



販売中止のお知らせ

お客様各位

いつも小社製品をご愛顧頂きありがとうございます。

2020年2月1日より下記製品は販売中止となりますため、

本冊子に記載の製品に関してご注意頂きますようよろしくお願い申し上げます。

販売中止品目

製品コード	製品名	容量
A386	-Cellstain- AO	1 mg
CS21	Calcium Kit - Fluo 3	2000 assays
E262	-Cellstain- EB	1 mg
E272	-Cellstain- EB solution	1 ml

ご不明点等がございましたら、小社カスタマーサポートまでお問い合わせ下さ

い。フリーダイヤル 0120-489548



Reagents for Cell Biology



<http://www.dojindo.co.jp>

Reagents for Cell Biology

1. Intracellular transduction

- ・細胞内カルシウムイオン測定用試薬..... p1 ~ 10
Fura 2, Fura 2-AM, Fluo3, Fluo 3-AM, Fluo 4-AM, Rhod 2, Rhod 2-AM,
Indo-1, Indo-1-AM solution, Quin 2, Calcium Kit 類, Coelenterazine-WS
- ・細胞内亜鉛イオン測定用蛍光試薬..... p11
Dansylaminoethyl-cyclen, Zinquin ethyl ester
- ・細胞内 pH 測定用蛍光試薬..... p12
BCECF, BCECF-AM
- ・細胞内塩化物イオン測定用蛍光試薬..... p12
MQAE
- ・膜電位感受性色素..... p13
DiBAC₄(3)
- ・Caged 化合物 p14
Caged ATP
- ・キレート試薬、他..... p15, 16
GEDTA(EGTA), BAPTA, BAPTA-AM solution, TPEN, Ins(1,4,5)P₃(synthetic), MATP+

2. Cell staining

- Cellstain- 群
- ・生細胞染色用色素..... p18, 19
Calcein-AM, BCECF-AM special packaging, CFSE, FDA, CytoRed solution
- ・死細胞染色用色素..... p19
DAPI, EB, PI
- ・ミトコンドリア染色用色素..... p20
MitoRed, Rh123
- ・核染色用色素..... p21
AO, Hoechst 33258, Hoechst 33342
- ・細胞二重染色キット..... p22
Double Staining Kit

細胞内カルシウムイオン測定用試薬

カルシウムイオン Ca^{2+} は、細胞内情報伝達機構の中でセカンドメッセンジャーとしての重要な役割を担っている。その働きは、様々な酵素の活性を速く濃度依存的に制御することである。 Ca^{2+} 依存性酵素は多種存在し、細胞の収縮・弛緩や分泌、遺伝子発現などの様々な細胞応答に関わっている。calcium oscillation や calcium wave 等の Ca^{2+} のダイナミクスと細胞応答との相関も着目されており、細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) や Ca^{2+} の時間的・空間的局在を知ることが極めて重要な意味を持つと考えられている。

細胞内カルシウムイオン測定用蛍光色素 (カルシウムプローブ) は下記に示すものがあり、測定装置・目的により選択されることをおすすめする。

〈各カルシウムプローブの特性〉

製品名	励起波長 $\lambda_{\text{ex}}(\text{nm})$	蛍光波長 $\lambda_{\text{em}}(\text{nm})$	解離定数 $K_d(\mu\text{mol/l})$	参考文献
Fura 2	340(Ca 錯体) 380(Ca free)	510*	0.224	2
Fluo 4	495	518	0.345	4
Fluo 3	508	527	0.40	3
Rhod 2	553	576	1.0	3
Indo 1	330*	410(Ca 錯体) 485(Ca free)	0.250	2
Quin 2	339	492	0.115	1

* 条件により変動する。

参考文献

- 1) R. Y. Tsien, *Biochemistry*, **1980**, 19, 2396.
- 2) G. Grynkiewicz, M. Poenie, R. Y. Tsien, *J. Biol. Chem.*, **1985**, 260, 3440.
- 3) A. Minta, J. P. Y. Kao, R. Y. Tsien, *J. Biol. Chem.*, **1989**, 264, 8171.
- 4) K. R. Gee, K. A. Brown, W-N. U. Chen, J. Bishop-Stewart, D. Dray, I. Johnson, *Cell Calcium*, **2000**, 27, 97.

各カルシウムプローブの特長

Fura 2

2 励起・1 蛍光でのレシオ測定が可能。細胞内での濃度測定に適している。

Fluo 4

アルゴン (Ar) レーザーによる励起が可能。

Fluo 3

アルゴン (Ar) レーザーによる励起が可能。

Rhod 2

Kr レーザーや、He-Ne レーザーによる励起が可能。

Indo 1

1 励起・2 蛍光でのレシオ測定が可能。

Quin 2

Fura 2 と同じフィルターが使用可能。比較的安価。

—細胞内カルシウムイオン蛍光測定試薬（2 励起・1 蛍光）—

Fura 2, Fura 2-AM

Fura 2	1 mg	347-05421 ; 同仁品コード (F014)
Fura 2-AM	1 mg	- ; 同仁品コード (F015)
Fura 2-AM solution	1 ml	343-05401 ; 同仁品コード (F016)
Fura 2-AM special packaging	50 µg × 8	348-05831 ; 同仁品コード (F025)

Fura 2 は、最も汎用されている細胞内カルシウム蛍光試薬（カルシウムプローブ）の一つである。特長として、生理的条件下における $[Ca^{2+}]_i$ に近い解離定数を有することが挙げられる ($K_d=224$ mol/l)。そのため、刺激に対する $[Ca^{2+}]_i$ の変化に対応して、蛍光強度が大きく変化する。また Ca^{2+} 錯体の解離定数が小さすぎる場合、カルシウムプローブ自体の Ca^{2+} 緩衝作用によって $[Ca^{2+}]_i$ が低く抑制され、刺激に対する細胞の応答を抑制してしまうことが想定される。しかし、常法にしたがって Fura 2 を $\mu\text{mol/l}$ レベル前後で使用する場合には、そのような緩衝作用を無視し得る場合が多い。

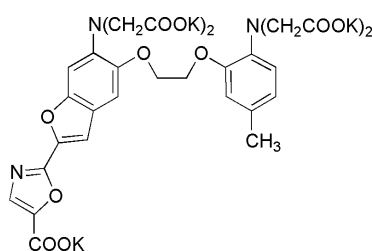
Ca^{2+} 錯体を形成することによって、励起波長がシフトすることも特長の一つである ($\lambda_{ex}=362$ nm $\rightarrow$ 335 nm)。370 ~ 380 nm で励起した場合には $[Ca^{2+}]_i$ の上昇につれて蛍光強度が減少し、逆に 340 nm 近辺で励起した場合には蛍光強度が増大する。適切な二波長の励起光を照射し、両波長における蛍光強度の比を取ることによって、Fura 2 濃度や励起光強度、試料の厚みなどに影響されない、より正確な $[Ca^{2+}]_i$ 測定が可能になる。この測定を *ratiometry* と呼び、 $[Ca^{2+}]_i$ は下式で表される。

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \times (R - R_{min}) / (R_{max} - R) \times (F_{free} / F_{bound})$$

ここで、R は波長 λ_1 と λ_2 における蛍光強度の比を示し、 R_{min} は $[Ca^{2+}]_i$ が十分に低い場合の R を、 R_{max} は $[Ca^{2+}]_i$ が十分に高い場合の R である。 F_{free} は $[Ca^{2+}]_i$ が十分に低い場合の λ_2 における蛍光強度、 F_{bound} は $[Ca^{2+}]_i$ が十分に高い場合の λ_2 における蛍光強度をそれぞれ表す。

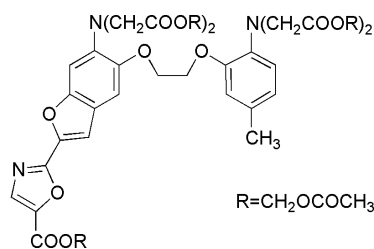
Fura 2-AM は Fura 2 の 5 つのカルボキシル基を AM(acetoxymethyl) 化し、脂溶性を高めたものである。その脂溶性によって細胞膜を通過することが出来るが、一旦細胞内に導入されると細胞内エステラーゼによって AM エステルが加水分解を受け、Fura 2 を再生する。従って、Fura 2-AM 溶液を細胞外液に添加してインキュベーションするだけで、Fura 2 を細胞内に導入することが可能である。

Fura 2 そのものは、細胞膜透過性を有していないので、ご使用の際にはご注意ください。



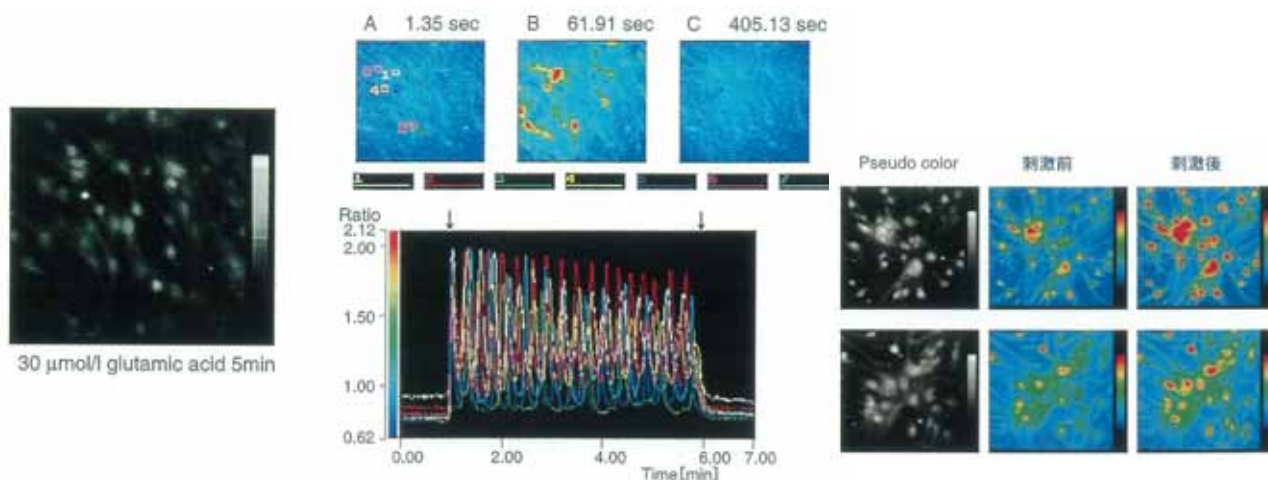
Fura 2

1-[6-Amino-2-(5-carboxy-2-oxazolyl)-5-benzofuranyloxy]-2-(2-amino-5-methylphenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid, pentapotassium salt
C₂₉H₂₂K₅N₃O₁₄=831.99
[CAS No.96314-98-6]



Fura 2-AM

1-[6-Amino-2-(5-carboxy-2-oxazolyl)-5-benzofuranyloxy]-2-(2-amino-5-methylphenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid, pentaacetoxymethyl ester
C₄₄H₄₇N₃O₂₄=1001.85
[CAS No.108964-32-5]



アストログリアを選択的に培養して、特殊な処理を加えると、グルタミン酸に対して激しいカルシウムオシレーションを生ずるようになる (Fura 2-AM で染色)。画面中のほとんど全ての細胞がカルシウムオシレーションを示している。1 秒毎の蛍光イメージを解析した。

(使用画像処理装置: ARGUS/HiSCA; 顕微鏡 ニコン C600、対物レンズ 40 倍)

(データ提供: 東京薬科大学生命科学部 工藤佳久先生)

—細胞内カルシウムイオン蛍光測定試薬（1 励起・1 蛍光）—

Fluo 3, Fluo 3-AM

Fluo 3	1 mg	345-05721	； 同仁品コード (F019)
Fluo 3-AM	1 mg	-	； 同仁品コード (F023)
Fluo 3-AM special packaging	50 µg × 8	349-06961	； 同仁品コード (F026)

Fluo 3 は、可視光励起を実現するために、蛍光性化合物 fluorescein 様の構造を分子内に導入したカルシウムプローブである。極大励起波長、極大蛍光波長とも fluorescein と同様である ($\lambda_{ex}=508$ nm、 $\lambda_{em}=527$ nm)。

励起光源として紫外光を必要とするカルシウムプローブを用いる場合、紫外光照射によって活性酸素種が発生し、DNA 損傷等の影響を細胞に与えてしまう可能性がある。また、NADH などの蛍光性化合物による自家蛍光の影響を無視し得ない。それに対して、可視光励起のカルシウムプローブを利用した場合には、それらの妨害を回避することが可能となり、より高感度な測定が可能となる。更に、Caged 化合物 (紫外光による光化学反応を利用して生理活性物質を細胞内の局所に添加できる試薬) との併用も可能である。

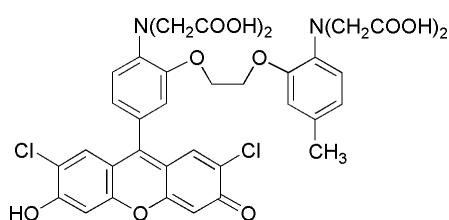
Ca^{2+} に対する親和性は Fura 2 よりもやや低く ($K_d=400$ nmol/l)、比較的高濃度域の $[Ca^{2+}]_i$ 変化を知るのに適する。また、Ar レーザー (488 nm) を励起光源として使用することが可能であるため、共焦点レーザー顕微鏡やフローサイトメーター等での使用にも適する。尚、 $[Ca^{2+}]_i$ の導出には、下式を用いる。ここで、F は蛍光強度を表す。F_{min} は $[Ca^{2+}]_i$ が十分に低い場合の F を、F_{max} は $[Ca^{2+}]_i$ が十分に高い場合の F である。

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \times (F - F_{min}) / (F_{max} - F)$$

近年では、High-throughput screening に対応したシステムも提供されている。 $[Ca^{2+}]_i$ 変化が、各種刺激に対する細胞応答を知るための、迅速かつ簡便な指標として用いられることから、Drug screening にも使用されている。

