

# AcidiFluor™ ORANGE-Zymosan A

表 1. 製品情報

品番	品名	容量	保存	安定性
GC305	AcidiFluor ORANGE-Zymosan A	1 mg	湿気を避け、遮光冷凍保存	未開封で約 1 年

## 1. AcidiFluor ORANGE-Zymosan A について

AcidiFluor ORANGE-Zymosan A は、AcidiFluor ORANGE と酵母細胞壁由来の免疫活性化物質 Zymosan A の共有結合体です。AcidiFluor ORANGE は、細胞質や培養液の中性溶液中ではほとんど蛍光を示さず、酸性オルガネラ内環境で蛍光強度が増大するため、フローサイトメーターによる細胞の貪食活性の評価に適しています。褪色も遅いため、蛍光顕微鏡によるタイムラプスイメージングにも適しています。

表 2 色素の物性

吸収極大 波長 (nm)	蛍光極大 波長 (nm)	pKa	$\epsilon$
535	568	5.8, 7.0	80 000

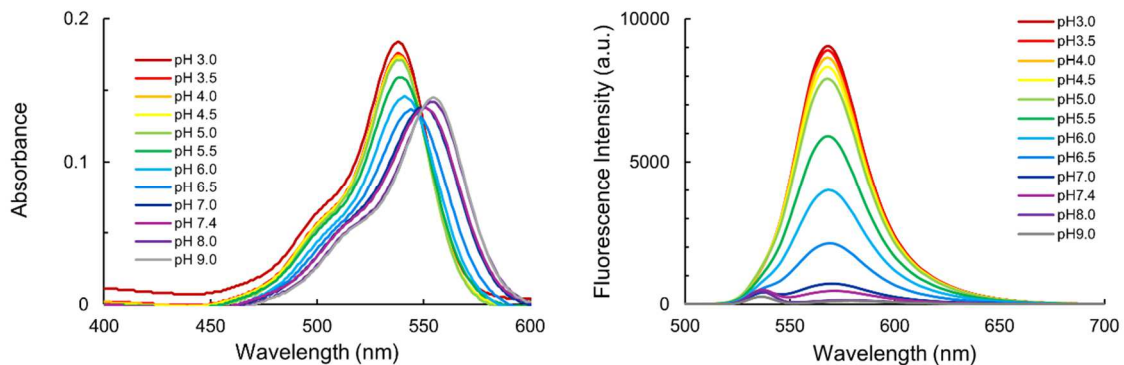


図 1 色素のスペクトル。蛍光スペクトルは 535 nm で励起したものの。

### ■ 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 -20°C 以下で冷凍保存してください。水溶

液として保存した時の試薬の活性は保証しておりません。



## 2. プロトコル

### ■ 試薬の調製

1. 細胞培養用培地に AcidiFluor ORANGE-Zymosan A を懸濁します。本製品は水に溶けません。
2. 懸濁液を 2 分間ソニケーションし、氷上で 2 分間冷却します。この作業を 5 回繰り返して粒子を均一に分散させます。

### ■ 使用例

#### RAW264.7 細胞による貪食のイメージング

1. ガラスボトムディッシュに RAW264.7 細胞を播種し一晩培養します。
2. ディッシュから細胞培養培地を除去します。続いて AcidiFluor ORANGE-Zymosan A を 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  に希釈した懸濁液を培養容器に入れ、37°C、5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下で約 1–2 時間培養します。通常は、1 時間程度で良く貪食されます。
3. 余分な AcidiFluor ORANGE-Zymosan A を含む染色懸濁液を取り去ります。その後、この細胞を HBSS などの洗浄バッファーで 2 回洗浄し、余分な細胞外の AcidiFluor ORANGE-Zymosan A を除きます。この際、細胞が剥がれないように優しく洗浄してください。
4. 溶液を HBSS もしくはフェノールレッドを含まない観察用培地に置換し、常法にて蛍光顕微鏡観察を行ってください。

※ 必要に応じて AcidiFluor ORANGE-Zymosan A の濃度を調節してください。弊社の検討では、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  AcidiFluor ORANGE-Zymosan A では約 10 %、20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  AcidiFluor ORANGE-Zymosan A では約 20 %の陽性細胞が得られております。また、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  AcidiFluor ORANGE-Zymosan A では約 50 %の陽性細胞が得られますが、余分な AcidiFluor ORANGE-Zymosan A の画面への映り込みが非常に多くなります。

#### フローサイトメーターによる貪食の計測

1. 条件の整った RAW264.7 細胞を準備します。
2. 培養細胞から細胞培養メディアムを除去します。続いて 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  AcidiFluor ORANGE-Zymosan A 懸濁液を培養容器に入れ、37°C、5 % CO<sub>2</sub> 雰囲気下で約 1–2 時間培養します。通常は、1 時間程度で良く貪食されます。
3. AcidiFluor ORANGE-Zymosan A を含む細胞培養培地を取り除き、細胞を HBSS で 2 回洗浄します。細胞が剥がれないように優しく洗浄してください。
4. Trypsin-EDTA を用いて細胞をディッシュから剥がした後、血清を含む細胞培養培地で trypsin を中和します。その後、この細胞懸濁液を遠心分離により細胞と上清を分離します。
5. 上清を捨てた後、細胞を PBS にて再懸濁します。
6. 細胞懸濁液を 40  $\mu\text{m}$  ナイロンメッシュのセルストレーナーを通し、大きな塊を除きます。
7. フローサイトメーターにて測定します。

### ■ 蛍光観察

励起波長は 532 nm が適切ですが、488 nm レーザーでも励起が可能です。蛍光顕微鏡では、一般的な G 励起フィルター (Cy3 用等) が使用できます。フローサイトメーターで用いるフィルタは、phycoerythrin 用フィルターが最適です。

表 3. 関連製品

型番	品名	主な用途
GC301	AcidiFluor ORANGE	ライソソームのイメージングに
GC302	AcidiFluor ORANGE-NHS	[タンパク質・核酸標識用 pH プローブ] 抗体などへの修飾に
GC304	AcidiFluor ORANGE labeling kit	修飾のためのオールインワンタイプ
GC306	AcidiFluor ORANGE-Dextran 10k	エンドサイトーシスの解析に
GC307	AcidiFluor ORANGE-Beads	AcidiFluor ORANGE をシリカ粒子に固定化したタイプ
GC308	AcidiFluor ORANGE-wBeads	FITC を内包する pH センシングビーズ。追跡が容易です
GC309	AcidiFluor ORANGE-Transferrin	エンドサイトーシスの解析に
GC310-01	HaloTag® AcidiFluor ORANGE Ligand	ハロタグリガンド化された pH センサー
GC3006-01	HySOx	細胞内の次亜塩素酸の検出に