

細胞外酸素

総説

細胞外酸素測定技術の開発

Development of methodology of extracellular oxygen

群馬大学 吉原 利忠

注目の研究

細胞老化の理解と酸素消費速度

株式会社同仁化学研究所 高橋 政孝、見汐 航太郎

新製品 酸素消費速度プレートアッセイキット P.5

pH センサーラベル化キット P.9

脂質過酸化検出試薬 P.11

お役立ち セミナーアーカイブご案内、試薬の使い方セミナー 第2弾 のご案内 P.17



CONTENTS

Review

細胞外酸素測定技術の開発

群馬大学 吉原 利忠

1

Commercial

細胞内代謝関連製品	6
酸化ストレス関連製品	10
新製品	
酸素消費速度プレートアッセイキット	5
pHセンサーラベル化キット	9
脂質過酸化検出試薬	11
関連製品	
解糖系/酸化的リン酸化測定キット	7
過酸化検出試薬	12
ミトコンドリア脂溶性過酸化検出試薬	12
ミトコンドリアスーパーオキシド検出用蛍光色素	13
マロンジアルデヒド測定キット	13
耐光性トータルROS検出キット	14
トータルROS検出キット	15
ミトコンドリア一重項酸素検出試薬	15
細胞内鉄イオン測定試薬	16
ミトコンドリア内鉄イオン測定試薬	16

Topics on Chemistry

細胞老化の理解と酸素消費速度

株式会社同仁化学研究所 高橋 政孝、見汐 航太郎

8

お役立ち

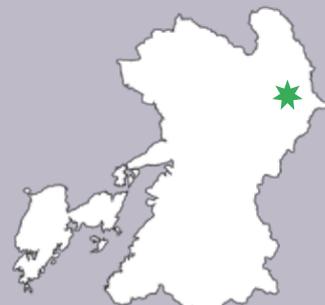
製品包材変更のご案内	4
学会展示のご案内	4
教材としても人気のプロトコル集	4
セミナーアーカイブご案内	17
試薬の使い方セミナー 第2弾のご案内	17



表紙:高森町 上色見熊野座神社

この神社は夏の霧の時から冬の雪の時を狙う。石段に足跡がつかないように横の山道を歩き、本堂から階下を見下ろし、雪を表現するため、フラッシュを焚いて撮影。

photo:永島 俊介氏



ツイッター 

小社製品の最新情報や使用文献などをツイートしています。



フォロー
お願いします

@dojindoinfo

※希望納入価格には消費税は含まれておりません。
※試験・研究用のみに使用するものです。
医療用その他の目的には使用できません。

細胞外酸素測定技術の開発 Development of methodology of extracellular oxygen



吉原 利忠

群馬大学
大学院理工学府
分子科学部門
准教授

1. はじめに

好気性生物の生命活動において、酸素は必要不可欠な物質の1つである。細胞内の酸素は、主にATP合成のためにミトコンドリアの電子伝達系における最終電子受容体として消費される¹⁾。そのため、細胞内酸素レベルの変化、特に酸素レベルの低下は生命活動に大きな影響を及ぼす。何らかの原因によって、細胞内の酸素レベルが低下すると、通常酸素下においてタンパク質分解されていた低酸素誘導因子(HIF-1 α)が安定となる。安定化したHIF-1 α は、核内に移行し低酸素状態を解消するために様々な遺伝子の発現を上昇させる²⁾。例えば、がん組織のように低酸素環境下にある細胞では、酸素レベル低下によって、好氣的代謝から嫌氣的代謝になることで生成できるATP量が大きく減少する。そのため、グルコーストランスポーター1の発現量が増加し、グルコースの取り込み量を増加させる。また、血管内皮細胞増殖因子の発現により無秩序な血管新生が促進される。このように細胞は、酸素レベル変化に対して迅速に対応できる備えを有している。一方、どのくらいの酸素レベルまで低下したら、このようなシステムは機能するのだろうか。この疑問に対しては、細胞内・外の酸素レベルや酸素消費速度(OCR)を正確に測定することが必要となる³⁾。これまでに、抗HIF-1 α 抗体やニトロイミダゾール誘導体などの低酸素マーカーを用いて、低酸素細胞を検出する方法が開発されている^{4,5)}。低酸素マーカーを用いた場合、対象となる細胞がある時点で低酸素状態であったことを履歴として記録できる一方、酸素レベルを定量化し、その変化をリアルタイムに追跡することはできない。これに対して、近年、分子の発光の1つであるりん光を用いた方法が注目されている⁶⁻⁸⁾。本稿では、りん光を利用した細胞外酸素濃度やOCR測定について、測定原理や実際の測定例について紹介する。

2. 酸素の測定原理

分子の発光を利用した生体内情報計測(温度、粘度、pH、生体関連化学種)は、生物、薬学、医学にとって強力な研究ツールとなっている^{9,10)}。例えば、温度によって構造が変化する高分子に、環境応答型蛍光団を結合させ、その蛍光特性の変化から細胞内の温度を計測することができる¹¹⁾。ここで、蛍光団として用いている有機化合物の発光は励起三重項状態(S_1 状態)からの発光であり、現在使用されている発光プローブのほとんどが蛍光を検

Abstract

Molecular oxygen plays essential roles in aerobic organism as a terminal electron acceptor in the electron transport chain of mitochondria in cells. Acute and chronic oxygen deprivation in cells results in various diseases. Measurement of oxygen levels in biological samples is therefore of high importance in elucidating fundamental studies of cellular metabolism and hypoxia-related diseases. This review focusses on optical measurements of extracellular oxygen levels based on phosphorescence lifetime and intensity measurements using a microplate reader and phosphorescent probes. Principles of oxygen measurements by means of phosphorescence quenching, recent advances of extracellular oxygen probes and their applications to quantitative oxygen levels and oxygen consumption rate are described.

出する蛍光プローブである。一方、酸素を測定する際には、励起三重項状態(T_1 状態)からの発光であるりん光を用いることが有効である。りん光はスピン禁制遷移であるため、蛍光に比べて発光寿命が著しく長い。その結果、りん光プローブを取り込んだ細胞や組織にパルス光を照射すると、通常、自家蛍光は数十ナノ秒以内に減衰して消えてしまうのに対して、りん光は数百ナノ秒から数百マイクロ秒以上の間、光り続ける。よって、りん光寿命が数マイクロ秒以上ある励起分子では、励起寿命内に拡散によって周囲の酸素分子と衝突することが可能となるため、酸素分子にエネルギーを渡して励起分子が基底状態(S_0 状態)に失活するりん光消光が起こる。

酸素によるりん光消光が2分子反応にしたがって起こると仮定すると、りん光強度(I_p)、りん光寿命(τ_p)と酸素濃度($[O_2]$)あるいは酸素分圧(pO_2)は、(1)式に示すStern-Volmerの関係式で表すことができる。

$$\frac{I_p^0}{I_p} = \frac{\tau_p^0}{\tau_p} = 1 + K_{SV}[O_2] = 1 + K'_{SV}pO_2 \quad (1)$$

ここで、 I_p^0 と τ_p^0 は、それぞれ $[O_2] = 0$ (あるいは $pO_2 = 0$)のときのりん光強度、りん光寿命であり、 K_{SV} (あるいは K'_{SV})はStern-Volmer定数である。ここで、Stern-Volmer定数はりん光消光速度定数 k_q (あるいは k'_q)と τ_p^0 の積である。(1)式を変形すると $[O_2]$ および pO_2 は、

$$[O_2] = \frac{1}{K_{SV}} \left(\frac{I_p^0}{I_p} - 1 \right), \quad pO_2 = \frac{1}{K'_{SV}} \left(\frac{I_p^0}{I_p} - 1 \right) \quad (2)$$

$$[O_2] = \frac{1}{K_{SV}} \left(\frac{\tau_p^0}{\tau_p} - 1 \right), \quad pO_2 = \frac{1}{K'_{SV}} \left(\frac{\tau_p^0}{\tau_p} - 1 \right) \quad (3)$$

となる。(2)式を用いた場合 K_{SV} (あるいは K'_{SV})と I_p^0 、(3)式を用いた場合 K_{SV} (あるいは K'_{SV})と τ_p^0 をあらかじめ求めておけば、りん光強度 I_p またはりん光寿命 τ_p の測定から酸素濃度($[O_2]$)あるいは酸素分圧(pO_2)を決定することができる。ここで、(2)式と(3)式は、それぞれりん光強度測定とりん光寿命測定に基

づいて $[O_2]$ や pO_2 を決定する式である。

りん光強度は、プローブ分子の濃度、励起光強度、測定光学系に依存するのに対して、りん光寿命はこれらに依存しない。したがって、酸素濃度や酸素分圧の定量的測定では、培養液中（細胞外）のようにプローブ分子が均一に溶けている場合を除いて、りん光寿命を計測することが求められる。

3. 細胞外酸素濃度計測および酸素消費速度 (OCR)

平面培養細胞は、通常 21% O_2 条件下で培養されているため、細胞内で消費された酸素は、培養液からすぐに供給される。空気中から培養液中への酸素拡散が十分に速い場合、細胞内の酸素レベルはほぼ一定である。このため、細胞外酸素レベル計測においては、外部からの酸素流入を遮断する必要がある。これは、酸素透過性の低いミネラルオイルで培養液を覆うことで達成できる(図 1)。また、測定時に用いるデッシュ、チャンバー、プレートもなるべく酸素透過性の低いものを選ぶべきである。ガラスは酸素を透過させないため、理想的な素材である一方、細胞接着が悪いことやすべてガラスでできたものは汎用性に欠ける。

細胞外酸素濃度や OCR 測定で用いられる機器として、フラックスアナライザーがある。専用プレートに細胞を播種し、センサーカートリッジによって半閉鎖的微小環境を構築する。センサーカートリッジには、酸素センサーと pH センサーが搭載されており、また、細胞の代謝過程を変えるための試薬を添加することができる。この装置を用いて、細胞外酸素濃度のリアルタイム測定や OCR と代謝活性の関係が明らかにされている¹²⁾。フラックスアナライザーは導入のための初期費用が比較的多く必要であること、また、専用プレートを用いるためランニングコストもかかる。そのため、多くの研究室で導入されている汎用のマイクロプレートリーダーを用いた測定について紹介する。