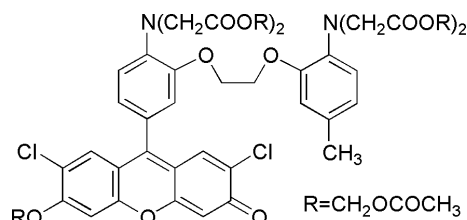
Fluo 3 は、遊離酸であるため、そのままでは水に溶解しない。Fluo 3 1 mg に 0.1N NaOH (または KOH) 溶液 50 µl を加え、Fluo 3 を完全に溶解して水溶液を調製する。その上で、適切な緩衝液で希釈して実験に使用する。

Fluo 3-AM は、Fluo 3 のカルボキシル基を脂溶性のアセトキシメチルエステル体にして細胞膜透過性としたものである。細胞懸濁液に混ぜるだけで容易に細胞内に取り込まれ、細胞内のエステラーゼにより加水分解されて Fluo 3 を再生し、細胞内 Ca^{2+} を蛍光モニターできる。



Fluo 3

1-[2-Amino-5-(2,7-dichloro-6-hydroxy-3-oxo-9-xanthenyl)phenoxy]-2-(2-amino-5-methylphenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid
 $C_{36}H_{30}Cl_2N_2O_{13}=769.53$
 [CAS No.123632-39-3]



Fluo 3-AM

1-[2-Amino-5-(2,7-dichloro-6-acetoxymethoxy-3-oxo-9-xanthenyl)phenoxy]-2-(2-amino-5-methylphenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid, tetra(acetoxymethyl) ester
 $C_{51}H_{50}Cl_2N_2O_{23}=1129.85$
 [CAS No.121714-22-5]

—細胞内カルシウムイオン蛍光測定試薬（1 励起・1 蛍光）—

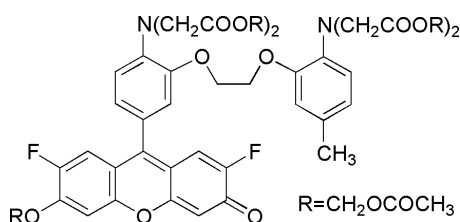
Fluo 4-AM

Fluo 4-AM 1 mg ; 同仁品コード (F311)
Fluo 4-AM special packaging 50 µg × 8 ; 同仁品コード (F312)

Fluo 4 は Fluo 3 のクロロ基 (Cl) をフルオロ基 (F) へと置きかえた構造を持つカルシウム蛍光プローブである。より電子吸引力の高いフルオロ基に置き換わったことで、励起極大波長は Fluo 3 よりも約 10 nm 短波長側にシフトしている。これはアルゴンレーザーの波長により近い。そのため、アルゴンレーザー励起による Fluo 4 の蛍光強度は Fluo 3 の約 2 倍と高感度である。

Fluo 4 の Ca^{2+} 親和力は Fluo 3 と近い値であるため (Fluo 3 : $K_d=0.4 \mu\text{mol/l}$, Fluo 4 : $K_d=0.345 \mu\text{mol/l}$)、汎用されている Fluo 3 と同様に、共焦点レーザー顕微鏡やフローサイトメーターなどの装置を用いた細胞内のカルシウムイオンの濃度変化を観察するのに有用である。

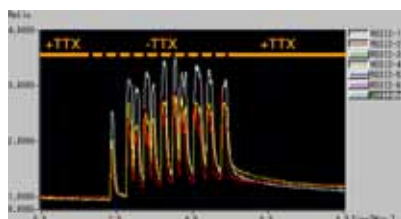
Fluo 4-AM は Fluo 4 のカルボキシル基を脂溶性のアセトキシメチルエステル体にして細胞膜透過性としたものである。細胞懸濁液に混ぜるだけで容易に細胞内に取り込まれ、細胞内のエステラーゼにより加水分解されて Fluo 4 を再生し、細胞内 Ca^{2+} を蛍光モニターできる。



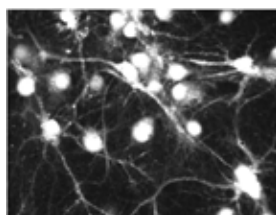
Fluo 4-AM

1-[2-Amino-5-(2,7-difluoro-6-acetoxymethoxy-3-oxo-9-xanthenyl)phenoxy]-2-(2-amino-5-methylphenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid, tetra(acetoxymethyl) ester
 $\text{C}_{51}\text{H}_{50}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_{23}=1096.94$
[CAS No.273221-67-3]

<ニューロン興奮性自発的活動>



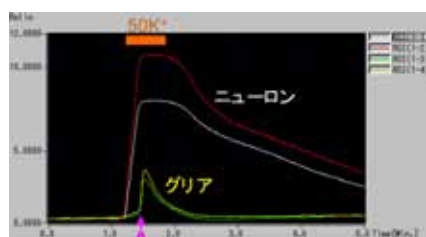
1-a Ca 濃度変化



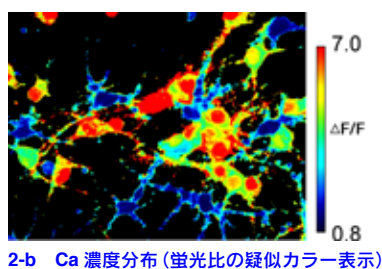
1-b Fluo 4-AM の蛍光染色像

ラット海馬初代培養細胞で、TTX のない状態では自発的に興奮状態となり、ニューロン間で同期して、Ca 濃度に変化している (1-a)。 (1-b) は興奮時の Fluo 4-AM 染色画像。
(Fluo 4-AM 5 µmol/l, インキュベート 45 min)

<脱分極刺激>



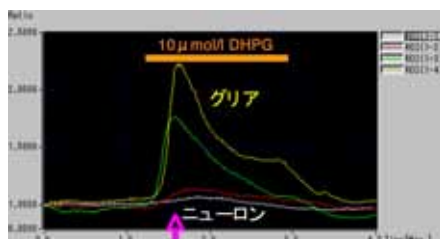
2-a Ca 濃度変化



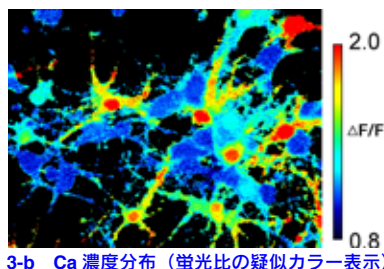
2-b Ca 濃度分布 (蛍光比の疑似カラー表示)

ラット海馬初代培養細胞を 50K^+ , 30 sec で脱分極刺激した時の Ca 濃度変化 (2-a) および A の時点での Ca 濃度分布 (2-b)。

< mGluR 刺激 >



3-a Ca 濃度変化



3-b Ca 濃度分布 (蛍光比の疑似カラー表示)

ラット海馬初代培養細胞を 10 µmol/l DHPG で mGluR 刺激した時の Ca 濃度変化 (3-a) および B の時点での Ca 濃度分布 (3-b)。

(データ提供：科学技術振興機構 カルシウム振動プロジェクト 中村 健先生)

—細胞内カルシウムイオン蛍光測定試薬 (1 励起・1 蛍光) —

Rhod 2, Rhod 2-AM

Rhod 2	1 mg	344-05811 ; 同仁品コード (R001)
Rhod 2-AM	1 mg	341-05821 ; 同仁品コード (R002)

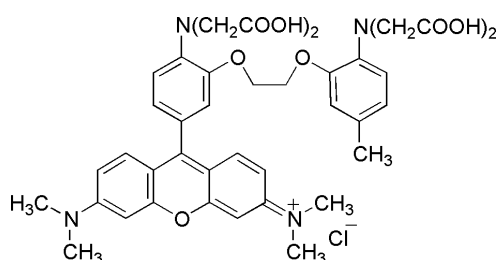
可視光励起のカルシウムプローブである。蛍光性化合物である rhodamine 様の構造を分子内に有するため、rhodamine 同様の極大励起波長、極大蛍光波長を有する ($\lambda_{ex}=553$ nm、 $\lambda_{em}=576$ nm)。

可視光励起であるため、紫外光励起の場合に問題となる細胞の損傷や自家蛍光を回避することができる。Kr レーザー (568 nm) や He-Ne レーザー (543 nm) を励起光源として利用することができるため、共焦点レーザー顕微鏡による高解像度の観察等にも使用することが可能である。また、Caged 化合物との併用も可能である。

Ca^{2+} に対する親和性は、Fluo 3 よりも更に弱く、 $K_d=1.0$ $\mu\text{mol/l}$ と報告されている。したがって、より高濃度域での $[Ca^{2+}]_i$ の変化を知るのに適したカルシウムプローブであると考えられる。

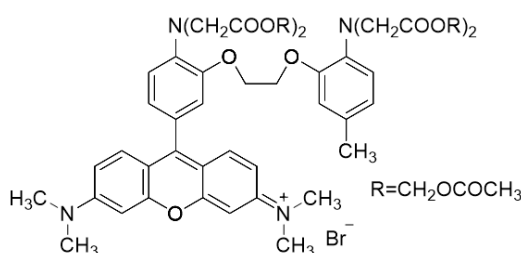
他のカルシウムプローブと同様、AM エステルの形で提供されており、それを用いることによって細胞内に容易に導入することが可能である。

また、Rhod 2 は、ミトコンドリア内 Ca^{2+} 濃度を測定するのに適しているという報告がある。分子内の rhodamine 様骨格による性質であると考えられる。



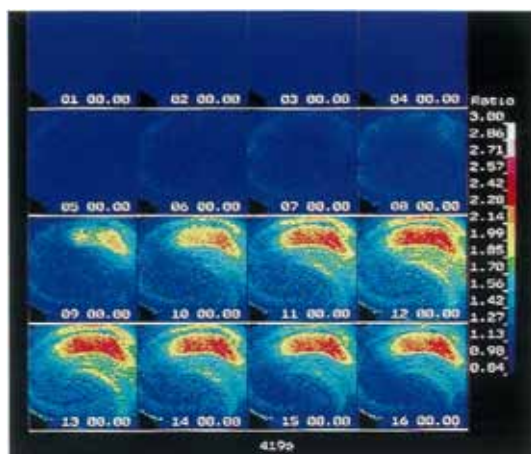
Rhod 2

1-[2-Amino-5-(3-dimethylamino-6-dimethylammonio-9-xanthenyl)phenoxy]-2-(2-amino-5-methylphenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid, chloride
 $C_{40}H_{43}ClN_4O_{11}=791.24$
 [CAS No.132523-91-2]



Rhod 2-AM

1-[2-Amino-5-(3-dimethylamino-6-dimethylammonio-9-xanthenyl)phenoxy]-2-(2-amino-5-methylphenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid, tetraacetoxymethyl ester, bromide
 $C_{62}H_{59}BrN_4O_{19}=1123.94$
 [CAS No.145037-81-6]



ラット海馬スライスを 10 $\mu\text{mol/l}$ の Rhod 2-AM で染色して、虚血状態にしたときの細胞内カルシウム濃度の変動部位差。カラスケールは最初の蛍光強度からの変化率を示している。

上段の一番右 (04.00.00) の所から虚血人工脳脊髄液でかん流した。約 5 分後から CA1 領域でカルシウムの上昇が生じていることが分かる。

(データ提供 : 東京薬科大学 工藤佳久先生)

—細胞内カルシウムイオン蛍光測定試薬（1 励起・2 蛍光）—

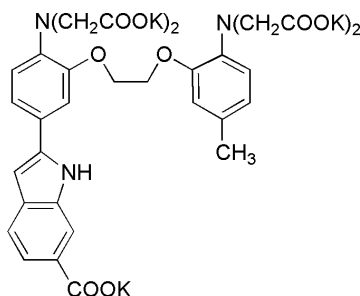
Indo 1, Indo 1-AM solution

Indo 1 **1 mg** **341-05561 ; 同仁品コード (I004)**
Indo 1-AM solution **1 ml** **348-05571 ; 同仁品コード (I006)**

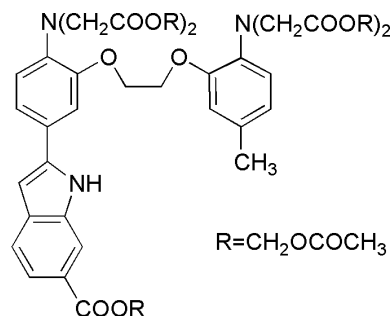
Fura 2 と同時に報告されたカルシウムプローブである。Ca²⁺ に対する親和性は、Fura 2 とほぼ同等であり ($K_d=250$ nmol/l)、一般的に、生理的条件下の [Ca²⁺]_i の変化を知るのに適切なカルシウムプローブである。

Fura 2 と異なる点は、Ca²⁺ 錯体形成に伴って、励起波長ではなく蛍光波長が変化することである ($\lambda_{em}=485$ nm → 410 nm)。この特性のため Fura 2 と同様に **ratiometry** が可能であるが、励起波長を高速に変化させる必要が無く、速い [Ca²⁺]_i 変化を追跡するのにより適していると考えられる。また、原理的に励起波長を変化させることの出来ないフローサイトメトリー等でも **ratiometry** を行うことが可能である。

Indo 1-AM は、Indo 1 を AM 化して細胞膜透過性としたものである。他プローブの AM エステルと同様に、容易に細胞内に導入することが可能である。



Indo 1
1-[2-Amino-5-(6-carboxy-2-indolyl)phenoxy]-2-(2-amino-5-methylphenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid, pentapotassium salt
 $C_{32}H_{26}K_5N_3O_{12}=840.05$
[CAS No.96314-96-4(free acid)]



Indo 1-AM
1-[2-Amino-5-(6-carboxy-2-indolyl)phenoxy]-2-(2-amino-5-methylphenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid, pentaacetoxymethyl ester
 $C_{47}H_{51}N_3O_{22}=1009.91$
[CAS No.112926-2-0]

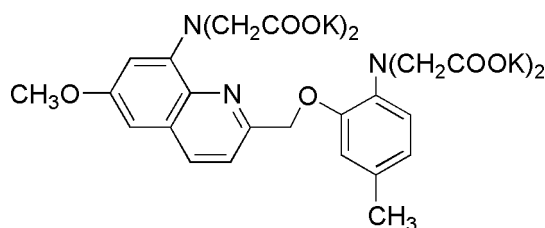
—細胞内カルシウムイオン蛍光測定試薬（1 励起・1 蛍光）—

Quin 2

Quin 2 **50 mg** **340-04713 ; 同仁品コード (Q001)**

Quin 2 は R. Y. Tsien らによって合成されたカルシウムに特異的な蛍光指示薬で、カルシウムと錯形成することによって強い蛍光を示す。マグネシウムとの反応は無視できる。カルシウム選択性の GEDTA の分子構造に蛍光性のキノリン骨格を組込むことにより、Mg²⁺ に対して約 10⁵ 倍の選択性を可能とした ($\log K_{Ca}=7.1$, $\log K_{Mg}=2.7$)。メトキシ基の存在によって、高い蛍光量子収率を示す (Ca 錯体の $\phi=0.14$)。カルシウム錯体の蛍光励起波長は 339 nm、蛍光波長は 492 nm である。

