

## 1 細胞増殖 / 細胞毒性測定用試薬

## 概要

細胞増殖アッセイや死細胞アッセイは、ドラッグスクリーニングや各種物質の毒性分析に用いられている。これらのアッセイは、酵素活性や、細胞膜の状態、細胞接着性、ATP生産量、補酵素量、ヌクレオチド取り込み活性などといった細胞機能を対象としている。広く用いられている方法としては、Trypan Blueの死細胞と生細胞の染め分けによる細胞数計測法があるが、染色されないという条件だけでは、細胞増殖能を持った細胞と増殖能を失った細胞との区別ができない。そのため、酵素活性をベースにした細胞増殖活性測定方法が使用されるようになってきた。

酵素活性をベースにした細胞増殖活性測定法において、MTTアッセイは、生細胞中のミトコンドリアの脱水素酵素活性をベースにした方法で、最もよく用いられている。MTTは細胞膜を透過し、ミトコンドリアに集積し、補酵素であるリボフラビンにより還元され、紫色のMTTホルマザンとなる。水溶性が低いいため、MTTホルマザンは針状結晶となる。したがって吸光度を測定する前に、結晶を有機溶媒で溶解しなければならない。加えて、MTTホルマザンの結晶が析出してくることによって細胞膜が壊れ細胞が死滅してしまう。培地を除く操作では、浮遊してきた細胞を吸い込んでしまい各ウェル間のエラーが大きくなる。

## 脱水素酵素を指標としたアッセイ

小社では各種WSTを開発してきた。WSTは水溶性ホルマザンを生じるため、MTTアッセイで問題となるホルマザンの不溶化を解消できるため、細胞増殖活性測定や死細胞アッセイへの応用が可能である。WST-8は安定で、乳酸脱水素酵素の補酵素であるNADHから電子伝達物質を介して電子を受け取り還元されて高水溶性のWST-8ホルマザンとなる。Cell Counting Kit-8はWST-8と1-Methoxy PMSを含み、室温で6カ月以上、冷蔵保存で一年以上安定である。使用濃度では、WST-8も1-Methoxy PMSも細胞毒性は極めて低く、Cell Counting Kit-8を用いたアッセイの後に、追加でアッセイすることも可能である。脱水素酵素を指標としたアッセイは、複数の要因が関わりあう。たとえば、脱水素酵素、NAD、NADH、ミトコンドリア活性などである。一方MTTアッセイはミトコンドリアの脱水素酵素活性のみであるので、ミトコンドリア活性を反映する。また、Cell Counting Kit-8はMTTよりも高感度に測定ができる。また、ホルマザンが水溶性であるので、溶解のプロセスが不要なため、発色後は直ちに吸光度を測定することができる。

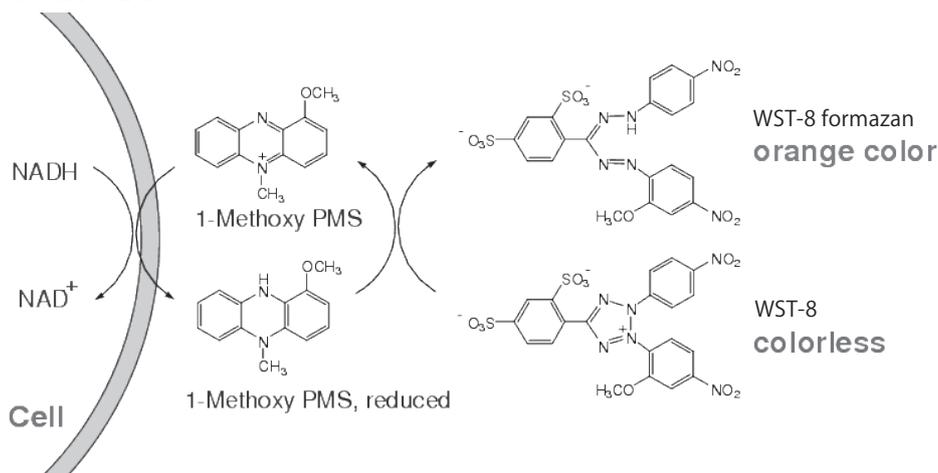


図1 Cell Counting Kit-8の発色機構

## エステラーゼ活性を指標としたアッセイ

Cell Counting Kit-Fは細胞増殖アッセイキットであるが、これは細胞のエステラーゼ活性を指標としたものである。Calcein-AM、BCECF-AM、CFSE、FDAなどは無蛍光であるが、細胞膜を透過し、細胞内のエステラーゼで加水分解され蛍光を発するようになる。したがって、生細胞活性をエステラーゼ活性を指標として測定することができる。細胞膜を透過した後は、加水分解されて蛍光性になるが、化合物によって長時間細胞内にとどまるものと、細胞外に放出されるものがある。

## 死細胞生細胞同時染色

細胞群を死んだ細胞と生きている細胞に分別する場合、生細胞は細胞に存在するエステラーゼにより細胞膜透過性のCalcein-AMが細胞内で蛍光性になるが、核酸染色試薬のPropidium iodideは細胞膜を透過できない。したがって、生細胞はCalceinの蛍光を示すことになる。一方、死細胞では膜が破壊されているため、Propidium iodideが透過できるので、核酸とインターカレートし蛍光性になる。これらの波長の異なる蛍光を観察することにより、生細胞と死細胞を分別することができる。

## 1-1 細胞増殖 / 細胞毒性アッセイキット

Cell Counting Kit-8	2
Cell Counting Kit	3
Cell Counting Kit-F	4
Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST	5
Cellular Senescence Detection Kit - SPiDER-βGal	6
DALGreen - Autophagy Detection	7
Mitophagy Detection Kit	8

## 1-2 関連試薬

1-Methoxy PMS	9
MTT	10
WST-1	11
SPiDER-βGal	12

## 1-1 細胞増殖アッセイキット

## Cell Counting Kit-8

Protocol: 「生細胞数を測りたい(吸光測定)」

	同仁品コード: CK04
100 回用	¥5,200 341-07761
500 回用	¥13,200 347-07621
2500 回用	¥36,600 343-07623
10000 回用	¥101,000 —

## キット内容

[100 回用]	1 ml × 1	[2500 回用]	5 ml × 5
[500 回用]	5 ml × 1	[10000 回用]	100 ml × 1

取扱注意 1. 保存方法: 冷蔵, 遮光

**性質** Cell Counting Kit-8 は細胞増殖または化学物質の感受性試験において、細胞数を測定するキットである。高感度水溶性ホルマザンを生成する新規テトラゾリウム塩 WST-8 を発色基質として採用することで、従来の Cell Counting Kit より高感度測定が可能になった。WST-8 は細胞内脱水素酵素により還元され、水溶性のホルマザンを生成する。このホルマザンの 450 nm の吸光度を直接測定することにより、容易に生細胞数を計測することができる。細胞数と生成するホルマザンの量は直線的な比例関係にある。1 ボトル溶液タイプとし、より使いやすくなった。

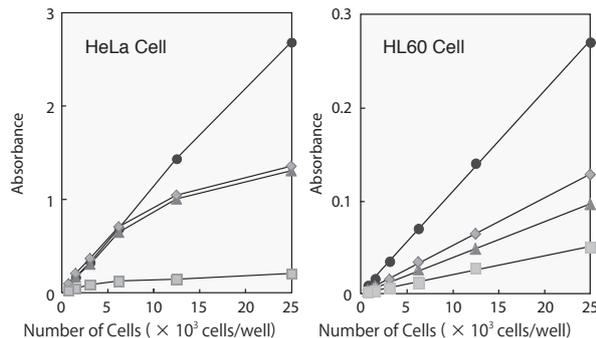
測定原理は、1. 細胞増殖 / 細胞毒性測定用試薬脱水素酵素を指標としたアッセイをご参照頂きたい。

## 特長

- 1)  $[^3\text{H}]$ -チミジン取り込み法のようなラジオアイソトープを必要としない。
- 2) テトラゾリウム塩およびホルマザンとも高水溶性であるため、MTT アッセイのようなホルマザンの溶解操作が不要である。
- 3) 他の水溶性タイプのテトラゾリウム塩 (XTT, MTS) より高感度・低毒性である。
- 4) 1 ボトル溶液タイプであるため、試薬の調製が不要である。
- 5) 他の測定キットより試薬が安定である。
- 6) フェノールレッドを含む培地でも使用できる。

