

# DOJIN NEWS

ドージンニュース

## Review

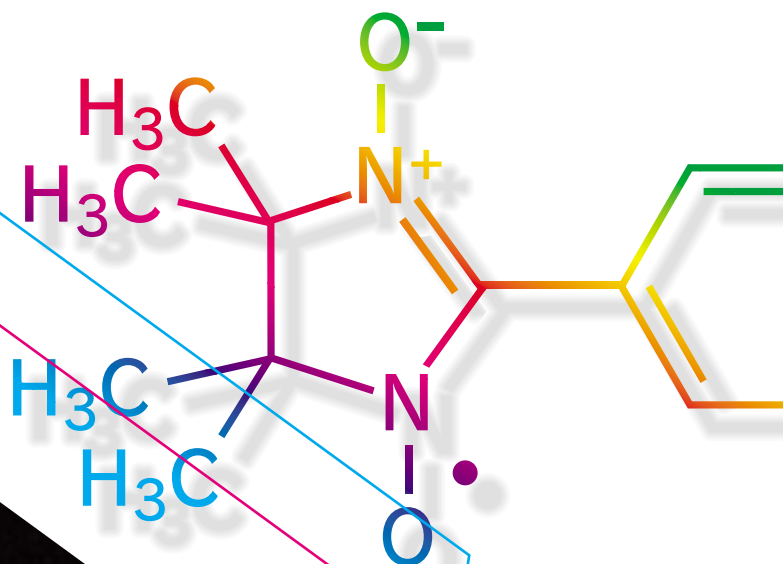
蛍光標識プラスミドを用いたプラスミド/キトサン複合体の発現機構の解析  
佐藤智典

## Topics on Chemistry

糖鎖合成の最近の展開  
- 酵素を用いたsweet success -  
佐々本一美

## 連載

実用的蛍光誘導体化9  
山口政俊・能田 均



## 目次

### Review

- 蛍光標識プラスミドを用いたプラスミド/  
キトサン複合体の発現機構の解析  
慶應義塾大学理工学部 佐藤 智典 ..... 1
- 実用的蛍光誘導体化 9  
福岡大学薬学部 山口 政俊、能田 均 ..... 6

### Topics on Chemistry

- 糖鎖合成の最近の展開  
- 酵素を用いた sweet success - ..... 5

### Column

- 結合定数を求めてみよう ..... 9

### Commercial

- Q&A  
新規タンパク質定量キット ..... 10

### 新製品

- 遅放出型 NO ドナー NOR 5 ..... 12
- 膜電位性感受性色素 DiBAC<sub>4</sub>(3) ..... 13

### 近日発売予定

- 膜タンパク質結晶解析用界面活性剤 ..... 13

### お知らせ

- 第 12 回フォーラム・イン・ドージン開催ご案内 ..... 12
- キットケース変更ご案内 ..... 14

## 新製品案内

容量、価格は下記ページをご覧ください。

- 遅放出型 NO ドナー NOR 5 ..... 12
- 膜電位性感受性色素 DiBAC<sub>4</sub>(3) ..... 13
- 膜タンパク質結晶解析用界面活性剤 ..... 13



初夏の同仁化学研究所

## 蛍光標識プラスミドを用いたプラスミド/キトサン複合体の発現機構の解析

Analysis for the mechanism on the expression of plasmid/chitosan complexes using FITC-labeled plasmid



佐藤 智典

(Toshinori Sato)

慶應義塾大学理工学部

### [ Summary ]

Aminopolysaccharides such as chitosan and polygalactosamine (pGalN) were used to transfer luciferase plasmid (pGL3), while pGalN did not at all. Transfection efficiencies of the pGL3/chitosan complexes were dependent on pH of culture medium, stoichiometry of pGL3:chitosan, serum, and molecular mass of chitosan. The transfection mechanism of plasmid/chitosan complexes was analyzed by using FITC-labeled plasmid and sulforhodamine-labeled chitosan. After which, plasmid/chitosan complexes are endocytosed, and possibly released from endosome due to swelling of lysosomal in addition to swelling of plasmid/chitosan complex, causing the endosome to rupture. Finally, complexes were also observed to accumulate in the nucleus using a confocal laser scanning microscope.

### キーワード :

遺伝子治療、遺伝子導入、蛍光プローブ、フローサイトメーター、共焦点レザ - 顕微鏡

### 遺伝子のデリバリーシステム

遺伝子治療を目指した遺伝子、リボザイムやアンチセンス核酸の細胞内導入法の開発が活発に研究されている。遺伝子治療ではADA欠損症のような先天的な遺伝子疾患に加えて癌やエイズなどが対象疾患として大きな割合を占めている。癌の遺伝子治療の例として、東京大学医科学研究所ではサイトカインを発現するレトロウイルスベクターを用いた *ex vivo* 法による腎癌の免疫遺伝子治療が行われた。またアデノウイルスベクターでは癌細胞を選択的に殺す遺伝子を組み込み腫瘍部に直接注入する方法も行われている。このように現在、遺伝子キャリアーとして多く用いられているのはウイルスベクターである。ウイルスベクターは本来ウイルス自身が持つ特性を利用して高い発現活性を有している。しかしながらウイルスベクターにおいては、数々の問題点も報告されている。例えばアデノウイルスベクターは、免疫原性のために繰り返し投与できない。レトロウイルスベクターにおいては宿主の細胞の形質転換を誘起し癌化させることが考えられる。アデノ随伴ウイルスベクターにおいては運べる遺伝子情報の量が少ない。さらにはウイルスベクターには病原性という大きな問題も現れる可能性がある。そこで安全でかつ効率の良い遺伝子キャリアーとして人工的に作製した遺伝子キャリアーの開発が要求されている。

人工的な遺伝子導入法としては、機械的に細胞に導入する方法と化学的なキャリアーによる導入方法の二種類がある。機械的に遺伝子を導入するものとしては、電位差を利用して細胞内へDNAを導入するエレクトロポレーション法と細胞内へマイクロシリンジを通してDNAを導入するマイクロインジェクション法がある。化学的なキャリアーの研究では、リボソームやカチオン性高分子を用いて遺伝子の細胞内導入を行っている。名古屋大学医学部ではリボソーム法を用いた脳腫瘍の遺伝子治療が試みられている。高分子キャリアーとしては、ポリリジン、ポリエチレンイミン、キトサン、

合成ペプチド、あるいは dendrimer などが報告されている。レセプター介在型のキャリアーを開発するために糖やトランスフェリンによる修飾も行われている。またアデノウイルスやインフルエンザウイルス、センダイウイルスの膜タンパク質をリボソームに組み込むことによりウイルスの持つ細胞指向性やエンドソームからの放出といった機能を利用することも行われている。しかしながら、化学的キャリアーにおいてはウイルスベクターと比較して安全性は高いが、発現活性が低いのが欠点である。

### キトサンによる遺伝子導入

キトサンは、カニやエビの甲羅のキチンを脱アセチル化したものである。キチンは、菌界、植物界、動物界に広く存在しており、バイオマス資源としてはセルロースに匹敵する。キトサンは人工皮膚や止血剤など医学的材料として注目されており、ドラッグデリバリーシステムや薬物の徐放剤としての研究も行われている。最近では遺伝子導入試薬として注目されてきている。筆者らは1996年にプラスミド/アミノ化多糖複合体のガン細胞や血液細胞への導入について検討し<sup>1)</sup>、翌年にはプラスミド/キトサン複合体は市販の遺伝子導入試薬リポフェクテンより高い遺伝子発現活性を持つことを確認していた。同時期に報告された他の論文では、キトサンを用いても発現活性が非常に低かったが<sup>2)</sup>、われわれの実験ではキトサンは非常に優れたキャリアーであることが示された。その理由としては、キトサンの分子量、複合体の作製方法、あるいは細胞への感染実験条件を詳細に検討したことが挙げられる<sup>3)</sup>。1998年になって、キトサンを用いた遺伝子導入の実験が複数発表され急激に注目されるようになり<sup>4-6)</sup>、1999年には経口投与による遺伝子発現を確認した論文が出された<sup>7)</sup>。

筆者らの研究では、キトサンによる発現活性を確認した後は発現機構の解析を中心に行ってきた<sup>8)</sup>。遺伝子が細胞に導入されて発現

がおきるまでの過程は、1)細胞内への導入、2)エンドソームからのリリース、および3)核への集積、に分けることができるであろう。細胞内に導入された遺伝子の輸送を観察するには大きく分けて二つの方法がある。一つは透過型顕微鏡 (TEM, Transmission Electron Microscopy) であり、もう一つは共焦点レーザー顕微鏡 (Confocal Laser Scanning Microscopy) である。透過型電子顕微鏡を用いるには、固定、包埋、切片作製、染色、観察、写真撮影などという一連の作業手順が煩雑である。一方、共焦点レーザー顕微鏡では、細胞小器官での局在は観察できるが、分解能力はTEMに及ばない。しかしながら細胞を固定することなく生細胞のままでの観察が可能である事は大きな利点である。なぜなら、固定化するだけで細胞での局在は変化してしまう可能性があるからである。