和田らは高濃度食塩溶液 (5 mol/l NaCl) 中の微量カルシウムの蛍光検出フローインジェクション分析法に Quin 2 を適用し、10⁻⁶ mol レベルの Ca²⁺ の迅速定量を可能とした。食塩電解隔膜法の電解槽のモニター法として有用である。



Quin 2
8-Amino-2-[(2-amino-5-methylphenoxy)methyl]-6-methoxyquinoline-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid, tetrapotassium salt
 $C_{26}H_{23}K_4N_3O_{10}=693.87$
[CAS No.73630-23-6]

ー洗浄不要な細胞内カルシウム測定キットー

Calcium Kit II - iCellux

Calcium Kit II - iCellux 10 plates ; 同仁品コード (CS34)

本キットは、細胞内カルシウムイオン測定蛍光試薬と測定に必要なバッファー等を組み込んだキットである。薬剤低濃度領域のシグナル応答を大幅に向上し、96 穴、384 穴のマイクロプレートでの測定に最適化している。

これまでの Calcium Kit II シリーズと同様に、溶液中のバックグラウンド蛍光を消去するクエンチャーを用いることで、カルシウムプローブを細胞へ負荷した後の洗浄操作を行うことなく、細胞内カルシウム濃度変化を測定できる。洗浄操作が不要となるため、HEK293 細胞などの剥離しやすい細胞を使用する場合や、薬剤スクリーニングを行う場合に適している。また、細胞種や添加する薬剤などに応じて、製品に付属した Probenecid (陰イオントランスポーター阻害剤) 溶液を添加することが可能である。

ただし、細胞種や添加する薬剤によっては、「レスポンスの高低」「リガンドとの相互作用」などが生じることがある。測定系に影響の少ない方法での測定を行いたい場合は、Wash タイプで姉妹品の「Calcium Kit - Fluo 4」をご使用いただきたい。

本キットでは、96 穴プレート 10 枚分の測定が可能である。測定にはクリアボトムのプレートと下方励起・下方蛍光測定が可能なプレートリーダーをご使用いただきたい。

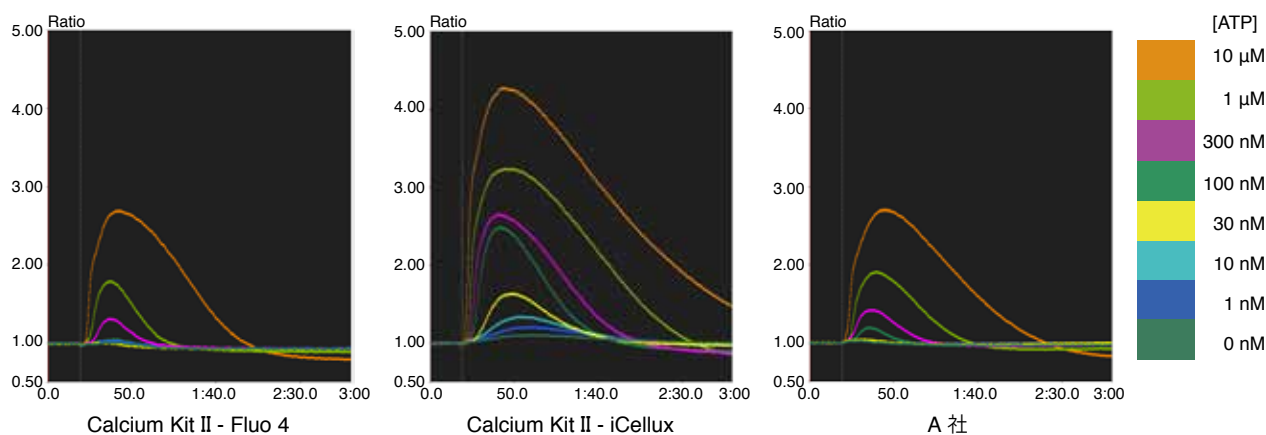
【特長】

- 1) 薬剤低濃度領域のシグナル応答が向上 (小社 Calcium Kit II - Fluo 4 比較)。
- 2) Ca^{2+} プローブを添加した後の細胞洗浄は不要。
- 3) Fluo 3 や Fluo 4 と同様の蛍光特性を有するプローブを使用。
- 4) 96 穴、384 穴の両方のマイクロプレートに対応。

【キット内容】

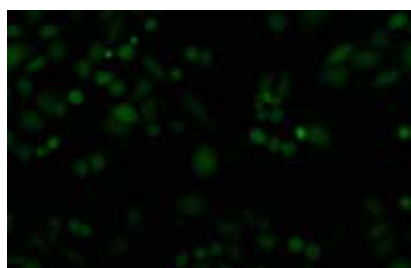
・ Calcium Probe	× 10
・ Dimethylsulfoxide	2 ml × 1
・ 250 mmol/l Probenecid	1.3 ml × 1
・ Quenching Buffer	100 ml × 1

< FDSS7000EX を用いた細胞内カルシウム測定結果 >

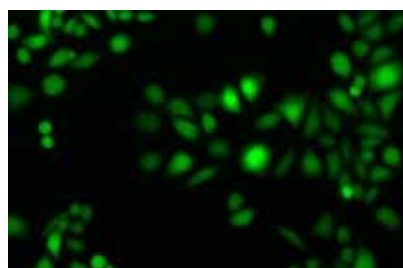


細胞 : CHO-K1
 プレート : NUNC384 wells plate(Non-coating)
 刺激薬剤 : ATP, Final : 1 nM ~ 10 μM
 Probenecid : final 1.25 mM, Calcium Probe インキュベート時間 : 1hr
 (データ提供 : 浜松ホトニクス株式会社)

< CHO 細胞を ATP で刺激した時の蛍光画像 (ATP 終濃度 31 nmol/l) >



Calcium Kit II - Fluo 4



Calcium Kit II - iCellux

ー細胞内カルシウム測定キットー

Calcium Kit - Fluo 4

Calcium Kit - Fura 2

Calcium Kit - Fluo 3

Calcium Kit - Fluo 4 10 plates ; 同仁品コード (CS22)

Calcium Kit - Fura 2 10 plates ; 同仁品コード (CS23)

Calcium Kit - Fluo 3 2,000 assays ; 同仁品コード (CS21)

ー洗浄のいらぬ細胞内カルシウム測定キットー

Calcium Kit II - Fluo 4

Calcium Kit II - Fura 2

Calcium Kit II - Fluo 4 10 plates ; 同仁品コード (CS32)

Calcium Kit II - Fura 2 10 plates ; 同仁品コード (CS33)

細胞内カルシウム測定において広く使用されているカルシウム蛍光プローブ (Fluo 4-AM または Fura 2-AM, Fluo 3-AM)、各種試薬および Buffer を取り揃えたマイクロプレートリーダー測定に対応したキットである。

各カルシウムプローブに対し、測定系に影響の少ない Wash タイプ [Calcium Kit] と洗浄操作が不要な Non Wash タイプ [Calcium Kit II] を取り揃えており、測定系に応じて選択できる。

各キットには、カルシウムプローブの溶解補助剤である界面活性剤 2 種類 (Pluronic® F127, Cremophor® EL) とカルシウムプローブの細胞からの漏れだしを防止する陰イオントランスポーター阻害剤 1 種類 (Probenecid) が入っており、細胞種や添加する薬剤に応じてそれぞれの試薬の各濃度を任意に設定することが出来る。バッファーも添付してあるため、測定の前段階において、別途試薬を準備する必要はなく、簡便なキットとなっている。

Calcium Kit II には、バックグラウンド蛍光を消光する Quenching Buffer が入っており、洗浄操作をせずに測定することが可能である。操作がより簡単となり、大量スクリーニングにも応用可能である。ただし、細胞種や添加する薬剤によっては Quenching Buffer が測定結果に影響する可能性があるため、ご注意ください。

測定系に応じて Wash タイプ [Calcium Kit] と Non Wash タイプ [Calcium Kit II] をご選択いただきたい。

【特長】

- 1) キットには Probenecid や界面活性剤を組み込んであり、任意に濃度設定が可能である。
- 2) ハイスループットスクリーニングに用いられる各種蛍光プレートリーダーで測定可能である。
- 3) 96 穴マイクロプレート、384 穴マイクロプレートの両方に対応している。

【キット内容】

Calcium Kit (Fluo 4, Fura 2 共通)

※Wash タイプ

・ Fluo 4-AM (Fura 2-AM)	50 µg × 10
・ Dimethylsulfoxide	2 ml × 1
・ 5% Pluronic® F127	2.5 ml × 1
・ 5% Cremophor® EL	2.5 ml × 1
・ 250 mmol/l Probenecid	1.3 ml × 1
・ Recording Medium (2X)	100 ml × 1

Calcium Kit II(Fluo 4, Fura 2 共通)

※Non Wash タイプ

・ Fluo 4-AM (Fura 2-AM)	50 µg × 10
・ Dimethylsulfoxide	2 ml × 1
・ 5% Pluronic® F127	2.5 ml × 1
・ 5% Cremophor® EL	2.5 ml × 1
・ 250 mmol/l Probenecid	1.3 ml × 1
・ Hanks' HEPES Buffer (10X)	6 ml × 1
・ Quenching Buffer	55 ml × 1

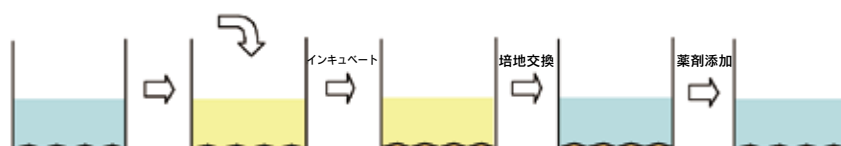
Calcium Kit - Fluo 3

・ Fluo 3 - AM	1 mg × 1
・ Dimethylsulfoxide	2 ml × 1
・ 5% Pluronic® F127	5 ml × 1
・ 5% Cremophor® EL	5 ml × 1
・ 250 mmol/l Probenecid	2.5 ml × 1
・ Recording Medium (2X)	100 ml × 1

Calcium Kit

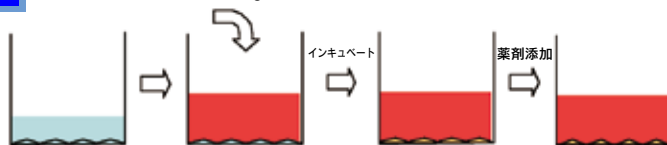
細胞内 Ca 測定試薬

* プレート上方からの測定も可能です。



Calcium Kit II

細胞内 Ca 測定試薬
+ Quenching Buffer



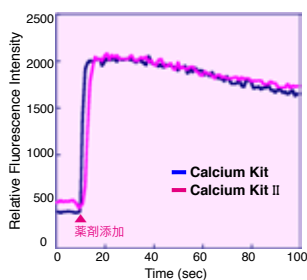
↑↓ 蛍光測定

Calcium Kit と Calcium Kit II それぞれの細胞内 Ca 測定手順

【測定例】

-Fluo 4 type-

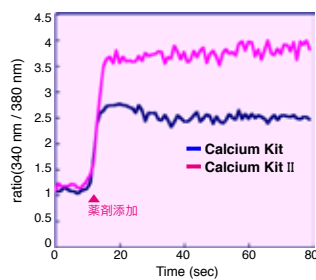
CHO 細胞を 25 $\mu\text{mol/l}$ ATP で刺激。



測定装置 :Infinit[®] M200 (TECAN)

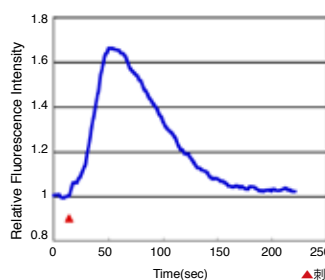
-Fura 2 type-

CHO 細胞を 1 $\mu\text{mol/l}$ ATP で刺激。



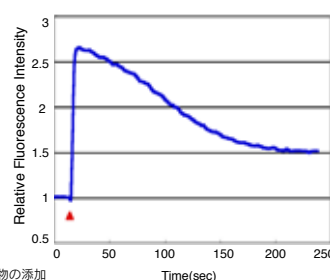
-Fluo 3 type-

Calcium Kit-Fluo 3 測定結果 (1)



メラニン凝集ホルモン (MCH) 受容体を発現させた CHO 細胞 (チャイニーズハムスター卵巣細胞 15,000 cells/well) を 10 nmol/l MCH で刺激した。

Calcium Kit-Fluo 3 測定結果 (2)



orexin B 受容体を発現させた CHO 細胞 (チャイニーズハムスター卵巣細胞, 15,000 cells/well) を 10 nmol/l orexin で刺激した。

カルシウムプローブの細胞への負荷方法

アセトキシメチル基を有するカルシウムプローブは、細胞と一定時間インキュベーションするだけで細胞内に導入することができる。ここでは Fura 2-AM を中心に記載するが、他の Fluo 3-AM, Fluo 4-AM, Rhod 2-AM 等も基本的には同様の操作で細胞に負荷できる。

1. Fura 2-AM の細胞への負荷方法

(1) 細胞

- ・初代培養肝細胞

(2) 試薬

- ・Fura 2-AM DMSO 溶液 (1 mmol/l)
- ・培養液 (DMEM, 5% ウシ胎児血清)
- ・Hanks' HEPES buffer (20 mmol/l HEPES, 115 mmol/l NaCl, 5.4 mmol/l KCl, 0.8 mmol/l MgCl_2 , 1.8 mmol/l CaCl_2 , 13.8 mmol/l glucose, pH7.4)