\* 使用方法および注意事項は別冊プロトコル集をご覧ください。

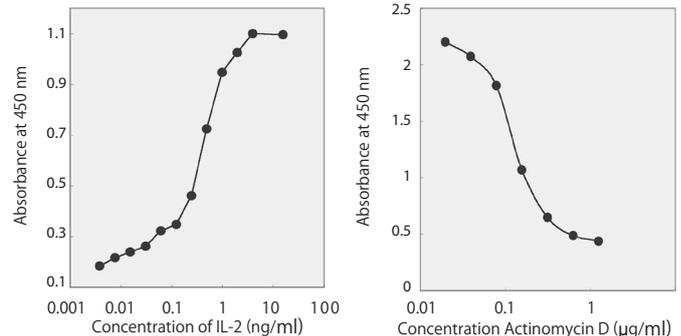
## 細胞数と吸光度の関係



Medium: MEM, 10%FBS(HeLa), RPM1640(HL60)  
Incubation: 37°C, 5%CO<sub>2</sub>, 2 hours (HeLa, HL60)  
Detection:  
Cell Counting Kit-8 (●) 450 nm MTS (▲) 490 nm  
XTT (◆) 450 nm MTT (■) 570 nm

## Cell Counting Kit-8 を用いた測定例

細胞増殖試験 (左) と細胞毒性試験 (右)



## 細胞増殖試験 (IL-2)

Cell line: CTLL-2  
Culture medium:  
PRM1640, 10% FBS  
Drug: Human Interleukin-2  
Exposure: 72 hours  
Incubation:  
37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 4 hours  
Detection: 450 nm

## 細胞毒性試験 (Actinomycin D)

Cell line: HeLa  
Culture medium:  
DMEM, 10% FBS  
Drug: Actinomycin D  
Exposure: 24 hours  
Incubation:  
37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 4 hours  
Detection: 450 nm

最新の情報は web へ 同仁化学 CK04 で検索

## 参考文献

- 1) M. Ishiyama, Y. Miyazono, K. Sasamoto, Y. Ohkura and K. Ueno, "A Highly Water-Soluble Disulfonated Tetrazolium Salt as a Chromogenic Indicator for NADH as Well as Cell Viability", *Talanta*, 1997, 44, 1299.
- 2) H. Tominaga, M. Ishiyama, F. Ohseto, K. Sasamoto, T. Hamamoto, K. Suzuki and M. Watanabe, "A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay", *Anal. Commun.*, 1999, 36, 47.
- 3) T. Miyamoto, W. Min and H. S. Lillehoj, "Lymphocyte Proliferation Response During Eimeria tenella Infection Assessed by a New, Reliable, Nonradioactive Colorimetric Assay", *Avian Dis.*, 2002, 46, 10.
- 4) K. Yoshimura, A. Tanimoto, T. Abe, M. Ogawa, T. Yutsudo, M. Kashimura and S. Yoshida, "Shiga toxin 1 and 2 Induce Apoptosis in the Amniotic cell line WISH", *J. Soc. Gynecol. Investig.*, 2002, 9, 22.
- 5) Y. Hayakawa, Y. Hirata, H. Nakagawa, K. Sakamoto, Y. Hikiba, H. Kinoshita, W. Nakata, R. Takahashi, K. Tateishi, M. Tada, M. Akanuma, H. Yoshida, K. Takeda, H. Ichijo, M. Omata, S. Maeda and K. Koike, "Apoptosis signal-regulating kinase 1 and cyclin D1 compose a positive feedback loop contributing to tumor growth in gastric cancer", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2011, 108, (2), 780.
- 6) R. Chugh, V. Sangwan, S. P. Patil, V. Dudeja, R. K. Dawra, S. Banerjee, R. J. Schumacher, B. R. Blazar, G. I. Georg, S. M. Vickers and A. K. Saluja, "A Preclinical Evaluation of Minnelide as a Therapeutic Agent Against Pancreatic Cancer", *Sci. Transl. Med.*, 2012, 4, (156), 156ra139.

生細胞測定 (Cell Counting Kit-8) と死細胞測定 (Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST) のセット品はこちら 同仁化学 CK17 で検索

\*表示している希望納入価格は「本体価格のみ」で消費税等は含まれておりません。  
社会状況の変動により、予告なしに変更することがありますので、最新の価格は HP にてご確認ください。

## Cell Counting Kit

Protocol: 「生細胞数を測りたい(吸光測定)」

同仁品コード: CK01  
 500 回用 ¥16,000 349-06461  
 2500 回用 ¥40,000 345-06463

## キット内容

[500 回用]

- 試薬 A (凍乾品): WST-1 / HEPES × 1
- 溶液 B (赤色水溶液): 1-Methoxy PMS 5 ml × 1

[2500 回用]

- 試薬 A (凍乾品): WST-1 / HEPES × 5
- 溶液 B (赤色水溶液): 1-Methoxy PMS 5 ml × 5

取扱注意 1. 保存方法: 冷蔵

**性質** 本キットは WST-1 および 1-Methoxy PMS を組み合わせた細胞数を測定するキットである。

- 操作は不要で操作が簡便である。  
 2) 付着細胞、浮遊細胞ともに使用できる。  
 3) フェノールレッドを含む培地でも使用できる。

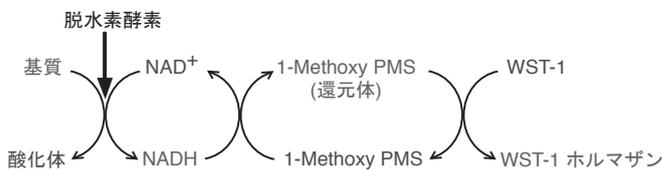
## 特長

1) WST-1 および WST-1 ホルマザンは高水溶性 (0.1 mol/l 以上) であり、WST-1 アッセイではホルマザンを溶かす

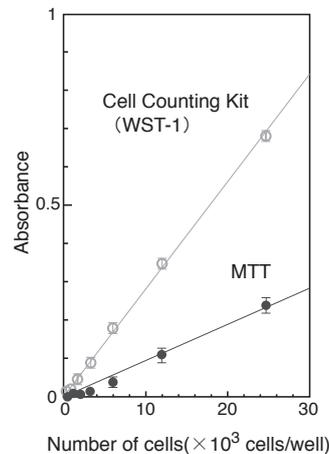
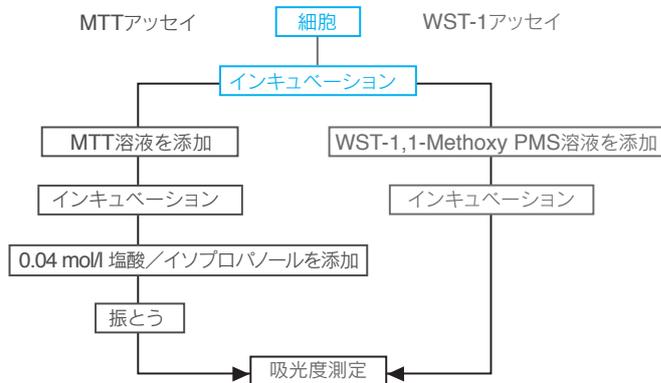
\*使用方法および注意事項はプロトコルをご覧ください。

## 測定原理

## Cell Counting Kit の測定原理



## MTTアッセイとWST-1アッセイとの操作法の比較



## 細胞数と吸光度との関係 (MTTとの比較)

使用細胞: HeLa 細胞  
 使用培地: MEM 培地 (10%牛胎児血清, L-グルタミン含, フェノールレッド不含)  
 呈色反応: 37°C, 5%CO<sub>2</sub>, 2時間  
 測定器: Molecular Device社・UVmax  
 測定波長: WST-1 450 nm (参照波長650 nm)  
 MTT 570 nm (参照波長650 nm)

最新の情報は web へ [同仁化学 CK01](#) で検索

## 参考文献

- M. Ishiyama, M. Shiga, K. Sasamoto and M. Mizoguchi, "A New Tetrazolium Salt That Produces a Highly Water-Soluble Formazan Dye", *Chem. Pharm. Bull.*, 1993, 41, 1118.
- 渡邊正己, "細胞増殖測定法", 組織培養, 1995, 27(12), 435.