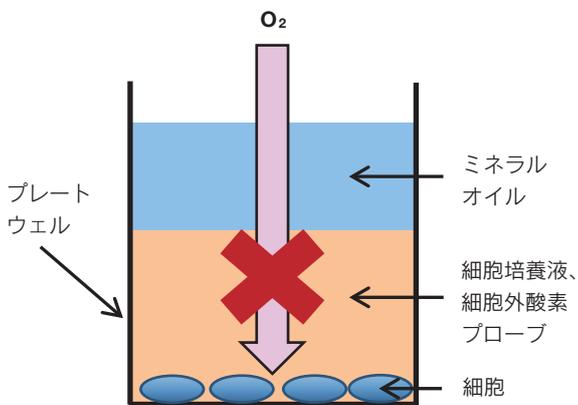


図 1 細胞外酸素濃度測定概念

酸素透過性の低いミネラルオイルで覆うことで培養液中への酸素流入を防ぐ

3.1. りん光寿命測定に基づく方法

マイクロプレートリーダーの励起光源は、パルス幅が数マイクロ秒のキセノンフラッシュランプが用いられているため、発光強度測定に加えて、時間分解発光強度測定に基づく発光寿命測定も可能である。マイクロプレートリーダーを用いたりん光寿命測定では、励起パルス光の照射後に 2 つの遅延時間 (t_1, t_2) を設定し、その時間幅 (W) において積分された発光強度 (I_1, I_2) を測定する(図 2)。りん光寿命は、(4) 式を用いて算出する。

$$\tau_p = \frac{t_2 - t_1}{\ln\left(\frac{I_1}{I_2}\right)} \quad (4)$$

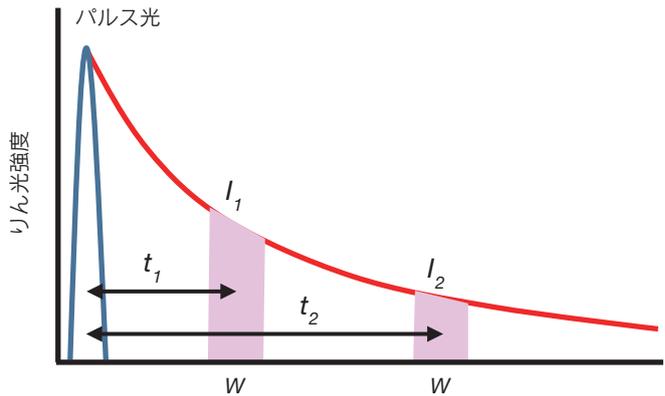


図 2 マイクロプレートリーダーを用いたりん光寿命測定概念

細胞外計測では、培地に添加されたりん光プローブが細胞内に移行せずに培地中に留まることが必要である。Papkovsky らは、Pt (II) - コポボルフィリン錯体 (PtCP) をウシ血清アルブミン (BSA) に結合させた細胞外酸素プローブ (PtCP-BSA) を開発した¹⁴⁾。疎水性の高い PtCP を水溶性タンパク質である BSA に結合させることで、PtCP は培養液中に留まる。PtCP-BSA は、360 - 400 nm (極大波長: 380 nm) と 525 - 545 nm (極大波長: 535 nm) に、それぞれ PtCP のソーレー帯と Q 帯に由来する吸収、630 - 670 nm (極大波長: 650 nm) にりん光を示す。また、空気飽和下および脱酸素下におけるりん光寿命は、それぞれ 27 μ s、72 μ s であり、市販のマイクロプレートリーダーを用いて発光寿命測定が可能である。彼らは、プレートに播種されたマウス胎児線維芽細胞の細胞外酸素濃度や OCR を測定した¹⁵⁾。PtCP-BSA は培養液に溶解しているため、正常細胞、がん細胞、細胞から単離されたミトコンドリアなど幅広く使用できる。一方、りん光性分子である PtCP が BSA に結合していることから、酸素によるりん光消光が (1) 式に示すような Stern-Volmer の関係式に従わない¹⁵⁾。よって、りん光寿命から酸素濃度を計算する際に、いわゆる 2 サイトモデル¹⁶⁾ の解析や物理的に意味を持たない指数関数を用いた解析が必要となる。また、Q 帯の光吸収効率はソーレー帯のそれよりも低いため、通常、励起波長として 380 nm の紫外線を用いる。そのため、長時間測定では光毒性が懸念される。さらに、時間分解発光強度測定機能が搭載されていないマイクロプレートリーダーでは、細胞外酸素濃度や OCR の絶対値を求めることは困難である。

3.2. りん光強度測定に基づく方法

発光強度測定は、簡便に測定できる一方、培養液中のプローブ分子の濃度、励起光強度、測定光学系に依存するため、異なる実験日や異なるプレートのデータを比較することは困難である。ここで、(2) 式において K_{sv} (あるいは K'_{sv}) は測定条件が決まれば、固有値として扱うことができる。そのため、各測定における I_p^0 が決定できれば、発光強度測定から、酸素濃度を求めることが可能となる。(1) 式より、 $I_p^0 = I_p \times (\tau_p^0 / \tau_p)$ の関係から、空気飽和下における I_p を測定することで、その実験における I_p^0 を決定できる。例えば 96 ウェルプレートを用いた実験では、培養液中に溶解したりん光プローブの I_p を測定するレーンを設定する。ある実験において、 I_p が 1000 ならば I_p^0 は $1000 \times (\tau_p^0 / \tau_p)$ となり、別な実験で I_p が 1200 ならば I_p^0 は $1200 \times (\tau_p^0 / \tau_p)$ となる。ここで、温度一定のもと、酸素プローブのりん光が溶存酸素のみによって消光さ

れる場合、 τ_p^0/τ_p は一定値となり、その実験における I_p^0 を正確に算出できる。これにより、発光強度測定から培養液中の酸素濃度を求めることが可能となる。OCRにおいては、培養液の体積（例えば 100 μ L）から溶存酸素量を求め、その時間に対する変化の傾きから1ウェル当たりのOCRが決定できる。これを細胞数で割れば、1細胞当たりのOCRとなる。

筆者らは、Stern-Volmerの関係式が適用でき、また、発光強度測定から細胞外酸素濃度やOCRの絶対値を求めることが可能な細胞外酸素プローブの開発を進めた。ここでは、りん光性化合物にイリジウム錯体（Ir 錯体）を用いた。Ir 錯体は、可視光領域に光吸収効率の高い吸収帯があり、また、吸収極大波長、りん光極大波長、りん光量子収率、りん光寿命が配位子に依存して著しく変化する。近年、Ir 錯体を酸素プローブとする細胞および組織内酸素分圧計測・イメージングが報告されている¹⁷⁾。筆者らは、赤色りん光を示す Ir 錯体の配位子にポリエチレングリコール（PEG）を結合させた Ir 錯体 **1** を合成した。PEG は、生体親和性が高く、疎水性化合物の親水性を向上させるためにしばしば利用される。Ir 錯体 **1** は、可視光領域において 480 nm 付近に吸収極大、645 nm にりん光極大を示す（図 3）。また、空気飽和下および脱酸素下の生理食塩水中、37 $^{\circ}$ C におけるりん光寿命は、それぞれ 0.9 μ s、4.0 μ s である。細胞外酸素濃度や OCR 測定では、細胞の生理活性を維持するために細胞培養液を用いる。通常、培養液中には 10% 程度のウシ胎児血清（FBS）があり、FBS 中に含まれるアルブミンがりん光消光に影響を及ぼすことがある。我々は、FBS 中における Ir 錯体 **1** のりん光寿命測定から、培養液中における Ir 錯体 **1** の酸素によるりん光消光が、アルブミンの影響を受けることなく、(1) 式に従うことを明らかにした。

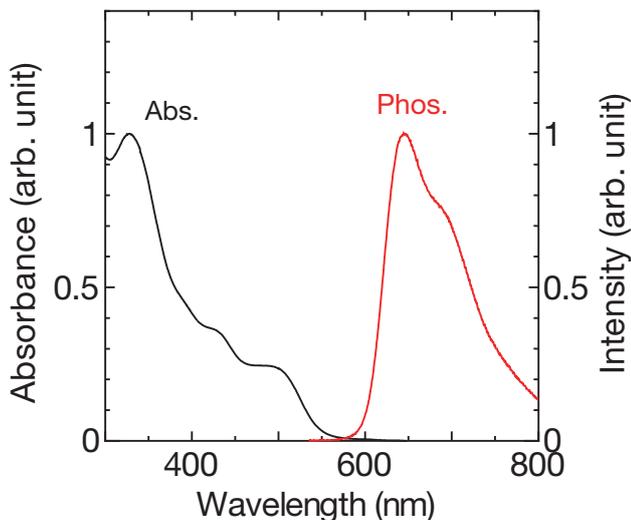


図 3 Ir 錯体 **1** の吸収・りん光スペクトル

次に Ir 錯体 **1** を用いて求めた細胞外酸素濃度や OCR の結果について示す。96 ウェルプレートにヒト結腸腺癌由来の細胞を播種し、48 時間培養後に Ir 錯体 **1** を含む McCoy's 5A 培地で置換した。ミネラルオイルで封止したウェルと、封止直前に脱共役剤である FCCP を添加したウェルについて、りん光強度測定を実施した。図 4A に示すように時間経過とともにりん光強度が増加し、また、増加の割合は FCCP を添加したウェルの方が未添加のウェルよりも大きかった。これは細胞の酸素消費によって培養液中の酸素濃度が減少し、その減少速度は FCCP を添加することで速くなったためである。(2) 式に測定されたりん光強度 I_p を代入し、得られた酸素濃度の時間変化（図 4 (B)）の初期（0 – 60 min）における傾きから、FCCP が未添加および添加された 1 ウェル当

たりの OCR をそれぞれ 30 pmol min^{-1} 、129 pmol min^{-1} と求めた。各ウェル内の細胞数はほぼ同じであるため、FCCP を添加することで細胞の OCR が著しく増加することがわかった。これはフラックスアナライザーを用いた計測や、PtCP-BSA のりん光寿命計測から得られた結果と同じである。また、りん光強度測定から細胞外酸素濃度や OCR の絶対値を決定できることが明らかとなった。