### 蛍光標識法

共焦点レーザー顕微鏡はDNAの細胞内局在の観察に頻繁に用いられている。直鎖状のDNAの蛍光修飾にはDNAの5'末端のリン酸基に蛍光ラベルする方法が報告されている。しかしながら環状プラスミドの蛍光標識は一般には行われておらず、遺伝子デリバリーでの発現機構の解析には、モデル的に線状DNAやオリゴ核酸を用いている例もある。環状プラスミドの蛍光標識には、酵素的に標識する方法<sup>9)</sup>、光架橋<sup>10)</sup>、およびプリンを取り除いた部位に蛍光修飾する方法<sup>11)</sup>などが報告されている。また発現活性を保ち、高次構造を保った蛍光修飾プラスミドの作製法として、cyclopropapyrroloindole リンカーを用いてDNAと蛍光標識物質を共有結合させる方法<sup>12)</sup>、およびDNAリボースのアルデヒド部位にアジドにより蛍光標識物質を反応させる方法も報告されている<sup>13)</sup>。しかしながら、これらの方法においては、リンカーの構造が複雑でありUV照射下で反応する必要があった。

従来法では満足できるものが無かったので、独自の方法を開発することにした。筆者らが注目したのはジアゾカップリング法である。この方法により、1988年にJ. M. RothenbergはDNAのグアニン塩基の8位にビオチン修飾を行い<sup>14)</sup>、また小林らはDNAに糖の導入を行っている<sup>15,16)</sup>。そこで、このジアゾ化反応を用いることでプラスミドに蛍光修飾を行うことにした<sup>17)</sup>。合成スキームはFig.1に示した。2-(4-Aminophenyl)ethylamineとFITC(型)をDMF中室温で一晩攪拌し、これにNaNO<sub>2</sub>を加えてジアゾ化した。次にLuciferase plasmidとジアゾ化したFITCをホウ酸バッファー(pH 9.0)中で反応させた。これによりプラスミド1分子当たりFITCが約1個導入された。得られたFITC修飾プラスミドは、発現活性の低下が認められず、フローサイトメーターや共焦点レーザー顕微鏡での観察に十分な蛍光強度を有していた。一方、キトサンはスルホローダミンで蛍光修飾した。

### 遺伝子発現のメカニズム解析<sup>3,8)</sup>

#### 1) 細胞への取込

##### i) キトサン分子量依存性と他の高分子キャリアーとの比較

Fig. 2にはSOJ細胞でのルシフェラーゼプラスミドの発現と細胞への取込効率の比較を行った結果を示している。発現活性に対しては、SOJ細胞以外にもHelaヒト子宮癌細胞、B16マウス黒色腫細胞、A549ヒト肺癌細胞においてキトサンの分子量依存性がみられ40 kDが最適であった。またフローサイトメーターにより得られた取込量の結果にも分子量依存性が見られている。一方、ポリガラクトサミンやDEAD-デキストランでは発現活性が非常に低く、特にDEAD-デキストランで高い取込が見られるにも関わらず発現が非常に低いことが示された。

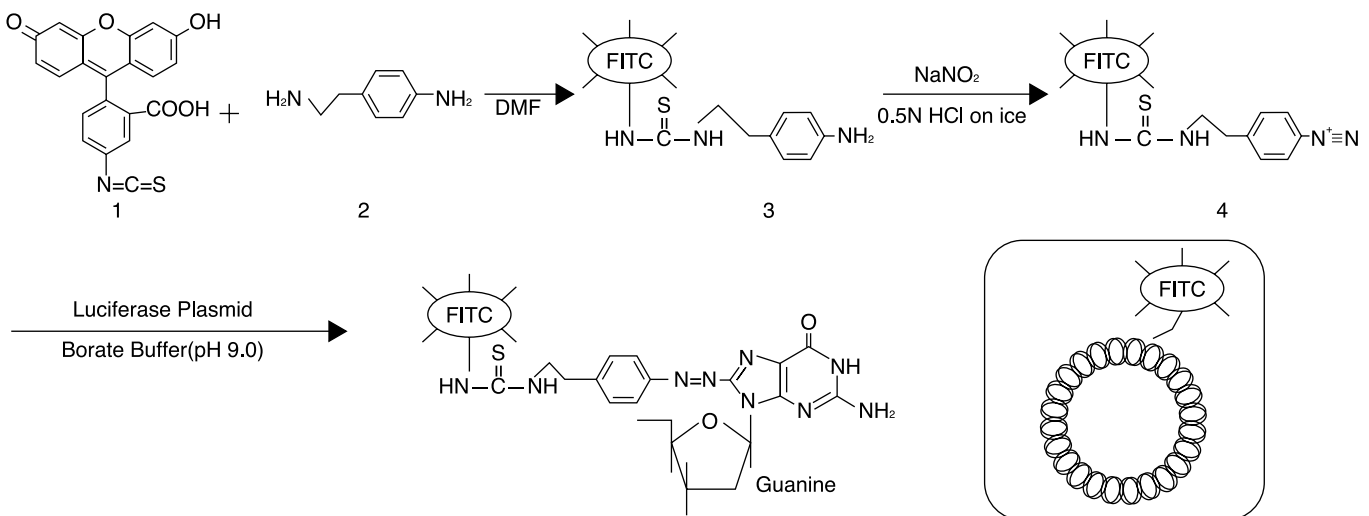


Fig.1 Synthetic procedure of FITC-labeled plasmid.

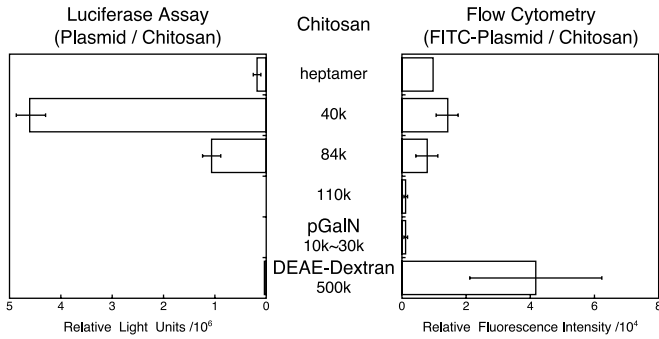


Fig.2 Luciferase Activity and Cell Uptake of Plasmid/Chitosan (1:5) Complexes (SOJ Cells cultured in RPMI1640 containing 10% FBS, [FITC-Plasmid] = [Plasmid] = 1mg/ml, Transfection Time = 4 h, Plasmid; Normalized to 100)

ii) 血清依存性

通常の遺伝子キャリアでは血清存在下で発現の低下する例が多い。しかし、キトサンでは10-20%FBS存在下において高い発現活性が見られた。一方、遺伝子の取込効率は無血清で最も高く血清の添加により徐々に減少していた。これにより、血清の存在により細胞の機能が高まり発現活性の向上が見られたものと推察できる。分子量や血清の影響以外にも培地のpH、複合体のカチオン・アニオンの比、プラスミドの濃度などの条件での測定を行っており、取込効率との相関性が見られている。

2) 共焦点レーザー顕微鏡によるプラスミドの細胞内局在の観察

プラスミド/キトサン複合体をHela細胞に投与した時のFITC-プラスミドの局在をFig.3に示した。2時間後にはFITCの蛍光はエンドソームと思われる所に観察された。このことは、エンドソームマーカーとして用いられるスルホローダミン修飾デキストランとプラスミド/キトサン複合体の蛍光が細胞質内で同じ局在を示した事からも支持された。また、6時間後においては複合体が細胞の盛り上がった核と思われる場所に局在していることが観察された。同時に、スルホローダミン修飾キトサンの蛍光も核で見られたことから、複合体の状態では核に局在すると考えられる。

このように、蛍光標識プラスミドは細胞に導入されたときの輸送を追跡するのに非常に有効であった。筆者らのこれまでの研究では、蛍光標識されたオリゴ核酸やサケ精子のDNAを用いてきた。しかし、フローサイトメータでの取込効率の測定ではサケ精子DNAとプラスミドでは異なることが示されており、実際に発現を見ているプラスミドを蛍光標識して取込効率や細胞内局在を観察することの意義は大きい。

まとめ

蛍光標識したプラスミドやキトサンを用いた実験などを中心に、プラスミド/キトサン複合体の発現のメカニズムは以下のように提唱できる。1) 細胞への取込はエンドサイトーシスで行われている。2) エンドソームからは、バッファリング効果かスポンジ効果により複合体のままリリースされている。その間、複合体の酵素による分解は抑制されている。3) 核への集積は比較的早い

