

活性酸素種（ROS）検出用試薬

表 1. 内容および保存条件

材料	量	保存	安定性
活性酸素種（ROS）検出用試薬	ラベルを参照	<ul style="list-style-type: none"> • -20°C 以下 • 乾燥 • 遮光 • 空気から遮断* • 凍結-解凍の繰り返しを避ける 	本製品は、指示のとおり保管すれば3ヵ月以上安定です。
*これらの製品は空気感受性であり、乾燥アルゴンまたは窒素下で保存する必要があります。			
おおよその蛍光励起波長および発光波長 (nm) : 492~495 / 517~527 (nm)。			

はじめに

Molecular Probes 社は、活性酸素種の細胞浸透性指示薬として還元型フルオレセインの誘導体およびカルセインを提供しています。化学的に還元され、アセチル化された 2',7'-ジクロロフルオレセイン (DCF) およびカルセインは、酢酸基が細胞内エステラーゼにより除去され細胞内で酸化されて、はじめて蛍光を発します¹⁻⁴ (図 1 および図 2)。エステラーゼにより親油性保護基が切断されると、色素が荷電型となり、親化合物よりもはるかに良好に細胞に保持されます。これらのプローブの酸化は、フローサイトメーター、フルオロメーター、マイクロプレートリーダー、蛍光顕微鏡により、フルオレセインに適した励起光源およびフィルター (FITC) を用いて、その増加を観察することにより検出可能です⁵⁻⁸。色素は光酸化しやすいため、蛍光顕微鏡のアプリケーションにはできるだけ低照度の条件を用いる必要があります⁹。

フルオレセインのカルボキシ誘導体であるカルボキシ-H₂DCFDA (C400) は、より多くの負の電荷を帯びており、その細胞内保持率は非カルボン酸型と比べて改善されます。フッ素化誘導体である H₂DFFDA (C13293) は、光安定性が塩素化フルオレセイン誘導体よりも高いことが示されています。チオール反応性クロロメチル基を有する誘導体 (C6827) またはアミン反応性スクシニミジルエステル基を有する誘導体 (D2935) は細胞内成分との共有結合が可能であり、細胞内保持時間がさらに長くなります。H₂DCFDA, SE (D2935) は細胞外標識も可能です。

ジヒドロカルセイン AM は細胞膜を自由に透過し、酸化されて緑色蛍光カルセインとなり、優れた保持特性を示します。しかし、フルオレセイン誘導体とは異なり、カルセインの蛍光は、pH 7 で Fe³⁺、Co²⁺、Ni²⁺、Cu²⁺により消光します。Molecular Probes 社の提供するその他の還元型フルオレセイン ROS 指示薬としては、アミノフェニルフルオレセイン (A36003) およびヒドロキシフェニルフルオレセイン (H36004) があります。

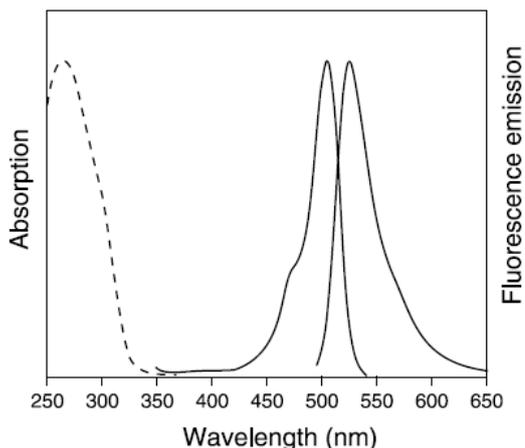


図 1. 還元型色素の吸収スペクトル（点線）および酸化型色素（実線）の吸収／発光スペクトル

使用ガイドライン

お客様にご用意いただく材料

- DMSO
- DMF
- エタノール
- PBS、HBSS、HEPES などのバッファー

ストック溶液の調製

使用直前まで製品を解凍しないでください。アセチル化色素は、必要な場合にのみ、高品質無水ジメチルスルホキシド (DMSO)、ジメチルホルム-アミド (DMF)、または 100%エタノールを用いて溶解してください。使用溶液はその都度新たに調製してください。1 回の実験が終了するたびに、余った希釈済みプローブは廃棄してください。これらのプローブは溶液中では酸化しやすく、水分存在下では色素の分解が促進されます。

