

はじめに

細胞内の不要なタンパク質や細胞小器官は、再利用または代謝するための分解過程が存在し、オートファジーと呼ばれています。この過程において、二重膜で構成される隔離膜は次第に伸長し、不要物を覆いオートファゴソームを形成します。内容物は、オートファゴソームとリソソームが融合したオートリソソームの段階で消化酵素により分解を受けます。この細胞機能はパーキンソン病などの神経変性疾患、老化に関与することが分かっており盛んに研究されています。

本色素は、疎水性および酸性環境で蛍光発光する特性を有します。そのため、オートファゴソームがリソソームと融合したオートリソソームを検出します。低分子のため細胞への導入も容易であり、遺伝子導入などの必要はありません。本色素を細胞へ導入後は、蛍光顕微鏡下でのライブセルイメージングやフローサイトメトリーによる定量が可能です。

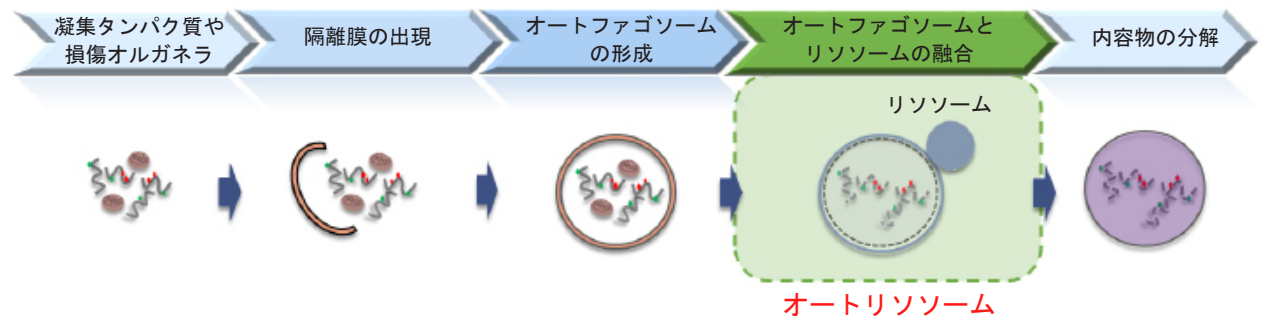


図1 DALGreenによるオートファジー検出

内容 DALGreen - Autophagy Detection 20 nmol x 1

保存条件 遮光、-20°Cにて保存してください。

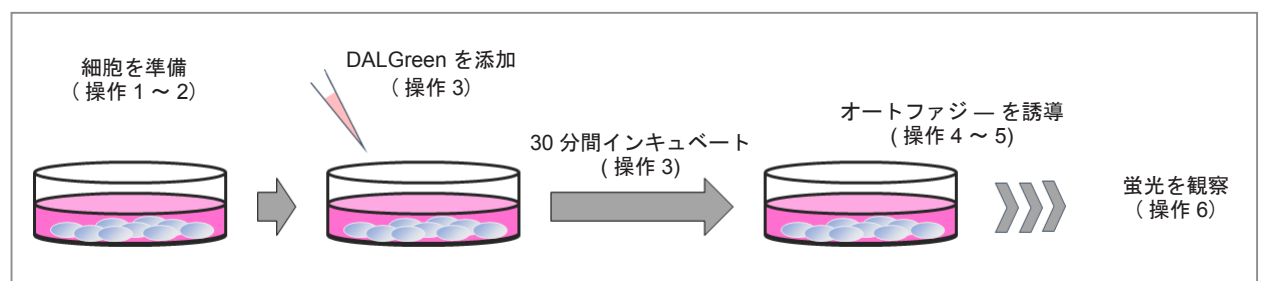
必要なもの

- Dimethyl sulfoxide (DMSO)
- 培養培地
- Hanks' HEPES buffer またはフェノールレッド不含培地
- Micropipettes

溶液調製 **1 mmol/l DALGreen DMSO stock solution の調製**
DALGreen 20 nmol を含むチューブに 20 μ l の DMSO を加えピペティングにより溶解する。
※調製後は -20°Cで保存してください。調製後 1 か月間安定です。

DALGreen working solution の調製
最終濃度が 0.1-1.0 μ mol/l になるように DALGreen DMSO stock solution を培養培地で希釈する。
※細胞種により最適濃度が異なります。最適条件をご確認ください。

