

NO Fluor シリーズ - Publication List -

一酸化窒素：Nitric oxide (NO) は重要な生理活性物質です。1998 年には内皮依存性血管拡張因子として NO を発見した 3 研究者にノーベル医学生物学賞が授与されました。

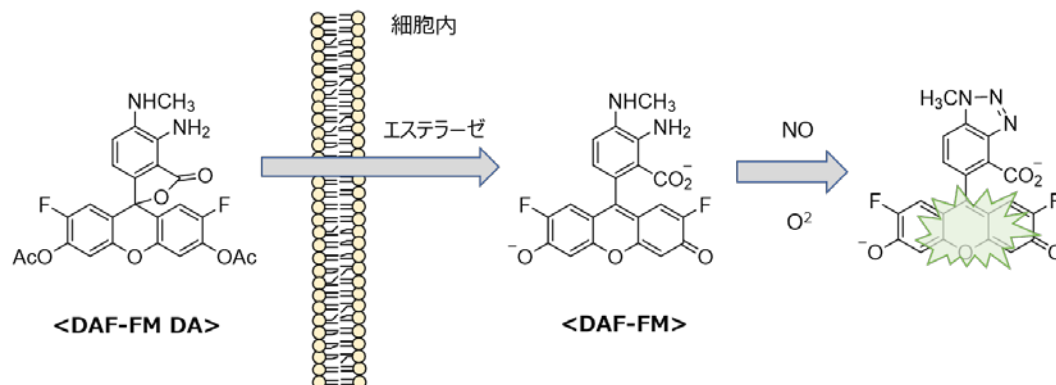
血管拡張だけでなく、炎症反応や神経シグナル、また植物や酵母など多くの生物種で研究されています。NO はフリーラジカルであり生体内では迅速に酸化されるため、検出が困難です。

五稜化薬では、NO と反応し蛍光を発するアクティブイタブル蛍光プローブを複数種販売しております。これら試薬は不可逆的に反応するため、迅速に消失する NO を蛍光体として安定的にとらえることが可能です。

1. 特徴

| 型番 | 商品名 | 特徴 | 細胞膜透過性 | 使用可能 pH | Ex (nm) | Em (nm) | Extinction coefficient* ($10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) | Relative quantum efficiencies* |
|-----------|-----------|------------------------------------|--------|---------|---------|---------|---|--------------------------------|
| SK1001-01 | DAF-2 | 最も広く使用され、実績のあるタイプです | - | >7 | 495 | 515 | 7.3 | 0.92 |
| SK1002-01 | DAF-2 DA | | + | >7 | 495 | 515 | | |
| SK1003-01 | DAF-FM | 酸性領域でもシグナルが低下せず、DAF-2 よりも感度が優れています | - | >5.5 | 495 | 515 | 7.3 | 0.81 |
| SK1004-01 | DAF-FM DA | | + | >5.5 | 495 | 515 | | |
| SK1005-01 | DAR-4M | 長波長励起で細胞の自家蛍光と重ならず、幅広い pH で使えます | - | 4-12 | 560 | 575 | 7.6 | 0.42 |
| SK1006-01 | DAR-4M AM | | + | 4-12 | 560 | 575 | | |

※1：開発論文における、NO と反応後の蛍光体の値を示しています。



2. Publication List

2.1. 開発論文

Kojima H, Nakatsubo N, Kikuchi K, Kawahara S, Kirino Y, Nagoshi H, Hirata Y, Nagano T. Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. **Anal Chem.** 1998 Jul 1;70(13):2446-53. DOI: 10.1021/ac9801723
DAF-2, DAF-2 DA 開発論文

Kojima H, Urano Y, Kikuchi K, Higuchi T, Hirata Y, Nagano T. Fluorescent Indicators for Imaging Nitric Oxide Production. **Angew Chem Int Ed Engl.** 1999 Nov 2;38(21):3209-3212. DOI: 10.1002/(SICI)1521-3773(19991102)38:21<3209::AID-ANIE3209>3.0.CO;2-6
DAF-FM, DAF-FM DA 開発論文

Kojima H, Hirotsu M, Nakatsubo N, Kikuchi K, Urano Y, Higuchi T, Hirata Y, Nagano T. Bioimaging of nitric oxide with fluorescent indicators based on the rhodamine chromophore. **Anal Chem.** 2001 May 1;73(9):1967-73. DOI: 10.1021/ac001136i
DAR-4M, DAR-4M AM 開発論文

2.2. 脳・神経

Choi WS, Eom DS, Han BS, Kim WK, Han BH, Choi EJ, Oh TH, Markelonis GJ, Cho JW, Oh YJ. Phosphorylation of p38 MAPK induced by oxidative stress is linked to activation of both caspase-8- and -9-mediated apoptotic pathways in dopaminergic neurons. **J Biol Chem.** 2004 May 7;279(19):20451-60. DOI: 10.1074/jbc.M311164200

