

一般研究用

# HYDROP™, HYDROP-EX™

表 1. 製品情報

品番	品名	容量	保存	安定性
GC3007-01	HYDROP	30 nmol×3 本	遮光冷凍保存 DMF 溶解後は使い切り	未開封で 約 1 年
GC3008-01	HYDROP-EX	30 nmol×3 本		

## 1. はじめに

HYDROP, HYDROP-EX は活性酸素種 (ROS) のひとつ、過酸化水素 ( $H_2O_2$ , hydrogen peroxide) と選択的に反応し、蛍光強度が増大する蛍光プローブです。この試薬は生理的条件下で  $H_2O_2$  に対し優れた選択性を示します。

HYDROP は細胞内の  $H_2O_2$  を検出するための蛍光プローブです。細胞膜を透過しやすく、また細胞外では  $H_2O_2$

とは反応しにくくなっていますが、細胞内でアセチル基が加水分解され、膜透過性が低く、 $H_2O_2$  との反応性が高い HYDROP-EX が生成します。

HYDROP-EX は膜透過性が低く、細胞には導入できません。溶液中の  $H_2O_2$  を検出・定量するためにご利用いただけます。

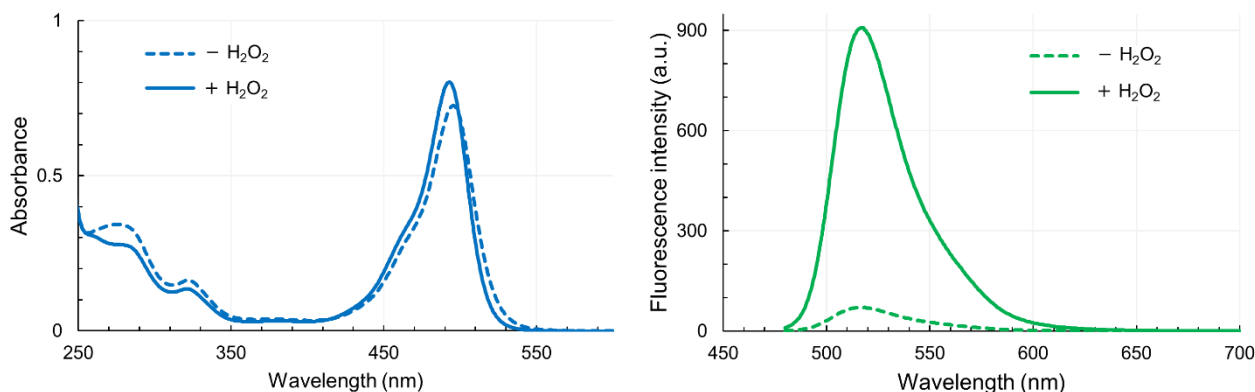


図 1 HYDROP-EX の吸収・蛍光スペクトル。

0.1 M リン酸バッファー (pH 7.4) 中で測定した  $H_2O_2$  反応前 (点線) および反応後 (実線) のスペクトル。吸収スペクトルは 10  $\mu$ M HYDROP-EX のもの。最大吸収波長は 492 nm, 最大蛍光波長は 526 nm。

## ■ 試薬の保存

色素は窒素封入、乾燥状態で出荷しております。入荷後は遮光し  $-20^{\circ}\text{C}$  以下で冷凍保存してください。DMF 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. 試薬の準備

溶媒として、N,N-dimethylformamide (DMF) をご用意ください。

HYDROP は無色の固体、HYDROP-EX はオレンジ色の固体です。吸湿しないよう室温に戻したバイアルをマイクロ遠心機で遠心し、蓋などに付着している粉末を底に集めてから開封してください。1 バイアル (30 nmol) に DMF 30  $\mu$ L を加え、ピペティングを5回以上繰り返し完全に溶解してください。これが 1 mM 溶液となります。HYDROP 溶液は無色透明、HYDROP-EX 溶液はオレンジ色となります。