(3) 方法

- 1) Fura 2-AM DMSO 溶液 (1 mmol/l) を Hanks' HEPES buffer に 3.3 ~ 5 $\mu\text{mol/l}$ になるように加え、超音波処理する。
- 2) 培養液と置換して 37℃ で 30 ~ 60 分インキュベーションする。
* 細胞によっては取り込みにくいものもあり、その場合にはアルブミンや Cremophor[®] EL, Pluronic[®] F-127 などの界面活性剤を使用すると取り込み易くなります。
- 3) Fura 2-AM を含む緩衝液でのインキュベーション後、新しい Hanks' HEPES buffer と交換し、顕微鏡で観察する。

細胞内カルシウム測定装置について

(1) 蛍光分光光度計

多くは 200 ~ 700 nm の領域で蛍光スペクトルが測定できるようになっている。試料をキュベットに入れて測るため、 $10^6 \sim 10^7$ cells/ml の細胞が必要となる。測定された $[\text{Ca}^{2+}]$ は全細胞の平均的な濃度を表す。

(2) 蛍光顕微鏡

倒立型で落射蛍光を利用できる顕微鏡が多い。分光器は毎秒 100 ~ 1,000 回の光路切換えができ、Fura 2 を用いて高速の $[\text{Ca}^{2+}]$ 変化が測定できる。Indo 1 のような一波長励起二波長蛍光測定する場合、蛍光側でも分光できる機種が必要となる。顕微測光の範囲は直径 1 ~ 300 μm 程度まで選択できる。

(3) 顕微鏡画像処理

$[\text{Ca}^{2+}]$ の二次元分布を見ることができる。 $[\text{Ca}^{2+}]$ の計算は各画素毎に二波長分の蛍光像から TV カメラの固定ノイズパターンの値とバックグラウンド蛍光の分を差し引き、蛍光強度比を計算し、検量線を用いて濃度に変換する。結果は疑似カラーで表示することができる。連続的に測定した画像を次々切り換えていくことにより、経時的な変化を追うことができる。

カルシウムプローブを用いる際の注意点

- 1) カルシウムプローブの AM 体 (粉末) は水溶性が低いため、細胞に負荷する際には DMSO に溶かし、適当なバッファーに分散させ細胞に添加する。
* 高濃度に溶解したい場合、細胞への取り込みが悪い場合には、低毒性の界面活性剤 (Cremophor[®] EL, Pluronic[®] F-127 など) が良く用いられる。小社カルシウムプローブをお買い上げいただいた方には、ご要望により Pluronic[®] F-127 (1 g 包装) をサンプルとしてお送りしている。
- 2) 各種カルシウムプローブは DMSO 中では比較的安定であるが、バッファーに溶解 (希釈) すると非常に不安定になり、加水分解しやすい。バッファーに溶解後は直ぐに使用すること。
- 3) 調製した DMSO 溶液を一度に使用しない場合は、使用量分ずつ小分けして冷凍保存する。凍結融解を繰り返すと吸湿の危険性が高く試薬の分解が促進される場合がある。

Coelenterazine-WS

Coelenterazine-WS 1 mg ; 同仁品コード (C397)

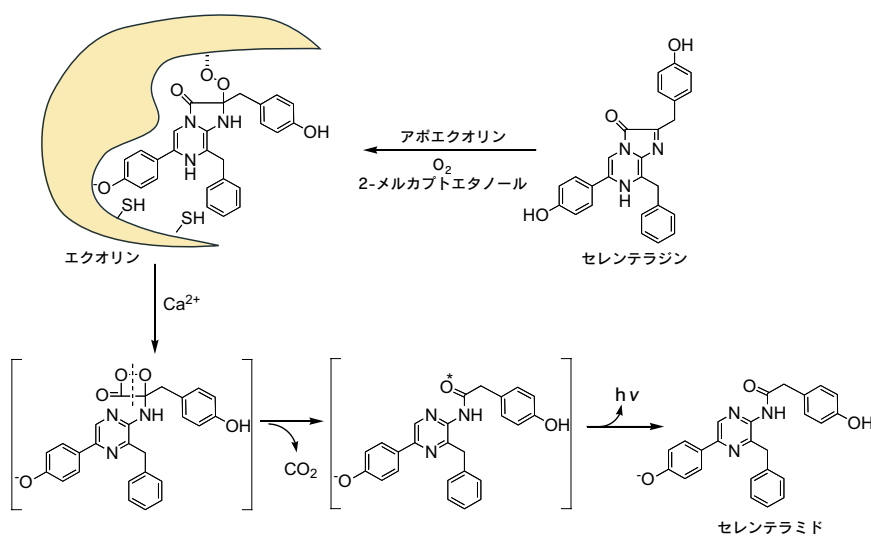
エクオリン (aequorin) は発光オワンクラゲ (aequorea) から単離された発光タンパク質であり、タンパク質部分であるアポエクオリン (apoequorin)、発光種であるセレンテラジン (coelenterazine)、および分子状酸素からなる複合体である。この複合体にカルシウムイオンが結合すると、タンパク質のコンフォメーションが変化し、セレンテラジンが酸化的に分解する過程で生じる励起カルボニル基が基底状態に戻るときのエネルギーが発光として放出されることが知られている。このエクオリンの発光は、極めて低濃度のカルシウムイオンの存在により起こるので、生理的条件下の細胞内カルシウムイオンの濃度測定にも使用することができる。

また、分子生物学的手法を用いて細胞内にアポエクオリンを導入する方法が確立され、更にセレンテラジンを細胞内に導入することによりエクオリンを再生させ、細胞内カルシウムイオンの濃度変化を発光により測定する実験系が開発されている。

セレンテラジンおよびその類縁化合物は、生体試料において一般的な中性近傍の pH における水溶性が低く、細胞内への導入は容易ではない。一般的にはメタノールに溶解後、培養液に添加するなどして試料溶液に添加されている。しかしながら、メタノールを使用するため、細胞への毒性の影響を避けることはできない。

ここで紹介する水溶性セレンテラジン (Coelenterazine-WS) は、セレンテラジンに包接化合物を添加して水溶性としたもので、中性領域における水溶性が飛躍的に向上し、そのため種々のバッファー溶液にも容易に溶解することができる。したがって、細胞への導入が容易になることによりエクオリンの発光性能を増加することができる。

Coelenterazine-WS 中のセレンテラジン含量は 2% である。



エクオリンの発光メカニズム

参考文献

- 1) K. Teranishi, O. Shimomura, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **1997**, 61, 1219.
- 2) J. Nakajima-Shimada, H. Iida, F. I. Tsuji, Y. Anraku, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1991**, 88, 6878.
- 3) S. Inoue, N. Noguchi, Y. Sakaki, Y. Takagi, T. Miyata, S. Iwanaga, T. Miyata, F. I. Tsuji, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1985**, 82, 3154.
- 4) J. R. Blinks, P. H. Mattingly, B. R. Jewell, M. van Leeuwen, G. C. Harrer, D. G. Allen, *Methods Enzymol.*, **1978**, 57, 292.
- 5) S. Inoue, Y. Sakaki, T. Goto, F. I. Tsuji, *Biochemistry*, **1986**, 25, 8425.
- 6) H. Iida, Y. Yagawa, Y. Anraku, *J. Biol. Chem.*, **1990**, 265, 13391.

細胞内亜鉛イオン測定用蛍光試薬

—細胞内亜鉛イオン蛍光測定試薬—

Dansylaminoethyl-cyclen, Zinquin ethyl ester

Dansylaminoethyl-cyclen 5 mg 341-07641; 同仁品コード (D480)
Zinquin ethyl ester 1 mg 347-07121; 同仁品コード (Z215)

亜鉛は、ヒトの体内において、鉄に次いで含量の多い必須微量元素である。しかし、細胞内でフリーの亜鉛イオン (Zn^{2+}) として存在するのは通常 nmol/l レベル以下であるとされており、細胞内の殆どの Zn^{2+} は主にタンパク質と強固な結合を作っていると考えられる。その働きは重要であり、タンパク質の構造の維持、酵素活性の制御などが挙げられる。また、転写因子等の DNA 結合タンパク質は zinc finger や LIM motif 等の Zn^{2+} 結合性のモチーフを有し、それを介して DNA に結合していると言われている。 Zn^{2+} の欠乏は DNA の転写などに影響を与え、発癌に関与している可能性も示唆されている。

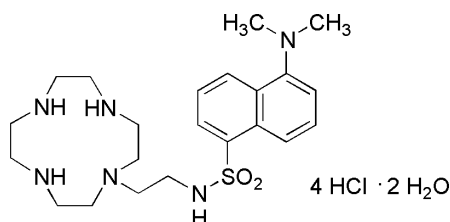
外因性 Zn^{2+} による脳細胞の選択的細胞死や、細胞死と相関の深い酵素の活性制御、酸化ストレスによる酵素活性中心への影響など、様々な研究が精力的に行われ亜鉛の生体内での働きに関する知見が集積されつつあるものの、その動態や局在については未知の部分が多い。

Zinquin ethyl ester は、 Zn^{2+} との錯形成によって蛍光強度が約 30 倍に増強する。一旦、細胞内に導入すると、細胞内エステラーゼによってエステル結合が加水分解を受け、水溶性が増し細胞外へ漏れにくくなると言われている。組織染色のほか、浮遊細胞への応用例も報告されている。

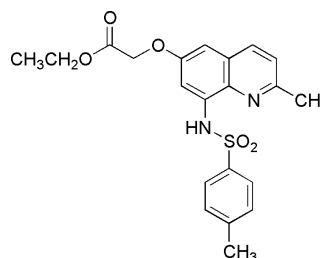
Dansylaminoethyl-cyclen は、 Zn^{2+} と 1 対 1 錯体のみを形成することと、水溶性であることが大きな特長である。また、Dansyl 基を有するため、他プローブに比較して蛍光強度が大きいことも有利な点である。 Zn^{2+} の濃度上昇につれ、蛍光強度が約 5 倍まで直線的に増強することが示されており、これまで困難であった定量への応用が期待されている。

これらは何れも Zn^{2+} 選択性が高いが、 Cd^{2+} や Cu^{2+} 等のイオンの妨害を受けるため、注意が必要である。 Cd^{2+} は、選択性は Zn^{2+} に劣るものの、試薬と蛍光性錯体を形成する。一方、 Cu^{2+} は蛍光消光を引き起す。ただし、これらを初めとする妨害金属イオンは何れも、細胞内濃度を勘案すると影響を無視できる場合が殆どであり、通常の測定に支障を来さない。

各化合物の特性を理解した上で、目的に応じたプローブを御利用いただきたい。

**Dansylaminoethyl-cyclene**

1-[2-[5-(Dimethylamino)-1-naphthalene-sulfonylamino]-ethyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecane, tetrahydrochloride, dihydrate
 $\text{C}_{22}\text{H}_{40}\text{Cl}_4\text{N}_6\text{O}_5\text{S} \cdot 2\text{H}_2\text{O}=630.50$
[CAS No.184537-03-9]

**Zinquin ethyl ester**

Ethyl [[2-methyl-8-[[[(4-methylphenyl)sulfonyl]amino]-6-quinolinyloxy]acetate
 $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}=414.48$

Zinquin ethyl ester を用いた B lymphoblastoid cell 中の Zn^{2+} の観察

1. 試薬

- Zinquin ethyl ester
- DMSO
- Hanks' balanced salt solution (HBSS)

2. 方法

- 1) Zinquin ethyl ester を DMSO に溶解してストック溶液とする。
- 2) B lymphoblastoid cell を HBSS に懸濁し ($5 \sim 10 \times 10^6$ cells/ml)、Zinquin ethyl ester の終濃度が $25 \mu\text{mol/l}$ となるようにストック溶液を加える。
- 3) 37°C で 30 分インキュベートする。
- 4) HBSS で 3 回洗浄し、 $2 \sim 5 \times 10^6$ cells/ml の細胞懸濁液とする。
- 5) 細胞懸濁液を、共焦点顕微鏡にて観察する。励起光としては、 365 nm の UV レーザーを利用する。apoptosis を起こす細胞において、細胞質中の Zn^{2+} 濃度が上昇し、蛍光強度が大きくなるのが観察できる。

製品名	極大励起波長 $\lambda_{\text{ex}}(\text{nm})$	極大蛍光波長 $\lambda_{\text{em}}(\text{nm})$	解離定数 $K_d(\text{mol/l})$
Dansylaminoethyl-cyclene	323	528	4.0×10^{-11}
Zinquin ethyl ester	368	490	$(3.7 \pm 0.6) \times 10^{-7}(1:1)$ $(8.5 \pm 1.6) \times 10^{-8}(1:2)$

細胞内 pH 測定用蛍光試薬

BCECF, BCECF-AM

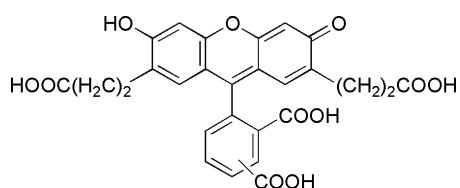
BCECF	5 mg	345-05184 ; 同仁品コード (B031)
BCECF-AM	1 mg	- ; 同仁品コード (B262)
BCECF-AM special packaging	50 µg × 8	349-08161 ; 同仁品コード (B221)

細胞内 pH(pH_i) は種々の細胞において、細胞内 Ca²⁺ などと共に細胞機能の調節因子として働いていると考えられている。そのため pH_i の測定は細胞内反応の制御機構を理解するために重要である。

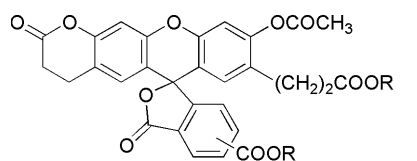
従来 pH_i は pH 電極や弱酸、弱塩基色素などを用いて測定されてきたが、測定感度、応答速度、検体数、操作の繁雑さ等の点において不十分であった。

pH 感受性の蛍光指示薬を導入して pH_i を測定する方法は、5-Carboxyfluorescein 等が知られているが、色素の細胞外への漏出や中性域での検量線の直線性等が問題であった。Fluorescein 誘導体である BCECF の pK_a は 6.98 であり、その蛍光強度と pH との間には pH6.4 ~ 8.0 の範囲内で良好な直線関係があり、最も一般的に使用されている。

BCECF の励起波長は 490 nm、蛍光測定波長は 526 nm であり、また 440 nm に等吸収点を持っているので、励起 2 波長測光も可能である。BCECF は高い親水性を有し細胞膜を透過しない。細胞内へ導入する際には、BCECF-AM を用いる。