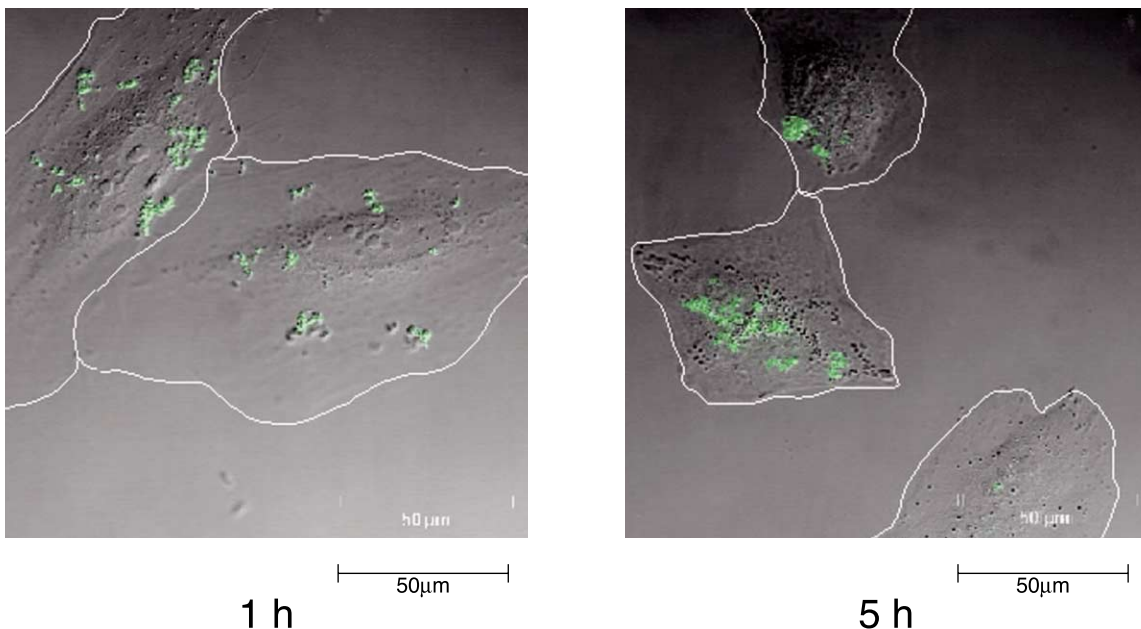


Fig.3 Subcellular Distribution of FITC-Plasmid/Chitosan(1:5) Complexes in HeLa Cells (HeLa Cells Cultured in MEM Containing 10% FBS, [Plasmid]=10mg/ml, Chitosan; M.W.40 kD, Incubation Time=1h, Post Incubation Time 1h or 5h)



時間で起き、複合体のまま移行している。このようにキャリアーが遺伝子発現を高めるメカニズムを解析することで、更に効率を高めるためのキャリアーの修飾や新たなキャリアーの設計に反映させることが出来るであろう。

ルシフェラーゼ遺伝子は発現を定量化するためのモデル遺伝子であるが、我々はガン細胞の増殖を抑制するような遺伝子とキトサンの複合体を用いた細胞実験も行っている。ヒトの膵臓癌細胞を用いた実験では、市販の遺伝子導入試薬であるリポフェクテンでは脂質の毒性のみ見られたが、キトサン複合体では遺伝子発現による細胞の増殖抑制が観察された。このようなキトサンの発現活性と生体内での安全性を考えると、癌の遺伝子治療への応用も試みたいと思っている。動物での投与実験を行う際にも、蛍光標識プラスミドは組織レベルでの取込や局在の観察にも利用できると期待される。

#### 参考文献

- 1) T. Sato, N. Shirakawa, H. Nishi, Y. Okahata, *Chem. Lett.*, **1996**, 725.
- 2) S. Venkatesh, T. J. Smith, *Pharm. Dev. Technol.*, **2**, 417(1997).
- 3) T. Sato, T. Ishii, and Y. Okahata, *Biomaterials*, 2001, in press
- 4) P. Erbacher, S. Zou, T. Bettinger, A. M. Steffan, J. S. Remy, *Pharm. Res.*, **15**, 1332 (1998).
- 5) K. Y. Lee, I. C. Kwon, Y. H. Kim, W. H. Jo, S. Y. Jeong, *J.Control. Release*, **51**, 213 (1998).
- 6) F. C. MacLaughlin, R. J. Mumper, J. Wang, J. M. Tagliaferri, I. Gill, M. Hinchcliffe, A. P. Rolland., *J.Control. Release*, **56**, 259 (1998).
- 7) K. Roy, H. Q. Mao, S. K. Huang, K. W. Leong, *Nat. Med.*, **5**, 387 (1999).
- 8) T. Ishii, Y. Okahata, T. Sato, submitted to *Biochim. Biophys. Acta*
- 9) M. A. Zanta, P. Belguise-Valladier, J. P. Behr, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**, 91 (1999).
- 10) M. Malecki, *Scanning Microscopy Supplement*, **10**, 1 (1996).
- 11) G. M. Makrigiorgos, S. Chakrabarti, A. Mahmood, *Int. J. Radiat. Biol.*, **74**, 99 (1998).
- 12) M. G. Sebestyen, J. J. Ludtke, M. C. Bassik, G. Zhang, V. Budker, E. A. Lukhtanov, J. E. Hagstrom, and J. A. Wolff, *Nat. Biotechnol.*, **16**, 80 (1998).
- 13) C. Ciolina, G. Byk, F. Blanche, V. Thuillier, D. Scherman, and P. Wils, *Bioconj. Chem.*, **10**, 49 (1999).
- 14) J. M. Rothenberg, M. Wilchek, *Nucleic. Acids. Res.*, **16**, 7179 (1988).
- 15) T. Akasaka, K. Matsuura, N. Emi, K. Kobayashi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **260**, 323 (1999).
- 16) K. Matsuura, T. Akasaka, M. Hibino, K. Kobayashi, *Chem. Lett.*, **1999**, 247.
- 17) T. Ishii, Y. Okahata, and T. Sato, *Chem. Lett.*, **2000**, 386.

#### 著者紹介

氏名：佐藤 智典 (Toshinori Sato)

年齢：42 歳

慶應義塾大学理工学部 応用化学科 助教授

出身大学：九州大学修士

学位：工学博士 (京都大学)

現在の研究テーマ：

- 1) 生体膜の構造と機能解析
- 2) バイオコンビナトリアル合成法による糖鎖ライブラリーの構築
- 3) フェージライブラリー法による感染阻害剤の開発
- 4) 遺伝子治療のためのデリバリーシステムの開発

主な学会活動：

FCCA : <http://www.gak.co.jp/FCCA/indexj.html>

生命化学研究会 : <http://www-pclab.ph.tokushima-u.ac.jp/FBC/FBC-home.html>

遺伝子・デリバリー研究会 : <http://bio.ch.nagasaki-u.ac.jp/gene/>

研究室 web site : <http://www.applc.keio.ac.jp/~sato/lab/index-jp.html>

連絡先：〒223-8522 横浜市港北区日吉 3-14-1

Tel:045-566-1771

e-mail:sato@applc.keio.ac.jp

# Topics on Chemistry

## 糖鎖合成の最近の展開 - 酵素を用いた sweet success -

(株) 同仁化学研究所 佐々本 一美

糖鎖生物学が非常に注目されており、その機能に着目した薬剤の開発も盛んに行われている<sup>1)</sup>。糖鎖の多様性はタンパク質や核酸と大きく異なっている。タンパク質に対する核酸の様に、構造を一義的に決定する情報分子が存在しないし、また、一級および二級水酸基からのみ成る糖自身の構造上の多様性も特異な点である。このため、糖鎖を自由に合成する技術はタンパク質や核酸と比べて大きく立ち遅れていたが、最近になって固相合成についての報告が多くなされており、自動化がいよいよ現実のものとなってきた。とは言え、研究者が望み通りの糖鎖を自由に自動合成できるレベルではなく、依然として主流は酵素を利用する合成である。酵素法は化学合成と比べ、高い選択性や穏和な反応条件、また、面倒な保護・脱保護を必要としないなどメリットは大きく、これまで多くの糖鎖合成に利用されてきた。

酵素法の場合、グリコシド結合形成を触媒する酵素は、glycosidase と glycosyltransferase の2種類であるが、glycosidase は反応が逆向きなので収量が低く、普通は glycosyltransferase が利用される(図1)。この場合の基質は糖ヌクレオチド(酵素が動物由来の場合、ヌクレオチドは UDP または GDP) であるが、最大の課題は基質が高価なことである(例えば、UDP-galactose は 5 mg で 1 万円以上)。glycosyltransferase がクローニングによって容易に入手できるようになってきた現在、基質の供給の問題はさらに深刻になっている(安価に化学合成する方法も Hindsgaul<sup>2)</sup> らによって報告されているが、生物・医学研究者に恩恵をもたらしてはいないようだ)。

これらの問題を回避する代表的な二つのアプローチを紹介したい。Wang<sup>3)</sup> らのグループは、galactoside の生合成経路上の4種類の酵素(GalK, GalPUT, GalU, PK)を大腸菌で発現させ、His-Tag によって樹脂に固定し、糖ヌクレオチドの再生システムを構築した(図2)。出発原料の acceptor, PEP, galactose (および、触媒量の ATP, UDP, Glc-1-P) を用い、生理的条件下、樹脂および glycosyltransferase と 24 時間、4 日間反応させる。樹脂は再生も可能である。これによって、種々の galactoside を 70% 以上の収率で得ている。

