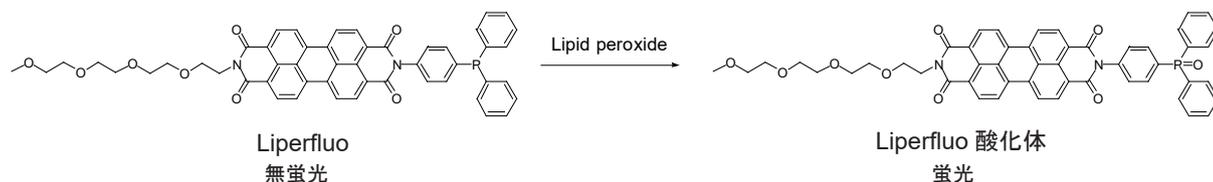


はじめに

Liperfluo は過酸化脂質検出用の試薬であり、過酸化脂質で特異的に酸化されエタノール等の有機溶媒中で強い蛍光を発します。Liperfluo 酸化体の励起波長および蛍光波長はそれぞれ 524 nm、535 nm で、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。本試薬は、ジソキノリン環の片方にテトラエチレングリコール基が導入されたもので、Spy-LHP よりも水系バッファー中での分散性が向上しています。Liperfluo 酸化体は水中ではほとんど蛍光を発しませんが、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、容易に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の分析に使用することができます。

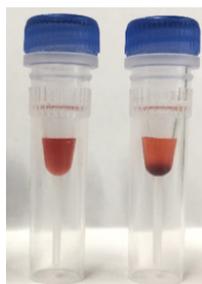


内容 Liperfluo 50 µg × 5 本

保存条件 遮光、0–5 °C で保存して下さい。

溶液調製 1 mmol/l Liperfluo DMSO solution の調製

- Liperfluo 50 µg を含むマイクロチューブに 60 µl の DMSO を加え 30 回程度ピペッティングを 1 分以内で行う^{*1,2}。
 - マイクロチューブをアルミホイル等で包んで遮光し、約 5 分間ボルテックスをする^{*3}。
- 調製後は遮光して、その日のうちにご使用ください。

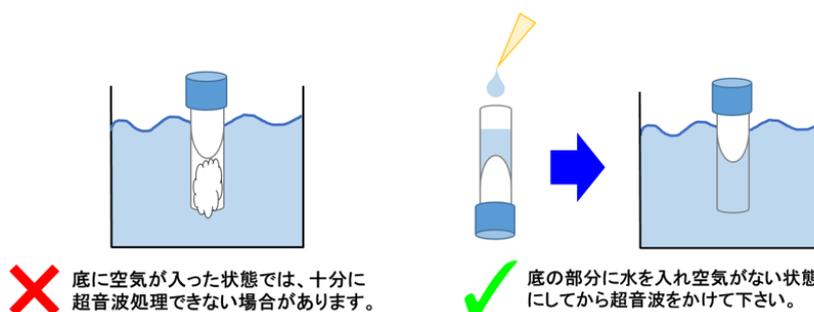


左：溶解できている状態
右：溶け残りがある状態

*1 Liperfluo は光で分解しやすいため、1 分以内を目安にピペッティングをしてください。

*2 Liperfluo の固体物が底面にある場合、ピペッティングの際にピペットの先端で大きな固体を分散させておくと、ボルテックスで固体が溶解しやすくなります。

*3 完全に溶解しない場合、遮光しながら超音波を照射もしくは 40°C の水浴で 3 分間加温して溶解してください。超音波処理の際は、下図のようにチューブ底に空気が入っていない状態で処理を行ってください。



Liperfluo Working solution の調製

Liperfluo の最適な染色濃度は実験条件によって異なるため、以下の手順に従って調製する。

蛍光顕微鏡観察

1 mmol/l Liperfluo DMSO 溶液を無血清培地等で希釈した Working solution を使用する。

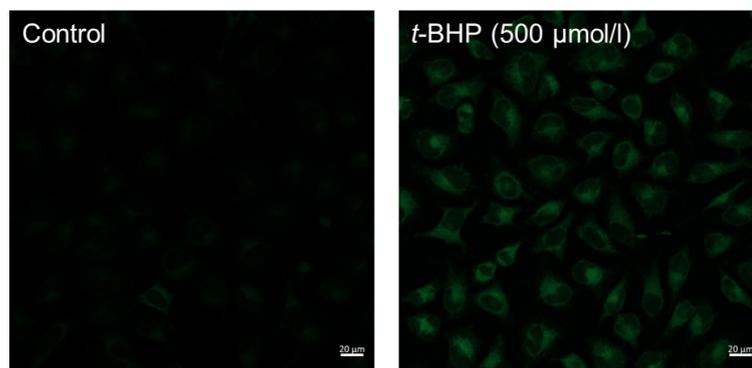
フローサイトメトリー

1 mmol/l Liperfluo DMSO 溶液を測定試料の細胞懸濁液に直接加える。

- 操作
1. 細胞をディッシュ等に播種し培養する。
 2. 培地を除去後、無血清培地で 1 回洗浄する。
 3. 適当な濃度に調製した Liperfluo 溶液を添加し、37°C で 30 分間インキュベートする。
 ※実験条件等により Liperfluo の最適濃度が異なります。最適条件をご検討ください。
 4. 上澄みを除去後、無血清培地で 2 回洗浄する。
 5. 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 1 HeLa 細胞を用いた共焦点蛍光顕微鏡による観察

