

一般研究用

HYDROP™, HYDROP-EX™

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
GC3008-01	HYDROP-EX	30 nmol×3 本		

1. はじめに

HYDROP, HYDROP-EX は活性酸素種 (ROS) のひとつ、過酸化水素 (H_2O_2 , hydrogen peroxide) と選択的に反応し、蛍光強度が増大する蛍光プローブです。この試薬は生理的条件下で H_2O_2 に対し優れた選択性を示します。

HYDROP は細胞内の H_2O_2 を検出するための蛍光プローブです。細胞膜を透過しやすく、また細胞外では H_2O_2

とは反応しにくくなっていますが、細胞内でアセチル基が加水分解され、膜透過性が低く、 H_2O_2 との反応性が高い HYDROP-EX が生成します。

HYDROP-EX は膜透過性が低く、細胞には導入できません。溶液中の H_2O_2 を検出・定量するためにご利用いただけます。

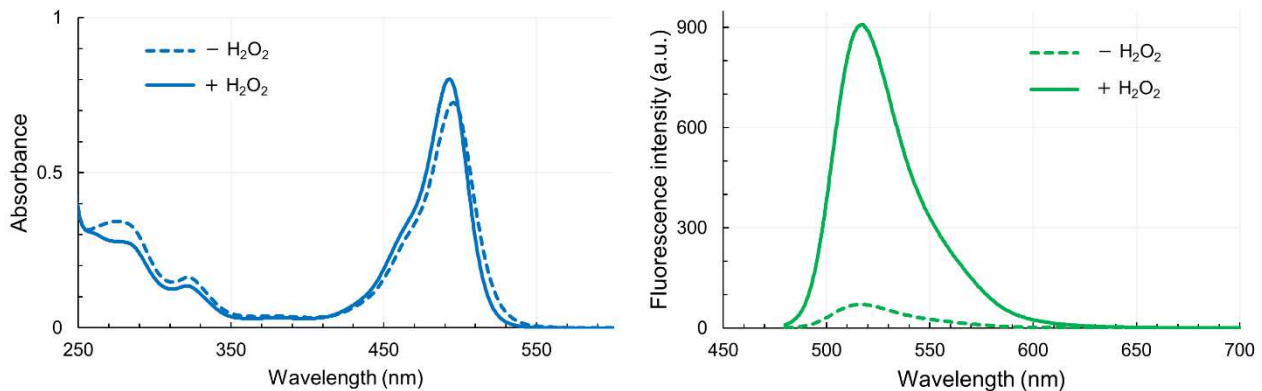


図 1 HYDROP-EX の吸収・蛍光スペクトル。

0.1 M リン酸バッファー (pH 7.4) 中で測定した H_2O_2 反応前 (点線) および反応後 (実線) のスペクトル。吸収スペクトルは 10 μ M HYDROP-EX のもの。最大吸収波長は 492 nm, 最大蛍光波長は 526 nm。

■ 試薬の保存

色素は窒素封入、乾燥状態で出荷しております。入荷後は遮光し -20°C 以下で冷凍保存してください。DMF 溶解後は使い切ってください。溶液で保存した試薬の活性は保証していません。



2. 試薬の準備

溶媒として、N,N-dimethylformamide (DMF) をご用意ください。

HYDROP は無色の粉末、HYDROP-EX はオレンジ色の粉末です。吸湿しないよう室温に戻したバイアルをマイクロ遠心機で遠心し、蓋などに付着している粉末を底に集めてから開封してください。1 バイアル (30 nmol) に DMF 30 μ L を加え、ピペティングを 5 回以上繰り返して完全に溶解してください。これが 1 mM 溶液となります。HYDROP 溶液は無色透明、HYDROP-EX 溶液はオレンジ色となります。