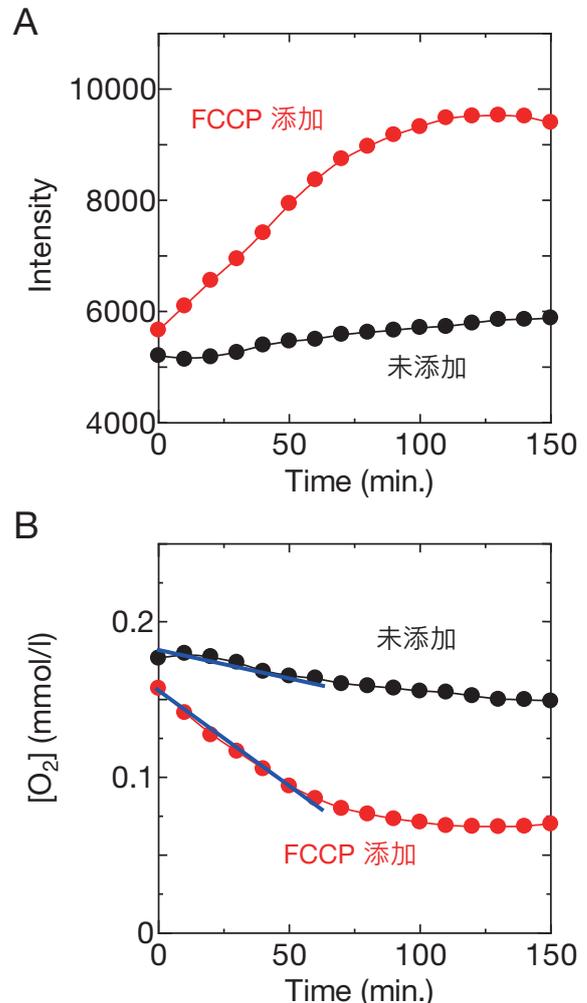


図 4 (A) 培養液中の Ir 錯体 **1** のりん光強度変化
(B) 培養液中の溶存酸素濃度変化
OCR の算出では、0 – 60 分間における $[O_2]$ の減少の傾きを計算

4. おわりに

本稿ではマイクロプレートリーダーとりん光プローブ分子を用いた細胞外酸素濃度および OCR 測定について、りん光寿命法とりん光強度法に基づく測定法について紹介した。本測定では、細胞内で消費された酸素が、培養液から素早く移動することを仮定している。実際の酸素消費の現場は細胞内であるため、細胞内酸素レベルをリアルタイムで計測する研究も国内外において勢力的に進められている。また、細胞内の酸素レベル変化は、代謝産物変化や pH 変化とも密接に関連しているため、これらを簡便に測定することが、細胞を基軸とした生命活動を理解する上で大変重要である。今後、酸素以外についても、多くの研究者が汎用的に利用できる分子プローブの開発が期待される。

[参考文献]

- 1) G. L. Semenza, *Cell*, **2012**, *148*, 399-408.
- 2) G. L. Semenza, *Annu. Rev. Pathol.*, **2014**, *9*, 47-71.
- 3) I. Godet, S. Doctorman, F. Wu, and D. M. Gilkes, *Cells*, **2022**, *11*, 686.
- 4) K. Ohnishi, T. Tani, S. Bando, N. Kubota, Y. Fujii, O. Hatano, and H. Harano, *Int. J. Oncol.*, **2014**, *45*, 581-586.
- 5) A. J. Varghese, S. Gulyas, and J. K. Mohindra, *Cancer Res.*, **1976**, *36*, 3761-3765.
- 6) D. B. Papkovsky and R. I. Dmitriev, *Cell. Mol. Life Sci.*, **2018**, *75*, 2963-2980.
- 7) T. Yoshihara, H. Hirakawa, M. Hosaka, M. Nangaku, and S. Tobita, *J. Photochem. Photobiol. C: Photochem. Rev.*, **2017**, *30*, 71-95.
- 8) E. Roussakis, Z. Li., A. J. Nichols, and C. L. Evans., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2015**, *54*, 8340-8362.
- 9) J. Yin, L. Hung, L. Wu, J. Li, T. D. James, and W. Lin, *Chem. Soc. Rev.*, **2021**, *50*, 12098-12150.
- 10) Y. Su, B. Yu, S. Wang, H. Cong, and Y. Shen, *Biomaterials*, **2021**, *271*, 120717.
- 11) K. Okabe, N. Inada, C. Gota, Y. Harada, T. Funatsu, and S. Uchiyama, *Nat. Commun.*, **2012**, *3*, 705.
- 12) D. A. Ferrick, A. Neilson, and C. Beeson, *Drug Discov. Today*, **2008**, *13*, 268-274.
- 13) D. Papkovsky, A. V. Zhdanov, A. Fercher, R. I. Dmitriev, and J. Hynes, *Phosphorescent Oxygen-Sensitive Probes*, Springer, **2012**.
- 14) J. Hynes, S. Floyd, A. E. Soini, R. O' Connor, and D. B. Papkovsky, *J. Biomol. Screen.*, **2003**, *8*, 264-272.
- 15) R. I. Dmitriev, A. V. Zhdanov, G. Jasionek, and D. B. Papkovsky, *Anal. Chem.*, **2012**, *84*, 2930-2938.
- 16) E. R. Carraway, J. N. Demas, B. A. DeGraff, and J. R. Bacon, *Anal. Chem.*, **1991**, *63*, 337-342.
- 17) S. Tobita and T. Yoshihara, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2016**, *33*, 39-45.

[著者プロフィール]

氏名：吉原 利忠 (YOSHIHARA Toshitada)
 所属：群馬大学大学院理工学府分子科学部門
 〒 376-8515 群馬県桐生市天神町 1-5-1
 TEL：0277-30-1211
 E-mail：yoshihara@gunma-u.ac.jp
 出身学校：群馬大学大学院工学研究科
 学位：博士（工学）
 専門分野：光化学
 現在の研究テーマ：生体内情報計測のための小分子発光プローブの開発

製品包材変更のご案内

水質分析用キット「残留塩素測定キット-SBT法」(メーカーコード：ZK01-50)のキットの緩衝材をウレタン素材のものから、エアークラップへ順次変更します。資源使用量削減および環境配慮への取り組みにご理解を頂きますようよろしくお願い致します。



変更前



変更後

学会展示のご案内

●第21回 日本ミトコンドリア学会
 日程：2023年3月16日(木)～18日(土)
 会場：帝京大学(東京)



担当者がお待ちしております。ぜひお立ち寄り下さい。

試薬・実験例をまとめた冊子
 教材としても人気のプロトコル集

測定の原理・トラブルシューティング・サンプル毎の前処理例をまとめたプロトコルを準備しております。これから実験を始める方、すでに実験を進められている方へも参考になる情報をまとめています。

- ・細胞機能解析冊子(第4版)
- ・食品機能性評価・微生物検出(第2版)
- ・細胞増殖測定・細胞染色プロトコル
- ・はじめての細胞内Ca測定
- ・はじめての抗体標識
- ・はじめての酸化ストレスマーカー測定



試薬パンフレット 同仁 検索

郵送をご希望の方は下記までお問い合わせ下さい。

新製品

酸素消費速度プレートアッセイキット

Extracellular OCR Plate Assay Kit

< 特長 >

- ・細胞の酸素消費速度をプレートアッセイで測定可能
- ・プレートリーダーの蛍光モードでの測定が可能*
- ・専用のプレートや培地の必要がない*

酸素は、主にミトコンドリアの酸化的リン酸化でアデノシン三リン酸 (ATP) が産出される過程で消費されるため、その酸素消費速度はミトコンドリア機能解析の指標となっています。がん細胞では酸化的リン酸化より非効率的な解糖系を用いて ATP を産出することが知られていますが、最近の研究では解糖系の抑制によって、ミトコンドリア機能を亢進させ、酸化的リン酸化による ATP 産出に代謝シフトすることも分かってきており、その指標として細胞の酸素消費が注目されています。

酸素消費速度 (OCR) を測定する方法としては、フォトルミネッセンス法を用いたフラックスアナライザーが主流ですが、高額な装置や煩雑な操作等が必要となります。また、りん光寿命を用いて OCR を測定するキットが市販されていますが、時間分解機能 (TRF) を有したプレートリーダーが必要となります。そこで小社では、培地中の酸素濃度が低下すると、りん光強度が高くなる新規りん光性酸素プローブを用いたプレートリーダーでのアッセイ方法を製品化しました。

< 原理 >

本製品は酸素プローブの他に、培地への空気中の酸素流入を防ぐためミネラルオイルを使用します。一定温度における培地中の溶存酸素濃度を測定できるため、薬剤処理による生細胞の OCR 値の変化をリアルタイムで評価することが可能となります。

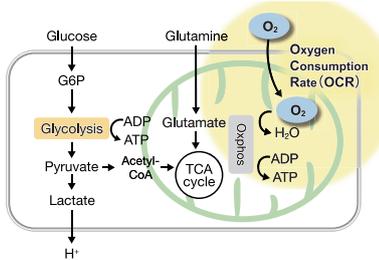
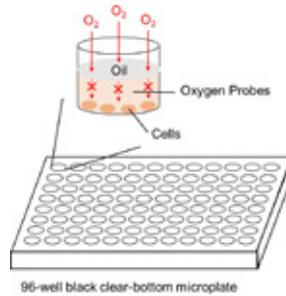


図 測定原理

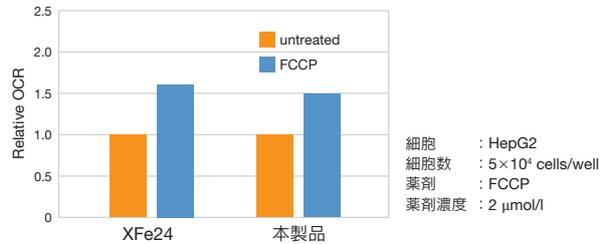


細胞外の酸素濃度変化を測定することができる
(=細胞のOCRを知ることができる)

*市販のクリアボトムプレートで下方励起測定が可能です。

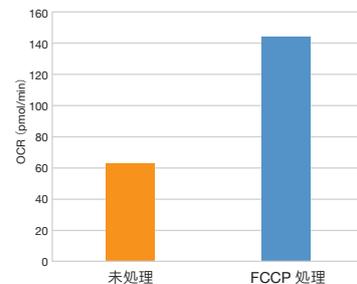
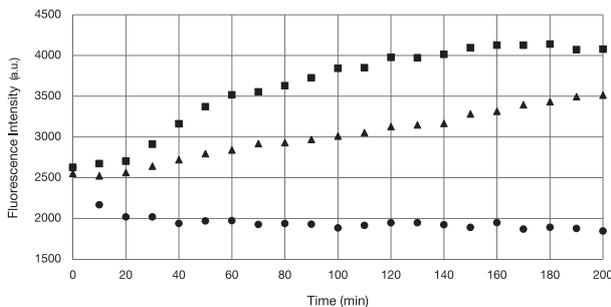
< XFe24 と Plate Assay の関連データ >

フラックスアナライザー (XFe24) と本製品を、同条件 (細胞種・細胞数・FCCP 濃度) にて、同日測定した。その結果、XFe24 と本キットで関連する酸素消費速度変化のデータが得られた。