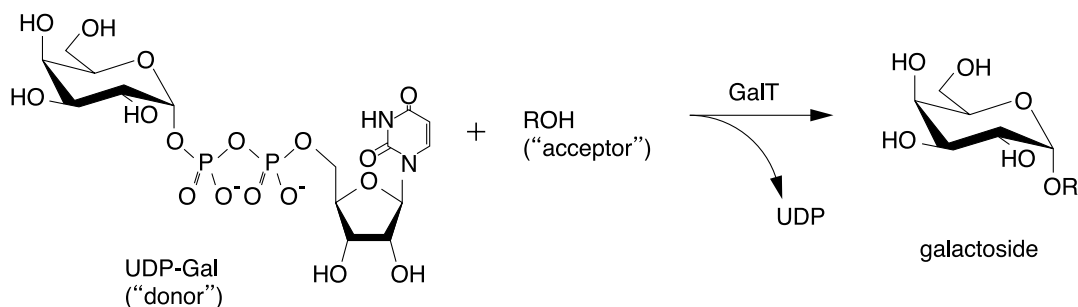


図1: galactosyltransferase (GalT) によるグリコシド形成反応

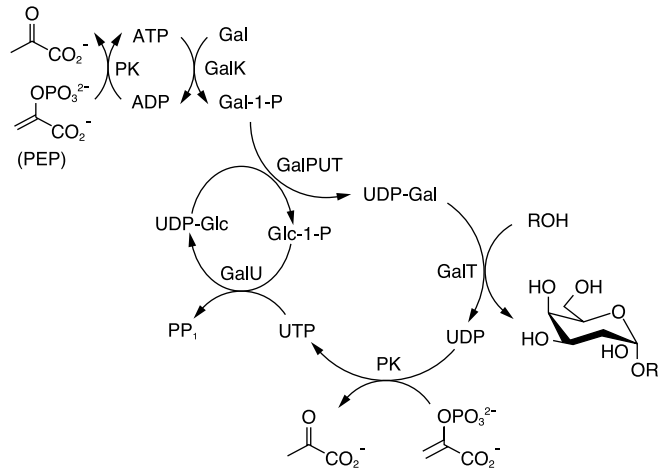


図2: UDP-Gal の生合成経路

一方、Blixt<sup>4)</sup> および Wang<sup>5)</sup> らのグループはそれぞれ独立に、基質としてもっと安価な UDP-glucose (数十倍安い) を利用する方法を報告している。galactosyltransferase と UDP-glucose-4'-epimerase (galactose 再生酵素) との融合タンパク質を大腸菌で発現させることにより、gスケールの経済的な糖鎖合成を実現している。これらは、糖のもつ可能性をさらに引き出すためにも重要なアプローチである。

### 参考文献

- 1) 例えば、J. Alper, *Science*, **291**, 2338 (2001).
- 2) M. Arlt and O. Hindsgaul, *J. Org. Chem.*, **60**, 14 (1995).
- 3) X. Chen, J. Fang, J. Zhang, Z. Liu, J. Shao, P. Kowal, P. Andreana, and P. G. Wang, *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 2081 (2001).
- 4) O. Blixt, J. Brown, M. J. Schur, W. Wakarchuk, and J. C. Paulson, *J. Org. Chem.*, **66**, 2442 (2001).
- 5) J. Fang, X. Chen, W. Zhang, J. Wang, P. R. Andreana, and P. G. Wang, *J. Org. Chem.*, **64**, 4089 (1999).

# 実用的蛍光誘導体化

## 9

福岡大学薬学部  
山口政俊・能田 均

前回までの「実用的蛍光誘導体化」において、通常用いられている蛍光誘導体化について述べてきた。最近、この通常の蛍光誘導体化に、時間分解や蛍光偏光などの種々の蛍光特性を積極的に取り込み、感度や選択性の向上を図る試みがなされている。筆者らは、通常の蛍光誘導体化にエキシマー蛍光現象を導入し、エキシマー蛍光誘導体化という新しい概念に基づく方法論を考案した。本法が、生体実試料中の生体成分分析に極めて有効かつ実用性の高い方法であることを実証したので、本稿で述べる。

一般に蛍光測定は比較的低濃度(1 $\mu$ mol/L以下)で行うので、蛍光分子同士の相互作用が観測されることは少ない。しかし、特定の条件下において蛍光分子(基)が近接すると、互いに相互作用して蛍光の消光(原因は多種)、蛍光共鳴エネルギー移動、励起会合体の形成・発光などがおこる。これらの蛍光分子間の相互作用は互いが近接しないと観測されないことから、高分子化合物(蛋白質、核酸、生体膜など)等及びそれらと相互作用する物質をそれぞれ蛍光修飾して、形態、動態の解析に用いられてきた。著者らはこれらの蛍光分子間の相互作用を低分子生理活性物質の誘導体化と組み合わせ高選択的かつ高感度な分析法の開発を試みている。

## 12. エキシマー蛍光誘導体化

### 12.1. エキシマー蛍光とは

ピレンなどの多環芳香族が互いに近接するとき、一方が光を吸収して励起状態となると、他方の基底状態のピレンと会合して励起会合体(エキシマー)を形成する。このエキシマーからの発光をエキシマー蛍光という(図1)。エキシマー蛍光は2個のピレン分子の間でおこる分子間エキシマー蛍光と1,3-ジピレンプロパンのように同一分子内に存在する2個のピレン基の間でおこる分子内エキシマー蛍光があり、前者は高濃度(一般に1mM以上)でしか観測されないが、後者は低濃度でも観測される。ピレンの場合、通常モノマーからの蛍光は375nm付近に発光極大波長があるの

に対して、エキシマー蛍光における極大波長は475nmへと長波長シフトする。このように、エキシマー蛍光はストークスシフト(励起極大波長と発光極大波長の差)が大きいという好ましい蛍光特性がある。これに加えて、従来の蛍光誘導体化では困難であった対象物質1分子あたり一個の蛍光基が導入された誘導体と複数個導入された誘導体を分光学的に識別できるであろうことに着目し、生体ポリアミンをモデルにエキシマー蛍光誘導体化法の開発を試みた(図2)。この方法では、複数のピレンが導入された目的成分をエキシマー蛍光検出するとき、試薬自身やモノアミンの誘導体はモノマー蛍光しか発しないので妨害とならない。

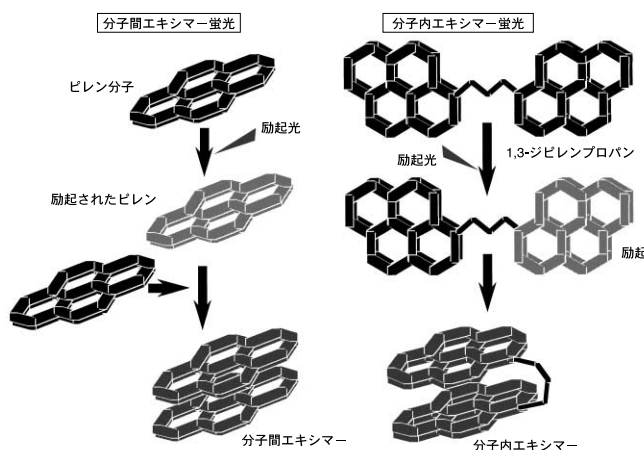


図1 ピレンのエキシマー - 蛍光

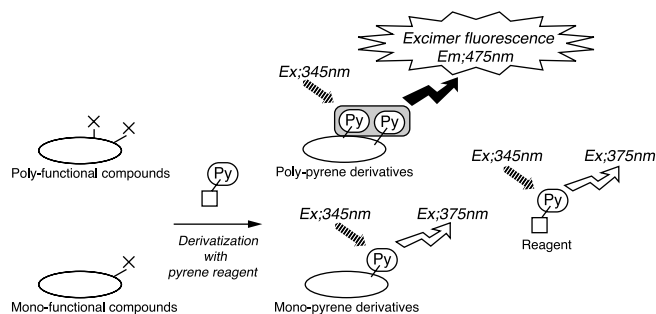


図2 エキシマー - 蛍光誘導体化の概念

### 12.2. ポリアミンのエキシマー蛍光誘導体化<sup>1)</sup>

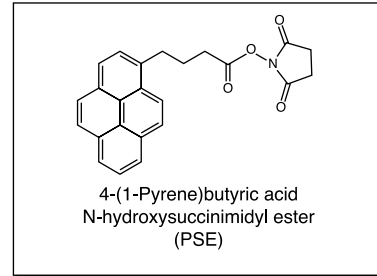
生体ポリアミン(Chart 1参照)は、分子内に2~4個のアミノ基を有している。従来の蛍光誘導体化法では、生体中の多くのモノアミン類(アミノ酸類を含む)も同時に誘導体化されて同様の蛍光を与えるので、これらとの分離のため試料の前処理やHPLC分離条件が煩雑にならざるをえなかった。そこで上記のエキシマー誘導体化を試みた。



Chart 1 Procedure for the excimer fluorescence derivatization of polyamines

Sample solution\* 200  $\mu$ L  
 1M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 10  $\mu$ L  
 5 mM PSE in CH<sub>3</sub>CN 200  $\mu$ L  
 Heat at 100 for 20 min

Reaction mixture  
 Inject into HPLC(20  $\mu$ L)  
 \*THF:DMSO:H<sub>2</sub>O=1:2:1(V/V)



Polyamines Structure	Abbreviation
Putrescine H <sub>2</sub> N(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NH <sub>2</sub>	Put
Cadaverine H <sub>2</sub> N(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> NH <sub>2</sub>	Cad
Spermidine H <sub>2</sub> N(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NH <sub>2</sub>	Spd
Spermine H <sub>2</sub> N(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NH <sub>2</sub>	Spm

HPLC conditions

Column; TSKgel Super Octyl  
 (100x4.6 mm I.D., 2  $\mu$ m)  
 Mobile phase;50-80% CH<sub>3</sub>CN(0-20 min,v/v)  
 Flow rate;1.0 mL/min  
 Fluorescence measurement;Excimer fluorescence:Ex345 nm,Em475 nm.