## 3. HYDROP-EX による $\text{H}_2\text{O}_2$ の定量方法

1. 検量線を描くために、過酸化水素 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , hydrogen peroxide) をご用意ください。市販の 30-35% 過酸化水素は、およそ 10 M です。この溶液を純水で 1000 倍に希釈し、240 nm における吸光度  $A_{240}$  を測定してください。
2. 希釈前の過酸化水素濃度を  $C = A_{240} / \varepsilon \times 1000$  (M) として求めます。ここで、 $\varepsilon = 43.6$  ( $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) は  $\text{H}_2\text{O}_2$  の 240 nm におけるモル吸光係数です。
3. 測定したい溶液と同じ溶液条件の緩衝液に  $\text{H}_2\text{O}_2$  を 0–100  $\mu\text{M}$  になるように希釈し、1–10  $\mu\text{M}$  となるよう HYDROP-EX を加えて攪拌して、37°C で 1 時間反応させます。(  $\text{H}_2\text{O}_2$  濃度、HYDROP 濃度は、測定したい  $\text{H}_2\text{O}_2$  の濃度範囲に合わせて調整してください。)
4. 反応した溶液の蛍光強度を蛍光分光光度計やマイクロプレートリーダーなどで測定してください。このとき、HYDROP-EX が濃すぎると、正確な蛍光測定ができませんので、HYDROP-EX の濃度が 1  $\mu\text{M}$  以下または測定溶液の 490 nm における吸収が 0.1 以下になるよう希釈してから蛍光を測定してください。励起は 470–490 nm、蛍光は 520–530 nm 付近で測定することを推奨します。測定機によっては、励起光が蛍光検出に漏れ込むことがありますので、条件検討の上で問題のない波長を設定してください。
5. 横軸に  $\text{H}_2\text{O}_2$  濃度  $C$ 、縦軸に蛍光強度  $I$  をプロットし、以下の関数

$$I = \frac{aC}{k - C} + b$$

でフィッティングし、パラメーター  $a, b$  および  $k$  を求めてください。この関数が検量線となります。

6.  $\text{H}_2\text{O}_2$  濃度を測定したい溶液に、検量線の測定時と同じ濃度になるように HYDROP-EX を加えて攪

拌し、同じ温度、同じ時間だけ反応させたのち、同様に蛍光強度を測定してください。測定溶液に他の蛍光物質が含まれる可能性があるときは、コントロールとなる溶液も同時に測定し、自家蛍光の強度を減算してください。

7. 得られた蛍光強度から、次式により  $\text{H}_2\text{O}_2$  濃度を求めることができます。

$$C = \frac{I - b}{I + a - b} k$$

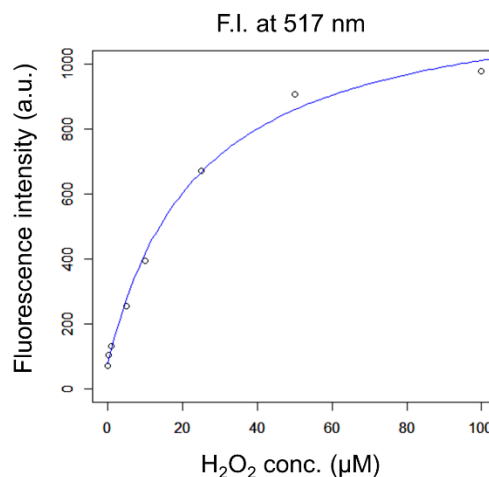


図 2. HYDROP-EX による検量線の例

## 4. HYDROP による細胞内 $\text{H}_2\text{O}_2$ 検出方法

1. HYDROP の DMF 溶液を細胞培養培地などで希釈し、終濃度 1–5  $\mu\text{M}$  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 (ヒト子宮頸がん由来細胞株) および A431 細胞 (ヒト上皮様細胞癌由来細胞株) で 5  $\mu\text{M}$ , 37°C, 20 分、RAW264.7 細胞 (マウスマクロファージ様細胞株) で 1  $\mu\text{M}$ , 37°C, 20 分の条件で良好な結果が確認できています。
2. 培養細胞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。
3. 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。
4. 染色した細胞を洗浄バッファーで 2 回洗浄します。
5. 洗浄後、適切な観察バッファーに置き換えます。
6. Phorbol myristate acetate (PMA) などを添加することで細胞を刺激し、蛍光顕微鏡で観察します。  
※ 同検討では、約 30 分で十分な蛍光が確認できていま

ど) が使用できます。

### ■ 蛍光観察

励起波長は 488 nm 付近の青色光が適しています。 蛍光波長はおよそ 516 nm をピークに検出されます。 蛍光顕微鏡では一般的な B 励起フィルター (GPF, FITC 用な

表 2. 関連製品

型番	品名	主な用途
SK3001-01 SK3001-02	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 ( $\text{ONOO}^-$ ) の検出に。
SK3002-01 SK3002-02	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 ( $\text{ONOO}^-$ )、 次亜塩素酸 ( $\text{HClO}$ ) の検出に。
SK3003-01	NISPY-3	パーオキシナイトライト ( $\text{ONOO}^-$ ) の検出に。
GC3006-01	HySOx	次亜塩素酸 ( $\text{HClO}$ ) 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	ゴルジ体に局在する Fe (II) イオンの検出に。
A401-1	QuicGSH3.0	還元型グルタチオンの定量に。