< 実験例 : FCCP (脱共役剤) 処理による OCR の変化 >

HepG2 細胞を脱共役剤である FCCP で処理しプレートリーダーで測定した。その結果、未処理の細胞と比べて OCR 値が増加することが確認された。



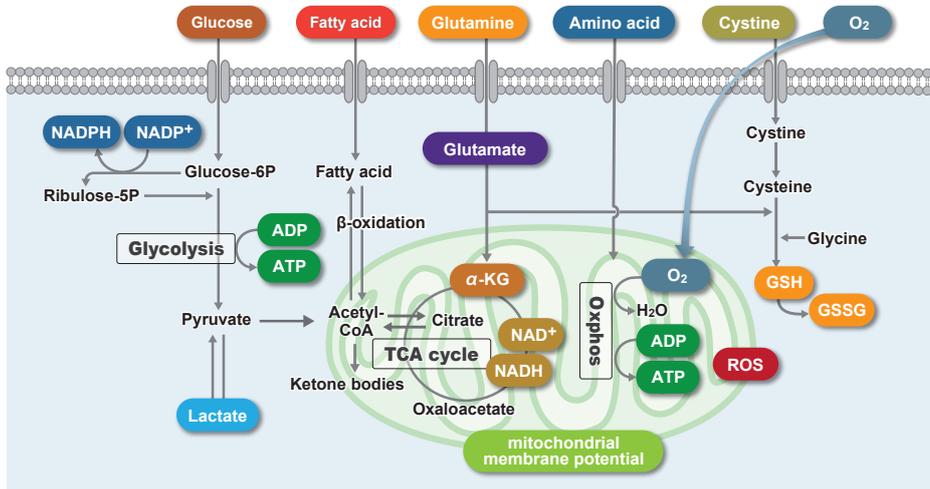
* 本製品は群馬大学 吉原利忠先生のご指導の下、製品化しました。

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Extracellular OCR Plate Assay Kit	100 tests	48,000	E297

関連製品

細胞内代謝関連製品

細胞内の代謝システム（解糖系や TCA 回路、ペントース - リン酸経路等）の解析は、細胞状態を理解する上で重要であり、グルコースや乳酸、NAD(P)⁺/NAD(P)Hなどのエネルギーおよび代謝産物を指標に評価されています。既存の市販製品よりも高い操作性を実現した小社製品は、測定に必要な試薬やコンポーネントも同梱しています。



測定指標	検出	操作
<ul style="list-style-type: none"> グルコース 乳酸 グルタミン グルタミン酸 NAD/NADH NADP/NADPH 	比色	<p>培養上清をプレートに移し発色試薬と混合するだけ</p> <p>解析 プレートリーダー</p> <hr/> <p>キット同梱の除タンパク質チューブ*と細胞溶解バッファーにより前処理が簡便</p> <p>解析 プレートリーダー</p> <p>* グルタミン、グルタミン酸、NAD(P)、NAD(P)Hに同梱しています。</p>
<ul style="list-style-type: none"> ATP ADP/ATP 	発光	<p>キット同梱の ATP 標準試薬と小容量のラインナップにより、手軽に試せる</p> <p>解析 発光プレートリーダー</p> <hr/> <p>解析 発光プレートリーダー</p>
<ul style="list-style-type: none"> α-ケトグルタル酸 	蛍光	<p>既存品の課題であるバラつきを低減した操作</p> <p>解析 蛍光プレートリーダー</p>

関連製品

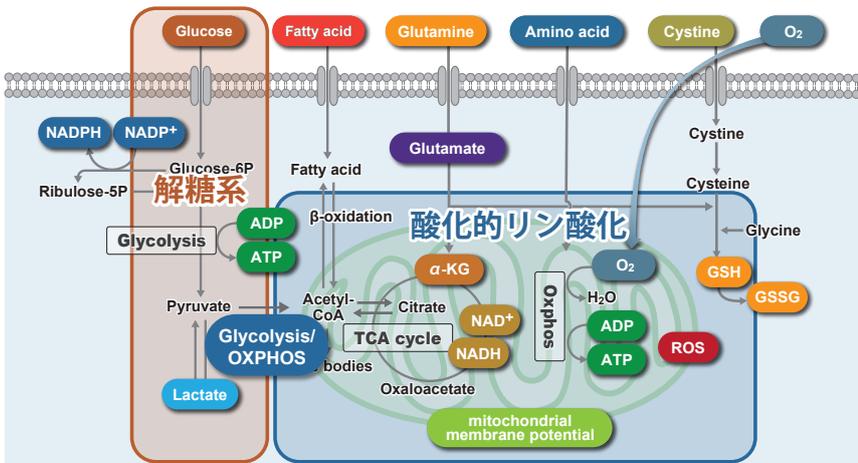
解糖系 / 酸化的リン酸化測定キット

Glycolysis/OXPHOS Assay Kit

<特長>

- ・プレートリーダーを使用するため、高額な装置購入が不要
- ・必要な試薬が入った All in One のキット形態
- ・実験操作の流れが解る詳細なプロトコル

多くのがん細胞は、解糖系に依存したエネルギー代謝により ATP を産生しています。一方で、解糖系が抑制されたがん細胞は、ミトコンドリア機能を亢進させることでエネルギー代謝を酸化的リン酸化にシフトさせ生存していることが、近年報告されています。本キットは、解糖能、代謝シフトおよび、細胞が解糖系と酸化的リン酸化のどちらに依存してエネルギー産生を行っているのかをプレートリーダーを用いて評価するキットです。本キットには、これらの評価に必要な試薬が同梱されています。



<原理>

本キットは、細胞内のアデノシン三リン酸 (ATP) 量をホタル・ルシフェラーゼ発光法で測定し、細胞外へ排出される乳酸量を WST ホルマザンを用いた吸光度測定法にて測定するキットです。解糖系と酸化的リン酸化それぞれに対する阻害剤を使用し得られる結果から、代謝経路を評価することが可能です。また、本キットではマイクロプレートを用いた測定が可能です。

実験例やプロトコルはこちらから

G270 同仁 [検索](#)

<本キットのできる3つの評価>

Oligomycin で酸化的リン酸化 (OXPHOS) での ATP 合成を阻害、あるいは、2-Deoxy-D-glucose (2-DG) で解糖系 (Glycolysis) での ATP 合成を阻害させた時の ATP 量 (発光値) や Lactate 量 (吸光度) の変化を測定することで、次の①~③の評価を行います。



品名	容量	希望納入価格 (¥)	メーカーコード
● Glucose Assay Kit-WST	50 tests 200 tests	18,600 39,200	G264
● Lactate Assay Kit-WST	50 tests 200 tests	30,000 70,200	L256
● Glutamine Assay Kit-WST	100 tests	55,000	G268
● Glutamate Assay Kit-WST	100 tests	50,000	G269
● NAD/NADH Assay Kit-WST	100 tests	55,800	N509
● NADP/NADPH Assay Kit-WST	100 tests	55,800	N510
● ATP Assay Kit-Luminescence	50 tests 200 tests	25,000 45,000	A550
● ADP/ATP Ratio Assay Kit-Luminescence	100 tests	50,000	A552
● α-Ketoglutarate Assay Kit-Fluorometric	100 tests	64,000	K261
● Glycolysis/OXPHOS Assay Kit	50 tests	48,000	G270

Topics on Chemistry

細胞老化の理解と酸素消費速度

2021年にCamellらのグループは、SARS-CoV-2に感染させた老齢のマウスに老化細胞除去薬（senolytic drug）であるフィセチンを投与することで、死亡率が50%減少し、免疫応答が改善されたという報告をした¹⁾。近年、老化細胞除去薬の研究は大いに注目を集めているが、対象となる老化の機序が複雑で、研究の進展にはそれを理解することが必要である。本稿では老化現象を複数の指標で評価し、対象の酸素消費速度（即ちミトコンドリア活性）を確認している論文をいくつか紹介したい。

2015年、竹林らは網膜芽細胞種の原因遺伝子 Retinoblastoma protein (RB) が老化に伴うエネルギー代謝を調整していることを報告した。著者は、老化細胞の代謝を理解するため、酸素消費速度、メタボローム解析、細胞外 pH 変動等を測定し、癌遺伝子活性下において RB が代謝遺伝子を活性化し、ミトコンドリア活性（解糖系、TCA サイクル、酸化的リン酸化系）を促進することで、細胞老化が誘導されることを示唆している²⁾。

同年、Capassoらのグループは、急性及び慢性的な老化間葉系幹細胞の特徴をオートファジーやプロテアソーム活性、代謝の変化から確認できることを報告した。細胞老化の誘導には大きく分けて2種類存在し、酸化ストレス・抗がん剤 (Doxorubicin) 処理・X線照射による急性的な細胞老化と、継代培養の繰り返しによる複製老化（慢性的な老化）があると述べている。彼らは、どの老化誘導においても、細胞は解糖系によるグルコース代謝が盛んであることを確認したが、慢性的な老化（複製老化と低線量のX線照射）誘導の細胞のみ、脂肪酸とグルタミンをグルコースの代わりに代謝する能力を持つことを発見した。つまり、解糖系からミトコンドリア呼吸に代謝シフトしていることが示唆された。彼らの検討方法は、まず、間葉系幹細胞に前述した種々の刺激を与え、急激に老化を誘導した細胞と慢性的に老化を誘導した細胞を作製し、次いで、それぞれの細胞に異なる栄養素（脂肪酸、グルタミン、グルコース）を与え ATP レベルや酸素消費速度、オートファジー活性を分析するものである。彼らの研究は、それらが細胞老化の表現型（急性もしくは慢性）の違いを識別するのに有用な情報であることを示唆している³⁾。

2019年、Quijanoらのグループは、化学療法と細胞老化の関係性に関して報告した。具体的には、ミトコンドリア外膜に存在する Mitofusins が老化メラノーマ細胞の治療においてミトコンドリアの長さやエネルギー生産、分泌表現型を調節していることを見出した。彼らは、老化誘導に伴うミトコンドリア量や形態の変化、酸素消費速度、ATP 生産、さらにミトコンドリアの分裂や融合を調整する mitofusin1, 2 や DRP1 の発現量を測定し、mitofusins は、senescence-associated secretory phenotype (SASP) を調節するための薬理的標的として有望であることを明らかにした⁴⁾。

