

一重項酸素を検出したい

使用製品

Si-DMA for Mitochondrial Singlet Oxygen Imaging [MT05]

解析装置



I はじめに

活性酸素種の一つであり非常に強い酸化力を持つ一重項酸素は、皮膚のシミやシワの原因となることが知られており、化粧品分野では、この一重項酸素を消去する化合物の探索が進められております。一方、医学分野、特に癌の治療においては、光感受性物質とレーザー照射により発生した一重項酸素の酸化力により癌細胞を破壊する光線力学的治療の研究が進められており、細胞内における一重項酸素レベルをモニターできる試薬が望まれております。しかしながら既存の一重項酸素検出試薬は細胞膜を透過しない為、細胞内の一重項酸素を検出できません。

真嶋らが開発した一重項酸素検出試薬 Si-DMA は、Silicon Rhodamine (SiR) 骨格を蛍光団とし、一重項酸素反応部位としてアントラセンを有した構造を持つ蛍光プローブです¹⁾。この Si-DMA は、容易に細胞膜を透過しミトコンドリアに集積後、選択的に一重項酸素と反応して強い蛍光を発生します。また、Si-DMA は 5-Aminolevulinic acid (5-ALA) で処理した細胞内のミトコンドリアで生成されるプロトポルフィリン IX 由来の一重項酸素をイメージングすることが可能です。このことから Si-DMA は、細胞内一重項酸素のイメージングが可能な蛍光色素として今後の研究への応用が期待されます。

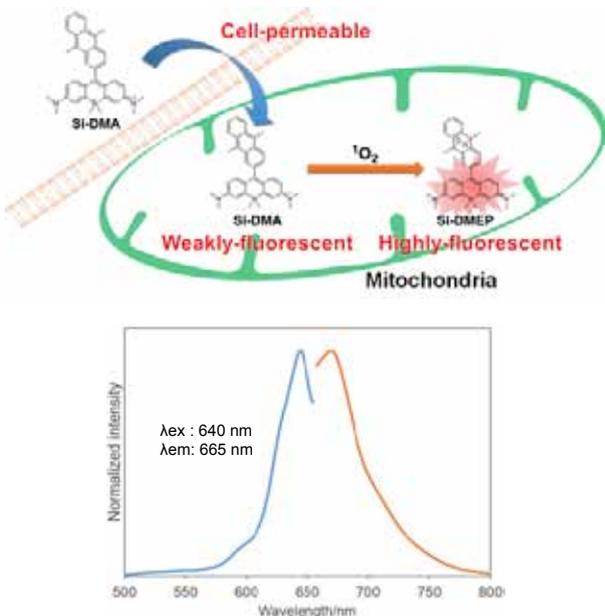


図 1 Si-DMA が ¹O₂ と反応後に生じた Si-DMEP の励起 (青), 蛍光 (赤) スペクトル

II 製品以外に必要なもの

- ・ Dimethyl sulfoxide (DMSO)
- ・ Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)
- ・ マイクロピペット

III 生細胞中の一重項酸素の検出

(1) 溶液調製

100 μmol/l Si-DMA DMSO stock solution の調製

Si-DMA 2 μg を含むチューブに 36 μl の DMSO を加え、ピペティングにより溶解する。

※ Si-DMA DMSO stock solution は遮光し、-20℃以下で保存する。

Si-DMA working solution の調製

Si-DMA DMSO stock solution を HBSS 等で希釈し、濃度が 25 - 200 nmol/l になるよう調製する。

※ Si-DMA working solution は遮光しその日の内に使用する。

(2) 染色操作

- 1) 細胞をディッシュまたはチャンバーに播種し、培養する。
- 2) 培地を取り除き、HBSS で 2 回洗浄する。
- 3) 調製した Si-DMA working solution を添加する。
- 4) 5% CO₂ インキュベーター (37℃) にて 45 分間インキュベートする。
- 5) 上澄みを除去し HBSS で 2 回洗浄する。
- 6) HBSS を加え蛍光顕微鏡で観察する。

IV 5-Aminolevulinic acid (5-ALA) で処理した HeLa 細胞を用いた一重項酸素の検出例

- 1) HeLa 細胞 (2.4 × 10⁵ cells/ml) 200 μl を μ-slide 8 well(ibidi) に DMEM 培地 (10% fetal bovine serum, 1% penicillin-streptomycin) で播種し、5% CO₂ インキュベーターで 37℃、一晚培養した。
- 2) 培地を取り除き HBSS で細胞を 2 回洗浄した。
- 3) HBSS で調製した 150 μg/ml の 5-ALA 溶液を添加し、5% CO₂ インキュベーター (37℃) にて 4 時間インキュベートした。
- 4) 上澄みを除去し HBSS で 2 回洗浄した。
- 5) Si-DMA working solution (40 nmol/l) を添加し、5% CO₂ インキュベーター (37℃) にて 45 分間インキュベートした。
- 6) 上澄みを除去し HBSS で 2 回洗浄した。
- 7) HBSS を加え、蛍光顕微鏡で観察した。