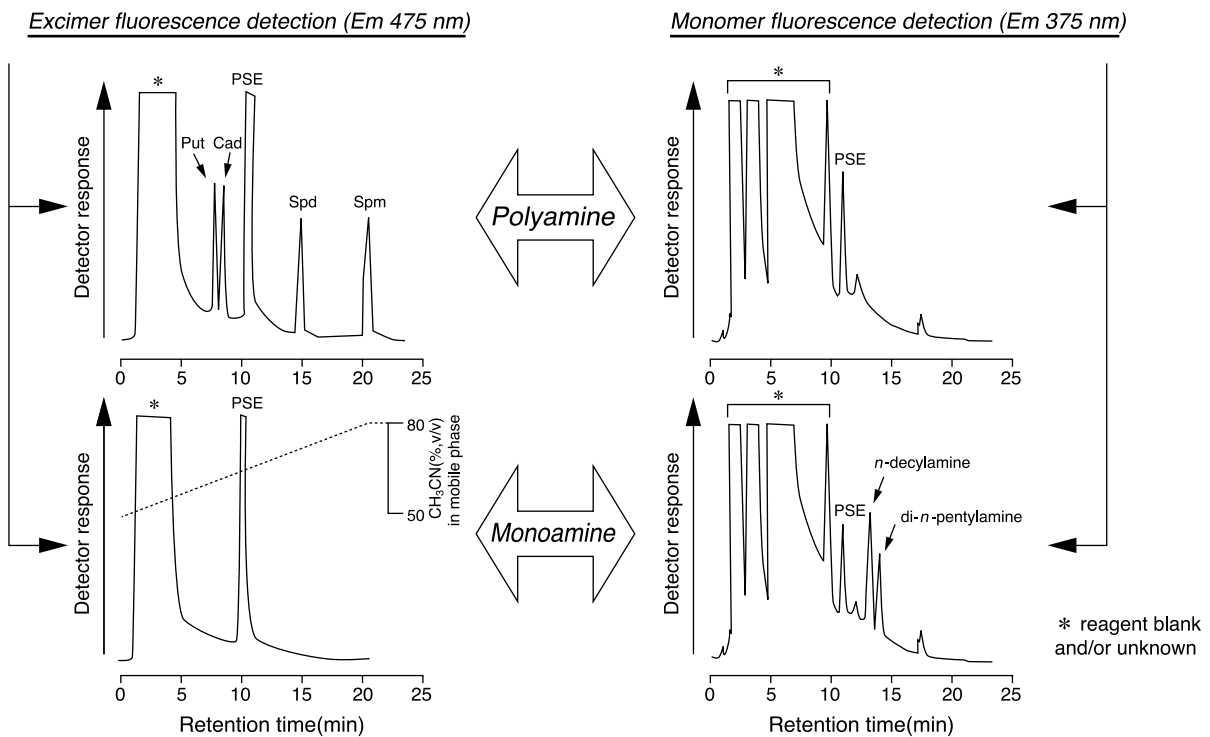


Fig. 3. Chromatograms of the PSE derivatives of polyamines and monoamines.  
 Concentrations(pmol/injection):Put and Cad (1),Spd(5),Spm(10),monoamines(50).

誘導体化操作をChart 1に示す。アミノ基用ピレンラベル試薬としてはPSEが市販されており、それをそのまま用いている。この条件で誘導体化を行った場合に、一級、二級アミンを問わず、全てのアミノ基にピレンが導入されていることをLC-MSにより確認している。また、これらの誘導体は全てエキシマー蛍光を発することも確認された。

この方法の選択性を検証するために、ポリアミンとモノアミンをそれぞれChart 1に従って誘導体化してHPLCに付し、エキシマー蛍光検出及び比較のためにモノマー蛍光検出したときに得られるクロマトグラムを図3に示す。本法で用いるエキシマー蛍光検出を行った場合には、ポリアミンのピークが観測されているのに対して、モノアミンのピークは観測されず、試薬ピークも比較的小さくなる(試薬は極めて高濃度であるので、分子間エキシマー蛍光によるピークが出現している)。それに対してモノマー蛍光検出では、モノアミンのピークは観測されるが、多くのブランクピークが出現するので高感度な分析は困難と思われる。以上の高い選択性に加えて、この方法はオンカラムでfmolレベルの感度も有しているため、従来法より簡便な前処理で生体試料(血液、尿)中ポリアミンの定量に適用できると考えている。

### 12.3. 塩基性アミノ酸のエキシマー蛍光誘導体化<sup>2)</sup>

塩基性アミノ酸[オルニチン(Orn)、リジン(Lys)]も、ポリアミンと同様に分子内にある二つのアミノ基をPSEでピレンラベルすることによりエキシマー蛍光検出できる。誘導体化は、ポリアミンの場合より緩和な条件で進行する。高い選択性を活かして、希釈尿をそのまま誘導体化するだけで、健康人の尿中塩基性アミノ酸が定量できる(Chart 2、図4)。これら以外のアミノ酸のピークは観測されない。

Chart 2 Procedure for the derivatization of urinary basic amino acids

Urine (100-times diluted)	100 $\mu$ L
50 mM Triethylamine	10 $\mu$ L
1 mM PSE (DMSO)	100 $\mu$ L
Warm at 40 for 30 min	
Dilute 10 times with mobile phase	
Reaction mixture	
Apply onto HPLC (20 $\mu$ L)	

#### HPLC conditions

Column: TSKgel Super ODS (100  $\times$  4.6 mm I.D., 2 $\mu$ m, Tosoh)  
 Mobile phase: CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O-CH<sub>3</sub>COOH (55:45: 1, v/v)  
 Flow rate: 1.0 mL/min  
 Fluorescence detection: Ex 345 nm, Em 475 nm

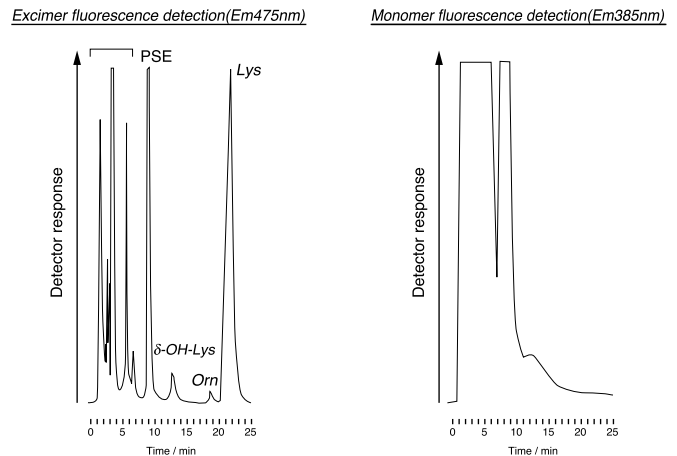


図4 Chromatograms obtained with a normal human urine Concentrations(nmol/ml urine):ornithine,13.2;lysine,234.

本法は、ポリアミンや塩基性アミン以外に、基本的には同一分子内に複数個のアミノ基を有する生体アミン(ヒスタミンなど)や医薬品(トリエンチンなど)にも適用可能で、すでに実用されている。

さらに、アミノ基以外の多くの官能基にも適用できる。次回は、ジカルボン酸、ポリフェノールなどについて述べる。

#### 参考文献

- 1) H. Nohta *et al.*, *Anal. Chem.*, **72**, 4199(2000).
- 2) H. Yoshida *et al.*, *Anal. Sci.*, **17**, 107(2001).

#### 追記)

前回の「実用的蛍光誘導体化<sup>8)</sup>」において、重要な参考文献の記述を忘れていましたので、ここで改めて紹介させていただきます。

#### 11.2. 糖

- 1) p-MOED : Y. Umegae *et al.*, *J. Chromatogr.*, **515**, 495 (1990).
- 2) OMB-COCl : H. Nagaoka *et al.*, *Anal. Sci.*, **5**, 525 (1989).

#### 11.4. グアニンヌクレオチ(シ)ド

- 3) PGO : M. Kai *et al.*, *Anal. Chim. Acta*, **207**, 243 (1988).

#### 11.5. ピリジンヌクレオチ(シ)ド

- 4) Br-DMEQ : M. Yamaguchi *et al.*, *Anal. Sci.*, **3**, 75 (1987).

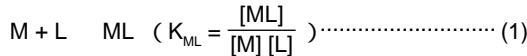
他の項目については、次の文献(総説)を参照いただきたい。

- 5) Y. Ohkura *et al.*, *J. Chromatogr. B*, **659**, 85 (1984).

