

GlycoGREEN™-βGal

表 1. 製品情報

品番	品名	容量	保存	安定性
GC611	GlycoGREEN™-βGal	30 nmol × 5 本	湿気を避け、遮光冷凍保存 DMSO 溶解後は使い切り	未開封で約 1 年

1. GlycoGREEN™-βGal について

GlycoGREEN-βGal は、β-galactosidase (βGal) 活性を蛍光として検出できる蛍光プローブです。生細胞での蛍光イメージング、マイクロプレートリーダーやフローサイトメトリーのほか、固定細胞でのβガラクトシダーゼ活性の検出も可能です。LacZ レポーター遺伝子導入のモニターのほか、細胞老化の評価やがん細胞におけるβガラクトシダーゼ活性の評価などにもお使いいただけます。

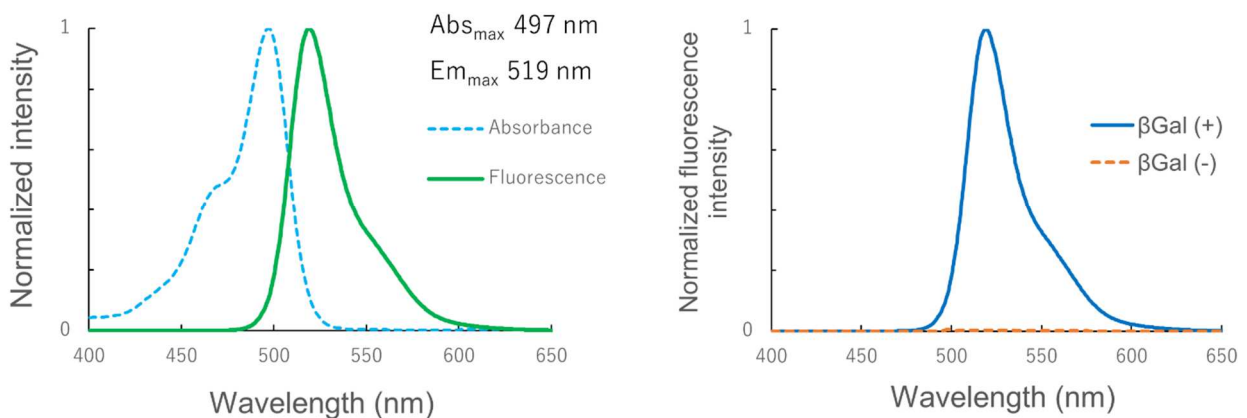


図 1. GlycoGREEN-βGal の吸収・蛍光スペクトル（左）と反応による蛍光の変化（右）。βGal との反応により 200 倍以上の蛍光強度増大が観察されます。

■ 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℃以下で冷凍保存してください。DMSO 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。

■ 試薬の調製

- ① GlycoGREEN-βGal は無色の粉末です。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。また、試薬の吸湿を防ぐため、室温に戻してから開封してください。
- ② 1 バイアルを DMSO 30 μL に溶解し、1 mM ストック溶液を作成します。ピペッティングにより注意深く完全に溶解してください。溶液も無色です。

2. プロトコル例

■ 細胞観察例 1 – HEK293 細胞での LacZ マーカー遺伝子発現確認

- ① ガラスボトムディッシュに HEK293 と HEK293/LacZ それぞれの細胞を播種し、Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) + 8% FBS 培地中で 37°C 5% CO₂ 環境で一晩培養します。
 - ② GlycoGREEN-βGal を培地で 1 μM に希釈した反応液を作成します。
 - ③ HEK293 と HEK293/LacZ 細胞を培養しているディッシュから液体培地を除去し、反応液を加えて 37°C で 15 分間インキュベートします。
 - ④ 染色液を除き、Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) または適切な洗浄用バッファーを加えて取り除きます。このリンスを 2 回繰り返し、観察用バッファーに置き換えます。その後、蛍光顕微鏡で細胞を観察します。
- ※ ステップ④の代わりに、反応液を除去し培養液でリンスしたのち、PBS に溶解した 3%パラホルムアルデヒドで 15 分固定してから観察することも可能です。
- ※ 細胞種等により適切な色素濃度および反応時間が異なるため、条件検討を行ってください。

