

オートファジーを検出したい

使用製品

DALGreen - Autophagy Detection [D675]

解析装置



I はじめに

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

分かっている盛んに研究されている。本色素は、疎水性および酸性環境で蛍光発光する特性を有する。そのため、オートファゴソームがリソソームと融合したオートリソソームを検出する。低分子のため細胞への導入も容易であり、遺伝子導入などは必要ない。本色素を細胞へ導入後は、蛍光顕微鏡下でのライブセルイメージングやフローサイトメトリーによる定量が可能である。

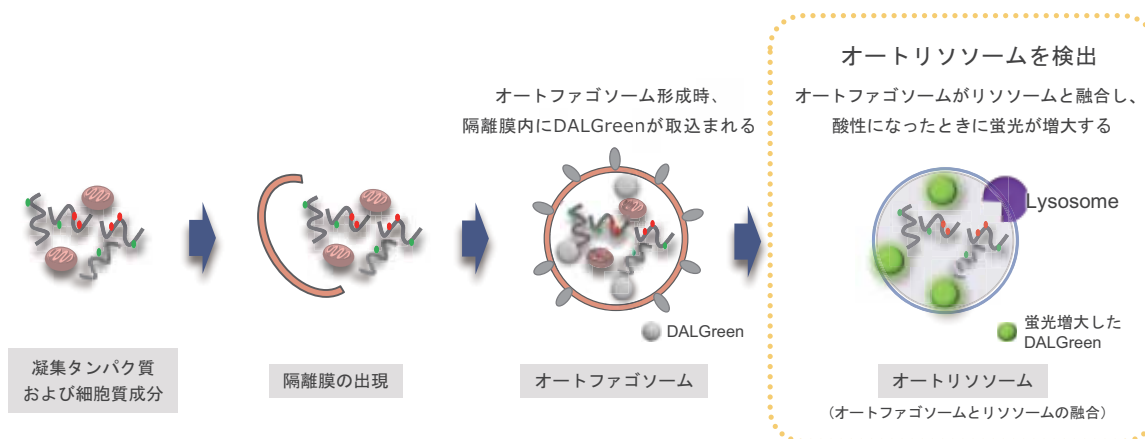


図1 DALGreen - Autophagy Detection によるオートファジー検出

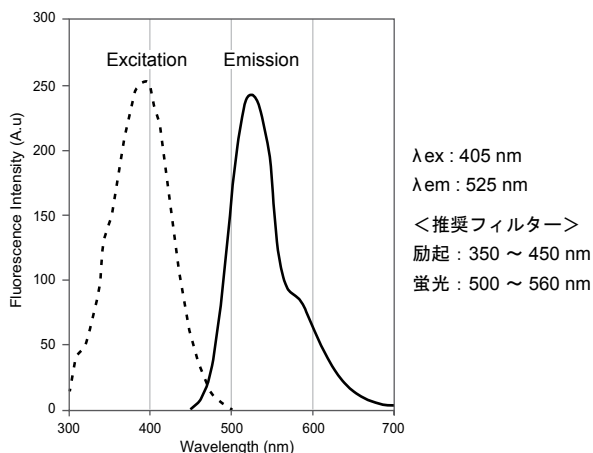


図2 DALGreen - Autophagy Detection の励起、蛍光スペクトル

II キット内容

DALGreen - Autophagy Detection 20 nmol x 1

キット以外に必要なもの

- ・ Dimethyl sulfoxide (DMSO)
- ・ 培養培地
- ・ Hanks' HEPES buffer またはフェノールレッド不含培地
- ・ マイクロピペット

III DALGreen - Autophagy Detection の操作

(1) 溶液調製

1 mmol/l DALGreen DMSO stock solution の調製

DALGreen 20 nmol を含むチューブに 20 μ l の DMSO を加えピペッティングにより溶解する。

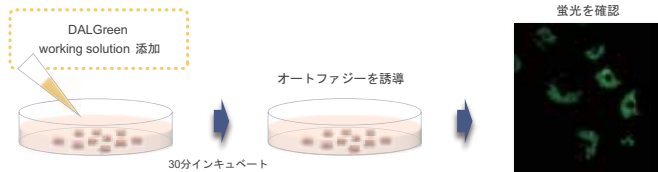
※ 調製後は -20°C で保存する。調製後 1 か月間安定である。

DALGreen working solution の調製

最終濃度が 0.1-1.0 μ mol/l になるように DALGreen DMSO stock solution を培養培地で希釈する。

※ 細胞種により最適濃度が異なるため最適条件の検討が必要である。

(2) 操作



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

IV 実験例

共焦点レーザー顕微鏡による観察

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

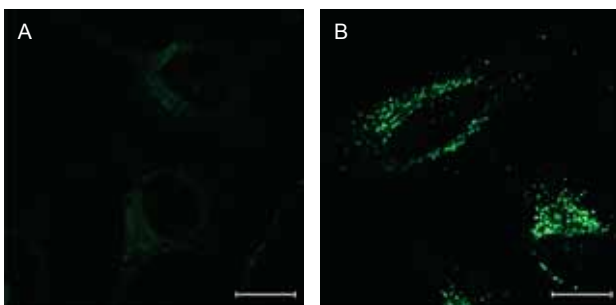


図 3 オートファジー誘導条件による共焦点レーザー顕微鏡画像
DALGreen 添加後、A) 培養培地で 6 時間培養した細胞、
B) アミノ酸不含培地で 6 時間培養した細胞
検出波長：488 nm (Ex)、500-563 nm (Em)
スケールバー：20 μ m

フローサイトメトリーによる検出

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

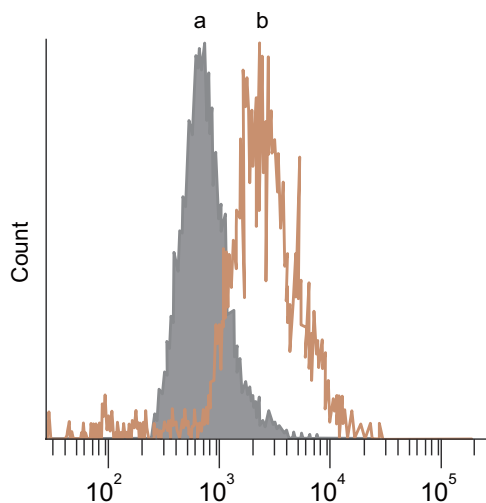


図 4 フローサイトメトリーを用いた検出
DALGreen 添加後、a) 培養培地で 20 時間培養した細胞、
b) アミノ酸不含培地で 20 時間培養した細胞
検出波長：405 nm (Ex)、485-535 nm (Em)

FAQ

Q: DALGreen working solution は、どのくらい安定ですか？

A: 保存できません。用時調製してください。

Q: DMSO stock solution は、どのくらい安定ですか？

A: 調製後は、-20°C で保存してください。調製後 1 ヶ月間安定です。また使用量に応じて小分けし保存することをお勧めします。

Q: 推奨フィルターを教えてください。

A: 励起フィルター：350 ~ 450 nm

蛍光フィルター：500 ~ 560 nm

なお、共焦点顕微鏡を用いて 488 nm 励起により蛍光観察した実績がございます。

弊社 HP 内の製品ページの実験例を参照ください。

最新の測定データやアプリケーション、論文情報を小社 HP にて掲載。ご興味のある方は、小社 HP にて最新情報をご確認下さい。

Autophagy 同仁

検索

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.