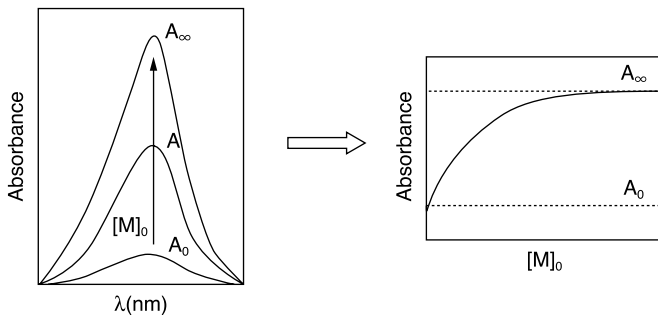
# Column

## 結合定数を求めてみよう

何げなく目にする結合定数も、どうやって計算するのか知らない場合が多い。学生のころ習ったはずだが、実際に自分で計算してみないとなかなか身につかない。最もよく遭遇するケースとして、次のような1:1のキレート生成反応を考えてみよう。



ここで、Mは金属、Lは配位子、 $K_{ML}$ は結合定数(この場合は錯体の安定度定数)であるが、別にキレート生成でなくても勿論構わない。今、金属の初濃度を $[M]_0$ 、配位子の初濃度を $[L]_0$ とした場合、 $[L]_0$ を一定にして $[M]_0$ をゼロから徐々に増やし、吸光度(A)の変化を測定する(図1)。ここでは例として吸光度が変化するケースを想定しているが、蛍光強度でも、NMRのケミカルシフトでも、要するに濃度と一次の対応をしているシグナルであれば、何でも構わない。



(図1)

$A_0$ は金属がないときの吸光度(つまり配位子のみの吸光度)、 $A$ は全て結合したときの吸光度(実際には、これ以上変化しないときの値)を表しているが、これらはもちろん実測可能な値である。

(1)式の $K_{ML}$ を求めるには、 $[M]$ 、 $[L]$ 、 $[ML]$ の3つの平衡状態での濃度を求める必要がある。そこで次の3つの式を用いることにしよう。

$$[M]_0 = [M] + [ML] \quad (2)$$

$$[L]_0 = [L] + [ML] \quad (3)$$

$$A = \epsilon_L[L] + \epsilon_{ML}[ML] \quad (4)$$

初濃度 $[M]_0$ 、 $[L]_0$ は既知であり、測定の間じゅう一定である。問題は(4)式で、 $\epsilon_L$ 、 $\epsilon_{ML}$ を各々、配位子および錯体のモル吸光係数とすると、吸光度Aはそれらの和として表される。 $\epsilon_L$ 、 $\epsilon_{ML}$ は別途求めなくても、次のように $A_0$ 、 $A$ を用いて表すことができる。すなわち、 $A_0 = \epsilon_L[L]_0$ 、 $A = \epsilon_{ML}[L]_0$ なので(ちょっと考えるとすぐに思いつく) (4)式は、

$$A[L]_0 = A_0[L] + A [ML] \quad (4)'$$

(株)同仁化学研究所 佐々本 一美

のように書き換えることができる。これで、求めたい3つの未知数を含む式が揃った。後は、中学校で習った(3)と(4)'式の一次の連立方程式を $[L]$ 、 $[ML]$ について解くと、

$$[ML] = \frac{(A - A_0)}{(A - A_0)} [L]_0 \quad (5)$$

$$[L] = \frac{(A - A_0)}{(A - A_0)} [L]_0 \quad (6)$$

得られた $[ML]$ を(2)式に代入すると、

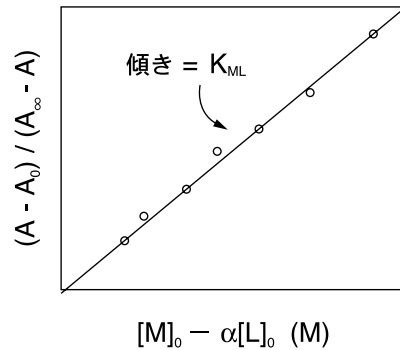
$$[M] = [M]_0 - \frac{(A - A_0)}{(A - A_0)} [L]_0 \quad (7)$$

これから $K_{ML} (= [ML] / ([M][L]))$ が求まるが、普通は、 $K_{ML}[M] = [ML] / [L]$ のように置き換え、 $[M]$ に対して $[ML] / [L]$ をプロットする。つまり、

$$K_{ML}([M]_0 - \alpha[L]_0) = \frac{(A - A_0)}{(A - A_0)} \quad (8)$$

$$\left( \text{ここで } \alpha = \frac{(A - A_0)}{(A - A_0)} \right)$$

とおき、 $[L]_0$ 一定条件下、 $[M]_0$ を変化させ、 $A$ 、 $A_0$ 、 $A$ を実測し、下図のプロットの傾きから結合定数( $K_{ML}$ )を求めることができる。



(図2)

(8)式は吸光度(A)の代わりに、蛍光強度(F)やケミカルシフト( $\delta$ )を用いても同様に成立する。

また、ある系中の金属(ターゲット分子)濃度を既存のキレーター(プローブ分子)を用いて求めたいような場合には、 $[M]_0$ が未知、 $K_{ML}$ が既知なので、式(1),(5),(6)より、

$$[M] = \frac{[ML]}{K_{ML}[L]} = \frac{1}{K_{ML}} \cdot \frac{(A - A_0)}{(A - A_0)} \quad (9)$$

を用いればいいことが分かる。

Q & A

新規タンパク質定量キット

-Proteostain-  
Protein Quantification Kit- Rapid  
-Proteostain-  
Protein Quantification Kit- Wide Range

Q1 それぞれのキットの測定原理を教えてください。

A1 RapidはBradford法を採用しています。Coomassie Brilliant Blue G (Fig.1)をタンパク質検出用試薬として用いており、高感度で反応が速いという特長を持っています。

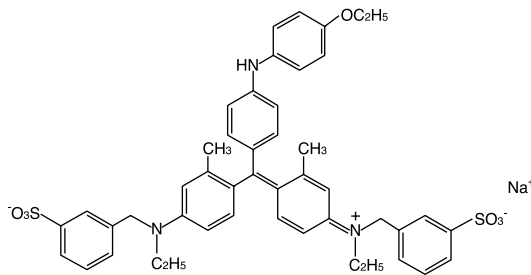


Fig.1 Coomassie Brilliant Blue G

Coomassie Brilliant Blue Gはタンパク質に作用し、酸性条件下で青色に呈色します(λ=595 nm付近)(Fig.2)。しかも呈色反応は1分以内に終了し、生じた色素は30分以上安定です。この方法を使うことにより数分程度でタンパク質定量を行うことができます。

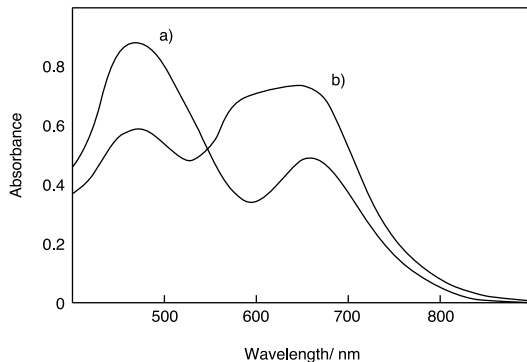


Fig.2 Coomassie Brilliant Blue Gの吸収スペクトル  
a) タンパク質無し  
b) タンパク質(BSA):500 µg/ml

一方Wide Rangeはtetrazolium saltであるWST-8を用いた方法になります。塩基性条件下でWST-8はタンパク質により容易に還元され、青色のformazan dyeを生成します。

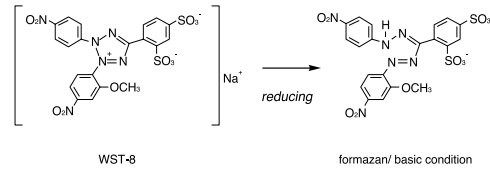


Fig.3 WST-8とそのformazan dyeの構造式

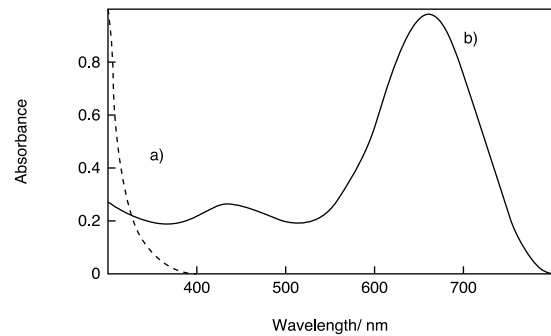


Fig.4 WST-8の吸収スペクトル

a) タンパク質無し  
b) タンパク質(BSA):200 µg/ml

- Q2 定量できるタンパク質の濃度範囲はどのくらいですか？  
A2 BSA換算でRapidはStandard法で10 µg/ml ~ 2,000 µg/ml、Micro法で0.1 µg/ml ~ 50 µg/mlです。Wide Rangeは50 µg/ml ~ 5,000 µg/mlです。
- Q3 キット以外に必要な器具として何を準備すればいいのですか？  
A3 マイクロプレートリーダー、96穴マイクロプレート、20 µl, 200 µl マイクロピペット(可変式)、1.5 ml遠心チューブになります。マイクロプレートリーダーは、Rapidの場合600 nmのフィルターが、Wide Rangeの場合650 nmのフィルターが必要になります。
- Q4 保存はどのようにすればいいのでしょうか？  
A4 Rapidの場合、冷蔵(0~5℃)で保存して下さい。CBB solutionは0~5℃で12ヶ月、室温では6ヶ月安定です。0~5℃の保存においてバックグラウンドの上昇はありません。Wide Rangeの場合、冷蔵(0~5℃)の遮光条件下で保存して下さい。WST-8 solutionは0~5℃で12ヶ月、室温で3ヶ月安定です。またBuffer solutionは室温で18ヶ月安定です。しかし、炭酸ガスを吸収してpHが下がる恐れがあるので、使用後はしっかりとキャップを締めて下さい。BSA solutionは0~5℃で12ヶ月安定です。