## Cell Counting Kit-F

500 回用 同仁品コード：CK06  
¥14,000 343-07743

**Protocol:** 「生細胞数を測りたい(蛍光測定)」

## キット内容

-Calcein-AM DMSO solution  
[500 回用]

110  $\mu$ l  $\times$  1

**取扱注意** 1. 危険物第四類 第三石油類 危険等級 III ,  
2. 火気厳禁  
3. 保存方法：冷凍, 遮光

危険・有害性シンボルマーク (GHS 表示)  
感嘆符



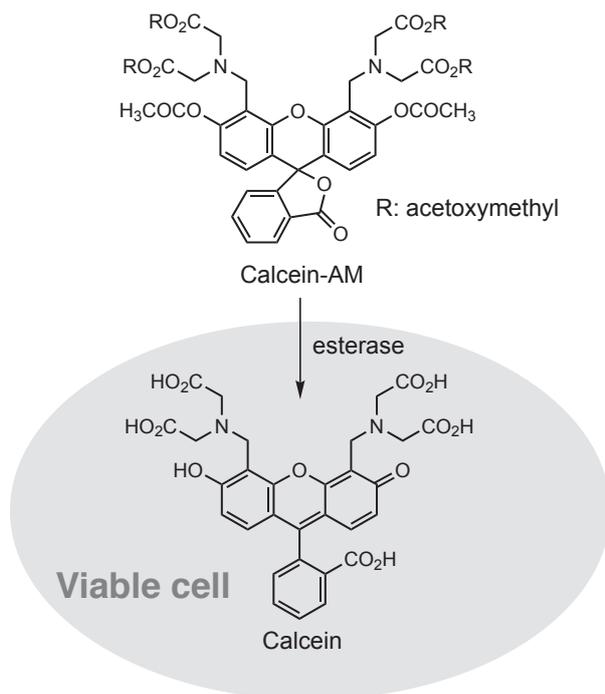
**性質** Cell Counting Kit-F は蛍光法により生細胞数を測定するキットである。キットに含まれる蛍光色素 Calcein-AM は細胞内エステラーゼにより Calcein に加水分解され、黄緑色の強い蛍光 ( $\lambda_{ex}=490$  nm,  $\lambda_{em}=515$  nm) を発する。この時の蛍光強度が細胞内エステラーゼ活性に比例することから、生じた Calcein の蛍光を測定することで、生細胞数を測定することができる。また、Cell Counting Kit-F は高感度かつ迅速な測定が可能であり、試薬添加後、30 ~ 60 分発色させることにより、テトラゾリウム塩を用いた比色法の限界とされている低細胞数域、リンパ球などの浮遊性細胞においても良好な直線が得られる。

## 特長

- 1) [ $^3$ H]-チミジン取り込み法のようにラジオアイソトープを必要としない。
- 2) Calcein-AM により生細胞の細胞質全体を染めてその蛍光を測定するため、比色法に比べて高感度である。
- 3) 短時間で発色し、溶解操作などの特別な操作を必要とせず、細胞と共にインキュベートするだけで測定できる。
- 4) 浮遊系・付着系の両方の細胞に用いることができる。

※使用方法は、プロトコルをご覧ください。

## 測定原理



最新の情報は web [同仁化学 CK06](#) で検索

## 参考文献

- 1) S. Sakamoto, M. Yokoyama, X. Zhang, K. Prakash, K. Nagao, T. Hatanaka, R. H. Getzenberg and Y. Kakehi, "Increased Expression of CYR61, an Extracellular Matrix Signaling Protein, in Human Benign Prostatic Hyperplasia and Its Regulation by Lysophosphatidic Acid", *Endocrinology*, 2004, 145, 2929.

細胞  
増殖 / 毒性  
酸化  
ストレス  
分子  
生物学  
細胞内  
蛍光プローブ  
細胞  
染色  
細菌研究用  
試薬  
膜タン  
パク質  
ラベル  
化剤  
二価性  
試薬  
酸化  
還元  
イオン  
電極  
シンチ  
レーター  
生化学用  
緩衝剤  
キレート  
比色 / 金属  
試薬  
水質  
分析用  
溶媒  
抽出  
高純度  
溶媒  
その他  
機能性  
有機材料

細胞増殖 / 毒性酸化ストレス分子生物学細胞内蛍光プローブ細胞染色細菌研究用試薬膜タンパク質ラベル化剤二価性試薬酸化還元イオン電極シンチレーター生化学用緩衝剤キレート比色 / 金属試薬水質分析用溶媒抽出高純度溶媒その他機能性有機材料

## Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST

Protocol: 「死細胞数を測りたい(吸光測定)」

同仁品コード: CK12  
 100 tests ¥9,600  
 500 tests ¥25,400  
 2000 tests ¥38,000

## キット内容

	[100 tests]	[500 tests]	[2000 tests]
• Dye Mixture	× 1	× 1	× 4
• Assay Buffer	11 ml × 1	55 ml × 1	55 ml × 4
• Lysis Buffer	1.1 ml × 1	5.5 ml × 1	5.5 ml × 4
• Stop Solution	5.5 ml × 1	27.5 ml × 1	27.5 ml × 4

取扱注意 1. 保存方法: 冷蔵, 遮光  
 PRTR 法: 第1種指定化学物質

危険・有害性シンボルマーク (GHS 表示)  
 感嘆符 環境



性質 Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST は、細胞から培地中に放出された乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性を測定することにより細胞傷害を測定するキットである。

LDH は細胞質に存在する酵素で、通常は細胞質に留まっているが、細胞膜が傷害を受けると培地中に放出される。放出された LDH は安定なので、死細胞または細胞膜に傷害を受けた細胞数を測る指標として広く測定されている。LDH は、NAD (ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド) を補酵素として乳酸の脱水素化を触媒し、ピルビン酸と NADH を生成する。生じた NADH は、電子メディエーターを介してテトラゾリウム塩 (無色) をホルマザン (橙色) に還元する。生成したホルマザンの量は、放出された LDH 活性に比例す

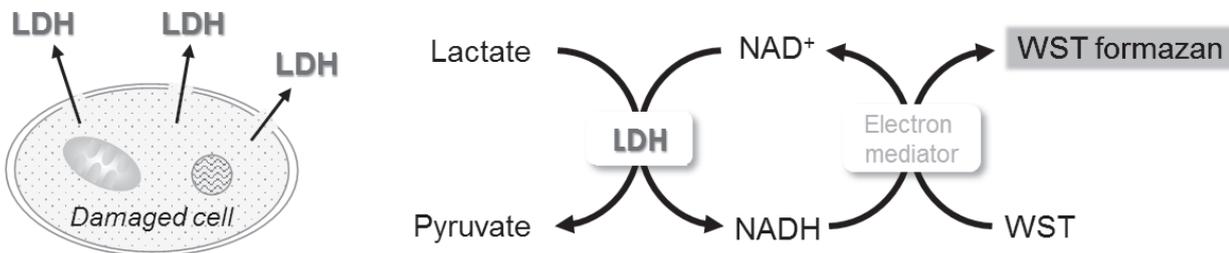
るため、傷害を受けた細胞数の指標となる。

本キットは、生細胞と反応せず、かつ、細胞にダメージを与えないため、生細胞と死細胞が混在する細胞培養液中に直接試薬を加えても細胞傷害を測定することが可能である (ホモジニアスアッセイ)。なお、一般的に用いられる細胞培養液を取り出して LDH 活性を測定する方法も可能である (ノンホモジニアスアッセイ)。また、安定性の高い試薬を用いているため、調製した溶液は長期間保存でき、用時調製する必要がない。そのため、多検体アッセイから、少ない検体数の測定にも対応することができる。

\*使用方法および注意事項は別冊プロトコル集をご覧ください。

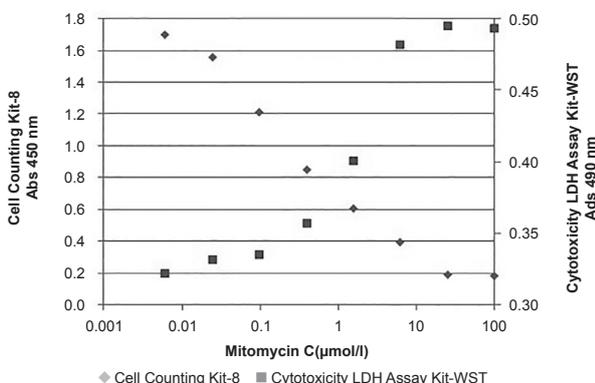
(開発元: Dojindo Molecular Technologies, Inc.)

