

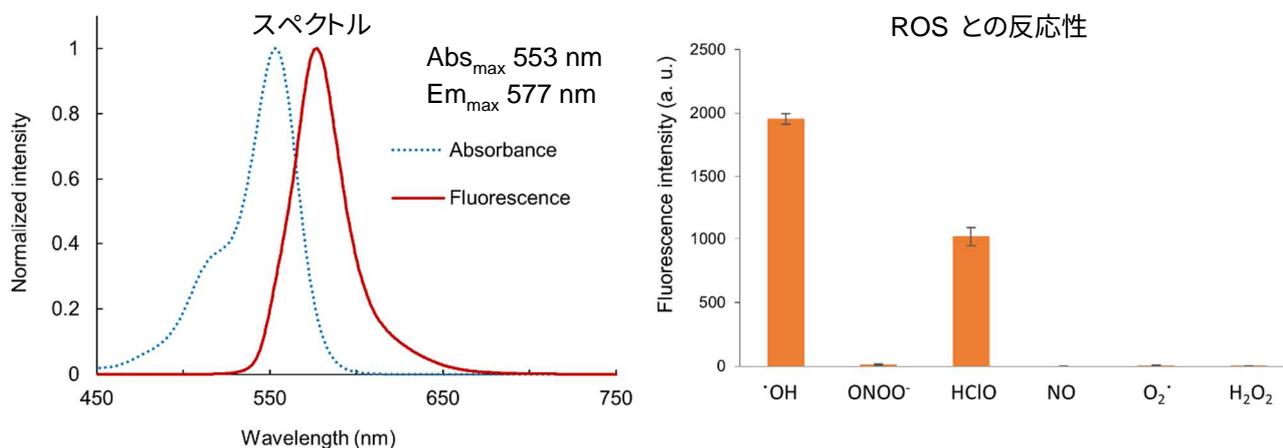
OxiORANGE

表 1. 製品情報

品番	品名	容量	保存	安定性
GC3004-01	OxiORANGE	100 nmol × 5 本	遮光冷凍保存 DMF 溶解後は使い切り	未開封で約1年

1. OxiORANGE について

OxiORANGE は細胞内の hROS (highly reactive oxygen species) と反応してオレンジ色の蛍光を発する蛍光プローブです。活性酸素種 (ROS) のうち、主にヒドロキシラジカル ($\cdot\text{OH}$) および次亜塩素酸 (HClO) を検出することができます。正の電荷を持つため細胞内では主にミトコンドリアに集積します。OxiORANGE は細胞膜透過性が高く生細胞の染色に適しますが、褪色に強いいためタイムラプスイメージングにも適しています。また、固定による蛍光の減少が少ないため、生細胞で ROS を検出したのち 4% 以下のパラホルムアルデヒドで固定してから観察することも可能です。



■ 保存

色素は窒素封入、乾燥状態で冷蔵または冷凍で出荷しております。入荷後は遮光し冷凍 (-20°C 以下) で保存してください。DMF に溶解後は使い切ってください。凍結融解の繰り返しは品質低下のおそれがあります。



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 等)

■ 試薬の調製および細胞染色例

HeLa 細胞の hROS 産生のタイムラプスイメージング

1. OxiORANGE 1 バイアル (100 nmol) を DMF 100 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ディウムで希釈し、終濃度 1 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、マウスマクロファージ様細胞株 (RAW264.7 細胞)、ラットマスト細胞株 (RBL-2H3 細胞) およびヒト骨髄性白血病細胞株 (HL-60) にて、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. HeLa 細胞より液体培地を除去し、HBSS などのバッファーで 1 回洗浄を行います。

※ 培養容器は顕微鏡観察に適した「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。

※ HeLa 細胞は飢餓状態で ROS 産生が促進される報告があるため、フェノールレッドの含まれていない細胞培養メディウムの使用をおすすめします。

7. 終濃度 500 μ M の H₂O₂ などを添加し、細胞の hROS 産生を誘導し、タイムラプスイメージングを開始します。

※ 同検討では、添加後すぐに蛍光が観察されはじめ、約 15 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 532 nm または 543 nm が適しています。蛍光波長はおよそ 577 nm をピークに検出されます。用いるフィルタは、Cy3, G-2A, G-2E/C, TRITC (Nikon 社)、もしくは U-FGW, U-FGWA, U-FRFP, U-FGNA, U-MWIGA3, U-MNIGA3 (Olympus 社) 等が最適です。

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 ($\cdot\text{OH}$), 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 ($\cdot\text{OH}$), 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
GC3007-01	HYDROP	細胞内の過酸化水素 (H_2O_2) 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	ゴルジに局在する Fe (II) イオンの検出に