Q & A

新規タンパク質定量キット

- Q5 タンパク種による感度の差はどの程度ですか？  
 A5 下記 Table 1 をご参照ください。正確な値を得るためには同じタンパク種を用いて検量線を作成して下さい。

Table1 タンパク種による感度の変動

Protein	Protein vs. BSA <sup>a)</sup>	
	Rapid	Wide Range
BSA	1.00	1.00
chymotrypsinogen A	0.67	0.75
transferrin	1.02	0.97
human IgG	0.96	0.37

a) 値は検量線の傾きの比を示す。  
 (タンパク種の傾き/BSAでの傾き)

- Q6 濃いタンパク質の濃度を測定する場合に注意する点を教えてください。  
 A6 Rapidの場合、BSA換算で2,000 µg/mlまでは測定できます。それ以上になるとCBB solutionとの混合時に沈殿を起こす事があります。その場合には予めサンプルを希釈して用いて下さい。Wide Rangeは5,000 µg/mlまで測定可能なので、濃いタンパク質濃度を測定する場合には、Wide Rangeがお勧めです。  
 Q7 測定に障害を与える物質とその濃度について教えてください。  
 A7 下記 Table 2 をご参照ください。障害物質が高濃度に含まれる場合は用いる前に除去操作を施して下さい。

- Q8 吸光度計を用いて測定することもできますか？  
 A8 Rapid、Wide Rangeそれぞれマイクロプレートを使わず、吸光度計を用いてセル法で測定することが可能です。Rapidの場合、500回用で最大80サンプル、2,500回用で400回測定できます。また、Wide Rangeの場合は500回用で最大40サンプル、2,500回用で200サンプル測定可能です。セル法での測定方法は、取扱説明書を参照して下さい。  
 Q9 サンプル中の界面活性剤濃度が、許容範囲よりも高い場合、どうしたらよいですか。  
 A9 Table 2 に記載のそれぞれの界面活性剤について、濃度が許容範囲以下になるようサンプルを希釈するか、市販の界面活性剤除去キットを使用して除去して下さい。

- Q10 このアッセイで得られたタンパク量はBSA換算値ですが、真のタンパク量を知るにはどうしたらよいでしょうか。  
 A10 BSAの代わりに、目的のタンパクを用いて検量線を作成し、その検量線からタンパク量を求めてください。

品名	容量	価格(¥)	メーカーコード
<i>-Proteostain-</i> Protein Quantification Kit - Rapid			
	500 tests	4,000	PQ01
	2,500 tests	11,000	PQ01
<i>-Proteostain-</i> Protein Quantification Kit - Wide Range			
	500 tests	4,000	PQ02
	2,500 tests	11,000	PQ02

Table 2 測定に影響を及ぼさない障害物質の最大濃度\*

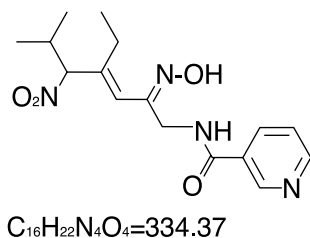
Chemical	Concentration		Chemical	Concentration	
	Rapid	Wide Range		Rapid	Wide Range
Detergent			Salt		
Brij 35	0.13 %	2 %	sodium chloride	2 mol/l	0.5 mol/l
Brij 56	0.03 %	1 %	potassium chloride	2 mol/l	1 mol/l
Brij 58	0.01 %	1 %	sodium acetate	0.4 mol/l	0.2 mol/l
Triton X-100	0.13 %	1 %	sodium bicarbonate	0.1 mol/l	6.25 mmol/l
Triton X-114	0.13 %	1 %	Buffer		
Tween 20	0.25 %	0.50 %	citrate pH 5.0	0.125 mol/l	0.6 mol/l
Tween 80	0.10 %	0.30 %	MES pH 6.1	0.125 mol/l	12.5 mmol/l
SDS	0.10 %	1 %	Tris pH 7.4	0.0625 mol/l	2.5 mmol/l
CHAPS	4 %	4 %	PBS	Undiluted	Undiluted
CHAPSO	4 %	2 %	HEPES pH 7.5	0.125 mol/l	12.5 mmol/l
MEGA 10	4 %	0.50 %	CHES pH 9.0	0.125 mol/l	12.5 mmol/l
Octyl-β-D-glucoside	0.50 %	0.50 %	Reducing agent		
NP-40	0.75 %	7.5 %	glucose	2 mol/l	
Organic solvent			glutathione	0.04 mol/l	
ethanol	10 %	10 %	ascorbic acid	0.4 mol/l	
isopropanol	10 %	10 %	dithiothreitol	1 mol/l	
DMSO	10 %	10 %	2-mercaptoethanol	1 mol/l	
Chelating agent					
EDTA	0.4 mol/l	2.5 mmol/l			
DTPA	0.4 mol/l	0.625 mmol/l			

\* 無添加のBSAによる検量線との誤差が5%以内の濃度を示す。  
 \* 両キットとも、Urea 50%含有まで影響はない。

## 新製品

## 遅放出型 NO ドナー

## NOR 5



## &lt;特長&gt;

- 半減期が長い(20時間, 37℃, pH7.4)
- 血圧降下作用がない
- 動物への経口投与が可能である

NOR 5はNO放出剤であるNORシリーズの中で最も遅いNO放出速度を持つドナーです。

Carboxy-PTIOを用いてNO放出を観察した場合、各NOR化合物のNO放出の半減期はpH 8.0、37℃で、NOR 1が2.6 min、NOR 3(FK409)が46 min、NOR 4が107 minであるのに比べてNOR 5は1800 minと非常に長いことが報告されています<sup>1)</sup>。

NOR 3とNOR 5を10 mg/kgでラットに経口投与した場合、血漿NO<sub>x</sub>量はNOR 3では120分で最大に達するのに対し、NOR 5は360分まで時間依存的に増大し、ゆっくりとNO放出が起こっていることが示されています<sup>2)</sup>。しかしながら尿中に排出される総NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>量は、分子量の違いでNOR 3の方がモル濃度では幾分高くなるため若干高くなりますが、両者に顕著な差はなくNOR 5から放出されたNOもNO<sub>x</sub>として排出されています。また、このラットへの経口投与(10 mg/kg)では、NOR 3は血圧降下作用を示しましたが、NOR 5は240分後も血圧の低下は見られないとされています<sup>2,3)</sup>。血栓形成抑制作用については、NOR 5は10 mg/kgで37%抑制すると報告されており、NOR 3が1.0 mg/kgの経口投与で35%抑制するのに比べると穏やかな効果を示しますが、代表的な硝酸薬の一つであるISDN(硝酸イソソルビド)が32 mg/kgでわずか17%しか抑制しないのと比較すると、NOR 5も有効な薬物であると考えられます<sup>4)</sup>。

NOR 5は他のNOR類と同様に、DMSOに溶解したPBSなどの緩衝液中に添加した時点から、NO放出が始まります。pH 7.4、37℃において、0.5 mmol/lのNOR 5から放出されるNOを、上記と同様にCarboxy-PTIOを用いてESRで測定した場合の半減期は20時間です。このようにNOR 5はNOR 3などと同様に大量のNOを、非常にゆっくりと放出させることができます。その上、急激な血圧降下作用を示さないため、eNOSから発生するNOのような長時間にわたるNOの作用を検討する場合に適していると考えられま

す。動物実験での経口投与においては、NOR 3と同様0.5%メチルセルロースに懸濁して投与することが可能です。

## 参考文献

- 1) M. Kato, S. Nishino, M. Ohno, S. Fukuyama, Y. Kita, Y. Hirasawa, I. Nakanishi, H. Takasugi, K. Sakane, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **6**, 33 (1996).
- 2) Y. Kita, Y. Hirasawa, S. Fukuyama, K. Ohkubo, Y. Kato, H. Takamatsu, M. Ohno, S. Nishino, M. Kato, J. Seki, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **276**, 421 (1996).
- 3) Y. Kita, Y. Hirasawa, Y. Kato, K. Ohkubo, M. Ohno, S. Nishino, M. Kato, S. Fukuyama, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **30**, 223 (1997).
- 4) Y. Hirasawa, Y. Kato, S. Fukuyama, M. Ohno, S. Nishino, M. Kato, Y. Kita, *Thrombosis & Haemostasis*, **79**, 620 (1998).

