

HaloTag[®] AcidiFluor[™] ORANGE Ligand

表 1. 製品情報

品番	品名	容量	保存	安定性
GC310-01	HaloTag [®] AcidiFluor [™] ORANGE Ligand	30 nmol	湿気を避け、遮光 冷凍保存	未開封で約 1 年
GC310-02		60 nmol		

1. HaloTag[®] AcidiFluor[™] ORANGE Ligand について

AcidiFluor[™] ORANGE は中性付近でほとんど蛍光を示さない一方、酸性でオレンジ色の蛍光を発する pH 応答性蛍光プローブです。この蛍光変化は可逆的なため、細胞内の微小環境での pH 変化をモニターできます。この製品は AcidiFluor[™] ORANGE に HaloTag[®] と共有結合するクロロアルカン基を結合させたもので、HaloTag を持つタンパク質を表面に発現した細胞と混ぜるだけで、そのタンパク質を特異的かつ安定に標識することができます。蛍光は比較的光褪色にも強く、タイムラプスイメージングなどによって、生細胞でのエンドサイトーシス、エキソサイトーシスやオルガネラの pH 変化などを追跡できます。

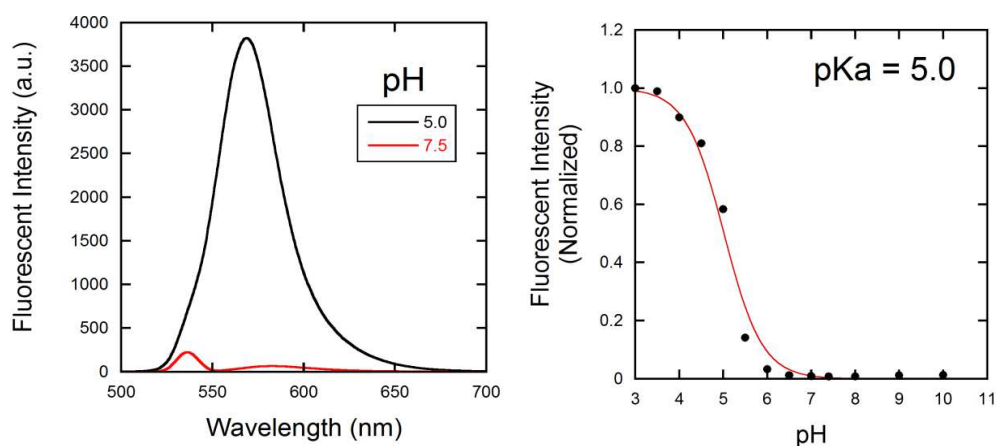


図 1. (左) pH 5.0 および 7.5 での蛍光スペクトル。(右) 溶液の pH 変化による蛍光強度変化

表 2. 製品の特徴

λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	ϵ ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	Φ_{max}
520	565	60,000	0.7

■ 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。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おりません。

2. プロトコル

■ 試薬の調製

- ① HaloTag® AcidiFluor™ ORANGE Ligand は紫色の固体です。輸送中の振動で結晶がキャップに付着していることがありますので、キャップを開ける前にチューブをマイクロ遠心機等で遠心してください。
- ② 室温に戻したバイアルを 30 μ L (GC310-01) または 60 μ L (GC310-02) の超純水に溶解し、1 mM ストック溶液を作成します。ピペティングにより完全に溶解してください。溶液も紫色の液体となります。この試薬は DMSO 中で比較的安定ではないため、溶媒としては水を推奨します。

■ 細胞染色例

- ① 酸性オルガネラに取り込まれるような HaloTag® タンパク質 (HaloTag-VAMP2, HaloTag-EGFR 等) を細胞表面に発現させた細胞をガラスボトムディッシュに準備します。37°C 5% CO₂ 条件下で 12 時間以上培養してください。
- ② 1 mM の HaloTag® AcidiFluor ORANGE™ Ligand ストック溶液を細胞培養メEDIUMで 10 μ M になるように希釈します。この染色液を 37°C に保ちます。
- ③ 細胞の培養容器に培地の 1/4 量の染色液を加え (終濃度 2 μ M)、37°C 5% CO₂ 雰囲気下で 15 分間インキュベートします。
- ④ 細胞を HBSS などの観察用バッファーで 2 回洗浄し、観察用バッファーに置き換えて観察します。必要に応じて観察用バッファーとして、フェノールレッドを含まない細胞培養培地も使用できます。

■ 蛍光観察

蛍光顕微鏡観察には、一般的な G 励起フィルターが使用できます。NIKON G-2A, Cy3 や OLYMPUS U-FGWA, U-FGW, U-FGNA, U-FGGFP などの他、Cy3 蛍光観察に適したフィルターセットが適します。レーザー励起の場合 532 nm または 514 nm 励起で、560 nm 付近の蛍光を観察してください。励起効率は下がりますが、488 nm で励起することもできます。

■ 参考文献

D. Asanuma, Y. Takaoka, S. Namiki, K. Takikawa, M. Kamiya, T. Nagano, Y. Urano & K. Hirose. (2014) Acidic-pH-Activatable Fluorescence Probes for Visualizing Exocytosis Dynamics. *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**: 6085–6089.

表 2. 関連製品

型番	品名	主な用途
GC301	AcidiFluor™ ORANGE	タグ発現のない細胞でのリソソーム染色に
GC302	AcidiFluor™ ORANGE-NHS	NHS を介したタンパク質などの 1 級アミンの標識に
GC305	AcidiFluor™ ORANGE-Zymosan A	ファゴサイトーシスのイメージングに
GC306	AcidiFluor™ ORANGE-Dextran 10K	デキストランによるエンドサイトーシスのイメージングに
GC308	AcidiFluor™ ORANGE-wBeads500	微小環境の酸性 pH の計測に
GC309	AcidiFluor™ ORANGE-Transferrin	トランスフェリンによるエンドサイトーシスのイメージングに
A201-01	HaloTag® HMSiR Ligand	HaloTag® タンパク質の超解像イメージングに
A308-01	HaloTag® STELLA Fluor™ 650 Ligand	HaloTag® タンパク質の近赤外蛍光によるイメージングに

HaloTag® はプロメガ株式会社の登録商標です。