試料：MN9D 細胞、試薬：DAF-FM DA、測定：蛍光顕微鏡、蛍光プレートリーダー

Kojima H, Hirata M, Kudo Y, Kikuchi K, Nagano T. Visualization of oxygen-concentration-dependent production of nitric oxide in rat hippocampal slices during aglycemia. **J Neurochem.** 2001 Mar;76(5):1404-10. DOI: 10.1046/j.1471-4159.2001.00161.x

試料：ラット脳スライス、試薬：DAF-FM DA、測定：蛍光顕微鏡

Lacza Z, Horn TF, Snipes JA, Zhang J, Roychowdhury S, Horváth EM, Figueroa JP, Kollai M, Szabó C, Busija DW. Lack of mitochondrial nitric oxide production in the mouse brain. **J Neurochem.** 2004 Aug;90(4):942-51. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2004.02553.x

試料：神経（プライマリー）、試薬：DAF-2 DA、測定：共焦点顕微鏡

Canabal DD, Potian JG, Duran RG, McArdle JJ, Routh VH. Hyperglycemia impairs glucose and insulin regulation of nitric oxide production in glucose-inhibited neurons in the ventromedial hypothalamus. **Am J**

Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2007 Aug;293(2):R592-600. Epub 2007 May 30.

DOI:10.1152/ajpregu.00207.2007

試料：ラット神経（プライマリー）、試薬：DAF-FM DA、測定：蛍光顕微鏡

2.3. 血管

Kashiwagi S, Kajimura M, Yoshimura Y, Suematsu M. Nonendothelial source of nitric oxide in arterioles but not in venules: alternative source revealed in vivo by diaminofluorescein microfluorography. **Circ Res.** 2002 Dec 13;91(12):e55-64. Erratum in: *Circ Res.* 2003 May 30;92(10):e79.

DOI: 10.1161/01.RES.0000047529.26278.4D

試料：ラット腸間膜微小血管、試薬：DAF-2 DA、測定：共焦点顕微鏡

Tomita T, Hirayama A, Matsui H, Aoyagi K. Effect of Keishibukuryogan, a Japanese Traditional Kampo Prescription, on Improvement of Microcirculation and Oketsu and Induction of Endothelial Nitric Oxide: A Live Imaging Study. **Evid Based Complement Alternat Med.** 2017;2017:3620130. DOI: 10.1155/2017/3620130.

試料：ラット細動脈内皮細胞、試薬：DAF-2 DA、測定：共焦点顕微鏡

Nie L, Wise ML, Peterson DM, Meydani M. Avenanthramide, a polyphenol from oats, inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and enhances nitric oxide production. **Atherosclerosis.** 2006 Jun;186(2):260-6.

DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2005.07.027

試料：ヒト血管平滑筋、および大動脈内皮細胞、試薬：DAF-2、測定：蛍光プレートリーダー

Sheng JZ, Wang D, Braun AP. DAF-FM (4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein) diacetate detects impairment of agonist-stimulated nitric oxide synthesis by elevated glucose in human vascular endothelial cells: reversal by vitamin C and L-sepiapterin. **J Pharmacol Exp Ther.** 2005 Nov;315(2):931-40.

DOI: 10.1124/jpet.105.087932

試料：HUVEC 細胞、試薬：DAF-FM DA、測定：蛍光プレートリーダー

2.4. 筋肉

Itoh Y, Ma FH, Hoshi H, Oka M, Noda K, Ukai Y, Kojima H, Nagano T, Toda N. Determination and bioimaging method for nitric oxide in biological specimens by diaminofluorescein fluorometry. **Anal Biochem.** 2000 Dec 15;287(2):203-9. DOI: 10.1006/abio.2000.4859

試料：ラット平滑筋（プライマリー）、試薬：DAF-FM DA、測定：蛍光顕微鏡

試料：ブタ冠状動脈、試薬：DAF-FM、測定：HPLC

Quintana E, Hernández C, Alvarez-Barrientos A, Esplugues JV, Barrachina MD. Synthesis of nitric oxide in postganglionic myenteric neurons during endotoxemia: implications for gastric motor function in rats. **FASEB J.** 2004 Mar;18(3):531-3. Epub 2004 Jan 8. DOI: 10.1096/fj.03-0596fje

試料：ラット平滑筋（プライマリー）、試薬：DAF-FM DA、測定：共焦点顕微鏡

Strijdom H, Muller C, Lochner A. Direct intracellular nitric oxide detection in isolated adult cardiomyocytes: flow cytometric analysis using the fluorescent probe, diaminofluorescein. **J Mol Cell Cardiol.** 2004 Oct;37(4):897-902. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2004.05.018

試料：ラット心筋細胞（プライマリー）、試薬：DAF-2 DA、測定：フローサイトメーター

2.5. 免疫

Nagy G, Koncz A, Perl A. T cell activation-induced mitochondrial hyperpolarization is mediated by Ca²⁺ and redox-dependent production of nitric oxide. **J Immunol.** 2003 Nov 15;171(10):5188-97.

