五稜化薬株式会社

改訂日: 2022 年 10 月 27 日

一般研究用

HySOx

表 1. 製品情報

品番	品名	容量	保存	安定性
GC3006-01	HySOx	20 µg × 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. HySOx について

HySOx は、生理的環境下で次亜塩素酸に対して優れた選択性を示す蛍光プローブで、生細胞中の次亜塩素酸を検出できます。次亜塩素酸は、高い反応性を示す活性酸素種 (hROS) のひとつです。生体内では、免疫細胞 (好中球とマクロファージ) により産生され、ファゴサイトーシスによって取り込まれたバクテリアの殺菌作用に関わることが報告されています。反応が早く、褪色に強いため、タイムラプスイメージングに適しています。

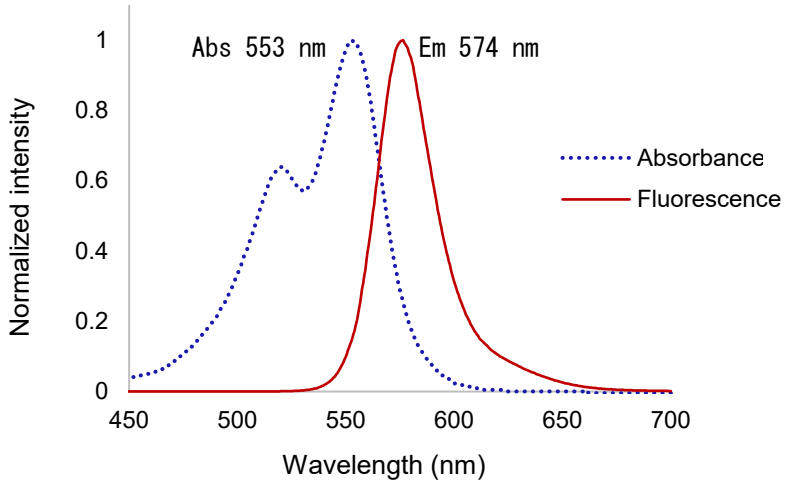

図 1. HySOx の吸収および蛍光スペクトル
0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 pH 7.4 で測定。

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 など)

■ 試薬の調製および細胞染色例

活性化マクロファージより産生される次亜塩素酸のタイムラプスイメージング

① HySOx 1 バイアル (20 μg) を DMF 51.5 μL に溶解させ、1 mM ストック溶液を作成します。
※ 分子量は、製品外装および製品バイアルのラベルに記載されています。

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 5 μM 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、ヒトマクロファージ様細胞株 (U937 細胞) 、マウスマクロファージ様細胞株 (RAW264.7 細胞) およびブタ好中球にて、5 μM, 37℃ 30 分の条件で良好な結果が確認できています。

③ マクロファージより液体培地を除去し、PBS, HBSS, KRP buffer などの洗浄バッファーで 2 回洗浄を行います。
※ 培養容器は自家蛍光の少ない「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℃で 30 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。

⑦ ZymosanA などを添加することでファゴサイトーシスを誘導し、タイムラプスイメージングを開始します。
※ 同検討では、約 10 分後に蛍光が観察されはじめ、30 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 574 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 (Olympus 社) 等が最適です。

■ 保存

色素は窒素封入、乾燥状態で冷蔵出荷しております。入荷後は冷凍 (-20℃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。溶液での保存はお勧めしません。

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 (˙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 (˙OH), パーオキシナイトライト (ONOO⁻), 次亜塩素酸 (OCl⁻) の検出に。
SK3003-01	NiSPY-3	パーオキシナイトライト (ONOO⁻) 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。
AR2901-U5	FeRhoNox™-1	ゴルジに局在する Fe (Ⅱ) イオンの検出に。

五稜化薬株式会社
〒060-0008 北海道札幌市中央区北 8 条西 18-35-100 エアリービル 5 階
TEL: 011-624-5860 FAX: 011-351-1822
URL: https://www.goryochemical.com/