エネルギー生産の機序を図1に示す。

株式会社同仁化学研究所 高橋 政孝、見汐 航太郎

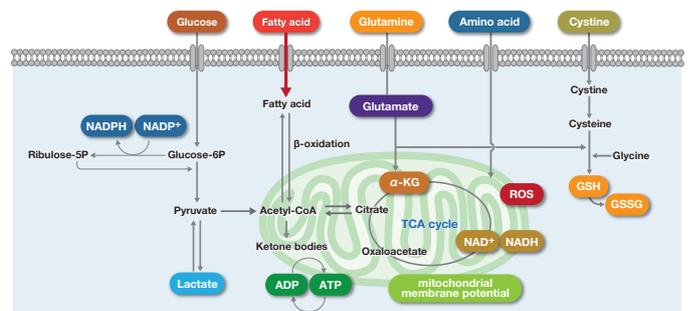


図1 細胞のエネルギー生産の機序

この中でも特に酸素消費速度の解析は、老化現象を確認した論文の多くで行われており、測定方法はフラックスアナライザーを用いた手段が主流であった^{2,4)}。参考文献の中で紹介されているが、老化には様々な誘導方法があり、誘導の種類によっては老化細胞の応答が大きく異なる。すなわち、ある特定の薬剤の検証を行う場合、細胞における様々な老化の表現型が存在するため、分析しなければならない検体数は多くなってしまふことが予想され、装置の維持費や必要な消耗品を考えると分析に係る費用はかさむことになる。試薬ベースで酸素消費速度の測定を気軽に行う事ができると、本研究の価格的なハードルを下げる事ができる。本誌 (p.1-4) に掲載されている群馬大学 吉原らが開発したリン光プローブ分子を用いて汎用の蛍光プレートリーダーやマイクロプレートで酸素消費速度を評価する手法は、老化研究の進展に更なる加速化に寄与することが期待される。

参考文献

- 1) C. D. Camell *et al.*, "Senolytics reduce coronavirus-related mortality in old mice" *Science*, **2021**, 373, eabe4832.
- 2) S. Takebayashi *et al.*, "Retinoblastoma protein promotes oxidative phosphorylation through upregulation of glycolytic genes in oncogene-induced senescent cells" , *Aging Cell*, **2015**, 14, 689-697.
- 3) S. Capasso *et al.*, "Changes in autophagy, proteasome activity and metabolism to determine a specific signature for acute and chronic senescent mesenchymal stromal cells" *Oncotarget*, **2015**, 6(37), 39457-39468.
- 4) J. Martinez *et al.*, "Mitofusins modulate the increase in mitochondrial length, bioenergetics and secretory phenotype in therapy-induced senescent melanoma cells" *Biochemical Journal*, **2019**, 476, 2463-2486.

新製品

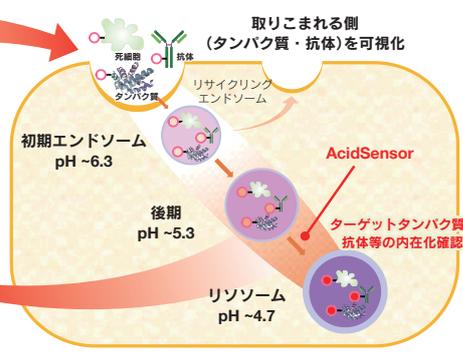
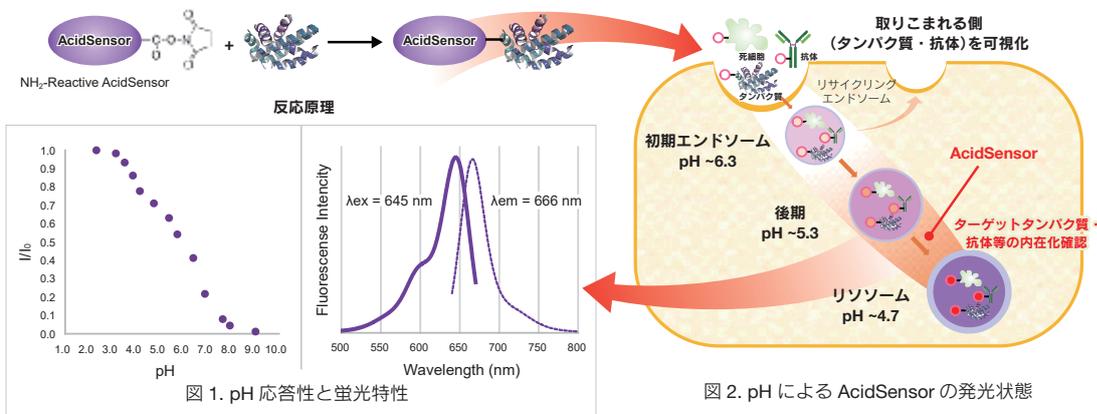
pH センサーラベル化キット

AcidSensor Labeling Kit – Endocytic Internalization Assay

< 特長 >

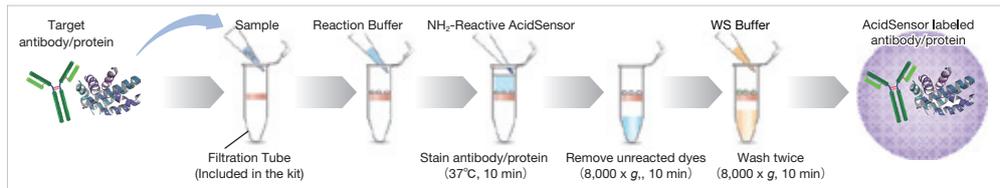
- ・目的タンパク質への標識、精製が簡単にできる
- ・リソソーム（酸性条件下）に移行したタンパク質だけを可視化できる
- ・Deep Red（もしくは 633 nm）励起可能なので、他の色素と共染色しやすい

本製品は、目的物質のエンドサイトーシスによる取り込みを可視化することができるオールインワンのキットです。同梱の NH₂-Reactive AcidSensor（蛍光プローブ）は、分子内に活性エステル基を持ち、アミノ基を有する目的物質（タンパク質）と混合するだけで安定な共有結合を形成します。AcidSensor 標識体は 633 nm で励起可能であるため、緑色や赤色蛍光との多重染色ができます（図 1）。また AcidSensor 標識体は中性では蛍光をほとんど示さず、エンドサイトーシスによって取り込まれた細胞内で酸性化されると蛍光を発します（図 2）。



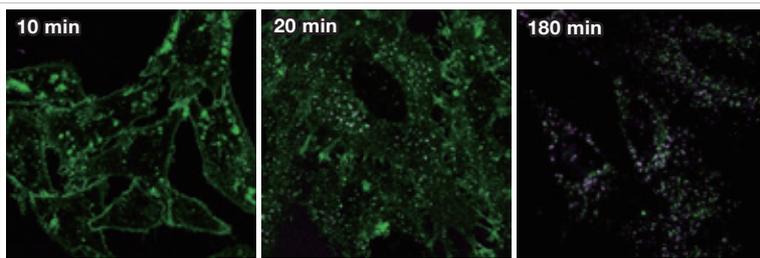
< 初めてでも迷わない実験操作 >

本製品は、未反応の色素を除くために必要なフィルトレーションチューブを同梱しており、標識から精製操作までを行うことができます。*また、取扱説明書に沿って実験していただくことで、初めての方でも容易に AcidSensor を標識することが可能です。



< 実験例：ラベル化 IgG の細胞内取り込みの経時観察 >

本キットを用いて染色した AcidSensor 標識マウス IgG と小社エンドサイトーシス検出色素（メーカーコード：E296, ECGreen-Endocytosis Detection）を HeLa 細胞に添加し、10 分、20 分、180 分後の AcidSensor 標識体（紫）とエンドソーム膜を同時に観察した。その結果、AcidSensor 標識マウス IgG が経時的に細胞内に取り込まれ、その蛍光輝点がエンドソームと共局在していることから、IgG がエンドサイトーシス経路で細胞内に取り込まれたことを確認した。



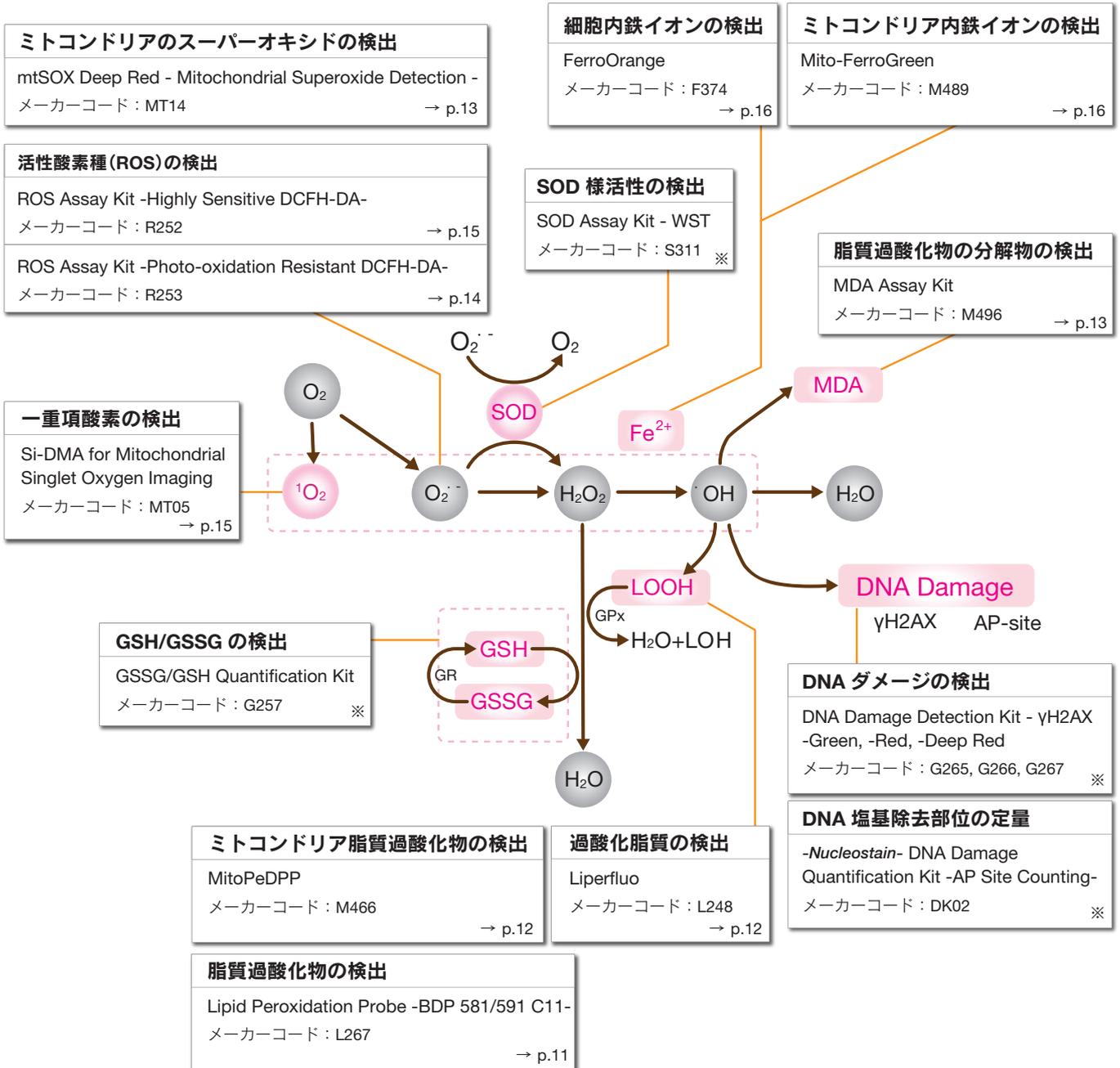
< 検出条件 >
 緑：ECGreen
 Ex = 405 nm, Em = 500-550 nm
 紫：AcidSensor
 Ex = 633 nm, Em = 650-700 nm