■ 細胞観察例 2 – 固定細胞での検出

- ① ガラスボトムディッシュに HEK293 と HEK293/LacZ それぞれの細胞を播種し、DMEM + 8% FBS 培地中で 37°C 5% CO₂ 環境で一晩培養します。
 - ② 培養液を取り除き、PBS に溶解した 3%パラホルムアルデヒドで 15 分固定します。
 - ③ 固定液を除去し、PBS を加えて 3 回リンスします。
 - ④ GlycoGREEN-βGal を HBSS で 1 μM に希釈した反応液を作成します。PBS をこの反応液に交換して 37°C で 15 分間反応させます。
 - ⑤ 反応液を取り除き、PBS または HBSS で 2 回リンスしてから蛍光顕微鏡で観察します。
- ※ 固定時間が長い、またはアルデヒド濃度が高いなどの理由で細胞の酵素活性が低下すると、反応性が低下します。その他、細胞種等により適切な試薬濃度および反応時間が異なるため、条件検討を行ってください。

■ 細胞観察例 3 – 正常細胞と、がん細胞由来の細胞株の染め分け

- ① ガラスボトムディッシュに HUVEC などの正常細胞（初代培養細胞）および、がん細胞株（例: OVCAR5, HeLa, HepG2 細胞など）をそれぞれ播種し、50–70%コンフルエント程度まで培養します。
- ② GlycoGREEN-βGal を培地で 1 μM に希釈した染色液を作成します。
- ③ ディッシュから液体培地をとりのぞき、反応液を加えて 37°C で 2 時間インキュベートします。
- ④ 染色した細胞を HBSS で 2 回リンスし、HBSS に置換します。その後、蛍光顕微鏡で細胞を観察します。

※細胞の種類や β-ガラクトシダーゼの発現量によって適切な色素濃度および反応時間が異なります。そのため、染色に適した条件を検討してください。また、細胞がはがれやすい場合は、poly-L-lysine などをコーティングしたガラスボトムディッシュを使用してください。

■ フローサイトメーターでの測定例

- ① 細胞培養用の 24 well プレートに HEK293 と HEK293/LacZ 細胞をそれぞれ 5×10^4 cells/well 播種し、一晩培養します。
- ② GlycoGREEN-βGal を培地で 1 μM に希釈した反応液を作成します。
- ③ それぞれの well から液体培地を除去し、染色液を加えて 37°C で 1 時間インキュベートします。
- ④ 反応させた細胞をそれぞれ PBS でリンスし、0.25% trypsin-EDTA を用いて 24 well より細胞懸濁液を回収します。
- ⑤ 細胞懸濁液を遠心分離 (3,000 xg, 5 min) によって細胞を回収し、PBS またはシース液等に再懸濁します。
- ⑥ 細胞懸濁液を 40 μM セルストレイナー（ナイロンメッシュ）に通した後、フローサイトメーターで計測します。

※細胞等により適切な試薬濃度および反応時間が異なるため、条件検討を行ってください。

■ 蛍光観察

レーザーを使用する場合は、励起にはアルゴンレーザー等の 488 nm が適しています。顕微鏡のフィルターキューブは、いわゆる B 励起フィルターが適しています。B-2A、FITC (NIKON) や U-FBW、U-FBWA (OLYMPUS) の他、一般的な FITC、GFP 用などのフィルターが使用可能です。フローサイトメーターでは FITC 用のフィルターが最適です。

■ 参考文献

D. Asanuma, M. Sakabe, M. Kamiya, K. Yamamoto, J. Hiratake, M. Ogawa, N. Kosaka, P. L. Choyke, T. Nagano, H. Kobayashi & Y. Urano (2015) *Nature Communications* 6:6463

表 2. 関連製品

型番	品名	主な用途
GC601	GlycoYELLOW™-βGal	黄色蛍光によるβガラクトシダーゼ活性の検出。ライブセルイメージングやハイコンテンツスクリーニングに。
SK4001-01	TokyoGreen®-βGal	マイクロプレートリーダーによるガラクトシダーゼ活性のスクリーニングに。
SK4002-01	TokyoGreen®-βGlu	マイクロプレートリーダーによるグルコシダーゼ活性のスクリーニングに。
SK4003-01	TokyoGreen®-βGlcU	マイクロプレートリーダーによるグルクロニターゼ活性のスクリーニングに。