 ~ 8.0 で、pH と蛍光強度の間に良好な直線関係。
- 2) 440nm に等吸収点を持ち、励起二波長測光が可能。

4. 生物発光試薬

D-Luciferin, D-Luciferin K salt

- 1) 530nm ~ 635nm の光を発する。
- 2) 発光素子収率は 88% と高く、Luminol の 20 倍以上。

5. 細胞増殖 / 細胞毒性測定用試薬

Cell Counting Kit-8

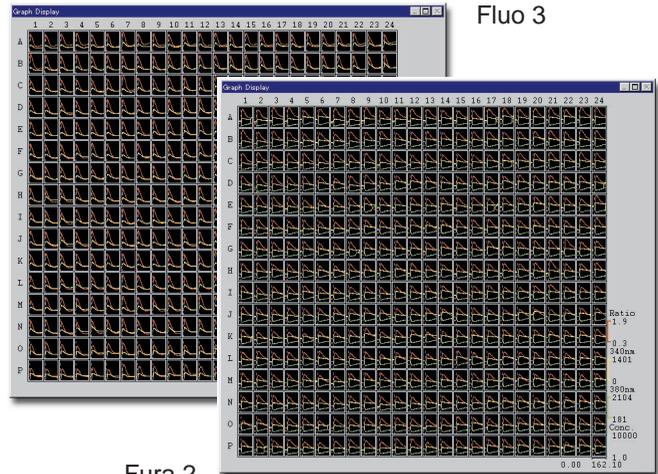
- 1) 高水溶性であり、ホルマザンの溶解操作が不要。
- 2) 他の水溶性テトラゾリウム塩 (XTT、MTS) より高感度。
- 3) 1 ボトル溶液タイプであるため、試薬の調整が不要。

MTT

- 1) λ_{max}=565nm、ε=2 × 10⁴

Calcein-AM

- 1) 細胞膜を容易に透過し、蛍光性の Calcein を生じる。
- 2) 細胞からの漏出および細胞毒性が少ない。



(FDSS6000を用いた384プレートにて細胞内Caを測定した例。浜松ホトニクス株式会社より提供)

品名	容量	価格(¥)	コード	メーカーコード
Fura 2	1mg	27,000	347-05421	F014
Fura 2-AM	1mg	Request		F015
Fura 2-AM special packaging				
	50µg × 8	16,800	348-05831	F025
	50µg × 40	Request		F025
Fura 2-AM solution	1 ml	36,200	343-05401	F016
Fura 2-AM solution	10 ml	Request		F016
Fluo 3	1mg	23,500	345-05721	F019
Fluo 3-AM	1mg	Request		F023
Fluo 3-AM	10mg	Request		F023
Fluo 3-AM special packaging				
	50µg × 8	22,000	349-06961	F026
Fluo 3-AM special packaging				
	50µg × 40	Request		F026
Rhod 2	1mg	25,000	344-05811	R001
Rhod 2-AM	1mg	41,000	341-05821	R002
Rhod 2-AM	10mg	Request		R002
Coelenterazine-WS	1mg	9,000		C397
Coelenterazine-WS	10mg	Request		C397
MQAE	50mg	12,000	348-06051	M024
BCECF	5mg	8,500	345-05184	B031
BCECF-AM	10mg	Request		B262
BCECF-AM solution	1ml	30,000	344-05431	B034
D-Luciferin	25mg	14,000		L221
D-Luciferin K salt	25mg	18,000		L226
Cell Counting Kit-8	500 回用	12,500	347-07621	CK04
Cell Counting Kit-8	2500 回用	31,000	343-07623	CK04
Cell Counting Kit-8	10000 回用	Request		CK04
MTT	1g	12,500	341-01823	M009
MTT	5g	44,000	349-01824	M009
Calcein-AM	1mg	10,000	349-07201	C326

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