一般的事項

特定の色素や細胞型のローディングプロトコールは、文献に示されています。AM または酢酸エステル濃度はできる限り低く保ち、不完全な加水分解、特定の場所への局在 (compartmentalization)、加水分解副産物 (例、ホルムアルデヒド、酢酸) による毒性作用など、オーバーローディングによるアーチファクトを抑制してください。ローディングは細胞増殖の至適温度で実施しますが、生理学的温度では室温よりも区画局在の程度が大きくなることも報告されています。

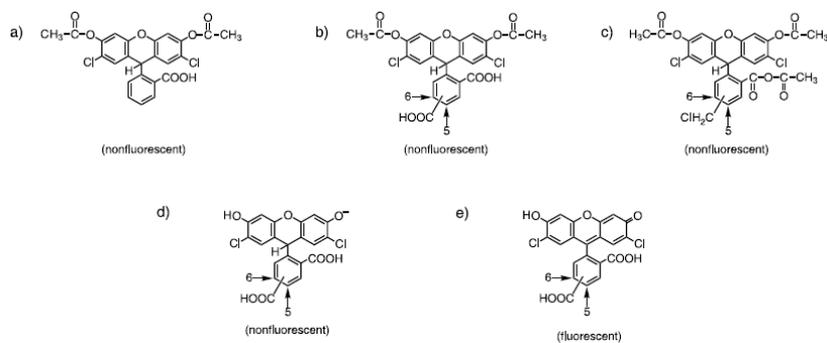


図 2. (a) H₂DCFDA、(b) カルボキシ-H₂DCFDA、(c) クロロメチル-H₂DCFDA、(d) 脱アセチル化 H₂DCF、(e) 脱アセチル化酸化産物である DCF の構造

お客様独自のアプリケーションに最適な色素ローディング濃度、温度、インキュベーション時間、回復時間、保色時間を決定するために、カルボキシ-DCFDA (C369)、二酢酸フルオレセイン (F1303)、カルセイン AM (C1430) などの細胞浸透性酸化型 ROS 指示薬を使用することを推奨します。

AM および酢酸エステルの細胞外加水分解は、第一級アミンおよび第二級アミンを含有しないローディングバッファー (PBS など) の使用により最小限にできます。細胞は、アッセイ前からアッセイ中にかけてはフェノールレッドなどの比色分析用色素を含有していない培地で維持し、ローディング後は色素を含有していないバッファーか培地で洗浄します。

注: 色素の細胞内保持時間は、実験時間より長くなければなりません。細胞の色素に対する反応はさまざまです。時間の経過とともに受動的拡散により消滅する色素もあれば、能動的流出のため、より迅速に消滅する色素もあります。アッセイを長時間にわたって実施しなければならない場合、色素の保持時間を前もって決定しておく必要があります。この作業は共有結合する誘導体についても実施します。細胞は、多岐にわたる細胞内成分を代謝回転する速度が異なるため、共有結合修飾後の生存率もそれぞれ異なるためです。

プロトコール

以下のプロトコールに、多様な文献から得られた一般的ガイドラインを示しますが、特殊なアプリケーションや必要な感度に応じて改変する必要があります。

- 1.1** 実験を行う直前に、ROS 指示薬を解凍して濃縮ストック溶液を作成します。使用までしっかりと密封しておきます。
- 1.2** 遠心分離またはピペッティングにより増殖用培地から細胞を除去します。色素の最終使用濃度が約 1~10 μM になるように調製し、予め温めておいたプローブ含有バッファー (PBS、HBSS、HEPES、またはその他の単純な生理学的バッファー) に細胞を再懸濁します。お客様のアプリケーションに最適な使用濃度は、経験的に決定する必要があります。
- 1.3** その細胞の至適温度でインキュベートします。一般に、ローディング時間は 5~60 分で十分です。
- 1.4** ローディングバッファーを除去します。予め温めておいた増殖用培地に細胞を戻し、至適温度でインキュベートします。アセトキシメチルエステル (AM) や二酢酸基を有する誘導体については、細胞内エステラーゼに短い回復時間を与えると、AM または酢酸基が加水分解され、色素が酸化しやすくなります。細胞のタイプによっては一般にエステラーゼ活性が低いため、最適な回復時間は大幅に異なることがあります¹⁰。
- 1.5** 試験の誘導物質に細胞を曝露する前に、ロード済み細胞サンプルのベースライン蛍光強度を測定します。スクシニミジルエステル誘導体 (C2935) を用いる場合、トリパンブルー (約 0.0025% w/v) を用いて細胞外結合色素を消光させると、そのシグナルと細胞内 ROS 反応をより良好に区別できます。