BCECF
2',7'-Bis(carboxyethyl)-4 or 5-carboxyfluorescein
C₂₇H₂₀O₁₁=520.44
[CAS No.85138-49-4]



BCECF-AM
3'-O-Acetyl-2',7'-bis(carboxyethyl)-4 or 5-carboxyfluorescein, diacetoxymethyl ester
C₃₅H₂₈O₁₅=688.59
[CAS No.117464-70-7]

細胞内塩化物イオン測定用蛍光試薬

MQAE

MQAE	50 mg	348-06051 ; 同仁品コード (M024)
------	-------	---------------------------

細胞膜を介する塩化物イオンの輸送は、細胞の生理機能に関係し、生物学的に重要な研究課題である。細胞内の塩化物イオン濃度の測定には同位体をトレーサーとする方法や、イオン選択性電極を用いる方法等があるが、応答速度や使いやすさに問題がある。

これらの問題を解決するため、MQAE のような蛍光試薬を用いる方法が開発され、さまざまな細胞中の塩化物イオン濃度の測定に利用されている。MQAE は塩化物イオン濃度の増加とともに蛍光強度が減少する。蛍光強度と塩化物イオン濃度との関係は Stern-Volmer 則に従い、次式により示される。

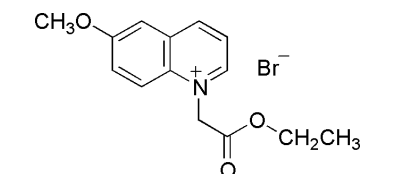
$$F_0/F = 1 + K_q[Cl^-]$$

F₀: 試薬の蛍光強度 F: Cl⁻ 存在下の蛍光強度 K_q: 消光係数 (mol⁻¹)

塩化物イオンによる MQAE の蛍光強度の減少速度は 1 msec 以下であり、十分な応答速度である。MQAE の蛍光強度は、塩化物イオンだけでなく Br⁻, I⁻ や SCN⁻ イオンにより大きく減少する。また、クエン酸のような有機酸によってもやや減少するが、生体内のアニオン (NO₃⁻, SO₄²⁻, HCO₃⁻ や PO₄³⁻) による影響はない。

MQAE は高い水溶性と膜透過性を持っているが、これらの蛍光試薬を細胞内に導入する際には、細胞の種類によって導入方法を工夫する必要がある。一般に、神経細胞の場合には、これらの蛍光試薬を含む緩衝液中で培養するだけで細胞内に蛍光試薬が導入できる。一方、腎細胞の場合には導入が難しく、界面活性剤や低張液ショックを用いたり、マイクロインジェクションにより導入する必要がある。

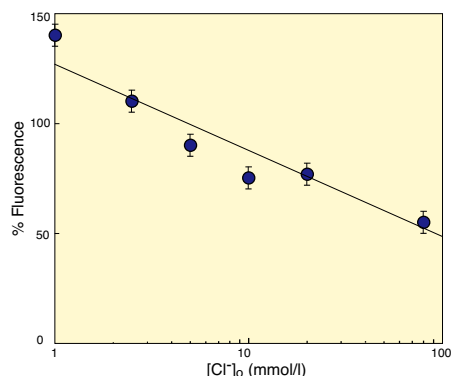
細胞内に導入することにより、塩化物イオン濃度の変化を蛍光強度で追跡することが可能となり、ラットの脳神経細胞や腎上皮細胞中の塩化物イオン濃度測定にも応用されている。



MQAE
N-Ethoxycarbonylmethyl-6-methoxyquinolinium bromide
C₁₄H₁₆BrNO₃=326.19

表 MQAE の蛍光強度に対する陰イオンの影響

	励起波長 (nm)	蛍光波長 (nm)	消光係数 (M ⁻¹)				
			Cl ⁻	Br ⁻	I ⁻	SCN ⁻	citrate
MQAE	355	458	200	293	456	410	41



Cl⁻ 濃度による MQAE の蛍光強度の変化

膜電位感受性色素

DiBAC₄(3)DiBAC₄(3)

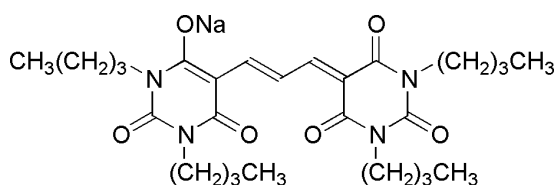
25 mg ; 同仁品コード (D545)

細胞膜やオルガネラ膜の電位変化は情報伝達、エネルギーの産生などに関係しており、細胞の活動を議論するのに重要である。膜電位感受性色素は、電位変化に応じて再分布し吸収や蛍光の変化を起こす色素であり、膜電位の変化をモニターできる。

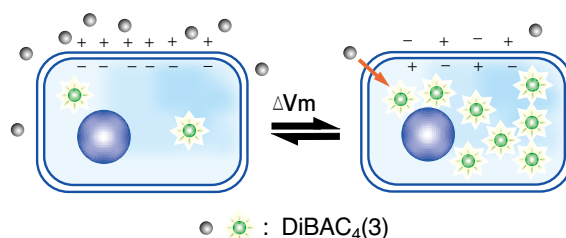
DiBAC₄(3) を細胞外液に添加してインキュベートすると、膜電位に応じた細胞膜内外の分布を示す。刺激によって細胞膜が脱分極すると、細胞質中へさらに色素が取り込まれる。取り込まれた色素は細胞内タンパクや細胞内膜に結合して、蛍光強度増強を起こす。その蛍光強度の変化を測定することで、膜電位をモニターできる。

Bräuner らは、BICR/M1R-k 細胞 (ラット乳癌細胞) において、-25 ~ -90 mV の膜電位範囲で約 1 %/mV の蛍光強度変化が得られることを報告している。電位変化に伴う応答は 1 次の速度式に従い、その速度定数は 0.1 ~ 0.8/min と報告されている。

DiBAC₄(3) は、Bis-oxonol 型のアニオン性膜電位感受性色素であり、DiBAC₄(5) や DiSBAC₂(3) などの他の Bis-oxonol 型や、スチリル系の di-4-ANNEPS、シアニン系の DiOC₆(3) などの膜電位感受性色素に比べ、高い電位応答性を持っている。Ar レーザー (488 nm) で励起可能なことから、フローサイトメトリー、共焦点レーザー顕微鏡観察などで利用可能である。他にもカルシウムイオン濃度と膜電位の相関解析、抗生物質に対する細胞の生存率の分析、ATP 感受性カリウムイオンチャネルの活性評価などの研究に応用され、High Throughput Screening (HTS) での細胞応答検出にも、頻繁に使用されている。

DiBAC₄(3)

Bis(1,3-dibutylbarbituric acid)trimethine oxonol,
sodium salt
C₂₇H₃₉N₄NaO₁₅=538.61

膜電位変化による DiBAC₄(3) の再分布モデル図像

蛍光顕微鏡を用いた膜電位測定例

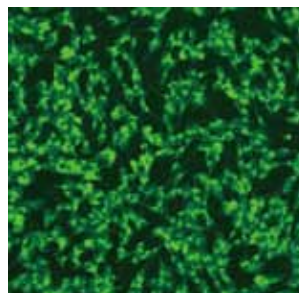
1. 使用試薬

- ・ DiBAC₄(3)
- ・ Dulbecco's MEM (DMEM)
- ・ FBS(fetal bovine serum)

2. 方法

- (1) 培養した細胞を測定する DMEM に移す。
- (2) FBS を添加する。(濃度範囲が 2 ~ 15% で一定になるようにする)
- (3) DiBAC₄(3) を添加する。(濃度範囲が 1 ~ 5 μmol/l で一定になるようにする)
- (4) 刺激による蛍光強度変化を蛍光顕微鏡で観察する。(Ar レーザー (488 nm) の共焦点レーザー顕微鏡) DiBAC₄(3) の蛍光は温度により変化するため、一定温度 (37℃) で測定する。細胞膜の電位が変化することで細胞質中の蛍光強度が変化するので観察できる。

膜電位が変化すると色素の分布が変わり、蛍光や吸収が変化する。この変化の大きさは、色素の分子数と細胞数の比・色素の全濃度・細胞の種類に依存する。

DiBAC₄(3) で染色した細胞の蛍光顕微鏡画像

SH-SY5Y(Human Neuroblastoma Cell) に 1 μmol/l DiBAC₄(3)
[in Hank's-HEPES] を加え無刺激で 10 分後に観察した (B 励起)。
(画像提供 浜松ホトニクス株式会社)

Caged 化合物

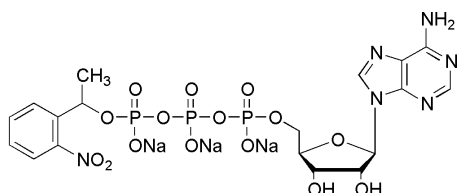
Caged ATP

Caged ATP 1 mg 345-05503 ; 同仁品コード (CC01)

Caged 化合物は生理活性物質や蛍光物質などの、その本来の性質をブロックした化合物であり、近紫外光照射により、瞬時に元の活性な物質に転換することができる化合物の総称である。ある物質の生体における作用機序を調べるには、その物質を系中で測定することも必要であるが、同時に、系中にその物質を入れて追従する変化を観察することも重要である。ところが、生体反応の多くは速度が速く、また複雑に関連した反応カスケードであることが多いため、外からその物質を加えた場合、系中を拡散する過程が律速となってその後の反応が明確に捉えられなくなってしまう恐れがある。そのため、いかに素早く目的物質を添加するかについて様々な方法がこれまで開発されてきている。

光は考えられる限り最も速い媒体であり、また細く絞り込むこともできる。そこで、もし光で物質を制御できれば、それは時間分解能、空間分解能共に優れた手法であるといえる。

Caged ATP は ATP の γ 位リン酸をニトロベンジル型化合物で保護した化合物で、ATP 活性を持たない。このニトロベンジル基は 310 ~ 360 nm の近紫外光で瞬時に解除でき、ATP を系内に素早く放出できる。アクトミオシン ATPase をはじめ各種 ATPase は反応が速いため、外から ATP を加えた場合には ATP 分子の系内への拡散が律速となってしまう、解析が困難になる場合が多い。これに対し Caged ATP は活性がないため、系中にあらかじめ均一に投与しておくことができる。この状態で光照射すれば、瞬時にかつ同時に ATP が出現することになり、拡散を除外できるため ATPase の作用メカニズムの研究に大きな力を発揮する。また、時間分解 X 線回折法などを用いた分野の研究にも使用できると予想される。光分解速度は、22℃ で約 100 s^{-1} である。



Caged ATP

$\text{P}^3\text{-[1-(2-Nitrophenyl)ethyl]adenosine-5'-triphosphate, trisodium salt}$
 $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{Na}_3\text{O}_{15}\text{P}_3=722.27$ (無水物として)

細胞内への導入

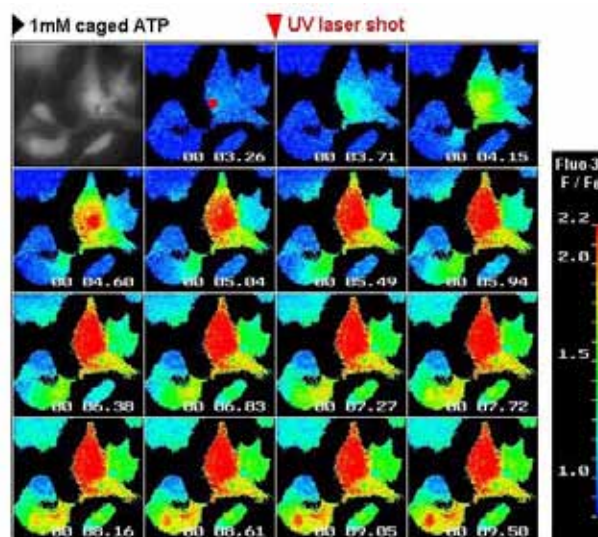
Caged ATP は水溶性が高く、細胞膜透過性が低い。骨格筋では、グリセロール、サポニンなどで処理したスキンドファイバーを用いることにより、インキュベートで筋繊維内に均一に分布させることができる。その他、パッチピペットの内液に入れたり、マイクロインジェクション、浸透ショック法などが用いられる。

Caged 化合物のアクティベートには紫外光の照射が必要となるが、短時間でアクティベートする必要がある場合、エネルギーの高い光源を用いる必要がある。通常用いられている光源は以下のようなものとなる。

- (1) キセノンフラッシュランプ
- (2) 水銀アークランプ
- (3) レーザー

【使用時の注意事項】

- 1) Caged ATP は水溶性であり、バッファーにそのまま溶解して用いる事ができる。
- 2) カルシウム濃度等を蛍光測定したい場合は、同時に Fluo 3 等を導入しておく。この際、観察用励起光が Caged ATP を解除してしまわないよう注意する。450 nm 以上のものが好ましい。
- 3) Caged ATP は Caged 化合物の中でも歴史が古く多くの報告がある。しかしながら、使用細胞、使用機器にあったプロトコルを確立するまで試薬の濃度、インキュベーション時間あるいは解除光照射の時間等、検討する必要がある。一度プロトコルを確立してしまうとその後は、再現性良く実験できる。



牛動脈血管内皮細胞 (BAE) にカルシウム蛍光指示薬 Fluo 3-AM をロードし、蛍光顕微鏡下で ARGUS/HiSCA システム (浜松ホトニクス) を用いてカルシウムイオン濃度を画像解析した。同時に細胞外液には 1 mmol/l の Caged ATP を投与しておき、カルシウム測定開始時にレーザーホトリシスシステム (浜松ホトニクス) にて Caged ATP を光解除して ATP を遊離させた。BAE 細胞は、局所に発生した ATP により、細胞内カルシウムイオンの一過性の上昇が見られた。対物レンズは 40 倍を用い、355 nm の解除光の照射は、標本上でおよそ 5 マイクロメートルのスポット (画像の赤丸表示) で 5 ナノ秒の照射時間で行われた。

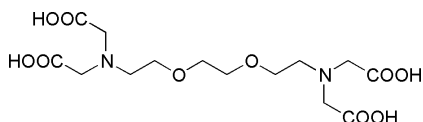
(データ測定協力: 浜松ホトニクス株式会社)