DOI: 10.4049/jimmunol.171.10.5188

試料：T cell、試薬：DAF-FM DA、測定：フローサイトメーター

Pinke KH, Lima HG, Cunha FQ, Lara VS. Mast cells phagocyte *Candida albicans* and produce nitric oxide by mechanisms involving TLR2 and Dectin-1. **Immunobiology.** 2016 Feb;221(2):220-7.

DOI: 10.1016/j.imbio.2015.09.004.

試料：mast cell、試薬：DAF-FM DA、測定：分光光度計

Collette JR, Zhou H, Lorenz MC. *Candida albicans* suppresses nitric oxide generation from macrophages via a secreted molecule. **PLoS One.** 2014 Apr 22;9(4):e96203. DOI: 10.1371/journal.pone.0096203.

試料：マクロファージ、試薬：DAF-2 DA、測定：プレートリーダー

Nagy G, Barcza M, Gonchoroff N, Phillips PE, Perl A. Nitric oxide-dependent mitochondrial biogenesis generates Ca²⁺ signaling profile of lupus T cells. **J Immunol.** 2004 Sep 15;173(6):3676-83.

DOI: 10.4049/jimmunol.173.6.3676

試料：T cell、試薬：DAF-FM DA、測定：フローサイトメーター

2.6. 植物

Mur LA, Mandon J, Cristescu SM, Harren FJ, Prats E. Methods of nitric oxide detection in plants: a commentary. **Plant Sci.** 2011 Nov;181(5):509-19. DOI: 10.1016/j.plantsci.2011.04.003

植物での NO 測定方法の総説。測定の注意事項なども記載

Corpas FJ, Hayashi M, Mano S, Nishimura M, Barroso JB. Peroxisomes Are Required for in Vivo Nitric Oxide Accumulation in the Cytosol following Salinity Stress of Arabidopsis Plants. **Plant Physiology**, 2009 Dec;151(4):2083-94. DOI: 10.1104/pp.109.146100.

生物 : Arabidopsis、試薬 : DAF-FM DA, DAR-4M AM、測定 : 共焦点顕微鏡

Foissner, I.; Wendehenne, D.; Langebartels, C.; Durner, J In vivo imaging of an elicitor-induced nitric oxide burst in tobacco. **Plant J**. 2000 Sep;23(6):817-24. DOI: 10.1046/j.1365-313X.2000.00835.x

生物 : Tobacco plants、試薬 : DAF-2 DA、測定 : 共焦点顕微鏡

Melillo MT, Leonetti P, Leone A, Veronico P, Blevé-Zacheo T ROS and NO production in compatible and incompatible tomato-Meloidogyne incognita interactions. *Eur J Plant Pathol*. 2011 130:489–502. DOI: 10.1007/s10658-011-9768-4

生物 : Tomato、試薬 : DAF-2 DA、測定 : 共焦点顕微鏡、分光光度計

Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hancock JT. Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. **Plant Physiol**. 2002 Jan;128(1):13-6. DOI: 10.1104/pp.010707

生物 : Pea、試薬 : DAF-2 DA、測定 : 共焦点顕微鏡

2.7. 固定条件での使用

本試薬類はライブセルイメージング用途で販売していますが、固定条件での報告例もあります。阻害剤との組み合わせなど、適切なコントロール試験が必要です。

Pandit L, Kolodziejaska KE, Zeng S, Eissa NT. The physiologic aggresome mediates cellular inactivation of iNOS. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2009 Jan 27;106(4):1211-5. DOI: 10.1073/pnas.0810968106.

Iantorno M, Chen H, Kim JA, Tesauro M, Lauro D, Cardillo C, Quon MJ. Ghrelin has novel vascular actions that mimic PI 3-kinase-dependent actions of insulin to stimulate production of NO from endothelial cells. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. 2007 Mar;292(3):E756-64. DOI: 10.1152/ajpendo.00570.2006

2.8. 使用における注意

Mur LA, Mandon J, Cristescu SM, Harren FJ, Prats E. Methods of nitric oxide detection in plants: a commentary. **Plant Sci.** 2011 Nov;181(5):509-19. DOI: 10.1016/j.plantsci.2011.04.003

植物での使用における総説。測定 of 注意事項なども記載

Namin SM, Nofallah S, Joshi MS, Kavallieratos K, Tsoukias NM. Kinetic analysis of DAF-FM activation by NO: toward calibration of a NO-sensitive fluorescent dye. **Nitric Oxide.** 2013 Jan 15;28:39-46.