1.6 ネガティブコントロールを以下のように評価します。

- a) 未染色細胞の緑色発光範囲における自家蛍光について評価します。
- b) フローサイトメトリーについては、細胞の前方散乱と側方散乱が色素ローディングや処理後に変化しないことを確認します。細胞の大きさの変化は、取り扱い方法や毒性反応による泡状突起の発生や収縮に関連する可能性があります。
- c) 細胞を含有しない色素とバッファーまたは培地の混合物に、誘導物質または刺激物質を添加した場合としない場合の蛍光を測定します。細胞外エステラーゼやその他の酸化酵素の非存在下でも、ROS 指示薬は時間の経過とともに蛍光強度が徐々に増加します。この現象は、自然加水分解や大気酸化、光誘起酸化に関連すると考えられます¹¹⁻¹³。
- d) 増殖用培地または単純バッファーで維持していた未処理のロード済み細胞の蛍光を測定します。健康な細胞では、酸素ラジカルは細胞内酵素や天然抗酸化剤により除去されます。健全な細胞では、色素ローディングの回復時間後に低量の蛍光を示しますが、これは実験期間を通じて比較的安定です。ただし、蛍光が徐々に増強（自己酸化のため）または減弱（細胞の色素消失または蛍光退色のため）することがあります。刺激物質または誘導物質の非存在下で健全な未処理細胞に蛍光が急に発生した場合、細胞死またはその他の酸化イベントの進行を示している可能性があります。

1.7 ポジティブコントロールを作成するには、以下のとおりに酸化活性を誘導します。

- a) 発癌プロモーターである 4β-ホルボール 12-ミリステート 13-アセテート (PMA、DMF に溶解した 1 mM ストック溶液、使用濃度 100 pM~10 μM)
- b) 細菌走化性ペプチド N-ホルミル-L-メチオニル-L-ロイシル-L-フェニルアラニン (fMLP、DMF に溶解した 1 mM ストック溶液、使用濃度 1~10 μM)
- c) H₂O₂ または *tert*-ブチルヒドロペルオキシド (TBHP) を最終濃度約 100 μM に調製(細胞の感度と反応に基づき増量または減量)。

1.8 添加する薬剤または化合物が色素を消光させないことを確認するため、化合物の吸収スペクトルを検討し、その吸光ピークが酸化色素の励起ピークや発光ピークと重複しないことを確認します。また、薬剤や化合物をカルボキシ-DCF (C368)、フルオレセイン (F1300)、カルセイン (C481) と混合し、蛍光強度を色素のコントロール溶液と比較するか、または細胞透過酸化型色素をロードした培養物を薬剤や化合物で処理して、色素をロードした未処理細胞と比較することもできます。

参考文献

1. Anal Biochem 11, 6 (1965); 2. Anal Biochem 11, 1 (1965); 3. Anal Biochem 134, 111 (1983); 4. Cell Biol Int 24, 757 (2000); 5. J Immunol Methods 156, 39 (1992); 6. J Immunol Methods 178, 89 (1995); 7. Toxicol in Vitro 11, 531 (1997); 8. J Histochem Cytochem 50, 289 (2002); 9. Biochem Biophys Res Commun 304, 619 (2003); 10. J Leukoc Biol 43, 304 (1988); 11. FEBS Lett 511, 21 (2002); 12. Free Radic Biol Med 33, 938 (2002); 13. Free Radic Biol Med 30, 1418 (2001).