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
AcidSensor Labeling Kit – Endocytic Internalization Assay	3 samples	45,000	A558

酸化ストレス関連製品

小社では酸化ストレス関連試薬やキットをご用意しております。詳しくは各製品のページをご参照ください。
 なお、本誌に掲載のない製品^(※)はメーカーコードで検索ください。

メーカーコード 同仁 **検索**



新製品

脂質過酸化検出試薬

Lipid Peroxidation Probe -BDP 581/591 C11-

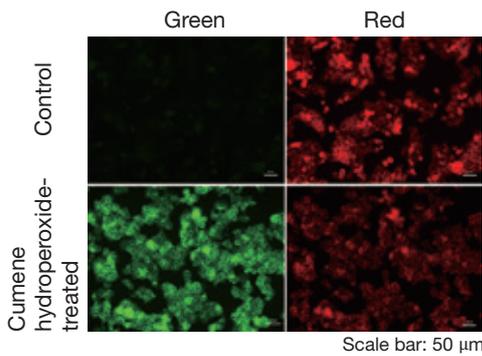
< 特長 >

- ・脂質過酸化を高感度に検出できる
- ・顕微鏡、プレートリーダー、フローサイトメーターで検出可能

活性酸素種とは酸素を起点に化学反応にて生じる様々な酸化力を増した分子種です。近年、生体内でスーパーオキシドによって脂質の過酸化等が引き起こされ、炎症や細胞死等の様々な疾病と関係性が報告されています。そのため多くの分野で研究対象となっています。活性酸素は生体内にて多様な変化をするため、その検出には、各活性酸素種を正確に解析する試薬を理解し使用する必要があります。本製品は、酸化前は常時赤色の蛍光を発していますが、脂質周辺の ROS によって酸化されることで、緑色の蛍光に変化します。赤色と緑色の 2 色の蛍光比率を算出することで、脂質の過酸化現象を高感度に検出することが可能です。また、高感度検出により Liperflu (メーカーコード : L248) では検出困難であったプレートリーダーでの検出が可能であるため、蛍光の数値化やスクリーニング用に適用が可能です。

< 高感度に脂質過酸化現象を検出 >

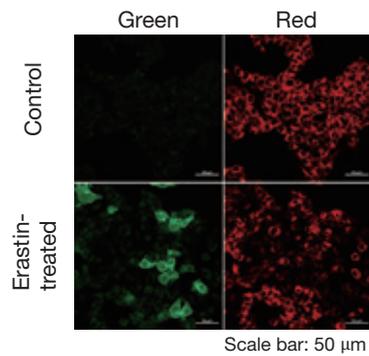
HepG2 細胞を 200 μmol/l cumene hydroperoxide で 2 時間処理し本製品で検出したところ、赤色蛍光が緑色蛍光にシフトしていることを確認し、脂質過酸化現象を検出できることが分かった。



【落射型顕微鏡】
BZ-X700 (Keyence 社)
Green: Ex = 450–490 nm Em = 500–550 nm
Red: Ex = 540–580 nm Em = 593–667 nm

< 実験例 : HepG2 細胞の脂質過酸化現象を検出 >

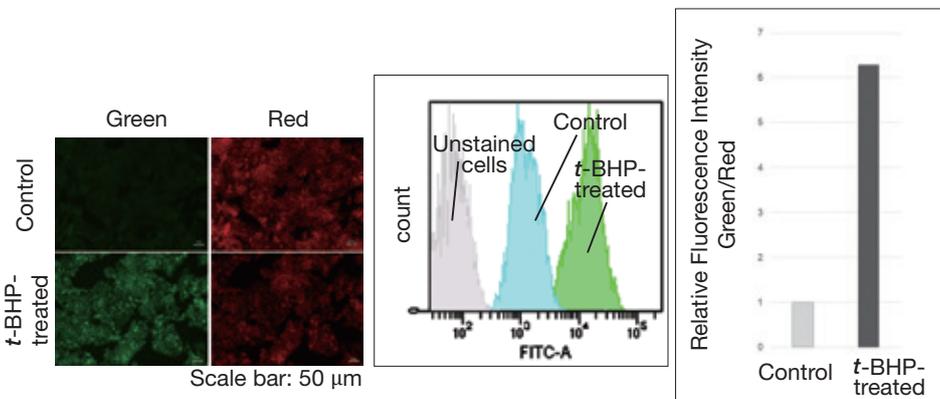
HepG2 細胞にフェロトキシ誘導剤である 10 μmol/l Erastin で 24 時間処理し本製品により検出したところ、赤色蛍光が緑色蛍光にシフトしていることを確認し、脂質過酸化現象を検出できることが分かった。



【検出条件】
共焦点レーザー顕微鏡 LSM800 (Zeiss 社)
Green: Ex = 488 nm Em = 510–550 nm
Red: Ex = 561 nm Em = 600–630 nm

< さまざまな検出器で検出可能 >

HepG2 細胞を 200 μmol/l tert-butyl hydroperoxide (t-BHP) で 2 時間処理後に本製品で過酸化脂質現象を検出した。その結果、顕微鏡、プレートリーダー、フローサイトメーターのいずれの検出器でも検出できることが分かった。



【落射型顕微鏡】
BZ-X700 (Keyence 社)
Green: Ex = 450–490 nm Em = 500–550 nm
Red: Ex = 540–580 nm Em = 593–667 nm
【フローサイトメーター】
FACS canto II (BD 社)
FITC フィルター
(Ex = 488 nm Em = 515–545 nm)
【プレートリーダー】
infinite M200 PRO (TECAN 社)
Green: Ex = 490 nm Em = 530 nm
Red: Ex = 570 nm Em = 610 nm

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Lipid Peroxidation Probe -BDP 581/591 C11-	200 tests	29,800	L267

関連製品

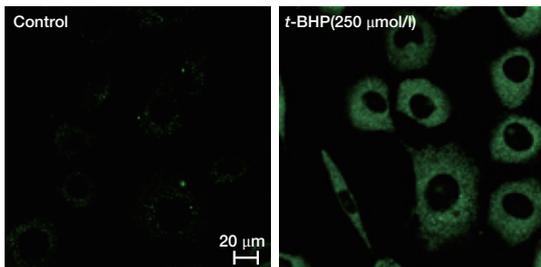
過酸化脂質検出試薬

Liperfluo

Liperfluo は、酸化体の励起および蛍光波長が長波長 ($\lambda_{ex} = 524 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 535 \text{ nm}$) であるため、測定試料への光によるダメージや試料由来の自家蛍光の影響を軽減できます。本製品は水中ではほとんど蛍光性はありませんが、細胞膜等の脂溶性の高い部位では蛍光性となることから、蛍光顕微鏡による生細胞の過酸化脂質のイメージングやフローサイトメトリーによる細胞の過酸化脂質量の分析に使用することができます。また、Liperfluo は細胞死メカニズムの一つとして注目を集めるフェロトシス研究において、Lipophilic ROS の検出用蛍光プローブとして使用されています。

< L929 細胞用いた検出例 >

L929 細胞に本製品を含む新しい培地を添加(終濃度:1 $\mu\text{mol/l}$)を添加した後、培地除去後、t-BHP を含む新しい培地を添加(終濃度:250 $\mu\text{mol/l}$)共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。



測定装置: Zeiss LSM510META
 フィルターセット:
 FITC (GFP, Alexa488) wide filterHFT UV/488,
 NFT490, BP505-550

データ提供: 北里大学薬学部 今井浩孝先生、熊谷剛先生
 生細胞を用いた過酸化脂質の共焦点顕微鏡イメージング

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Liperfluo	1 set (50 $\mu\text{g} \times 5$)	22,000	L248

<使用回数の目安> 50 μg あたり、5-50 回 (保存不可)

関連製品

ミトコンドリア脂溶性過酸化脂質検出試薬

MitoPeDPP

MitoPeDPP は、細胞膜を透過してミトコンドリアに集積し、膜中の脂溶性過酸化脂質によって特異的に酸化され蛍光を発します。酸化体の励起および蛍光波長が長波長 ($\text{Ex} = 452 \text{ nm}$, $\text{Em} = 470 \text{ nm}$) であるため、測定試料への光によるダメージや試料由来の自家蛍光の影響を軽減できることから、蛍光顕微鏡を用いた脂溶性過酸化脂質のイメージングが可能です。

< Rotenone を用いた脂溶性過酸化脂質の検出例 >

HeLa 細胞に本製品を添加した後、Rotenone 溶液を加え、蛍光顕微鏡を用いて観察した。Rotenone 添加により細胞内に発生する脂溶性過酸化脂質を検出することを確認した。

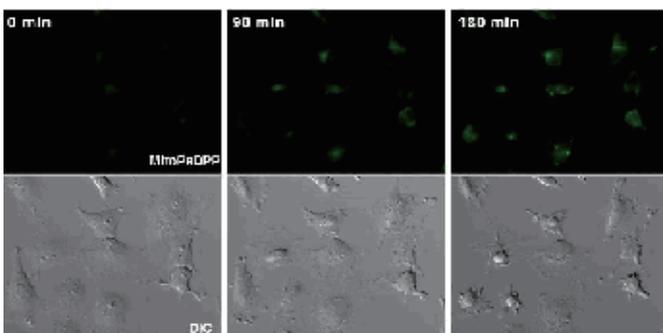


写真:
 左) Rotenone 添加直後
 中) Rotenone 添加 90 分後
 右) Rotenone 添加 180 分後
 上) 蛍光画像
 下) 位相差画像