キレート試薬、他

—カルシウム選択的キレート剤—

GEDTA(EGTA)

GEDTA はカルシウムに選択的なキレート試薬である。Ca²⁺ をマスクする際、およびカルシウムプローブのキャリブレーション用として使用される。EGTA と呼ばれることもある。



GEDTA(EGTA)

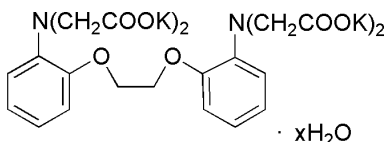
O,O'-Bis(2-aminoethyl)ethyleneglycol-N,N,N',N'-tetraacetic acid
C₁₄H₂₄N₂O₁₀=380.35

GEDTA(EGTA)	5 g	348-01311 ; 同仁品コード (G002)
GEDTA(EGTA)	25 g	346-01312 ; 同仁品コード (G002)
GEDTA(EGTA)	100 g	342-01314 ; 同仁品コード (G002)

—中性付近でのカルシウム選択的キレート剤—

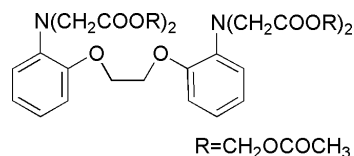
BAPTA, BAPTA-AM solution

BAPTA は GEDTA をもとに考案されたキレート試薬であり、GEDTA と比較して中性付近でもプロトンの影響を受けにくいという特長をもつ。



BAPTA

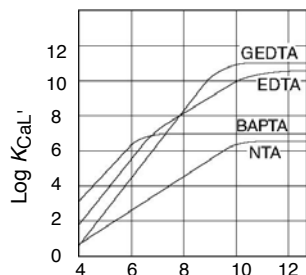
O,O'-Bis(2-aminophenyl)ethyleneglycol-N,N,N',N'-tetraacetic acid, tetrapotassium salt, hydrate
C₂₂H₂₀K₄N₂O₁₀=628.79(無水物として)



BAPTA-AM

O,O'-Bis(2-aminophenyl)ethyleneglycol-N,N,N',N'-tetraacetic acid, tetraacetoxymethyl ester
C₃₄H₄₀N₂O₁₈=764.68

BAPTA	100 mg	341-05061 ; 同仁品コード (B019)
BAPTA	500 mg	347-05063 ; 同仁品コード (B019)
BAPTA-AM solution	1 ml	348-05451 ; 同仁品コード (B035)



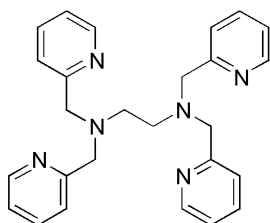
種々の Ca²⁺ 錯体の条件定数と pH の関係

	log K _{Mg}	log K _{Ca}	pK _{a3}	pK _{a4}
GEDTA(EGTA)	5.31	11.00	8.96	9.58
BAPTA	1.77	6.97	5.47	6.36

—重金属のキレート剤—

TPEN

細胞内カルシウム測定の際に、亜鉛や鉄などの重金属イオンによって蛍光が消光され、カルシウム含量が見かけ上少なく評価されることが指摘されている。TPEN はそれ自体脂溶性であり、細胞内カルシウム測定において優れた重金属マスク剤である。



TPEN

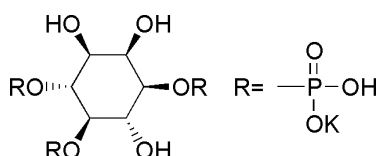
N,N,N',N'-Tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine
C₂₆H₂₈N₆=424.54

TPEN	100 mg	340-05411 ; 同仁品コード (T040)
------	--------	---------------------------

—細胞内セカンドメッセンジャー—

Ins(1,4,5)P₃(synthetic)

生体内情報伝達のメカニズムを知る上で、細胞内セカンドメッセンジャーとして重要なものである。



Ins(1,4,5)P₃(synthetic)

D-myo-Inositol-1,4,5-triphosphate, tripotassium salt
C₆H₁₂K₃O₁₅P₃=534.37

Ins(1,4,5)P ₃ (synthetic)	100 μg	347-05781 ; 同仁品コード (I007)
Ins(1,4,5)P ₃ (synthetic)	1 mg	343-05783 ; 同仁品コード (I007)

—アセチルコリンエステラーゼ特異的基質—

MATP+

MATP+ 10 mg ; 同仁品コード (M450)

アセチルコリンエステラーゼ (AChE) は、神経伝達物質であるアセチルコリンを分解して神経伝達系をコントロールする重要な酵素の1つであり、脳や血中等に存在する事が知られている。この酵素は、有機リン系およびカルバメート系の農薬や殺虫剤などによって活性が低下する事から、これら薬物の暴露指標として用いられている。また、アルツハイマー病では神経障害によってアセチルコリン量が減少するため、AChE 阻害剤がアルツハイマー病治療薬として注目されている¹⁾。

現在、AChE 活性測定には、基質であるアセチルチオコリンと検出試薬である DTNB を用いた Ellman 法が一般的に用いられている^{2,3)}。しかしながら、アセチルチオコリンは、AChE 選択性が低く、生体内に存在する非特異的なコリンエステラーゼ (ブチリルコリンエステラーゼ: BChE) に対しても反応する。そのため、AChE 活性を測定するためには BChE 阻害剤を添加する必要がある、操作が煩雑であった⁴⁻⁶⁾。

MATP+ は、一般的に用いられているアセチルチオコリンに比べ、非常に高い AChE 選択性を有している。そのため BChE 阻害剤を添加する事なく AChE 活性を選択的かつ簡便に測定する事ができる。

また、MATP+ は、既存のアセチルチオコリンと同様の方法によって使用する事が可能である。MATP+ を中性バッファーに溶解した後、AChE を含むサンプルおよび DTNB を添加し、反応に伴う 412 nm 吸光度を測定する事によって AChE 活性を測定する事ができる。

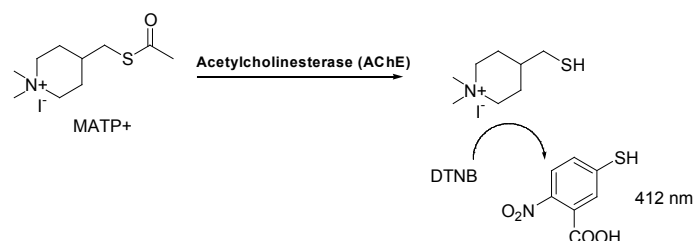
本試薬は全血中の AChE 活性測定や Karnovsky/Roots 法を用いた神経組織の AChE 染色にも有用である。

※ MATP+ は、独立行政法人放射線医学総合研究所 (NIRS) によって開発された新規のアセチルコリンエステラーゼ (AChE) 基質です⁷⁾。
(本製品は特許出願がなされており、小社は試薬用途として、その実施許諾を得て製造・販売しております。)

【特長】

- 1) アセチルコリンエステラーゼに対する高い選択性
- 2) ブチリルコリンエステラーゼ阻害剤添加不要
- 3) DTNB を用いた Ellman 法によりアセチルコリンエステラーゼ活性を簡便に測定可能

測定原理



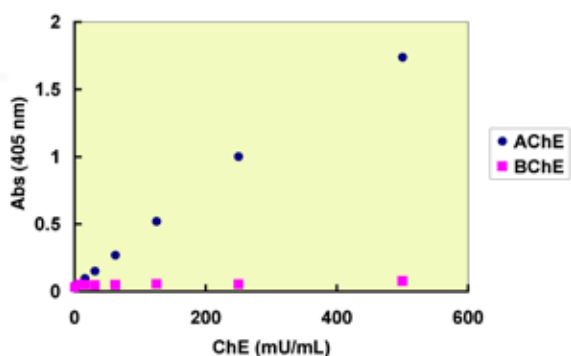
◎ AChE(アセチルコリンエステラーゼ)

神経組織、赤血球などに存在する。コリン作動性神経(副交感神経、運動神経、交感神経の中枢～神経節)の神経伝達物質アセチルコリン(AChE)を酢酸とコリンに分解する。

◎ BChE(ブチリルコリンエステラーゼ)

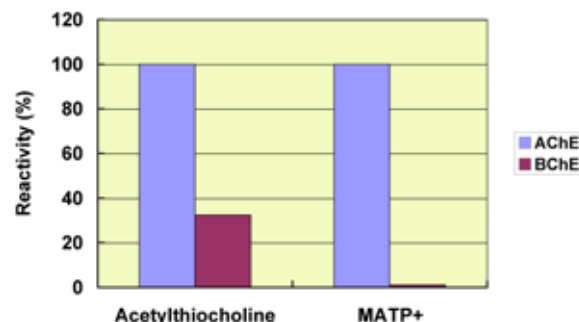
肝臓、血清などに存在する。ACh を含む様々なコリンエステル系を分解する。健康診断などで検査される ChE は、こちらの方である。高値の場合はネフローゼ症候群、脂肪肝など、低値の場合は、肝硬変、肝炎、有機リン系薬物中毒(有機リン系の農薬中毒、サリンなどの神経ガス中毒)などが疑われる。

MATP+の AChE 選択性 (DTNB 発色)



AChE および BChE の濃度依存的な発色を示す。
BChE とは殆ど反応せず、AChE のみ濃度依存的な発色を示す事から AChE 活性を選択的に測定する事ができる。

AChE 選択性の比較



注) AChE に対する反応性を 100% とした場合の値を示す。

汎用されているアセチルチオコリンは、内在于 BChE とも反応し、AChE に対する選択性は低い。一方、MATP+ は BChE とは殆ど反応せず、AChE に対する選択性が非常に高い事が分かる。

参考文献

- 1) 杉本八郎 日薬理誌, **2004**, 124, 163.
- 2) Vanessa Battisti, et al., *Clin. Chim. Acta.*, **2009**, 402, 114.
- 3) M. Salud Garcia-Ayllon, et al., *Hepatology*, **2006**, 43, 445.
- 4) Stephen Brimijoin and Pamela Hammond, *J. Neurochemistry*, **1998**, 51, 1227.
- 5) Franz Worek, et al., *Clin. Chim. Acta.*, **1999**, 288, 73.
- 6) Ramachandra S. Naik, et al., *Chem. Biol. Interact.*, **2008**, 175, 298.
- 7) T. Kikuchi, T. Okamura, K. Fukushima and T. Irie, *Biol. Pharm. Bull.*, **2010**, 33, 702.

-Cellstain- 群

Calcein-AM、Fluorescein diacetate (FDA)、や CFSE は細胞膜を容易に透過することができる。これらの色素は、エステル保護基のため本来の蛍光が抑えられているが、細胞内に浸透すると、細胞内のエステラーゼにより容易に加水分解を受け、fluorescein 本来の緑色の蛍光を示すようになる。また、加水分解を受けて、脂溶性が減少することにより細胞内からの溶出が抑えられ、結果的に細胞を蛍光染色することになる。このことを利用して、これらの fluorescein 系の色素類は、生細胞を染色する色素として利用することができる。

一方、Propidium iodide (PI)、Ethidium bromide (EB)、Acridine Orange (AO) や DAPI など正電価を持つ蛍光性色素は、DNA の 染色色素として知られており、一般的に生細胞の場合は細胞膜を透過しないが、死細胞の場合、細胞膜が変化するため透過するようになる。細胞膜を透過したこれらの蛍光色素は、DNA と結合することにより赤色 (PI、EB) や青色 (DAPI) の蛍光を発するようになる。これを利用して死細胞染色用の蛍光色素として使用されている。

細胞での染色例

1. 染色例 (HeLa 細胞での染色例)

(1) 試薬溶液の調製 (ストック溶液を調製する)

各色素に適した溶解液で、0.5 ~ 1 mg/ml 程度に溶解する。

製品名	性状	溶解液	調製後の保存	$\lambda_{ex}(nm)$	$\lambda_{em}(nm)$	目視色
生細胞染色色素						
-Cellstain [®] - Calcein-AM	白色～微黄色固体	DMSO	冷凍	490	515	黄緑
-Cellstain [®] - Calcein-AM solution	無色液体	DMSO 溶解済み	冷凍	490	515	黄緑
BCECF-AM special packaging	白色～微黄色固体	DMSO	冷凍	490	526	黄緑
-Cellstain [®] - CFSE	白色～微黄色固体	DMSO	溶解後保存不可	496	516	黄緑
-Cellstain [®] - FDA	白色結晶性粉末	DMSO	冷凍	488	530	黄緑
-Cellstain [®] - CytoRed solution	橙黄色液体	DMSO 溶解済み	冷凍	535	590	赤
死細胞染色色素 (長期に保存する場合は冷凍保存すること)						
-Cellstain [®] - DAPI	黄色粉末	H ₂ O	冷蔵・冷凍 (長期保存不可)	360	460	青
-Cellstain [®] - DAPI solution	微黄色～黄色液体	Buffer 溶解済み	冷蔵・冷凍	360	460	青
-Cellstain [®] - PI	赤褐色粉末	H ₂ O	冷蔵・冷凍	530	620	赤
-Cellstain [®] - PI solution	橙色～赤色液体	H ₂ O 溶解済み	冷蔵・冷凍	530	620	赤
-Cellstain [®] - EB	赤褐色粉末	H ₂ O	冷蔵・冷凍	520 ~ 525	615	赤
-Cellstain [®] - EB solution	橙色～赤色液体	H ₂ O 溶解済み	冷蔵・冷凍	520 ~ 525	615	赤
核染色色素 (生・死細胞) (長期に保存する場合は冷凍保存すること)						
-Cellstain [®] - AO	赤褐色粉末	H ₂ O	冷蔵・冷凍	420 ~ 460	630 ~ 650 (ssDNA)	黄緑
-Cellstain [®] - AO solution	橙色～黄色液体	H ₂ O 溶解済み	冷蔵・冷凍	500	520 (dsDNA)	赤
-Cellstain [®] - Hoechst 33258 solution	黄色液体	H ₂ O	冷蔵・冷凍	350	461	青
-Cellstain [®] - Hoechst 33342 solution	黄色液体	H ₂ O	冷蔵・冷凍	352	461	青
ミトコンドリア染色色素						
-Cellstain [®] - MitoRed	紫褐～赤紫固体	DMSO	溶解後保存不可	560	580	赤
-Cellstain [®] - Rh123	赤色～赤褐色粉末	DMSO	冷凍	507	529	黄緑