## 測定原理



## 測定例

Cell Counting Kit-8 と Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST を併用した細胞毒性試験



試験物質: Mitomycin C  
 細胞: HeLa  
 使用培地: MEM, 10% FBS  
 インキュベート: 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 48 時間  
 検出波長: Cell Counting Kit-8 (450 nm),  
 Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST (490 nm)

## 参考文献

- S. F. Jin, H. L. Ma, Z. L. Liu, S. T. Fu, C. P. Zhang, Y. He, "XL413, a cell division cycle 7 kinase inhibitor enhanced the anti-fibrotic effect of pirfenidone on TGF-β 1-stimulated C3H10T1/2 cells via Smad2/4.", *Exp. Cell Res.*, 2015, 339, (2), 289.
- S. Watanabe, C. S. Moniaga, S. Nielsen, M. Hara-Chikuma, "Aquaporin-9 facilitates membrane transport of hydrogen peroxide in mammalian cells.", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2016, 471, 191.

最新の情報は web へ [同仁化学 CK12](#) で検索

生細胞測定 (Cell Counting Kit-8) と死細胞測定 (Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST) のセット品はこちら [同仁化学 CK17](#) で検索

## Cellular Senescence Detection Kit - SPiDER-βGal

同仁品コード：SG03  
10 assays ¥38,000

Protocol: 「老化細胞を検出したい」

## キット内容

- [10 assays: 35 mm dish]
- SPiDER-βGal × 1
  - Bafilomycin A1 × 1

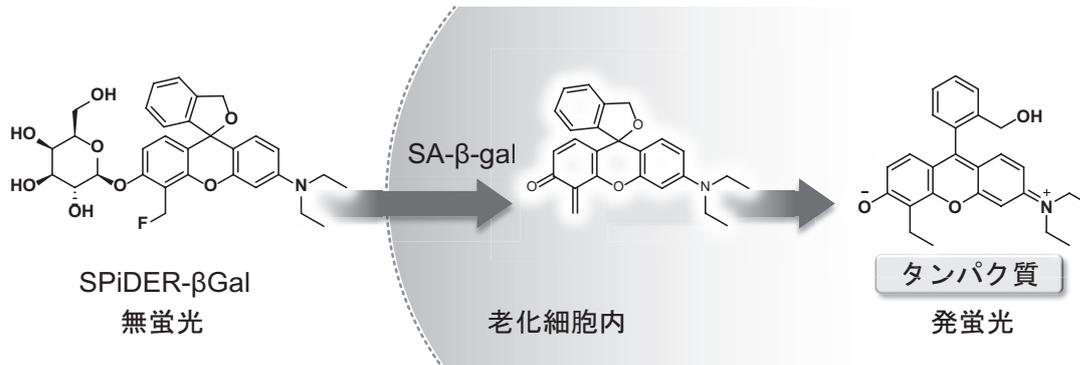
取扱注意 1. 保存方法：冷蔵

**性質** 正常細胞は、分裂を繰り返すことや、酸化ストレス等により DNA に損傷を生じる。損傷 DNA が修復されない異常細胞がこれ以上増えないようにするため、不可逆的に分裂を停止する細胞老化が引き起こされる。このようにして生じた老化細胞において過剰発現が認められる SA-β-gal (senescence-associated β-galactosidase) は、老化マーカーの 1 つとして広く用いられている。代表的な SA-β-gal の検出方法として X-gal 染色が広く利用されているが、(1) 細胞膜透過性が乏しいため細胞を固定化する必要がある、(2) 染色された細胞とそうでない細胞とを目視により見分ける必要があるため定量性に欠ける、(3) 染色に時間

を要する、などが課題となっている。

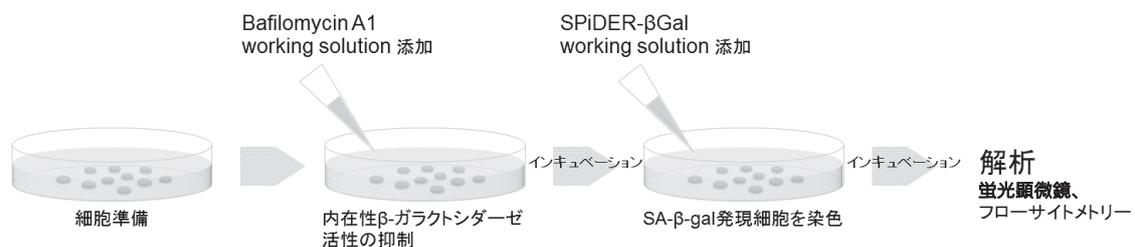
本キットに含まれる β-galactosidase 検出試薬 SPiDER-βGal は、細胞膜透過性が高く、優れた細胞内滞留性を有し反応後の基質が細胞外へ漏れ出さない、という性質を有し、細胞内 β-galactosidase の高感度検出、短時間染色を実現できる。また、蛍光検出が可能なることから、X-gal 染色法では適用できなかったフローサイトメトリーも利用することができ、定量性のあるデータを取得できる。なお、生細胞のみならず X-gal 法と同様に固定化細胞を用いても SA-β-gal を簡便かつ迅速に検出することが可能である。

## 測定原理

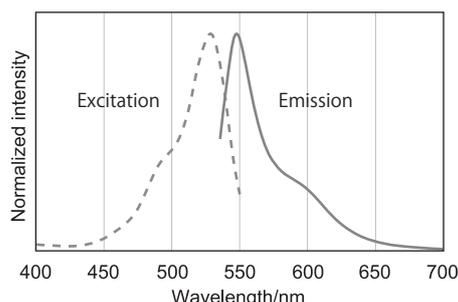


本キットの β-galactosidase 検出試薬 SPiDER-βGal は、細胞膜透過性を有するため、特別な膜透過処理や固定化操作は不要で生細胞に適応できる。細胞膜を透過した SPiDER-βGal は、SA-β-gal と反応することで蛍光を発生し、かつ近傍のタンパク質と共有結合する。また、SPiDER-βGal を添加する前に本キットに含まれる Bafilomycin A1 を添加することで、生細胞中の内在性 β-galactosidase の活性を抑制し、バックグラウンド抑えた状態で SA-β-gal を蛍光検出できる。

## キットの使用手順



## 蛍光特性 (β-galactosidase と反応後の SPiDER-βGal)



β-galactosidase ガラクトシダーゼと反応後の SPiDER-βGal の励起・蛍光スペクトル

最新の情報は web へ 同仁化学 SG03 で検索

\*表示している希望納入価格は「本体価格のみ」で消費税等は含まれておりません。社会状況の変動により、予告なしに変更することがありますので、最新の価格は HP にてご確認ください。

細胞増殖 / 毒性酸化ストレス分子生物学細胞内蛍光プローブ細胞染色細菌研究用試薬膜タンパク質ラベル化剤二価性試薬酸化還元イオン電極シンチレーター生化学用緩衝剤キレート比色 / 金属試薬水質分析用溶媒抽出高純度溶媒その他機能性有機材料

## DALGreen - Autophagy Detection

同仁品コード：D675  
20 nmol ¥28,000

**Protocol:** 「オートファジーを検出したい」

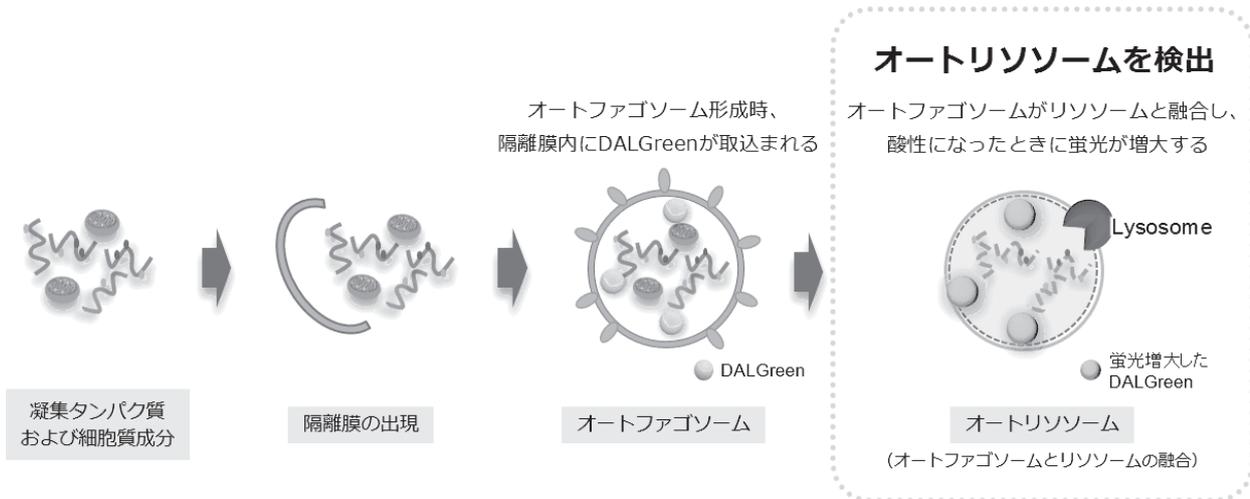
**規格** (1) 性状：淡黄色固体  
(2) 純度 (HPLC)：90.0% 以上