製品リスト 現在の価格は、ホームページでご確認いただくか、カスタマーサービス部にご連絡ください。

カタログ番号	製品名	単位
C13293	5-(and-6)-carboxy-2',7'-difluorodihydrofluorescein diacetate (carboxy-H ₂ DFFDA) *mixed isomers*	5 mg
C400	5-(and-6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (carboxy-H ₂ DCFDA) *mixed isomers*	25 mg
C6827	5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester (CM-H ₂ DCFDA) *mixed isomers* *special packaging*	20 x 50 µg
D23805	dihydrocalcein, AM *special packaging*	20 x 50 µg
D2935	2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, succinimidyl ester (OxyBURST™ Green H ₂ DCFDA, SE)	5 mg
D399	2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (2',7'-dichlorofluorescein diacetate; H ₂ DCFDA)	100 mg
C2938	6-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, di(acetoxymethyl ester)	5 mg

Contact Information

Molecular Probes, Inc.
 29851 Willow Creek Road
 Eugene, OR 97402
 Phone: (541) 465-8300
 Fax: (541) 335-0504

Customer Service:
 6:00 am to 4:30 pm (Pacific Time)
 Phone: (541) 335-0338
 Fax: (541) 335-0305
 probesorder@invitrogen.com

Toll-Free Ordering for USA:
 Order Phone: (800) 438-2209
 Order Fax: (800) 438-0228

Technical Service:
 8:00 am to 4:00 pm (Pacific Time)
 Phone: (541) 335-0353
 Toll-Free (800) 438-2209
 Fax: (541) 335-0238
 probestech@invitrogen.com

Invitrogen European Headquarters
 Invitrogen, Ltd.
 3 Fountain Drive
 Inchinnan Business Park
 Paisley PA4 9RF, UK
 Phone: +44 (0) 141 814 6100
 Fax: +44 (0) 141 814 6260
 Email: euroinfo@invitrogen.com
 Technical Services: eurotech@invitrogen.com

Further information on Molecular Probes products, including product bibliographies, is available from your local distributor or directly from Molecular Probes. Customers in Europe, Africa and the Middle East should contact our office in Paisley, United Kingdom. All others should contact our Technical Assistance Department in Eugene, Oregon.

Molecular Probes products are high-quality reagents and materials intended for research purposes only. These products must be used by, or directly under the supervision of, a technically qualified individual experienced in handling potentially hazardous chemicals. Please read the Material Safety Data Sheet provided for each product; other regulatory considerations may apply.

Limited Use Label License No. 223: Labeling and Detection Technology

The purchase of this product conveys to the buyer the non-transferable right to use the purchased amount of the product and components of the product in research conducted by the buyer (whether the buyer is an academic or for-profit entity). The buyer cannot sell or otherwise transfer (a) this product (b) its components or (c) materials made using this product or its components to a third party or otherwise use this product or its components or materials made using this product or its components for Commercial Purposes. The buyer may transfer information or materials made through the use of this product to a scientific collaborator, provided that such transfer is not for any Commercial Purpose, and that such collaborator agrees in writing (a) to not transfer such materials to any third party, and (b) to use such transferred materials and/or information solely for research and not for Commercial Purposes. Commercial Purposes means any activity by a party for consideration and may include, but is not limited to: (1) use of the product or its components in manufacturing; (2) use of the product or its components to provide a service, information, or data; (3) use of the product or its components for therapeutic, diagnostic or prophylactic purposes; or (4) resale of the product or its components, whether or not such product or its components are resold for use in research. Invitrogen Corporation will not assert a claim against the buyer of infringement of the above patents based upon the manufacture, use or sale of a therapeutic, clinical diagnostic, vaccine or prophylactic product developed in research by the buyer in which this product or its components was employed, provided that neither this product nor any of its components was used in the manufacture of such product. If the purchaser is not willing to accept the limitations of this limited use statement, Invitrogen is willing to accept return of the product with a full refund. For information on purchasing a license to this product for purposes other than research, contact Molecular Probes, Inc., Business Development, 29851 Willow Creek Road, Eugene, OR 97402, Tel: (541) 465-8300. Fax: (541) 335-0354.

Several Molecular Probes products and product applications are covered by U.S. and foreign patents and patents pending. All names containing the designation * are registered with the U.S. Patent and Trademark Office.

Copyright 2006, Molecular Probes, Inc. All rights reserved. This information is subject to change without notice.