※本製品は福岡大学理学部 塩路准教授らにより開発された製品です。

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
MitoPeDPP	5 $\mu\text{g} \times 3$	19,800	M466

<使用回数の目安> 5 μg あたり、96 well plate 1 - 5 枚、35mm dish 5 - 25 枚

新製品

ミトコンドリアスーパーオキシド検出用蛍光色素

mtSOX Deep Red-Mitochondrial Superoxide Detection

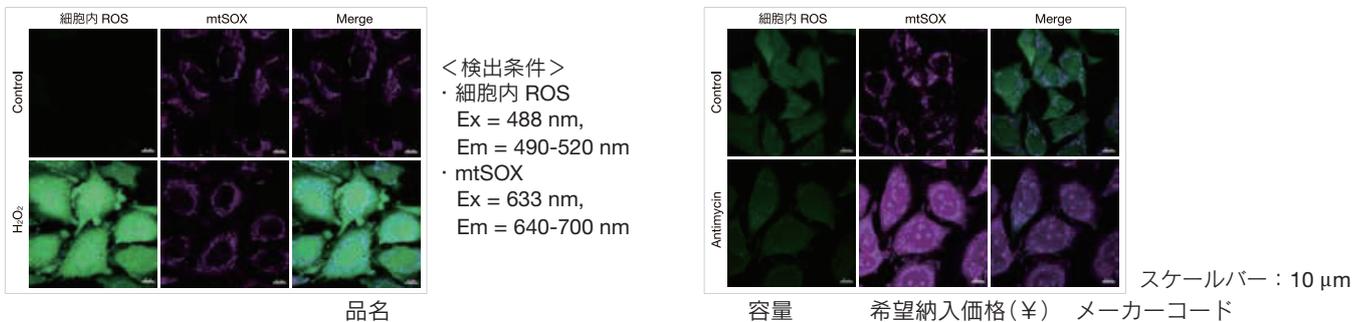
<特長>

- ・ミトコンドリアスーパーオキシドを長波長励起で検出できる
- ・緑色や赤色の蛍光色素と共染色ができる
- ・スーパーオキシド選択性が高い

ミトコンドリアに機能異常が起こると活性酸素が過剰に発生し、細胞に様々な機能不全を引き起こします。このような細胞の酸化ストレスを議論する際に、細胞内の活性酸素やミトコンドリア膜電位と活性酸素を同時解析するニーズが増えてきています。本製品はミトコンドリアスーパーオキシドと選択的に反応して赤紫色蛍光を発生し、既存の膜電位色素（JC-1 など）やトータル ROS 検出試薬（DCFH-DA）との共染色が可能です。

<細胞内 ROS とミトコンドリアスーパーオキシドの同時測定例>

HeLa 細胞を HBSS にて洗浄後、mtSOX と細胞内トータル ROS 検出キット（ROS Assay Kit -Highly Sensitive DCFH-DA-、メーカーコード：R252）を用いて共染色し、ミトコンドリアスーパーオキシド発生剤（Antimycin）もしくは過酸化水素による異なる刺激して観察した。その結果、細胞全体の ROS 誘導とミトコンドリア由来のスーパーオキシド誘導を見分けることができた。



<検出条件>
 ・細胞内 ROS
 Ex = 488 nm,
 Em = 490-520 nm
 ・mtSOX
 Ex = 633 nm,
 Em = 640-700 nm

スケールバー：10 μm

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
mtSOX Deep Red - Mitochondrial Superoxide Detection	100 nmol	20,000	MT14

<使用回数の目安> 35 mm dish 5 枚、96-well microplate 1 枚

関連製品

マロンジアルデヒド測定キット

MDA Assay Kit

<特長>

- ・細胞や組織中のマロンジアルデヒド量が測定可能（蛍光/比色）
- ・試薬の秤量が不要なため溶液調整が簡便
- ・マイクロプレート測定に対応

MDA Assay Kit は、チオバルビツール酸（TBA）とマロンジアルデヒド（MDA）の反応により生成する化合物の吸光度または蛍光を測定することで、試料中の MDA 濃度を定量できます。なお、本キットには測定過程における試料の酸化を防ぐために酸化防止剤が付属されています。

<細胞や組織サンプルで測定可能>

細胞を測定試料とする場合は、蛍光法で測定できます。組織を測定試料とする場合は、サンプル量や予想される MDA 含有量より蛍光法もしくは比色法から測定方法を選択できます。

	蛍光法	比色法	必要サンプル量	測定可能 MDA 濃度範囲
細胞	○	×	1-3 × 10 ⁷ cells	1-10 μmol
組織	○	○	蛍光法：10-30 mg 比色法：20-50 mg	蛍光法：1-10 μmol 比色法：1-50 μmol

測定例や参考文献はこちらから

MDA 同仁

検索

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
MDA Assay Kit	100 tests	29,000	M496

関連製品

耐光性トータル ROS 検出キット

ROS Assay Kit -Photo-oxidation Resistant DCFH-DA-

< 特長 >

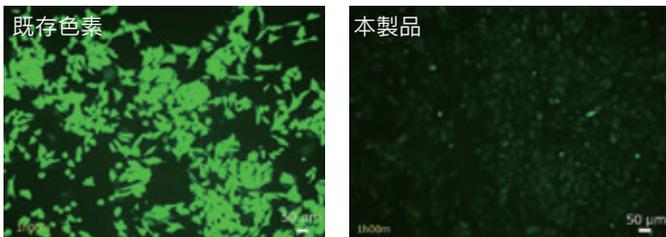
- ・ 励起光照射による自動酸化を低減
- ・ 染色後の固定化や免疫染色との共染色が可能
- ・ 既存の固定化可能な色素に比べ高感度

ROS (Reactive oxygen species) は主にミトコンドリアでの ATP 合成過程で発生する反応性の高い酸素種です。情報伝達のシグナル物質としての役割や、マクロファージなどの免疫機能の一部として重要である一方、DNA やタンパク質に対し酸化剤として作用することで様々な疾病や老化を引き起こす要因となります。最近の研究では、二価鉄を触媒とするフェントン反応によって起こる新しい細胞死 (フェルトーシス) 研究分野においても ROS が注目されてきており、ROS を検出する意義はますます高まっています。

< 自動酸化の比較 >

断続的な励起光照射による自動酸化の様子を、本製品または既存色素で染色した HeLa 細胞で観察しました。その結果、既存色素では自動酸化により蛍光の上昇が認められるのに対して、本製品では蛍光の上昇が抑えられました。このことより、バックグラウンド上昇を最小限に抑えながら観察することが可能となります。

タイムラプスイメージングの様子は右の動画リンクから参照頂けます。



[タイムラプスイメージング動画]



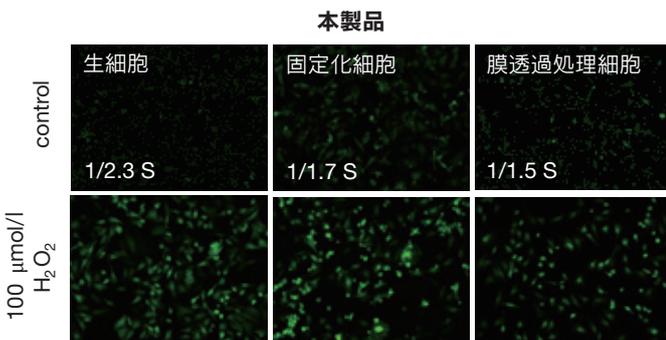
<https://youtu.be/SME10sR3ZOs>

観測光連続照射の比較 (12 回照射後)

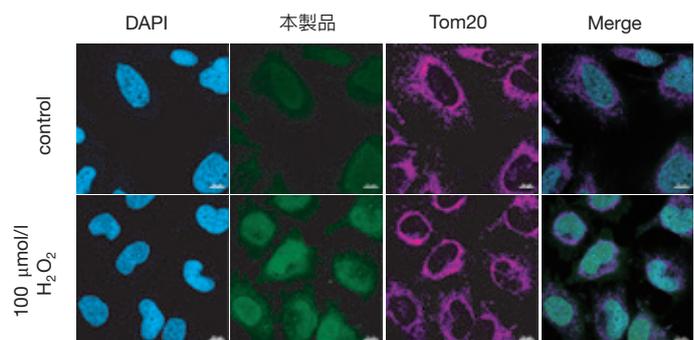
< 固定化処理と免疫染色での共染色 >

HeLa 細胞に過酸化水素で ROS を発生添加した際の蛍光強度を生細胞・固定化細胞・膜透過処理細胞にて観察した。その結果、高感度のまま ROS を検出できた。(左図)

また、HeLa 細胞に過酸化水素を添加した際の ROS の発生とミトコンドリアの形態を本製品と Tom20 antibody による免疫染色を用いて観察した。その結果、外部からの過酸化水素刺激によりミトコンドリアの顕著な形態異常は見られなかった。(右図)



落射型蛍光顕微鏡
Fluorescence microscopy (KEYENCE) GFP フィルター
Ex = 450-490 nm
Em = 500-550 nm



共焦点蛍光顕微鏡
Confocal microscopy (Zeiss)
(青) DAPI (Ex = 405 nm, Em = 450-495 nm)
(緑) 本製品 (Ex = 488 nm, Em = 500-550 nm)
(紫) Alexa Fluor 647anti-Tom20 (Ex = 633 nm, Em = 640-700 nm)
スケールバー : 10 μm

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
ROS Assay Kit -Photo-oxidation Resistant DCFH-DA-	100 tests	36,000	R253

< 使用回数の目安 > 96 well プレート 1 枚分

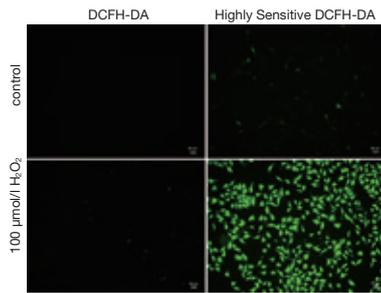
関連製品

トータル ROS 検出キット

ROS Assay Kit -Highly Sensitive DCFH-DA-

本製品は ROS (Reactive Oxygen Species) を蛍光プレートリーダー、蛍光顕微鏡、もしくはフローサイトメーターを使って蛍光法により検出するキットです。一般的に ROS により酸化されることで発蛍光する DCFH-DA が使用されますが、本キットに含まれる蛍光基質は細胞膜透過性が高く、DCFH-DA と比較してより高感度に ROS を検出することができます。また、DCFH-DA と同等の蛍光波長を有することから DCFH-DA と同じ検出器やフィルターを使用することができます。