**取扱注意** 1. 保存方法：冷凍, 遮光  
2. 窒素置換

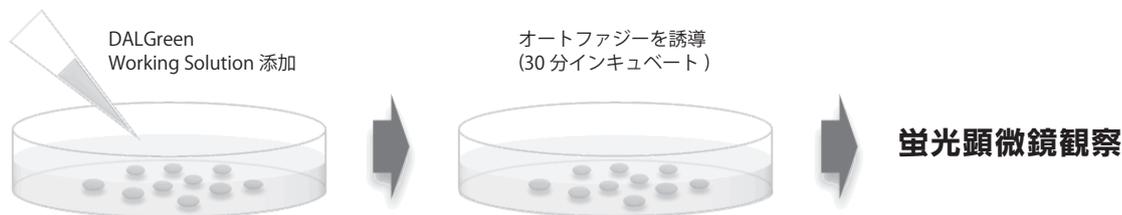
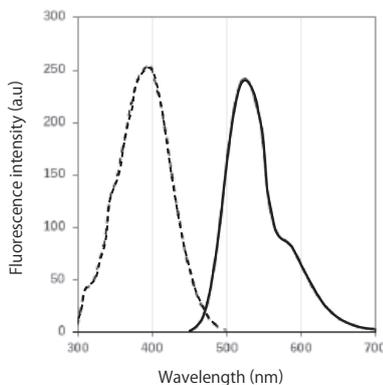
**性質**

DALGreen は、細胞内の不要なタンパク質・細胞小器官などの再利用や、代謝のための分解過程であるオートファジーを検出できる蛍光色素である。培養細胞に添加した

DALGreen は生細胞膜を透過し、オートファジー誘導により形成されたオートファゴソーム内に取り込まれる。その後、リソソームと融合し酸性環境となったオートリソソームにおいて DALGreen の蛍光が増大する。

**測定原理****操作は試薬の添加だけ**

遺伝子導入が不要。準備した細胞に試薬を添加するだけの簡単操作で蛍光イメージングを実現できる。

**DALGreen の励起、蛍光スペクトル**

$\lambda_{ex}$ : 405 nm  
 $\lambda_{em}$ : 525 nm  
<推奨フィルター>  
励起: 350 ~ 450 nm  
蛍光: 500 ~ 560 nm

**参考文献**

H. Iwashita, H. T. Sakurai, N. Nagahora, M. Ishiyama, K. Shioji, K. Sasamoto, K. Okuma, S. Shimizu, and Y. Ueno, "Small fluorescent molecules for monitoring autophagic flux" *FEBS Letters.*, 2018, 592(4), 559-567.

最新の情報は web へ [同仁化学 D675](#) で検索

## Mitophagy Detection Kit

同仁品コード：MD01  
1 set ¥36,000

**Protocol**：「マイトファジーを検出したい」

## キット内容

- Mtpthagly Dye 5  $\mu$ g  $\times$  1
- Lyso Dye 30  $\mu$ g  $\times$  1

## 規格

- (1) Mtpthagly Dye：試験適合  
(2) Lyso Dye：試験適合

**取扱注意** 1. 保存方法：冷蔵，遮光

**性質** ミトコンドリアはエネルギー産生のもととして知られ、細胞内で重要な機能を持つオルガネラの一つである。近年では、アルツハイマー病やパーキンソン病の原因の一つに不良化したミトコンドリアの蓄積が報告され、マイトファジーがその中で重要な役割をもった機構であることが明らかになってきている。マイトファジーは酸化ストレスやDNA損傷等により不良化したミトコンドリアを選択的に除去するシステムであり、不良ミトコンドリアはオートファゴソームにより隔離され、リソソームと融合し消化される。

Mtpthagly Dye は、生細胞膜を透過し細胞内のミトコンドリアに集積した後、化学結合によりミトコンドリアに固定

化される。周囲の環境により Mtpthagly Dye の蛍光強度は低い状態にあるが、マイトファジーが誘導されてミトコンドリアがリソソームと融合すると、酸性条件下におかれた Mtpthagly Dye の蛍光強度が増大する。本キットはマイトファジーを検出する Mtpthagly Dye とリソソームを染色する Lyso Dye で構成されている。

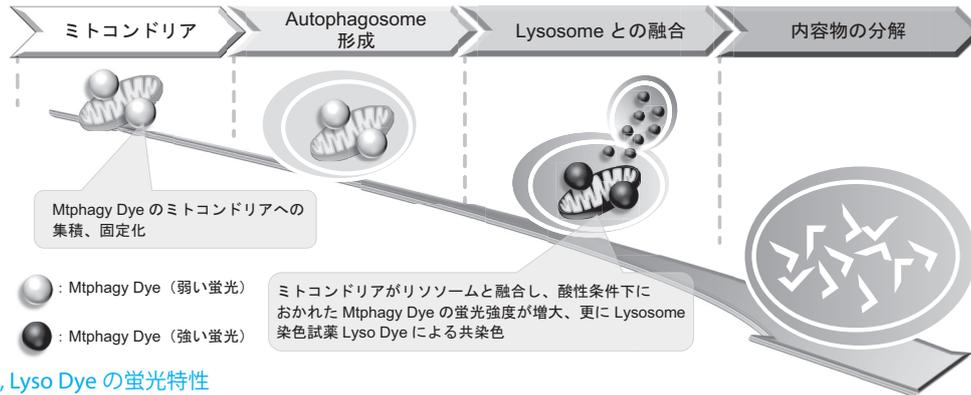
**特長**

- 1) 低分子蛍光試薬を添加するだけでマイトファジーを簡単に検出
- 2) 蛍光顕微鏡による生細胞イメージングが可能
- 3) 付属のリソソーム染色試薬との共染色が可能

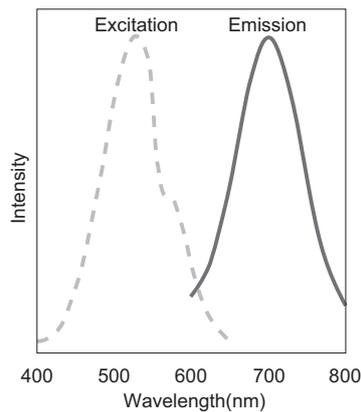
(開発元：Dojindo Molecular Technologies, Inc.)

## 検出原理

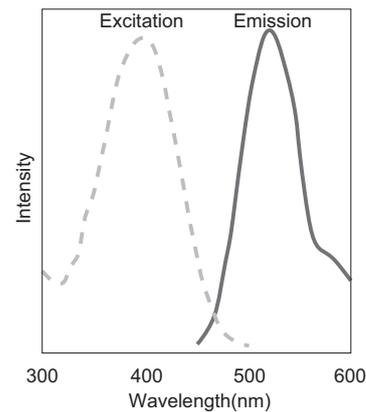
Mtpthagly Dye によるマイトファジー検出機構



## Mtpthagly Dye, Lyso Dye の蛍光特性



Mtpthagly Dye の励起・蛍光スペクトル



Lyso Dye の励起・蛍光スペクトル

## 参考文献

- 1) H. Iwashita, S. Torii, N. Nagahora, M. Ishiyama, K. Shioji, K. Sasamoto, S. Shimizu, and K. Okuma, "Live Cell Imaging of Mitochondrial Autophagy with a Novel Fluorescent Small Molecule", *ACS Chem. Biol.*, 2017, 10.1021/acschembio.7b00647.
- 2) J. Königa, C. Otta, M. Hugoa, T. Junga, A. L. Bulteaub, T. Grunea and A. Höhna, "Mitochondrial contribution to lipofuscin formation", *Redox Biol.*, 2017, 11, 673.
- 3) K. Kameyama, "Induction of mitophagy-mediated antitumor activity with folate-appended methyl- $\beta$ -cyclodextrin", *Int J Nanomedicine*, 2017, 12, 3433-3446.
- 4) E. F. Fang, T. B. Waltz, H. Kassahun, Q. Lu, J. S. Kerr, M. Morevati, E. M. Fivenson, B. N. Wollman, K. Marosi, M. A. Wilson, W. B. Iser, D. M. Eckley, Y. Zhang, E. Lehrmann, I. G. Goldberg, M. S. Knudsen, M. P. Mattson, H. Nilsen, V. A. Bohr, and K. G. Becker, "Tomatidine enhances lifespan and healthspan in *C. elegans* through mitophagy induction via the SKN-1/Nrf2 pathway", *Sci Rep.*, 2017, 7, 46208.