(2) 操作

1) ストック 溶液 10 μ l を 5.0 ml の PBS(-) に溶解し、添加用色素液を調製する。*

* 注意: PBS(若しくはバッファ類)にて希釈した染色液は分解しやすいので、用時調製すること。

2) HeLa 細胞をトリプシン-EDTA など処理し、細胞の懸濁液を準備する。

3) 細胞懸濁液を遠心分離する (1,000 rpm, 3 min)。

4) 上清を除き、PBS(-) を添加する (この時、細胞数が $10^5 \sim 10^6$ cells/ml になるように調製する)。

5) ピペッティングなどで十分分散させる。

* 培養液中の血清などはバックグラウンドを上昇させる恐れがあるので、2) ~ 4) の操作を繰り返し行い、十分に洗浄する。

6) 1.5 ml マイクロチューブに 4) で得た細胞懸濁液 30 μ l 添加する。

7) さらに添加用色素液 15 μ l 添加する。

8) マイクロチューブに蓋をして、37°C で 15 ~ 30 分インキュベートする。

9) カバーガラス上に 8) の溶液 10 μ l を乗せ、上からもう一枚のカバーガラスを重ね、染色した細胞溶液を挟みこむ。

10) このカバーガラスを蛍光顕微鏡に置き、色素に応じた励起光源を用いて励起し、観察する。



1-2) HeLa 細胞等の附着細胞はトリプシン-EDTA など剥がし細胞の懸濁液を用意する。



3) 細胞懸濁液を遠心分離する。



4-8) 上清を除き PBS(-) を添加し、ピペッティングなどで十分分散させる。くり返し行い洗浄を十分行う。色素溶液を入れ、インキュベートする。



9) カバーガラス上に 8) の溶液を適宜乗せ、上からもう一枚のカバーガラスを重ね染色溶液を挟みこむ。



10) 蛍光顕微鏡にセットし、観察する。

生細胞染色用色素

—生細胞蛍光染色—

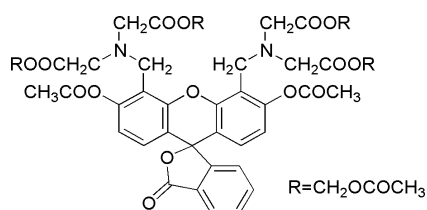
Calcein-AM, Calcein-AM solution

-Cellstain® - Calcein-AM 1 mg ; 349-07201 同仁品コード (C326)
-Cellstain® - Calcein-AM solution 1 ml ; 341-07901 同仁品コード (C396)

Calcein-AM は細胞膜透過性物質であり、細胞内のエステラーゼによる加水分解により膜不透過性 Calcein となることで蛍光を発する。 $(\lambda_{ex}=490\text{ nm}, \lambda_{em}=515\text{ nm})$ 。生細胞染色用色素として同様に fluorescein 骨格を持つ Carboxy fluorescein diacetate (CFDA) や Fluorescein diacetate (FDA) などは発色後細胞膜から漏出しやすく、それが使用上の問題のひとつとなっていた。これらのような色素に比べ、Calcein-AM は発色後の細胞からの漏出が少ない色素として利用が高まってきている。また、リンパ球の増殖や白血球のケモタキシスなどの細胞機能を阻害しないことが知られている。また、Calcein-AM はキラー T 細胞や NK 細胞などによる細胞障害活性の測定において、汎用されてきた放射性同位体を用いる ^{51}Cr release 法と同様の結果を与えてることから、細胞毒性も少ないことが示唆される。

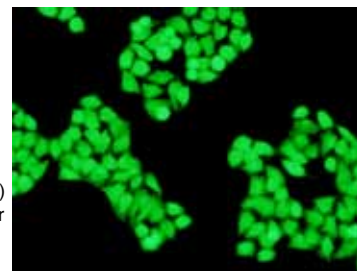
Calcein-AM は生細胞を染色し、蛍光顕微鏡下の観察やフローサイトメトリーなどに利用されているが、死細胞染色色素と共に用いることで生死細胞二重蛍光染色に利用される場合も数多い。

蛍光特性： $\lambda_{ex}=490\text{ nm}, \lambda_{em}=515\text{ nm}$



Calcein-AM

3',6'-Di(O-acetyl)-4',5'-bis[N,N-bis(carboxymethyl)aminomethyl]fluorescein, tetraacetoxymethyl ester
 $\text{C}_{46}\text{H}_{46}\text{N}_2\text{O}_{23}=994.86$
[CAS No.148504-34-1]



Calcein-AM (x400, B 励起)

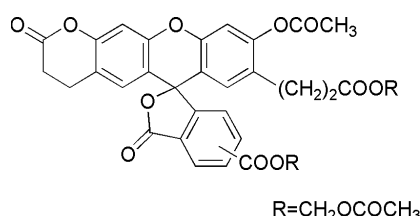
—生細胞蛍光染色—

BCECF-AM special packaging

BCECF-AM special packaging 50 $\mu\text{g} \times 8$; 349-08161 同仁品コード (B221)

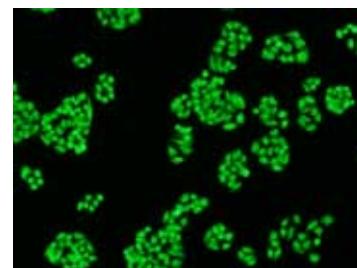
BCECF の pK_a は 6.97 で、pH と蛍光強度との間には pH6.4 ~ 7.6 の範囲内で直線関係がみられ、細胞内 pH 測定に適している。BCECF はイオン化しているために細胞膜を透過できないが、BCECF-AM は疎水性が増大し容易に細胞膜を透過する。細胞内に入った BCECF-AM はエステラーゼにより加水分解を受け、膜不透過性の BCECF に戻る。中性 pH 付近における BCECF-AM の蛍光（励起光波長 526 nm）は微弱であるが、BCECF は強い蛍光を示すので、加水分解の過程を蛍光強度（蛍光波長 530 nm）の変化としてモニターできる。本品には溶解用 DMSO（1 ml）が添付されている。

蛍光特性： $\lambda_{ex}=490\text{ nm}, \lambda_{em}=526\text{ nm}$



BCECF-AM

3'-O-Acetyl-2',7'-bis(carboxyethyl)-4 or 5-carboxy-fluorescein, diacetoxymethyl ester
 $\text{C}_{35}\text{H}_{28}\text{O}_{15}=688.59$
[CAS No.117464-70-7]



BCECF-AM (x200, B 励起)

—生細胞蛍光染色（結合型）—

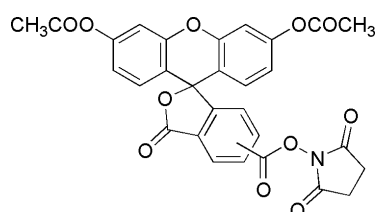
CFSE

-Cellstain® - CFSE 1 mg ; 341-07401 同仁品コード (C375)

CFSE は蛍光色素として細胞内に長時間とどまり、長期的な動的挙動を観察するトレーサーとしても利用できる生細胞蛍光染色色素である。CFSE は fluorescein に細胞内蛋白質と反応するよう活性エステル基を付けている。また、フェノール性水酸基をアセチル化しているため、それ自体蛍光を示さないことから、バックグラウンドを低く抑えることができる。

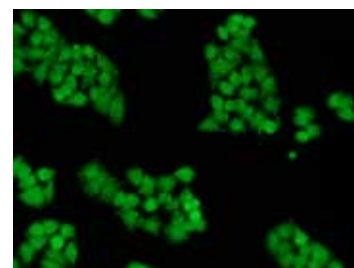
細胞内に取り込まれた CFSE は細胞内のエステラーゼによりアセチル基が加水分解され本来の fluorescein が持つ蛍光を示すようになり、かつ活性エステル部が細胞内蛋白質のアミノ基と結合し細胞内に固定化できることにより細胞外への漏出が少ない。細胞の成長、分裂融合などの動的挙動が蛍光顕微鏡を用いることによって観測することもできる。

蛍光特性： $\lambda_{ex}=496\text{ nm}, \lambda_{em}=516\text{ nm}$



CFSE

5- or 6-(N-Succinimidylloxycarbonyl)-fluorescein-3',6'-diacetate
 $\text{C}_{29}\text{H}_{19}\text{NO}_{11}=557.46$
[CAS No.150347-59-4]



CFSE (x400, B 励起)

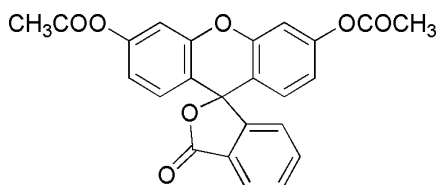
— 生細胞蛍光染色 —

FDA

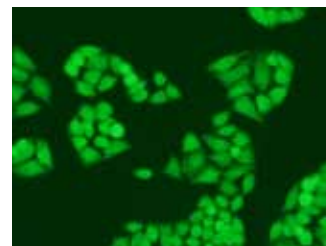
-Cellstain[®] - FDA 1 mg ; 348-07411 同仁品コード (F209)

Fluorescein diacetate (FDA) は 1966 年、Rotman らにより生細胞のみを蛍光染色する染色剤として報告されている。FDA が細胞内に取り込まれると、細胞内の各種酵素により加水分解され蛍光性の fluorescein となることから生細胞が蛍光染色される。FDA は生細胞蛍光染色色素として、蛍光顕微鏡下での形態観察、PI などの核染色色素とともに二重染色に使用されている。また、フローサイトメトリーへの応用は、Hulett らにより 1969 年に行われて以来、数多く行われている。

蛍光特性： $\lambda_{ex}=488\text{ nm}$, $\lambda_{em}=530\text{ nm}$



FDA
Fluorescein diacetate
 $C_{24}H_{16}O_7=416.38$
[CAS No.596-09-8]



FDA (x400, B 励起)

— 生細胞蛍光染色 (赤色) —

CytoRed solution

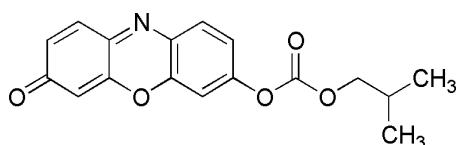
1 mmol/l DMSO 溶液

-Cellstain[®] - CytoRed solution 1 ml ; 同仁品コード (C410)

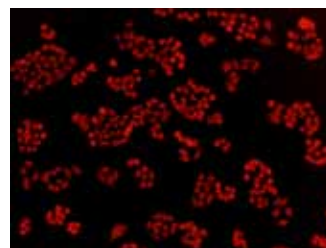
CytoRed は生細胞内に取り込まれたあと、細胞内のエステラーゼによって加水分解され蛍光性の Resorufin となり、生細胞を蛍光染色することが出来る。同様の生細胞染色色素として Calcein-AM が知られているが、CytoRed はより長波長域に比較的広い範囲での蛍光を持つため蛍光顕微鏡下で G 励起 (赤色蛍光) もしくは B 励起 (緑色蛍光) での観測が可能である (推奨 G 励起)。

本品は DMSO 溶液となっており試薬を量り取ったり溶解する手間が不要である。

蛍光特性： $\lambda_{ex}=535\text{ nm}$, $\lambda_{em}=590\text{ nm}$



CytoRed
7-Isobutyloxycarbonyloxy-3H-phenoxazin-3-one
 $C_{17}H_{15}NO_5=313.31$



CytoRed (x200, G 励起)

死細胞染色用色素

— DNA の蛍光染色 —

DAPI, DAPI solution

-Cellstain[®] - DAPI 1 mg ; 342-07431 同仁品コード (D212)
-Cellstain[®] - DAPI solution 1 ml ; 340-07971 同仁品コード (D523)

DAPI は 460 nm に青色の蛍光を持ち (励起波長 360 nm)、DNA の AT 配列に特異的な minor groove binder である。

DAPI は通常、溶液での長期保存は難しいとされているが、同仁の DAPI solution は独自の組成により数ヶ月単位での使用が可能である。

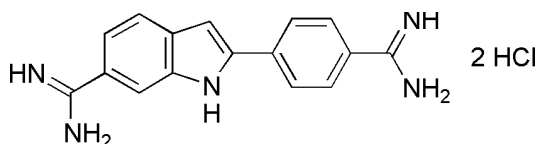
【注意事項】

DAPI ストック溶液を作成する場合には、水を使用する (PBS には溶解しにくい)。

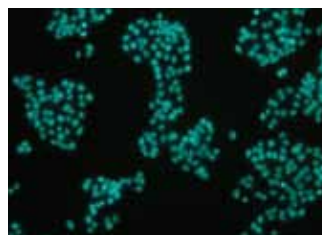
ただし、水に溶解したものは長期保存には適していない。

長期保存をお考えの際は、溶液の安定性を高めた溶液タイプの製品 -Cellstain- DAPI solution (コード：D523) をご使用いただきたい。

蛍光特性： $\lambda_{ex}=360\text{ nm}$, $\lambda_{em}=460\text{ nm}$



DAPI
4',6-Diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride
 $C_{16}H_{17}Cl_2N_5=350.25$
[CAS No.28718-90-3]



DAPI (x200, U 励起)

— DNA の蛍光染色 —

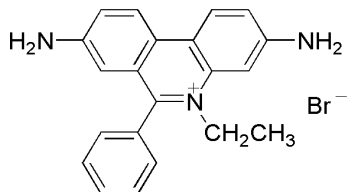
EB, PI

-Cellstain [®] - EB	1 mg ; 346-07451	同仁品コード (E262)
-Cellstain [®] - EB solution	1 ml ; 348-07891	同仁品コード (E272)
-Cellstain [®] - PI	1 mg ; 343-07461	同仁品コード (P346)
-Cellstain [®] - PI solution	1 ml ; 341-07881	同仁品コード (P378)

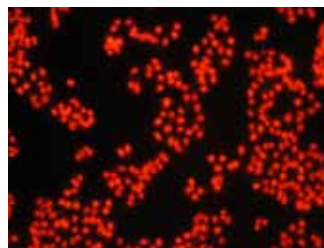
Propidium iodide (PI) は ethidium bromide とともに phenanthridium 系染料に分類されるカチオン性の蛍光色素であり、DNA の二重らせん構造に intercalate することにより特有の赤色蛍光が増強される核酸染色色素である。一部は二本鎖構造の RNA と結合するため、正確な DNA 染色のためには、二本鎖構造の RNA の除去が必要である。一般に生細胞の細胞膜は透過せず、死細胞にのみ入り込み、核内の DNA に intercalate して赤色蛍光を発する。したがって死細胞染色色素として利用される。