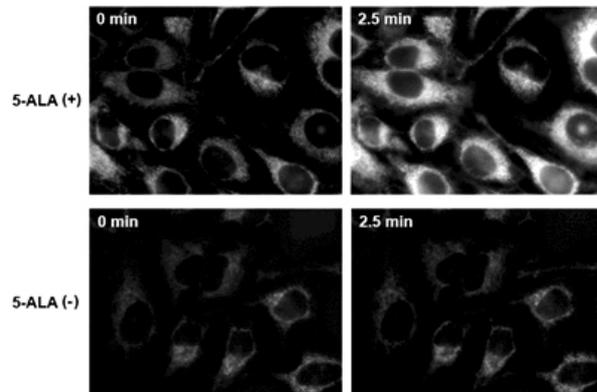


図 2 5-ALA で処理した HeLa 細胞の Si-DMA による一重項酸素の検出

励起光 (575-625 nm) の照射により、5-ALA で処理した HeLa 細胞で蛍光強度が増大した。よって、Si-DMA は 5-ALA により生成したプロトポルフィリン IX に観察光が照射されたことにより発生する一重項酸素の検出が可能である。

<フィルター> 蛍光イメージング : 575-625 nm (Ex), 660-710 nm (Em)

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
ミトコンドリア
関連試薬
細菌研究用試薬
膜タンパク質可溶化剤
ラベル化剤
二価性試薬
イオン電極
その他
機能性有機材料

V H₂O₂ / NaOCl で刺激した HeLa 細胞におけるミトコンドリア染色色素との共染色例

- 1) HeLa 細胞 (2.4 × 10⁵ cells/ml) 200 μl を μ-slide 8 well (ibidi) に MEM 培地 (10% fetal bovine serum、1% penicillin-streptomycin) で播種し、5% CO₂ インキュベーターで 37°C、一晩培養した。
- 2) 培地を取り除き HBSS で細胞を 2 回洗浄した。
- 3) Si-DMA working solution (100 nmol/l) と MitoBright Green (Code: MT06) (25 nmol/l) を細胞に添加し、5% CO₂ インキュベーター (37°C) にて 30 分間インキュベートした。
- 4) 上澄みを除去し HBSS で 2 回洗浄した。
- 5) H₂O₂ (100 μmol/l) および NaOCl (100 μmol/l) を添加し 30 秒後に蛍光顕微鏡にて観察した。

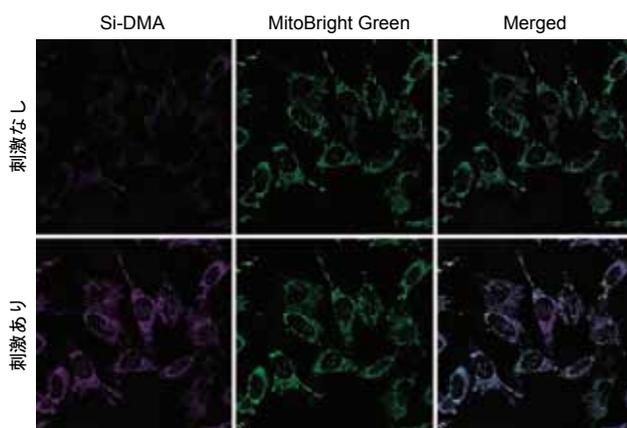


図 3 ミトコンドリア染色試薬との共染色例

参考文献

- 1) S. Kim, T. Tachikawa, M. Fujitsuka, T. Majima, "Far-Red Fluorescence Probe for Monitoring Singlet Oxygen during Photodynamic Therapy", *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, 136 (33), 11707.

FAQ

Q: Si-DMA の反応特異性について教えてください。

A: Si-DMA は一重項酸素に選択的に応答を示します。他の活性酸素種に比べ 8 倍以上高い選択を示すことが確認されています。反応特異性に関するデータは小社 HP にてご確認ください。

Q: 推奨のフィルターを教えてください。

A: 励起フィルターは 630-650 nm、蛍光フィルター 660-680 nm を推奨します。

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。

Si-DMA 同仁

検索