最新の情報は web へ [同仁化学 MD01](#) で検索

\*表示している希望納入価格は「本体価格のみ」で消費税等は含まれておりません。社会状況の変動により、予告なしに変更することがありますので、最新の価格は HP にてご確認ください。

細胞増殖 / 毒性酸化ストレス分子生物学細胞内蛍光プローブ細胞染色細菌研究用試薬膜タンパク質ラベル化剤二価性試薬酸化還元イオン電極シンチレーター生化学用緩衝剤キレート比色 / 金属試薬水質分析用溶媒抽出高純度溶媒その他機能性有機材料

## 1-2 関連試薬

## 1-Methoxy PMS

1-Methoxy-5-methylphenazinium methylsulfate  
〔CAS No. 65162-13-2〕

	同仁品コード：M003
100 mg	¥7,500 345-04001
1 g	¥46,800 341-04003

**規格**

(1) 性状：暗赤色～赤紫色粉末  
 (2) 純度 (吸光度)：95.0% 以上  
 (3) 水溶状：試験適合  
 (4) モル吸光係数：2,700 以上 (505 nm 付近)  
 (5) 融点 170°C 以上 (分解)  
 (6) IR スペクトル：試験適合

**溶解例** 34 mg/100 ml (水)  
**構造式**

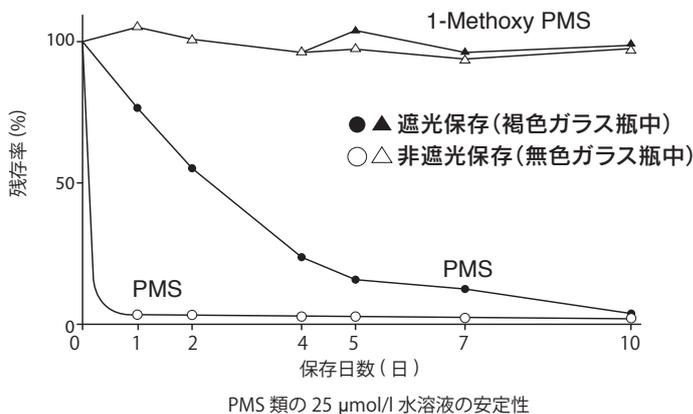
C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S=336.36

**性質** 水には容易に溶けて赤色 ( $\lambda_{\max}$  = 505 nm,  $\epsilon$  = 2.84 × 10<sup>3</sup>) となり、アルコールにもよく溶ける。標準酸化還元電位 + 0.063V。NADH-テトラゾリウム系の電子キャリアーとしては、PMS (フェナジンメトサルフェート、+ 0.08 V) やメルドラブルーが利用されているが、PMS の欠点は、光に対して非常に不安定で試薬溶液の保存が困難なことである。これに対し、1-Methoxy PMS の水溶液は、透明なガラ

ス容器に保存しても 100 日間も変化せず、ルーチンワークには極めてすぐれている。

**試薬溶液調製法**

25  $\mu$ mol/l 程度となるように本品を秤量し、一定量の水に溶解する。

**参考文献**

- R. Hisada and T. Yagi, "1-Methoxy-5-Methylphenazinium Methyl Sulfate", *J. Biochem.*, 1977, 82, 1469.
- 八木達彦, "1-メトキシ PMS", *Dojin News*, 1979, 14, 1.
- S. Nakamura, K. Arimura, K. Ogawa and T. Yagi, "Use of 1-methoxy-5-methylphenazinium Methyl Sulfate (1-methoxypms) in the Assay of Some Enzymes of Diagnostic Importance", *Clin. Chim. Acta.*, 1980, 101, 321.
- R. Hisada, W. Shinkai and T. Yagi, "Photochemical Stabilities and Biochemical Reactivities of Some Derivatives of 5-methylphenazinium methyl Sulfate (Phenazine Methosulfate)", *J. Appl. Biochem.*, 1981, 3, 535.
- C. J. von Noorden and J. Tas, "The Role of Exogenous Electron Carriers in NAD(P)-dependent Dehydrogenase Cytochemistry Studied *in vitro* and with a Model System of Polyacrylamide Films", *J. Histochem. Cytochem.*, 1982, 30, 12.
- H. Tsuge, Y. Kuroda, A. Iwamoto and K. Ohashi, "Partial Purification and Property of Pyridoxine (Pyridoxamine)-5'-phosphate Oxidase Isozymes from Wheat Seedlings", *Arch. Biochem. Biophys.*, 1982, 217, 479.
- M. Rabinovitch, J. P. Dedet, A. Rytter, R. Robineaux, G. Topper and E. Brunet, "Destruction of Leishmania Mexicana Amazonensis Amastigotes within Macrophages in Culture by Phenazine Methosulfate and Other Electron Carriers", *J. Exp. Med.*, 1982, 155, 415.
- 田部一弘, 河崎孝男, 前田昌子, 辻章夫, 籾内正彦, "1-メトキシフェナジンメトサルフェート及びイソルミノールを用いる還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドの化学発光分析法と生体成分の分析への応用", *分析化学*, 1987, 36, 82.
- 須藤幸夫, 石澤春生, 前田昌子, 辻章夫, "1-メトキシフェナジンメトサルフェート及びイソルミノールによる還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドの化学発光を用いる 17  $\alpha$ -ヒドロキシプロゲステロンの化学発光酵素", *分析化学*, 1988, 37, 185.

最新の情報は web へ  で検索

## MTT

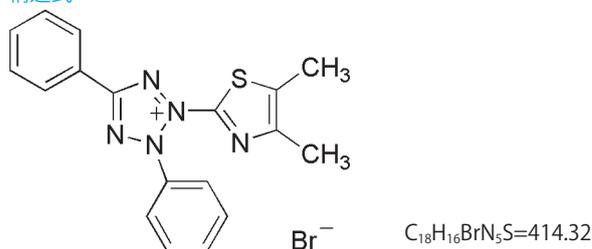
3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide  
〔CAS No. 298-93-1〕

同仁品コード：M009  
100 mg ￥3,200 345-01821  
1 g ￥15,600 341-01823  
5 g ￥55,600 349-01824

## 規格

- (1) 性状：黄色～黄橙色粉末
- (2) 純度（吸光度）：97.0% 以上
- (3) モル吸光係数：8,250 以上（375 nm 付近）
- (4) メチルアルコール溶状：試験適合
- (5) 融点：190 ~ 205℃（分解）
- (6) 強熱残分（硫酸塩）：0.10% 以下
- (7) 鋭敏度：試験適合
- (8) IR スペクトル：試験適合

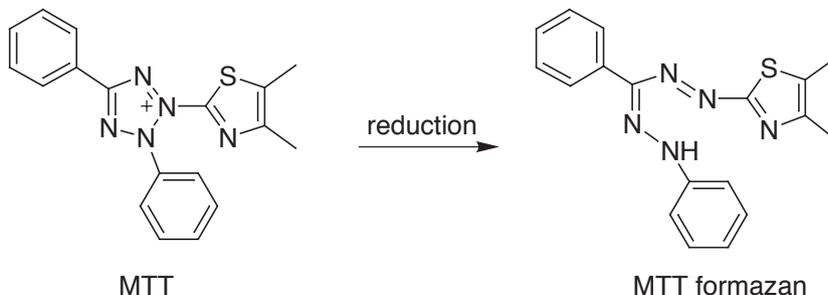
溶解例 100 mg/10 ml(熱メチルアルコール)  
構造式



**性質** メチルアルコールにはやや溶けるが、水、エチルアルコールにはわずかししか溶けない。エーテル、アセトン、酢酸エチルには全く溶けない。モノテトラゾリウムではあるがその性質が優れているため、TB、Nitro-TBなどが開発された後でもまだ広く利用されている。脱水素酵素によって

赤紫色のホルマザン（ $\lambda_{\max} = 565 \text{ nm}$ ,  $\epsilon = 2 \times 10^4$ ）を生ずる。コバルトキレートは（ $\lambda_{\max} = 660 \text{ nm}$ ,  $\epsilon = 2 \times 10^4$ ）となる。