操作



1. 細胞をディッシュに播種し培養する。
2. 培地を除去後、培養培地で1回洗浄する。
3. 調製した DALGreen working solution を添加し、37°C で 30 分間インキュベートする。
4. 上澄みを除去後、培養培地で2回洗浄する。
5. オートファジー誘導刺激剤を含む培地を加え 37°C でインキュベートする。
※オートファジー誘導条件に応じてインキュベート時間を設定して下さい。
6. 蛍光顕微鏡またはフローサイトメトリーにて測定する。

実験例 共焦点レーザー顕微鏡による観察

μ-slide 8 well (Ibidi) に HeLa 細胞を播種し 37°C、CO₂ インキュベーターにて一晩培養した。培養培地で 1 回洗浄後、1 μmol/l DALGreen working solution を添加し 30 分インキュベートした。培養培地で 2 回洗浄後、培養培地またはアミノ酸不含培地（和光純薬工業，製品コード：048-33575）で 6 時間培養した。Hanks' HEPES buffer で 1 回洗浄後、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

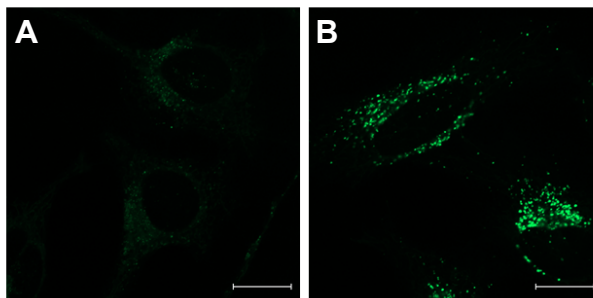


図2 様々なオートファジー誘導条件による共焦点レーザー顕微鏡画像
DALGreen 添加後、A) 培養培地で 6 時間培養した細胞、B) アミノ酸不含培地で 6 時間培養した細胞。
検出波長：488 nm (Ex)、500- 563 nm (Em)
スケールバー：20 μm

フローサイトメトリーによる検出

24 well プレートに HeLa 細胞を播種し 37°C、CO₂ インキュベーターにて一晩培養した。培養培地で 1 回洗浄後、1 μmol/l DALGreen working solution を添加し 30 分インキュベートした。培養培地で 2 回洗浄後、培養培地またはアミノ酸不含培地で 20 時間培養した。PBS で 1 回洗浄後、トリプシンで細胞を剥離し遠心にて細胞を回収した。Hanks' HEPES buffer に懸濁させ、フローサイトメトリーで測定した。

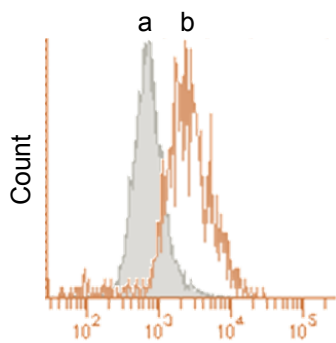
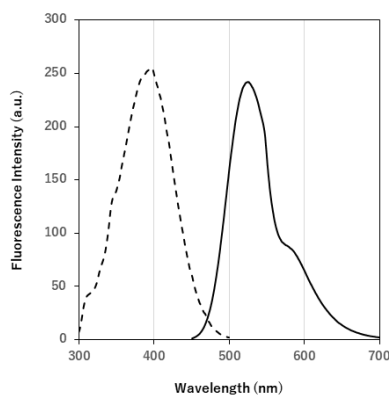


図3 フローサイトメトリーを用いた検出
DALGreen 添加後、a) 培養培地で 20 時間培養した細胞、b) アミノ酸不含培地で 20 時間培養した細胞。
検出波長：405 nm (Ex)、485- 535 nm (Em)

蛍光特性 DALGreen の励起、蛍光スペクトル



λ_{ex} : 405 nm
 λ_{em} : 525 nm

<推奨フィルター>
励起：350 ~ 450 nm
蛍光：500 ~ 560 nm

DALGreen は特許出願中です。
ご質問・ご要望は下記までお問い合わせください。

DOJINDO 株式会社同仁化学研究所
熊本県上益城郡益城町田原 2025-5
熊本テクニカサーチパーク 〒861-2202
Tel:096-286-1515 (代表) Fax:096-286-1525
E-mail: info@dojindo.co.jp URL: www.dojindo.co.jp

ドージン・イースト (東京)
東京都港区芝大門 2-1-17 朝川ビル 7F 〒105-0012
Tel: 03-3578-9651 (代表) Fax: 03-3578-9650
フリーダイヤル: 0120-489548
フリーファックス: 0120-021557