

一般研究用

HYDROP

表 1. 製品情報

品番	品名	容量	保存	安定性
GC3007-01	HYDROP	30 nmol × 3 本	遮光冷凍保存 DMF 溶解後は使い切り	未開封で 約 1 年

1. はじめに

HYDROP は細胞内で活性酸素種 (ROS) のひとつ、過酸化水素 (H_2O_2 , hydrogen peroxide) と反応して蛍光強度が増大する蛍光プローブです。ROS は生体内で酸化ストレスをもたらす毒性因子として知られる一方、細胞内のシグナル伝達物質としても注目されています。このうち、 H_2O_2 はアポトーシスの誘導や、貪食によって取り込まれた食胞内微生物の殺傷因子として機能することが知られているほか、オートファジーへの関与が示唆されるなど、細胞内消化の鍵として注目されています。

HYDROP は、生理的環境下で H_2O_2 に対し優れた選択性を示します。アセチル基が細胞内で加水分解されることで H_2O_2 と反応しやすくなり、また細胞内に長く留まる特性があるため、生細胞中の H_2O_2 の検出にお使いいただけます。加水分解前は H_2O_2 との反応性が低いため、細胞外では使用できません。ご注意ください。

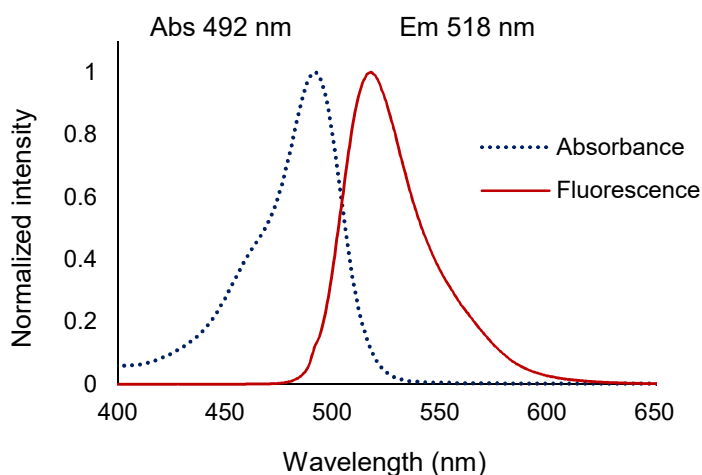


図 1. HYDROP の吸収および蛍光スペクトル
0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 pH 7.4 で測定。

2. 細胞染色プロトコル

■ ご用意いただくもの

- ・ N,N-dimethylformamide (DMF)
- ・ 適切な洗浄および観察用バッファー (例: 1 × PBS pH 7.4, HBSS, Krebs-Ringer phosphate (KRP) buffer など)

■ 試薬の調製および細胞染色例

1. HYDROP 1 バイアル (30 nmol) を DMF 30 μ L に溶解させ、1 mM ストック溶液を作成します。
2. 色素を HBSS などのバッファー、あるいは細胞培養メEDIUMで希釈し、終濃度 1–5 μ M の染色液を作成します。
 ※ 各細胞により適切な色素濃度およびインキュベーション時間は異なるため、最適化が必要です。弊社での検討では、HeLa 細胞(ヒト子宮頸がん由来細胞株)および A431 細胞(ヒト上皮様細胞癌由来細胞株)で 5 μ M, 37°C, 20 分、RAW264.7 細胞(マウスマクロファージ様細胞株)で 1 μ M, 37°C, 20 分の条件で良好な結果が確認できています。
3. 培養細胞より液体培地を除去し、PBS, HBSS, KRP buffer などの洗浄バッファーで 2 回洗浄を行います。
 ※ 培養容器は自家蛍光の少ない「ガラスボトムディッシュ」等を推奨します。
4. 培養容器に染色液を加え、37°C で 20 分間インキュベーションします。
5. 染色した細胞を洗浄バッファーで 2 回洗浄します。
6. 洗浄後、適切な観察バッファーに置き換えます。
7. Phorbol myristate acetate (PMA) などを添加することで細胞を刺激し、蛍光顕微鏡で観察します。
 ※ 同検討では、約 30 分で十分な蛍光が確認できています。

■ 蛍光観察

励起波長は 488 nm が適しています。蛍光波長はおよそ 518 nm をピークに検出されます。用いるフィルタは、GFP-LP (Nikon 社) もしくは U-MWB2 (Olympus 社) 等のロングパスフィルタを推奨します。

■ 保存

色素は窒素封入、乾燥状態で冷蔵出荷しております。入荷後は遮光して–20°C 以下で冷凍保存してください。DMF に溶解後は使い切ってください。溶液の状態で保存したときの活性は保証しておりません。

表 2. 関連製品

型番	品名	主な用途
SK3001-01	HPF	ヒドロキシルラジカル (\cdot OH)、パーオキシナイトライト (ONOO $^-$) の検出に。
SK3002-01	APF	ヒドロキシルラジカル (\cdot OH)、パーオキシナイトライト (ONOO $^-$)、次亜塩素酸 (ClO $^-$) の検出に。
SK3003-01	NiSPY-3	パーオキシナイトライト (ONOO $^-$) の検出に。
GC3006-01	HySOx	次亜塩素酸 (ClO $^-$) の検出に。
GC301	AcidiFluor™ ORANGE	pH 感受性プローブ。酸性オルガネラのイメージングに。
GC901	FeRhoNox™-1	ゴルジ体に局在する Fe (II) イオンの検出に。