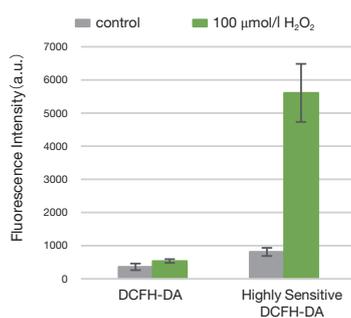
蛍光顕微鏡



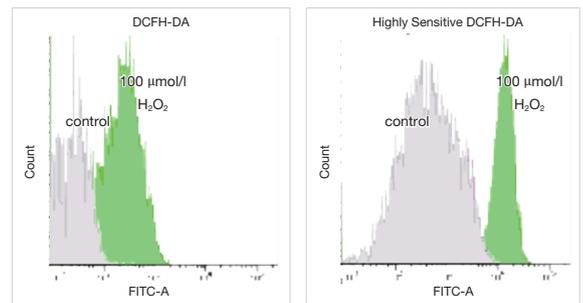
DCFH-DA との検出感度比較 (HeLa 細胞)
※Highly Sensitive DCFH-DA の観察条件と比較

HeLa 細胞, 1×10^4 cells/well,
100 $\mu\text{mol/l}$ -H₂O₂/HBSS 添加後 37°C,
30 min. インキュベート
スケールバー: 50 μm

プレートリーダー



フローサイトメーター



<測定条件>
蛍光顕微鏡 (GFP フィルター)
露光時間 0.13 s
マイクロプレートリーダー Ex = 490 nm, Em = 530 nm
フローサイトメーター FITC Filter

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
ROS Assay Kit -Highly Sensitive DCFH-DA	100 tests	18,000	R252

<使用回数の目安> 96 well プレート 1 枚分

関連製品

ミトコンドリア一重項酸素検出試薬

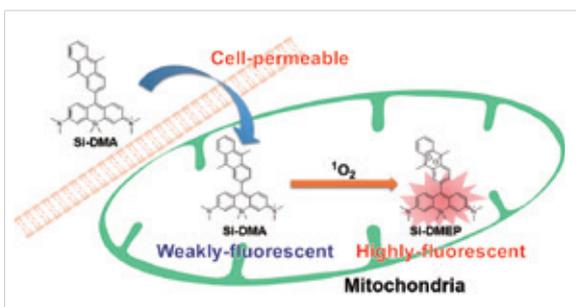
Si-DMA for Mitochondrial Singlet Oxygen Imaging

活性酸素種の一つであり非常に強い酸化力を持つ一重項酸素は、皮膚のシミやシワの原因となることが知られており、化粧品分野ではこの一重項酸素を消去する化合物の探索が進められています。Si-DMA は、容易に細胞膜透過しミトコンドリアに集積後、選択的に一重項酸素と応答して強い蛍光を発します。

使用論文やプロトコルはこちらから

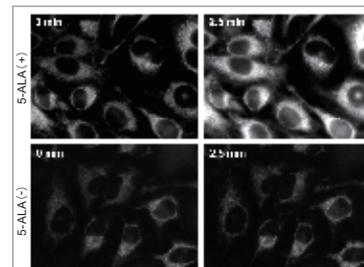
Si-DMA 同仁 [検索](#)

検出原理



検出例

5-ALA 処理後の HeLa 細胞を用いた検出例は小社 HP よりご確認ください。



5 - ALA : Aminolevulinic acid
Ex = 575 - 625 nm
Em = 660 - 710 nm

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Si-DMA for Mitochondrial Singlet Oxygen Imaging	2 μg	21,400	MT05

関連製品

細胞内鉄イオン測定試薬

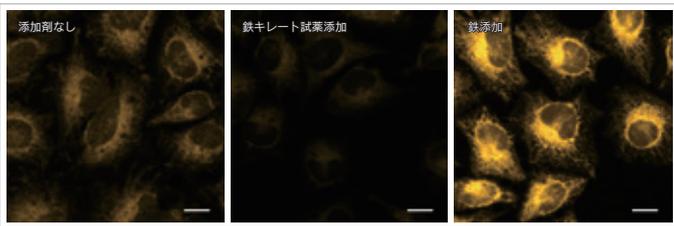
FerroOrange

鉄は生体内で最も多く存在する遷移金属元素であり、様々な生理活性を示すことが報告されています。近年、タンパク質非結合型の鉄イオン（自由鉄）としての存在が注目されており、その高い反応性は細胞損傷や細胞死にも関与していることが示唆されています。生細胞内において、細胞内還元的環境、水溶性、トランスポーターの存在等を考慮すると鉄（III）イオンよりも鉄（II）イオンの挙動を知ることが重要であると考えられています。

本製品は、蛍光顕微鏡およびプレートリーダーにて細胞内の鉄を簡便に検出することができます。試薬を培養細胞に添加するだけで細胞膜を透過し、細胞内の Fe²⁺ と選択的に反応し強い蛍光を発します。(λ_{ex} = 543 nm、λ_{em} = 580 nm)

< 蛍光顕微鏡によるイメージング例 >

HeLa 細胞を用いて、細胞内に内在する Fe²⁺ および鉄キレート試薬 Bpy (2,2'-bipyridine、終濃度：100 μmol/l) と鉄（硫酸アンモニウム鉄（II）、終濃度：100 μmol/l) の添加有無により、細胞内の Fe²⁺ の変化を FerroOrange により確認しました。鉄キレート試薬を添加することで無刺激の細胞に比べ蛍光強度が低下したことから、細胞内には内在性の Fe²⁺ が存在することが確認できました。



< 検出条件 >
Ex = 561 nm、Em = 570-620 nm
スケールバー：20 μm

※本製品は、岐阜薬科大学薬化学研究室 永澤秀子先生、平山祐先生のご指導の下、製品化しました。

関連製品

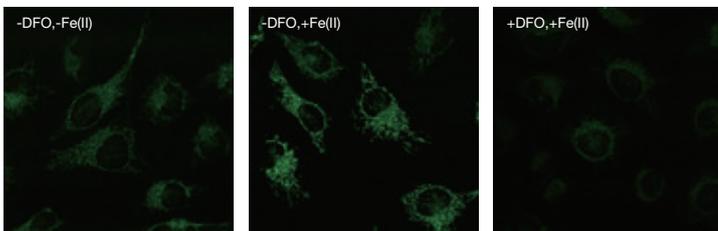
ミトコンドリア内鉄イオン測定試薬

Mito-FerroGreen

Mito-FerroGreen は、FeS クラスターやヘム合成の場として知られるミトコンドリア内の鉄（II）イオンと選択的に反応し強い蛍光 (λ_{ex} = 505 nm, λ_{em} = 535 nm) を発する試薬であり、細胞内鉄（II）イオンのライブセルイメージングに利用することが可能です。

< 蛍光顕微鏡によるライブイメージング例 >

HeLa 細胞に 5 μmol/l Mito-FerroGreen を添加し更に炭酸ガスインキュベータ内で 30 分間インキュベート（左図）。その後、100 μmol/l 硫酸アンモニウム鉄（II）を添加（中央図）、または、10 mmol/l DFO および 100 μmol/l 硫酸アンモニウム鉄（II）を添加し（右図）、それぞれを炭酸ガスインキュベータ内で 1 時間インキュベートしたものを蛍光イメージングにより観察。鉄キレート試薬と鉄を添加した細胞では、本製品の蛍光はほとんど見られませんでした。この様にミトコンドリア内鉄量の差を蛍光強度の差として確認できました。



(DFO: Deferoxamine)

< 検出条件 >
Ex = 488 nm、Em = 500-565 nm
スケールバー：20 μm

※本製品は、岐阜薬科大学薬化学研究室 永澤秀子先生、平山祐先生のご指導の下、製品化しました。

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
FerroOrange	1 tube ^{*1}	14,600	F374
	3 tubes	33,000	
Mito-FerroGreen	50 μg x 2 ^{*2}	25,800	M489

< 使用回数の目安 > ※1) 1 tube あたり、μ-Slide 8 well 20枚 ※2) 50 μgあたり、μ-Slide 8 well 6枚

お役立ち

セミナーアーカイブご案内

ミトコンドリア研究、菌・バイオフィルム研究、栄養素取り込み研究のサポートを目的に専門の先生方をお招きし、全3回のセミナーを開催しました。各研究分野を専門としていない方にとっても有用な内容となっており、大変好評を頂きました。この度、先生方のご厚意によりアーカイブ配信をいたします。視聴ご希望の方は、小社 Web よりお申し込み下さい。

セミナー 同仁

検索

<p>第1回 栄養素取り込みについて</p> <p>本セミナーでは主に腫瘍免疫に関わる細胞の代謝に関して栄養素の取り込みという観点から概説し、代謝解析の重要性と今後の代謝研究の展望について紹介します。</p>	 <p>講師： 岡山大学 学術研究院 医歯薬学域 免疫学分野 西田 充香子 先生</p>
<p>第2回 ミトコンドリアのダイナミクスについて</p> <p>本セミナーではミトコンドリアの膜構造変化の分子機構とその意義について、基礎から最近の話題まで講演します。</p>	 <p>講師： 日本ミトコンドリア学会 理事長 大阪大学 大学院理学研究科 生物科学専攻 石原 直忠 先生</p>
<p>第3回 細菌・バイオフィルムについて</p> <p>本セミナーではバイオフィルムの主役である細菌の特性と、バイオフィルムの基礎を十分に理解していただき、各分野での対策につながる内容を講演します。</p>	 <p>講師： 麻布大学 生命・環境科学部 臨床検査技術学科 微生物学研究室 古畑 勝則 先生</p>

お役立ち

試薬の使い方セミナー 第2弾のご案内

大変ご好評を頂きました「試薬の使い方セミナー」(全5回)の第2弾を開催します。セミナーの趣旨である、「これから実験を始める」「いまだ人には聞きづらい」「もう一度勉強したい」という方々へ向けた、開発者たち“DOJIN5”が各タイトルの試薬の使い方や測定意義などを、分かりやすく解説します。



	開催日	セミナータイトル
第1回	2022年12月14日	もっと出る！細胞内代謝の全貌
第2回	2022年12月17日	で…結局、酸化ストレスって？
第3回	2023年 1月19日	魁！エクソソーム — 極みへ —
第4回	2023年 1月24日	悩むお肌と、悩まない細胞老化。
第5回	2023年 1月26日	ほんとにそれってオルガネラ？

詳しくはこちらから

DOJIN5

検索

あー、酸素たりてへん・・・

Extracellular OCR Plate Assay Kit



小社へのお問い合わせ等は下記 HP よりお願いします
URL : <https://www.dojindo.co.jp/>

次号テーマ

バイオセンサー