3. HYDROP-EX による H₂O₂ の定量方法

1. 検量線を描くために、過酸化水素 (H₂O₂, hydrogen peroxide) をご用意ください。市販の 30-35% 過酸化水素は、およそ 10 M です。この溶液を純水で 1000 倍に希釈し、240 nm における吸光度 A₂₄₀ を測定してください。
2. 希釈前の過酸化水素濃度を $C = A_{240} / \epsilon \times 1000$ (M) として求めます。ここで、 $\epsilon = 43.6$ (M⁻¹cm⁻¹) は H₂O₂ の 240 nm におけるモル吸光係数です。
3. 測定したい溶液と同じ溶液条件の緩衝液に H₂O₂ を 0–100 μ M になるように希釈し、1–10 μ M となるよう HYDROP-EX を加えて攪拌して、37°C で 1 時間反応させます。(H₂O₂ 濃度、HYDROP 濃度は、測定したい H₂O₂ の濃度範囲に合わせて調整してください。)
4. 反応した溶液の蛍光強度を蛍光分光光度計やマイクロプレートリーダーなどで測定してください。このとき、HYDROP-EX が濃すぎると、正確な蛍光測定ができませんので、HYDROP-EX の濃度が 1 μ M 以下または測定溶液の 490 nm における吸収が 0.1 以下になるよう希釈してから蛍光を測定してください。励起は 470–490 nm、蛍光は 520–530 nm 付近で測定することを推奨します。測定機によっては、励起光が蛍光検出に漏れ込むことがありますので、条件検討の上で問題のない波長を設定してください。
5. 横軸に H₂O₂ 濃度 C 、縦軸に蛍光強度 I をプロットし、以下の関数

$$I = \frac{aC}{k - C} + b$$

でフィッティングし、パラメーター a, b および k を求めてください。この関数が検量線となります。

6. H₂O₂ 濃度を測定したい溶液に、検量線の測定時と同じ濃度になるように HYDROP-EX を加えて攪拌し、同じ温度、同じ時間だけ反応させたのち、同様に蛍光強度を測定してください。測定溶液に他の蛍光物質が含まれる可能性があるときは、コントロールとなる溶液も同時に測定し、自家蛍光の強度を減算してください。
7. 得られた蛍光強度から、次式により H₂O₂ 濃度を求めることができます。

$$C = \frac{I - b}{I + a - b} k$$

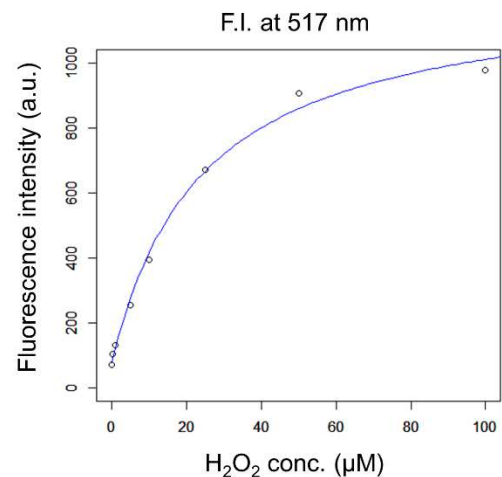


図 2. HYDROP-EX による検量線の例

4. HYDROP による細胞内 H₂O₂ 検出方法

1. HYDROP の DMF 溶液を細胞培養培地などで希釈し、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。
2. 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。
3. 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。
4. 染色した細胞を洗浄バッファーで 2 回洗浄します。
5. 洗浄後、適切な観察バッファーに置き換えます。
6. 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 付近の青色光が適しています。 蛍光波長はおよそ 516 nm をピークに検出されます。 蛍光顕微鏡では一般的な B 励起フィルター（GPF, FITC 用など）が使用できます。

表 2. 関連製品

型番	品名	主な用途
SK3001-1 SK3001-2	HPF	ヒドロキシルラジカル ($\cdot\text{OH}$)、 パーオキシナイトライト (ONOO^-) の検出に。
SK3002-01 SK3002-1	APF	ヒドロキシルラジカル ($\cdot\text{OH}$)、 パーオキシナイトライト (ONOO^-)、 次亜塩素酸 (HClO) 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 (HClO) 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。
A401-1	QuicGSH3.0	還元型グルタチオンの定量に。