\*使用方法はプロトコルをご覧ください。



## 参考文献

- 1) T. F. Slater, B. Sawyer and U. Strauli, "Studies on Succinate-tetrazolium Reductase Systems III. Points of Coupling of Four Different Tetrazolium Salts", *Biochim. Biophys. Acta.*, 1963, 77, 383.
- 2) T. Mosmann, "Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays", *J. Immunol. Methods*, 1983, 65, 55.
- 3) H. Tada, O. Shiho, K. Kuroshima, M. Koyama and K. Tsukamoto, "An Improved Colorimetric Assay for Interleukin 2", *J. Immunol. Methods*, 1986, 93, 157.
- 4) M. C. Alley, D. A. Scudiero, A. Monks, M. L. Hursey, M. J. Czerwinski, D. L. Fine, B. J. Abbott, J. G. Mayo, R. H. Shoemaker and M. R. Boyd, "Feasibility of Drug Screening with Panels of Human Tumor Cell Lines Using a Microculture Tetrazolium Assay", *Cancer Res.*, 1988, 48, 589.
- 5) E. Aoyama, N. Kobayashi, M. Shibata, T. Nakagawa and H. Tanaka, "Determination of Selenium by Flow Injection Analysis Based on the Selenium(III)-Catalyzed Reduction of 3-(4,5-Dimethyl-2-Thiazolyl)-2,5-Diphenyl-2H Tetrazolium Bromide", *Anal. Sci.*, 1991, 7, 103.
- 6) H. Yamaue, H. Tanimura, T. Tsunoda, M. Tani, M. Iwahashi, K. Noguchi, M. Tamai, T. Hotta and K. Ariei, "Chemosensitivity Testing with Highly Purified Fresh Human Tumor Cells with the MTT Colorimetric Assay", *Eur. J. Cancer*, 1991, 27, 1258.
- 7) M. Kodama, T. Yoshida, H. Otani, K. Kohmoto and S. Nishimura, "Effect of AL-toxin Produced by *Alternaria alternata* Tomato Pathotype on Viability of Cultured Tomato Cells Determined by MTT-colorimetric Assay", *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, 1991, 57, 663.
- 8) H. Yamaue, H. Tanimura, K. Noguchi, T. Hotta, M. Tani, T. Tsunoda, M. Iwahashi, M. Tamai and S. Iwakura, "Chemosensitivity Testing of Fresh Human Gastric Cancer with Highly Purified Tumor Cells Using the MTT Assay", *Br. J. Cancer*, 1992, 66, 794.
- 9) M. G. Stevens and S. C. Olsen, "Comparative Analysis of Using MTT and XTT in Colorimetric Assays for Quantitating Bovine Neutrophil Bactericidal Activity", *J. Immunol. Methods*, 1993, 157, 225.
- 10) M. Kodama, K. Inoue, H. Otani and K. Kohmoto, "Cultivar-specific and Non-specific Responses in Tomato Cell Cultures to AL-toxin from *Alternaria alternata* Tomato Pathotype", *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, 1995, 61, 582.
- 11) 渡邊正己, "細胞増殖測定法", 組織培養, 1995, 27(12), 435.
- 12) H. Yamaue, H. Tanimura, M. Nakamori, K. Noguchi, M. Iwahashi, M. Tani, T. Hotta, K. Murakami and K. Ishimoto, "Clinical Evaluation of Chemosensitivity Testing for Patients with Colorectal Cancer Using MTT Assay", *Dis. Colon Rectum*, 1996, 39, 416.
- 13) T. Hotta, H. Tanimura, H. Yamaue, M. Iwahashi, M. Tani, T. Tsunoda, M. Tamai, K. Noguchi, S. Mizobata, K. Ariei and H. Terasawa, "Tamoxifen Circumvents the Multidrug Resistance in Fresh Human Gastrointestinal Cancer Cells", *J. Surg. Res.*, 1996, 66, 31.

最新の情報は web へ  で検索

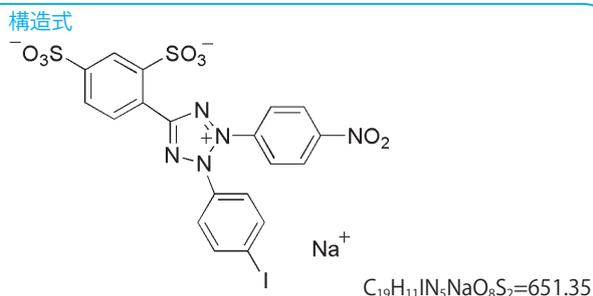
細胞増殖 / 毒性
酸化ストレス
分子生物学
細胞内蛍光プローブ
細胞染色
細菌研究用試薬
膜タンパク質
ラベル
化学剤
二価性試薬
酸化還元
イオン電極
シンチレーター
生化学用緩衝剤
キレート
比色 / 金属試薬
水質分析用
溶媒抽出
高純度溶媒
その他
機能性有機材料

## WST-1

2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulphophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt [CAS No. 150849-52-8]

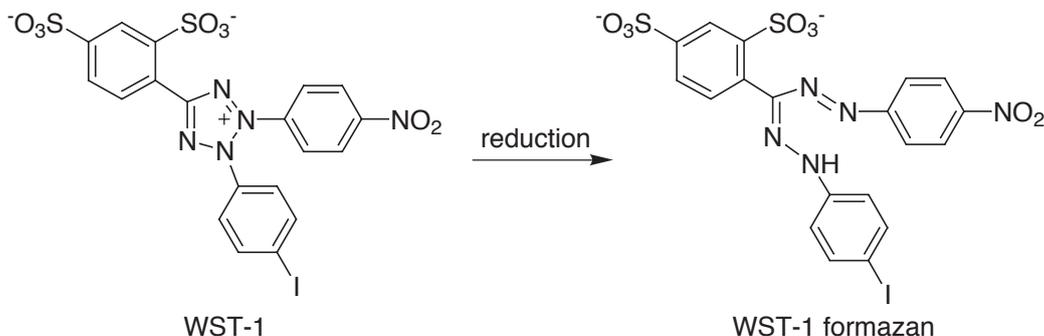
	同仁品コード: W201
25 mg	¥10,400 342-06451
100 mg	¥22,400 348-06453
500 mg	¥71,800 346-06454

規格	(1) 性状: 淡黄色～黄褐色粉末
	(2) 水溶状: 試験適合
	(3) モル吸光係数: 21,600 以上 (244 nm 付近)
	(4) 水分: 6.0% 以下
	(5) 鋭敏度: 試験適合
	(6) 薄層クロマトグラフィー: 試験適合
	(7) IR スペクトル: 試験適合
	(8) NMR スペクトル: 試験適合
溶解例	10 mg/ml(水)、6.5 mg/10 ml(50 mmol/l トリス buffer, pH8.0)
取扱注意	1. 保存方法: 冷蔵



**性質** 現在、還元型発色試薬の MTT は生化学分野で広く利用されている。しかし、MTT から生じるホルマザンは、水に難溶な結晶として細胞表面に析出するため、吸光度測定時には、それを溶解させ均一溶液にする操作が必要になる。そこで、水溶性ホルマザンを生じるテトラゾリウム塩 WST-1

は 1-Methoxy PMS を電子キャリアーとして用いると、脱水素酵素により還元され黄色ホルマザン (λ<sub>max</sub>=438 nm、ε=3.7 × 10<sup>4</sup>) を生じる。生じたホルマザンは 0.1 mol/l 以上の濃度で水に溶解する。