蛍光特性 : **EB** $\lambda_{ex}=520 \sim 525 \text{ nm}$, $\lambda_{em}=615 \text{ nm}$

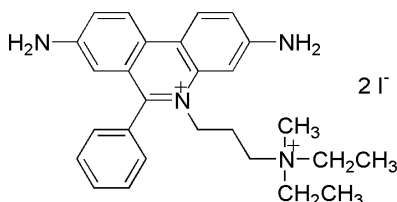
PI $\lambda_{ex}=530 \text{ nm}$, $\lambda_{em}=620 \text{ nm}$



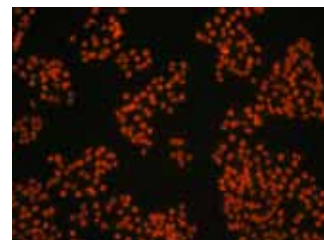
EB
3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridinium bromide
 $C_{21}H_{20}BrN_3=394.31$
[CAS No.1239-45-8]



EB (x300, G 励起)



PI
3,8-Diamino-5-[3-(diethylmethylammonio)propyl]-6-phenylphenanthridinium diiodide
 $C_{27}H_{34}I_2N_4=668.39$
[CAS No.25535-16-4]



PI (x200, G 励起)

ミトコンドリア染色用色素

— ミトコンドリア蛍光染色 —

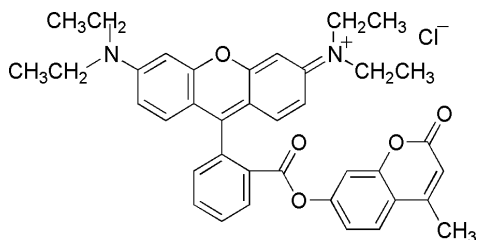
MitoRed, Rh123

-Cellstain [®] - MitoRed	50 $\mu\text{g} \times 8$;	- 同仁品コード (R237)
-Cellstain [®] - Rh123	1 mg ; 349-07941	同仁品コード (R233)

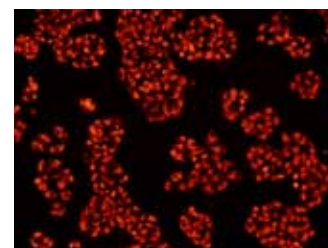
MitoRed および Rh123 は Rhodamine を基本骨格とする色素で細胞に取りこまれたあとミトコンドリアに集積する特長があるため、ミトコンドリアを特異的に染色することが可能である。ミトコンドリア選択性に優れた蛍光プローブである。MitoRed は蛍光顕微鏡 G 励起下で細胞内のミトコンドリアが赤色に蛍光染色され、Rh123 は B 励起下で緑色に蛍光染色されていることが観察できる。MitoRed には溶解用 DMSO が 1 ml 添付されている。

蛍光特性 : **MitoRed** $\lambda_{ex}=560 \text{ nm}$, $\lambda_{em}=580 \text{ nm}$

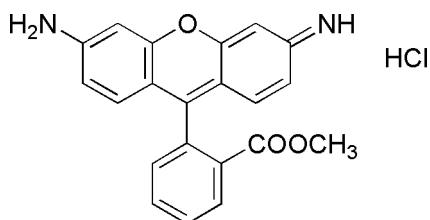
Rh123 $\lambda_{ex}=507 \text{ nm}$, $\lambda_{em}=529 \text{ nm}$



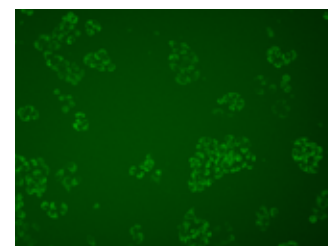
MitoRed
9-[2-(4'-Methylcoumarin-7'-oxycarbonyl)phenyl]-3,6-bis(diethylamino)xanthylium chloride
 $C_{38}H_{37}ClN_2O_5=637.17$



MitoRed (x200, G 励起)



Rh123
2-(6-Amino-3-imino-3H-xanthen-9-yl)benzoic acid methyl ester, hydrochloride
 $C_{21}H_{17}ClN_2O_3=380.82$
[CAS No.62669-70-9]



Rh123 (x200, B 励起)

核染色用色素

— DNA, RNA の蛍光染色 —

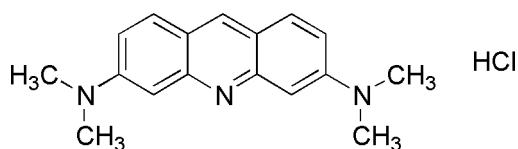
AO

-Cellstain® - AO 1 mg ; 349-07441 同仁品コード (A386)
 -Cellstain® - AO solution 1 ml ; 348-07911 同仁品コード (A430)

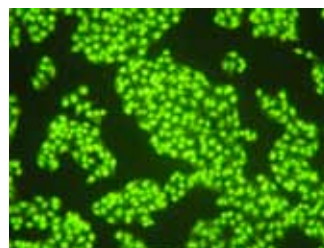
Acridine Orange (AO) は、dsDNA に結合して 520 nm の緑色の蛍光（励起波長 500 nm）を発し、ssDNA や RNA に結合して 650 nm の赤色の蛍光（励起波長 460 nm）を発する intercalator である。

二本鎖構造の核酸に取り込まれる場合、まずリン酸と静電的に結合して二本鎖の中に 3 塩基対に対し 1 個の割合で取り込まれる。この時、挿入された AO は互いに隣接することなく単量体で存在し、その結果 AO 本来の蛍光スペクトル（520 nm）を示す。単鎖構造の核酸に取り込まれる場合、リン酸基と最大 1 対 1 の割合で静電的に結合し、隣接する AO 分子間で stacking や aggregation を起こす。その結果、単量体の場合と異なる蛍光（650 nm）を示すようになる。このように AO のみで二本鎖、及び単鎖型 DNA や RNA を分別染色することができ、Ar レーザーで励起することにより DNA と RNA の同時観察が、また、フローサイトメトリーを用いて同時定量解析ができるという特徴がある。

蛍光特性：(dsDNA) $\lambda_{ex}=500\text{ nm}$, $\lambda_{em}=520\text{ nm}$
 (ssDNA) $\lambda_{ex}=420 \sim 460\text{ nm}$, $\lambda_{em}=630 \sim 650\text{ nm}$



AO
 3,6-Bis(dimethylamino)acridine, hydrochloride
 $C_{17}H_{20}ClN_3=301.81$
 [CAS No.65-61-2]



AO (x200, B 励起)

— DNA の蛍光染色 —

Hoechst 33258

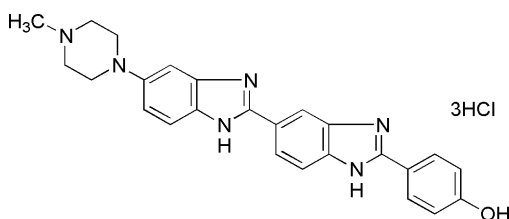
Hoechst 33342

-Cellstain® - Hoechst 33258 solution 1 ml ; 343-07961 同仁品コード (H341)
 -Cellstian® - Hoechst 33342 solution 1 ml ; 346-07951 同仁品コード (H342)

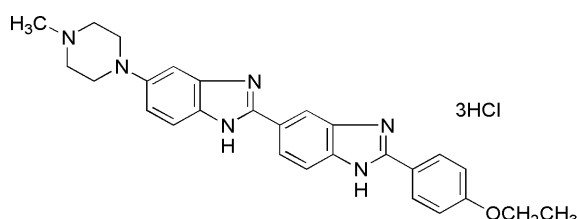
1 mg/ml H₂O

Hoechst 33258 および Hoechst 33342 は DNA に結合する蛍光色素であるが、生細胞に容易に取り込まれる。また、DNA の AT 配列の副溝に結合し、染色体分析などにも用いられる。

蛍光特性：Hoechst 33258 $\lambda_{ex}=350\text{ nm}$, $\lambda_{em}=461\text{ nm}$
 Hoechst 33342 $\lambda_{ex}=352\text{ nm}$, $\lambda_{em}=461\text{ nm}$



Hoechst 33258
 2'-(4-Hydroxyphenyl)-5-(4-methyl-1-piperazinyl)-2,5'-bi-1H-benzimidazole, trihydrochloride
 $C_{25}H_{27}Cl_3N_6O=533.88$
 [CAS No.23491-44-3]



Hoechst 33342
 2'-(4-Ethoxyphenyl)-5-(4-methyl-1-piperazinyl)-2,5'-bi-1H-benzimidazole, trihydrochloride
 $C_{27}H_{31}Cl_3N_6O=561.93$
 [CAS No.23491-52-3]



Hoechst 33258 (WU 励起)



Hoechst 33342 (WU 励起)

正常ヒト胎児由来細胞を 1% グルタルアルデヒド /PBS(-) で固定化した後に染色した。

細胞二重染色キット

—生細胞と死細胞の二重染色—

Double Staining Kit

-Cellstain®- Double Staining Kit 1 set ; 341-07381 同仁品コード (CS01)

-Cellstain®-Double Staining Kit(セルステイン細胞二重染色キット)は、生細胞染色用蛍光色素 Calcein-AM と、死細胞染色用蛍光色素 PI(Propidium Iodide) で構成され、生細胞及び死細胞の染め分けに使用される。

Calcein-AM は、蛍光色素 Calcein の四つのカルボキシル基をアセトキシメチル (AM) 化して脂溶性を高め、細胞膜透過性としたものである。それ自体蛍光はないが、生細胞の細胞膜を浸透して細胞内に入ると、細胞内のエステラーゼにより加水分解され、黄緑色の強い蛍光を発する。一方、PI は核酸染色色素の一つで、死細胞内に入り込み、細胞内の DNA の二重らせん構造に intercalate することにより、特有の強い赤色蛍光を発する。

この作用の異なる二つの色素を同時に使用する事により、生細胞は黄緑色に、死細胞は赤色に染め分けることができる。蛍光顕微鏡下の細胞観察はもちろん、更にはフローサイトメトリー、あるいはプレートリーダーを用いた細胞数の計測への応用が可能である。

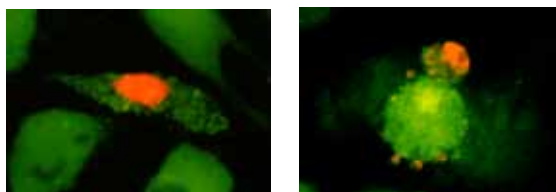
蛍光色素を利用した細胞染色は、Trypan blue と同様に分染法に代わる高感度な方法として用いられている。

1. キット内容

-Cellstain®-Double Staining Kit

A 液・・・Calcein-AM stock solution (1 mmol/l)
Calcein-AM, 1 mg/ml in DMSO 50 µl × 4

B 液・・・PI stock solution (1.5 mmol/l)
PI, 1 mg/ml in H₂O 300 µl × 1



HMD-1 細胞刺激下 (488 nm 励起)
広島大学医学部山本正夫先生提供

2. 蛍光顕微鏡を使用した細胞形態観察

以下に、HeLa 細胞を使用した場合の細胞染色の例を示すが、染色条件は細胞の種類、濃度などの観察条件によって変わるので注意すること。条件に応じて、細胞の固定や試薬濃度の調整など最適条件を検討する必要がある。

(1) 染色溶液の調整

- 1) A 液及び B 液を室温に戻す。
- 2) 5 ml の PBS(-) に A 液 10 µl、B 液 15 µl を入れる。これを染色溶液とする。この時 Calcein-AM は、2 µmol/l、PI は 4 µmol/l の濃度となる。

(2) 細胞染色

- 1) Hela 細胞等の付着細胞はトリプシン -EDTA など剥がし、細胞の懸濁液を用意する。
- 2) 細胞懸濁液を遠心分離する (1,000 rpm, 3 min)。
- 3) 上清を除き PBS(-) を添加する。(この時、細胞数が $10^5 \sim 10^6$ cells/ml となるよう調整する。)ピペッティングなどで十分分散させる。
- 4) 培養液中の血清などに含まれるエステラーゼにより Calcein-AM が加水分解し、バックグラウンドが上昇するので PBS(-) による洗浄、遠心分離を数回繰り返す。
- 5) マイクロチューブに細胞懸濁液を 200 µl 入れ、更に色素溶液を 100 µl 入れる。37°C で 15 min インキュベートする。
- 6) カバーガラス上に染色した細胞溶液を適宜サンプリングし、上からもう一枚カバーガラスを重ね染色溶液に挟み込む。
- 7) 蛍光顕微鏡にセットし、まず 490 ± 10 nm のフィルターで励起すると黄緑色に染色された生細胞が観察される。また、同時に赤色に染色した死細胞も観察することが出来る。さらに 545 nm のフィルターで励起することにより、赤色に染色した死細胞のみを蛍光観察することが出来る。

【注意事項】

- 1) Calcein-AM は湿気によりエステル部位が加水分解する恐れがあるので、使用後はキャップをしっかりと閉じ、水分の混入を避けること。
- 2) PI は発癌性の疑いがあるので、下記の点を参考にし、取り扱いには十分に注意すること。
 - ・ 取り扱い時には、手袋・保護眼鏡・マスク等を着用し、接触および吸引しないように注意する。
 - ・ 万一、皮膚に接触した場合、直ちに大量の水で洗い流す。
 - ・ 処理方法：使用した器具の洗浄液などの廃液は、各機関独自の取り扱いガイドラインに従い処理をする。あるいは、下記処理方法を参考にして分解後、廃棄する。
 - UV 照射や日光にさらし、分解する。
 - 次亜塩素酸ナトリウムにより酸化分解後、中和処理する。

URL: <http://www.dojindo.co.jp>
E-mail: info@dojindo.co.jp

Free dial:0120-489548
Free fax :0120-021557

*ご注意

○掲載内容(製品・包装など)はパンフレット編集時におけるものであり、予告無く変更することがあります。
○試験・研究用です。医薬品としては使用できません。

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

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

20120706