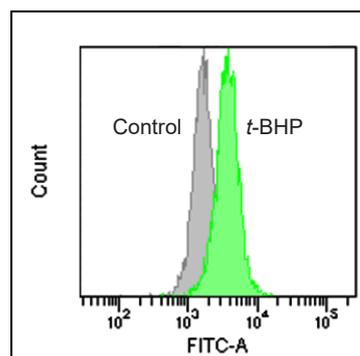
- (1) HeLa 細胞 (3.0×10^4 cells/well、血清入り MEM 培地) を μ -スライド 8 ウェル (ibidi 社製) に播種し、37 °C、5%CO₂ インキュベーター内で一晩培養した。
- (2) 培地を取り除き、細胞を無血清 MEM 培地で 1 回洗浄した。
- (3) 無血清 MEM 培地で希釈した 1 μ mol/l の Liperfluo 溶液 200 μ l をウェルに加え、37 °C、5%CO₂ インキュベーター内で 30 分間静置した。
- (4) 溶液を取り除き、HBSS 200 μ l で 2 回洗浄した。
- (5) HBSS で希釈した 500 μ mol/l の *t*-BHP (*tert*-butyl hydroperoxide) 溶液をウェルに 200 μ l 添加し、37 °C、5%CO₂ インキュベーター内で 60 分間静置した。
- (6) 共焦点蛍光顕微鏡で観察した (励起波長 : 488 nm、蛍光波長 : 500-550 nm)。



HeLa 細胞における過酸化脂質のイメージング

実験例 2 HeLa 細胞を用いたフローサイトメーターによる測定

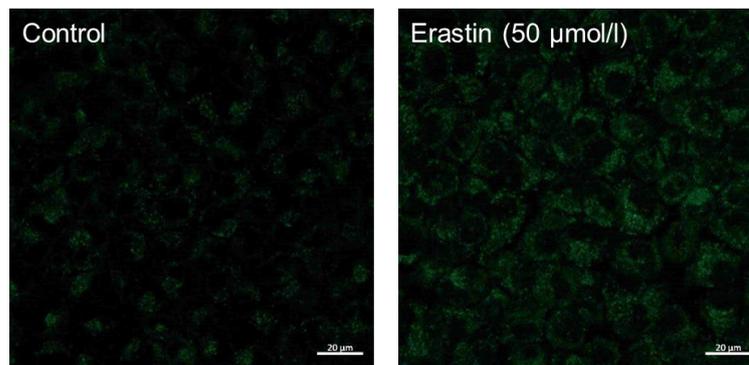
- (1) HeLa 細胞 (1.0×10^5 cells/well、血清入り MEM 培地) を 6 ウェルプレート (Thermo 社製) に播種し、37°C、5%CO₂ インキュベーター内で一晩培養した。
- (2) 培地を取り除き、細胞を無血清 MEM 培地で 1 回洗浄した。
- (3) 無血清 MEM 培地で希釈した 1 μ mol/l の Liperfluo 溶液 2 ml をウェルに加え、37°C、5%CO₂ インキュベーター内で 30 分間静置した。
- (4) 溶液を取り除き、HBSS 2 ml で 2 回洗浄した。
- (5) HBSS で希釈した 500 μ mol/l の *t*-BHP (*tert*-butyl hydroperoxide) 溶液をウェルに 2 ml 添加し、37 °C、5%CO₂ インキュベーター内で 60 分間静置した。
- (6) トリプシン処理により細胞をはがした後、血清入り MEM 培地でマイクロチューブに回収し HBSS に置換した。
- (7) フローサイトメーターで測定した。 (励起波長 : 488 nm、蛍光波長 : 515-545 nm)



Liperfluo を用いた過酸化脂質の定量

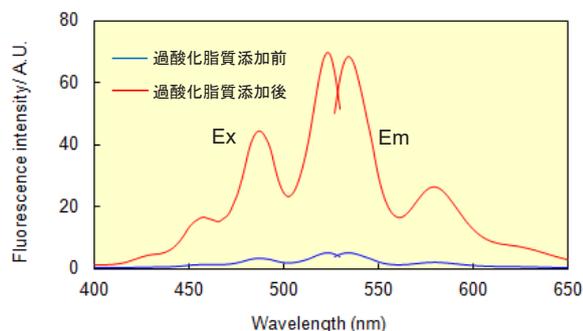
実験例 3 Erastin を用いてフェロトシスを誘導した細胞での蛍光イメージング

- (1) A549 細胞 (1.0×10^5 cells/well、血清入り DMEM 培地) を μ -スライド 8 ウェル (ibidi 社製) に播種し、37 °C、5%CO₂ インキュベーター内で一晩培養した。
- (2) 培地を取り除き、無血清 DMEM 培地で希釈した 50 μ mol/l の Erastin 溶液 200 μ l をウェルに加え、37 °C、5%CO₂ インキュベーター内で一晩静置した。
- (3) 培地を取り除き、HBSS 200 μ l で 2 回洗浄した。
- (4) HBSS を取り除き、HBSS で希釈した 1 μ mol/l の Liperfluo 溶液 200 μ l をウェルに加え、37 °C、5%CO₂ インキュベーター内で 30 分間静置した。
- (5) 溶液を取り除き、HBSS 200 μ l で 2 回洗浄した。
- (6) 共焦点蛍光顕微鏡で観察した (励起波長 : 488 nm、蛍光波長 : 500-550 nm)。



A549 細胞における Erastin 刺激による過酸化脂質のイメージング
シスチントランスポーター阻害剤である Erastin で処理することによりフェロトシスを誘導した細胞内の過酸化脂質が増加することを確認した。

蛍光特性



過酸化脂質による Liperfluo の励起および蛍光スペクトル変化 (エタノール溶媒中)

本製品は試験・研究用途です。臨床診断用途には使用できません。
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
熊本テクノリサーチパーク 〒861-2202
Tel:096-286-1515 (代表) Fax:096-286-1525
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