## 参考文献

- 1) M. Ishiyama, M. Shiga, K. Sakamoto, M. Mizoguchi and Pin-Gang He, "A New Sulfonated Tetrazolium Salt That produces a Highly Water-soluble Formazan Dye", *Chem. Pharm. Bull.*, 1993, 41, 1118.
- 2) T. Yano, K. Teruya, S. Shirahata, J. Watanabe, K. Osada, H. Tachibana, H. Ohashi, Eun-Ho Kim and H. Murakami, "Ras Oncogene Enhances the Production of a Recombinant Protein Regulated by the Cytomegalovirus Promoter in BHK-21 Cells", *Cytotechnology*, 1994, 16, 167.
- 3) K. Teruya, T. Yano, S. Shirahata, J. Watanabe, K. Osada, H. Ohashi, H. Tachibana, Eun-Ho Kim and H. Murakami, "Ras Amplification in BHK-21 Cells Produces a Host Cell Line for Further Rapid Establishment of Recombinant Protein Hyper-producing Cell Lines", *Biosci. Biotech. Biochem.*, 1995, 59, 341.
- 4) M. Ishiyama, K. Sasamoto, M. Shiga, Y. Ohkura and K. Ueno, "Novel Disulfonated Tetrazolium Salt That can be Reduced to a Water-soluble Formazan and Its Application to the Assay of Lactate Dehydrogenase", *Analyst*, 1995, 120, 113.
- 5) M. Ishiyama, H. Tominaga, M. Shiga, K. Sasamoto, Y. Ohkura, K. Ueno and M. Watanabe, "Novel Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays Using a Tetrazolium Salt That Produces a Water-soluble Formazan Dye", *In Vitro Toxicology*, 1995, 8, 187.
- 6) S. Q. Liu, K. Saijo, T. Todoroki and T. Ohno, "Induction of Human Autologous Cytotoxic T Lymphocytes on Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Tumour Sections", *Nat. Med.*, 1995, 1(3), 267.
- 7) T. Takenouchi and E. Munekata, "Trophic Effects of Substance P and β-Amyloid Peptide on Dibutyryl Cyclic AMP-Differentiated Human Leukemic (HL-60) Cells", *Life Sci.*, 1995, 56, 479.
- 8) T. Iwaki, A. Iwaki, Y. Fukumaki and J. Tateishi, "β-Crystallin in C6 Glioma Cells Supports their Survival in Elevated Extracellular K<sup>+</sup>: the Implication of a Protective Role of β-Crystallin Accumulation in Reactive Glia", *Brain Res.*, 1995, 673, 47.
- 9) 渡邊正己, "細胞増殖測定法", 組織培養, 1995, 21(12), 435.
- 10) M. Ishiyama, H. Tominaga, M. Shiga, K. Sasamoto, Y. Ohkura and K. Ueno, "A Combined Assay of Cell Viability and vitro Cytotoxicity with a Highly Water-soluble Tetrazolium Salt, Neutral Red and Crystal Violet", *Biol. Pharm. Bul.*, 1996, 19, 1518.
- 11) 溝口誠, 石山宗孝, 志賀匡宣, 佐々本一美, 臨床化学分析における新規な酸化及び還元発色試薬の開発, *分析化学*, 1996, 45, 111.
- 12) T. Mosmann, "Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays", *J. Immunol. Methods*, 1983, 65, 55.
- 13) A. H. Cory, T. C. Owen, J. A. Bartrop and J. G. Cory, "Use of an Aqueous Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth Assays in Culture", *Cancer Commun.*, 1991, 3, 207.
- 14) N. W. Roehm, G. H. Rodgers, S. M. Hatfield and A. L. Glasebrook, "An Improved Colorimetric Assay for Cell Proliferation and Viability Utilizing the Tetrazolium Salt XTT", *J. Immunol. Methods*, 1991, 142, 257.
- 15) 本多宏明, 小澤善徳, 森川秀行, 水村津与志, 長田嘉穂, 鈴木昌治, "マイクロプレートリーダーを用いるしょうゆ中 L-グルタミン酸, グルコースおよびアミノ基の定量", 醤油の研究と技術, 2005, 37(2), 63.

最新の情報は web へ [同仁化学 W201](#) で検索

## SPiDER-βGal

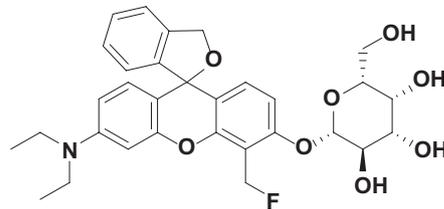
(2S,3R,4S,5R,6R)-2-[3'-(Diethylamino)-5'-(fluoromethyl)-3H-spiro(isobenzofuran-1,9'-xanthen)-6'-yl]oxy)-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triol  
[ CAS No. 1824699-57-1 ]

同仁品コード：SG02  
20 μg × 3 ￥42,000

**Protocol:** 「β-galactosidase を検出したい」

- 規格**
- (1) 性状：赤色～赤紫色固体
  - (2) 純度 (HPLC)：85.0% 以上
  - (3) 蛍光スペクトル：試験適合
  - (4) NMR スペクトル：試験適合
- 取扱注意**
1. 保存方法：冷蔵

構造式



C<sub>31</sub>H<sub>34</sub>FNO<sub>8</sub>=567.60

**性質** 大腸菌由来のβ-ガラクトシダーゼ遺伝子 (lacZ) は、レポーター遺伝子アクセスマーカーとして幅広く用いられている。代表的なβ-galactosidaseの検出方法として、X-gal染色が広く利用されているが、細胞膜透過性が乏しいため、細胞や組織を固定化する必要がある。また、従来のβ-galactosidase 検出蛍光試薬は細胞内滞留性が低いため、β-galactosidase 未発現細胞と発現細胞を明瞭に区別できないことが課題であった。

これらの課題を克服するため、浦野、神谷らは細胞膜透

過性と細胞内滞留性を有する新たな蛍光試薬 SPiDER-βGal の開発に成功した<sup>1)</sup>。本試薬は、β-galactosidase との酵素反応により、キノンメチドと呼ばれる中間体を形成して、近傍のタンパク質中のSH基等の求核性基と安定な共有結合を形成し、蛍光性になる。このように、反応した試薬が細胞内タンパク質に固定化されることで優れた細胞内滞留性を有し、その結果、β-galactosidase 発現細胞を一細胞レベルで明確に検出することが可能となる。

## 測定原理

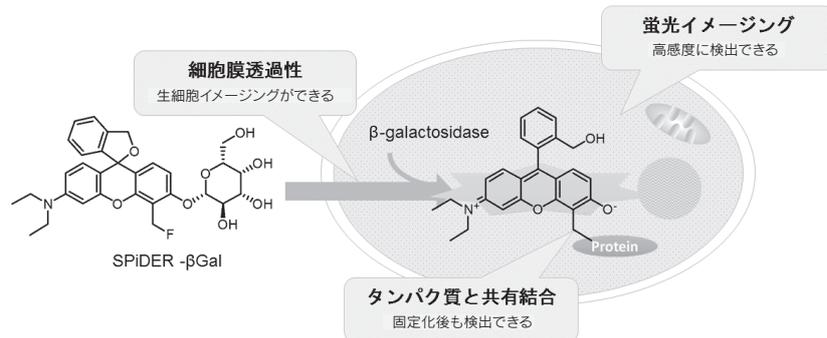


図1 SPiDER-βGalの細胞染色原理

SPiDER-βGal は生細胞膜を透過した後、細胞中のβ-galactosidaseによる酵素反応を受け、その中間体はタンパク質中の求核性基と共有結合を形成することで細胞内に滞留する。

## 染色操作



## 蛍光特性

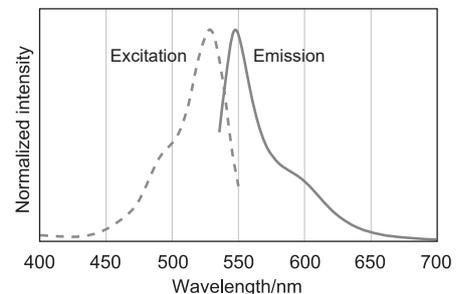


図2 β-galactosidase と反応後の SPiDER-βGal の励起・蛍光スペクトル

## 参考文献

- 1) T. Doura, M. Kamiya, F. Obata, Y. Yamaguchi, T. Y. Hiyama, T. Matsuda, A. Fukamizu, M. Noda, M. Miura and Y. Urano, "Detection of LacZ-Positive Cells in Living Tissue with Single-Cell Resolution.", *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2016, 55, 9620.
- 2) H. Omori, S. Ogaki, D. Sakano, M. Sato, K. Umeda, N. Takeda, N. Nakagata, and S. Kume, "Changes in expression of C2cd4c in pancreatic endocrine cells during pancreatic development.", *FEBS Lett.*, 2016, 590, 2584.

最新の情報は web へ  で検索

\*表示している希望納入価格は「本体価格のみ」で消費税等は含まれておりません。社会状況の変動により、予告なしに変更することがありますので、最新の価格は HP にてご確認ください。

細胞増殖 / 毒性酸化ストレス分子生物学細胞内蛍光プローブ細胞染色細菌研究用試薬膜タンパク質ラベル化剤二価性試薬酸化還元イオン電極シンチレーター生化学用緩衝剤キレート比色 / 金属試薬水質分析用溶媒抽出高純度溶媒その他機能性有機材料