DOI: 10.1016/j.niox.2012.10.001.

DAF の NO に対する反応をキネティクス解析

Balcerczyk A, Soszynski M, Bartosz G. On the specificity of 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein as a probe for nitric oxide. **Free Radic Biol Med.** 2005 Aug 1;39(3):327-35.

DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.03.017

200 ルクス程度の光を長時間あてると自己酸化する

Lacza Z, Horváth EM, Pankotai E, Csordás A, Kollai M, Szabó C, Busija DW. The novel red-fluorescent probe DAR-4M measures reactive nitrogen species rather than NO. **J Pharmacol Toxicol Methods.** 2005 Nov-Dec;52(3):335-40. DOI: 10.1016/j.vascn.2005.06.004

DOI: 10.1016/j.vascn.2005.06.004

NO とともに活性酸素が存在すると蛍光が増強する

2.9. その他の生物種

Lepiller S, Laurens V, Bouchot A, Herbomel P, Solary E, Chluba J. Imaging of nitric oxide in a living vertebrate using a diamino-fluorescein probe. **Free Radic Biol Med.** 2007 Aug 15;43(4):619-27.

DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.05.025

生物 : Zebrafish (発生)、試薬 : DAF-FM DA、測定 : 共焦点顕微鏡, 蛍光顕微鏡

Schuppe H, Cuttle M, Chad JE, Newland PL. 4,5-diaminofluorescein imaging of nitric oxide synthesis in crayfish terminal ganglia. **J Neurobiol.** 2002 Nov 15;53(3):361-9. DOI: 10.1002/neu.10117

DOI: 10.1002/neu.10117

生物 : Crayfish (終神経節)、試薬 : DAF-2 DA、測定 : 共焦点顕微鏡

Kohn AB, Lea JM, Moroz LL, Greenberg RM. *Schistosoma mansoni*: use of a fluorescent indicator to detect nitric oxide and related species in living parasites. **Exp Parasitol.** 2006 Jun;113(2):130-3.

DOI: 10.1016/j.exppara.2005.12.013

生物 : living *Schistosoma mansoni* (マンソン住血吸虫)、試薬 : DAF-2 DA、測定 : 蛍光顕微鏡

Davidson SK, Koropatnick TA, Kossmehl R, Sycuro L, McFall-Ngai MJ. NO means 'yes' in the squid-vibrio symbiosis: nitric oxide (NO) during the initial stages of a beneficial association. *Cell Microbiol.* 2004 Dec;6(12):1139-51. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2004.00429.x

生物 : *Euprymna scolopes* (ダンゴイカ)、試薬 : DAF-2 DA, DAF-FM DA、測定 : 共焦点顕微鏡

Sakihama Y, Nakamura S, Yamasaki H. Nitric oxide production mediated by nitrate reductase in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: an alternative NO production pathway in photosynthetic organisms. *Plant Cell Physiol.* 2002 Mar;43(3):290-7. DOI: doi.org/10.1093/pcp/pcf034

生物 : *Chlamydomonas reinhardtii* (クラミドモナス)、試薬 : DAF-2 DA、測定 : 分光光度計、蛍光顕微鏡

Leckie C, Empson R, Becchetti A, Thomas J, Galione A, Whitaker M. The NO pathway acts late during the fertilization response in sea urchin eggs. *J Biol Chem.* 2003 Apr 4;278(14):12247-54.

DOI: 10.1074/jbc.M210770200

生物 : Sea Urchin egg、試薬 : DAF-FM DA、測定 : 蛍光顕微鏡

Astuti RI, Watanabe D, Takagi H. Nitric oxide signaling and its role in oxidative stress response in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nitric Oxide.* 2016 Jan 30;52:29-40. DOI: 10.1016/j.niox.2015.11.001.

生物 : *Schizosaccharomyces pombe*、試薬 : DAF-FM DA、測定 : フローサイトメトリー、蛍光顕微鏡

Yoshikawa Y, Nasuno R, Kawahara N, Nishimura A, Watanabe D, Takagi H. Regulatory mechanism of the flavoprotein Tah18-dependent nitric oxide synthesis and cell death in yeast. *Nitric Oxide.* 2016 Jul 1;57:85-91. DOI: 10.1016/j.niox.2016.04.003.

生物 : *Saccharomyces cerevisiae*、試薬 : DAF-FM DA、測定 : フローサイトメトリー