品名	容量	価格(¥)	コード	メーカーコード
NOR 5	10mg	8,500	348-08011	N448
	50mg	32,500	344-08013	N448

## お知らせ

第12回フォーラム・イン・ドージン  
開催ご案内

以下の要項で開催を予定しております。  
詳細は次号にてご案内いたします。

## テーマ:「生物毒から生命現象を垣間見る」

オーガナイザー: 森田隆司(明治薬科大学生体分子学教授)  
中山 仁(熊本大学薬学部生体機能化学教授)  
代表世話人: 前田 浩(熊本大学医学部微生物学教授)  
当番世話人: 中山 仁、森田隆司、山本哲郎(熊本大学大学院分子病理学教授)  
演 者: 正木春彦(東京大学大学院分子育種学教授)  
梅田真郷(東京都臨床医学総合研究所)  
遠藤彌重太(愛媛大学工学部応用化学科教授)  
堀口安彦(大阪大学微生物病研究所細菌毒素学教授)  
川合述史(沼南リハビリテーション病院、自治医大名誉教授)  
佐藤一紀(福岡女子大学人間環境学部教授)  
森田隆司(明治薬科大学生体分子学教授)  
鎮西康雄(三重大学医学部医動物学教授)

(敬称略)

日 時: 平成 13 年 11 月 30 日(金) 9:10 ~ 16:45

開 場: 8:45 開演: 9:10

会 場: メルパルク熊本(熊本市水道町 15-11)

参加費: 無料

お問い合わせ・お申し込み先:

フォーラム・イン・ドージン事務局(担当: 斉藤、満田)

TEL: 0120-489548 FAX: 0120-021557

e-mail: motoko@dojindo.co.jp または mitsuda@dojindo.co.jp



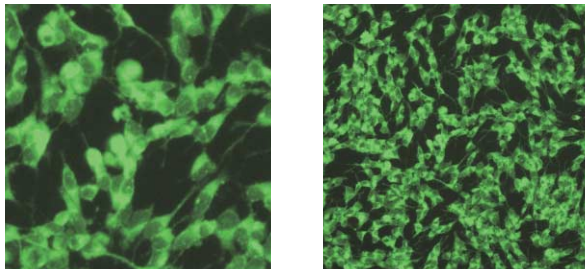
新製品

膜電位感受性色素

DiBAC<sub>4</sub>(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(20 mmol/l HEPES, pH 7.0): λ<sub>ex</sub>=495 nm, λ<sub>em</sub>=517 nm



DiBAC<sub>4</sub>(3)で染色した細胞の蛍光顕微鏡画像

SH-SY5Y(Human Neuroblastoma Cell)に 1 mmol/l DiBAC<sub>4</sub>(3) [Hanks-HEPES]を加え無刺激で10分後に観察した。(B 励起)

DiBAC<sub>4</sub>(3)を用いた膜電位測定例

1 細胞洗浄

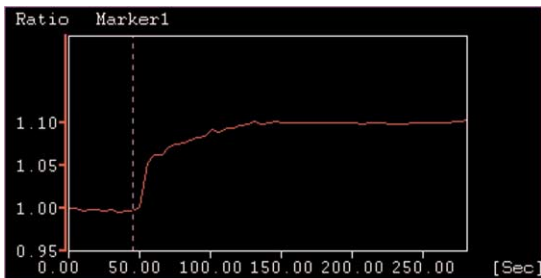
マイクロプレート中で培養した細胞を、5 μmol/lのDiBAC<sub>4</sub>(3)を含むアッセイ用緩衝液 200 μl で2回洗浄する。  
アッセイ用緩衝液の組成は以下の通りである。  
20 mmol/l HEPES, 120 mmol/l NaCl, 2 mmol/l KCl,  
2 mmol/l CaCl<sub>2</sub>, 1 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 5 mmol/l グルコース, pH 7.4

2 色素のロード

上記、DiBAC<sub>4</sub>(3)を含むアッセイ用緩衝液 180 μl 中で、5%CO<sub>2</sub>存在下、37 °C で30分インキュベートする。

3 測定

刺激による蛍光強度変化を蛍光プレートリーダーで測定する。  
DiBAC<sub>4</sub>(3)の蛍光は温度により変化するため、一定温度(37 °C)で測定する。DiBAC<sub>4</sub>(3)を含むアッセイ用緩衝液に溶解した薬剤を 20 μl 加え、蛍光変化を測定する。



SH-SY5Y 細胞(50,000 cells/well)を 1 μmol/l DiBAC<sub>4</sub>(3)で染色し、脱分極刺激(50 mmol/l KCl)した際の蛍光強度変化  
装置：FDSS6000(浜松ホトニクス株式会社)

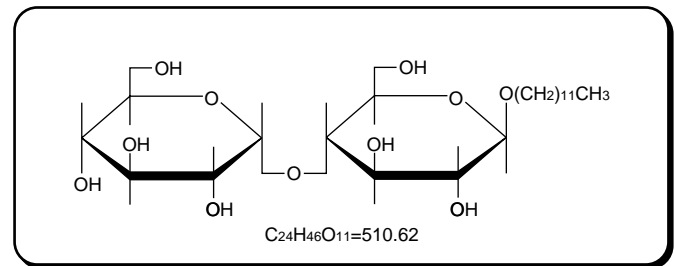
品名	容量	価格( ¥ )	メーカーコード
DiBAC <sub>4</sub> (3)	25mg	27,000	D545

近日発売予定

膜タンパク質結晶解析用界面活性剤

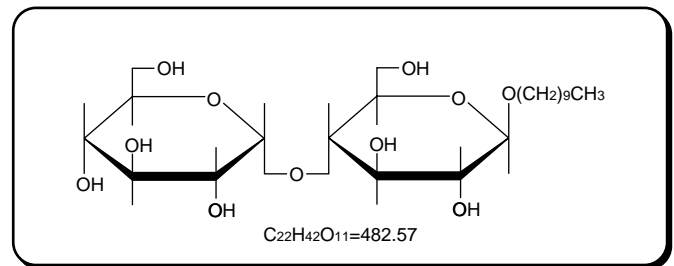
*n*-Dodecyl-β-D-maltoside

化学名：*n*-Dodecyl-β-D-maltopyranoside  
CMC 値：0.17 mmol/l



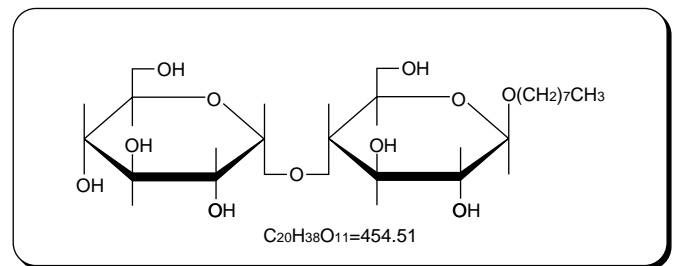
*n*-Decyl-β-D-maltoside

化学名：*n*-Decyl-β-D-maltopyranoside  
CMC 値：1.8 mmol/l



*n*-Octyl-β-D-maltoside

化学名：*n*-Octyl-β-D-maltopyranoside  
CMC 値：23.4 mmol/l



品名	容量	価格( ¥ )	コード	メーカーコード
<i>n</i> -Dodecyl-β-D-maltoside	1 g	10,800	341-06161	D316
	5 g	42,500	347-06163	D316

*n*-Decyl-β-D-maltoside(D382), *n*-Octyl-β-D-maltoside (O393)についてはお問い合わせください。

## キットケース変更ご案内

今年4月より同仁化学研究所およびDOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC開発のキット類の仕様を変更しました。同仁化学研究所のカラーであるブルーを基調にした新しいデザインを採用し、研究者の方々に使いやすいように工夫を凝らしました。従来のケースから徐々に新しいケースに変更していきます。DOJINDOのキットをご愛顧くださいますようお願い申し上げます。



### ケース

- ・従来ケースよりも強い材質にし、中の試薬を取り出しやすい形態に改良しました。
- ・紙で出来ておりますので、使用後は焼却可能です。

### ラベル

- ・冷蔵庫の中に入れてそのままでも、机の上に置いたときでも見やすいように、前からでも上からでも品名が確認できます。
- ・ラベルでシーリングしております。お使いになる際には、カッターで開封してください。

### 中仕切

- ・ホールド性の高いスポンジを採用しました。
- ・スポンジは焼却可能な素材を使用しています。(廃棄にあたりましては、各地方自治体の指示に従ってください。)

### 新しいケースへの切替え対象製品

- Proteostain- Protein Quantification Kit - Rapid (500 tests)
- Proteostain- Protein Quantification Kit - Wide Range (500 tests)
- Biotinylation Kit (Sulfo-OSu)
- Biotinylation Kit (Sulfo-OSu, Designed for use with BIACORE<sup>®</sup> instrument systems)
- SOD Assay Kit – WST
- Cell Counting Kit ( 500 回用、2500 回用 )
- Cell Counting Kit-8 ( 500 回用、2500 回用 )

- NO<sub>2</sub> / NO<sub>3</sub> Assay Kit-F(Fluorometric) ~ 2,3-Diaminonaphthalene Kit ~
- NO<sub>2</sub> / NO<sub>3</sub> Assay Kit-C(Colorimetric) ~ Griess Reagent Kit ~
- NO<sub>2</sub> / NO<sub>3</sub> Assay Kit-F II(Fluorometric) ~ 2,3-Diaminonaphthalene Kit ~
- NO<sub>2</sub> / NO<sub>3</sub> Assay Kit-C II(Colorimetric) ~ Griess Reagent Kit ~
- Nucleostain- DNA Damage Quantification Kit -AP Site Counting-
- Total Glutathione Quantification Kit
- Nitrosothiol Assay Kit

### 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](mailto:info@dojindo.co.jp)

### フリーファックス

0120-021557

### フリーダイヤル

0120-489548