

CopperGREEN™

表 1. 製品情報

品番	品名	容量	保存	安定性
GC902	CopperGREEN	50 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. はじめに

CopperGREEN は遊離した銅 (I) イオンを特異的に検出する蛍光プローブです。銅はチトクローム c や superoxide dismutase などの酵素活性に必要な生体中の微量元素です。銅代謝の異常はウィルソン病やメンケス症候群を引き起こすほか、アルツハイマー病や癌に銅の動態変化が伴うことも報告されています。銅は酸化還元により銅 (I) と銅 (II) の状態をとり、細胞内の還元的条件下では銅 (I) が比較的多く存在します。細胞膜透過性がある CopperGREEN は反応前はほとんど蛍光を示しませんが、細胞内の銅 (I) と反応して緑色の蛍光物質に変化するため、生細胞中の銅 (I) イオンのイメージングにご利用いただけます。

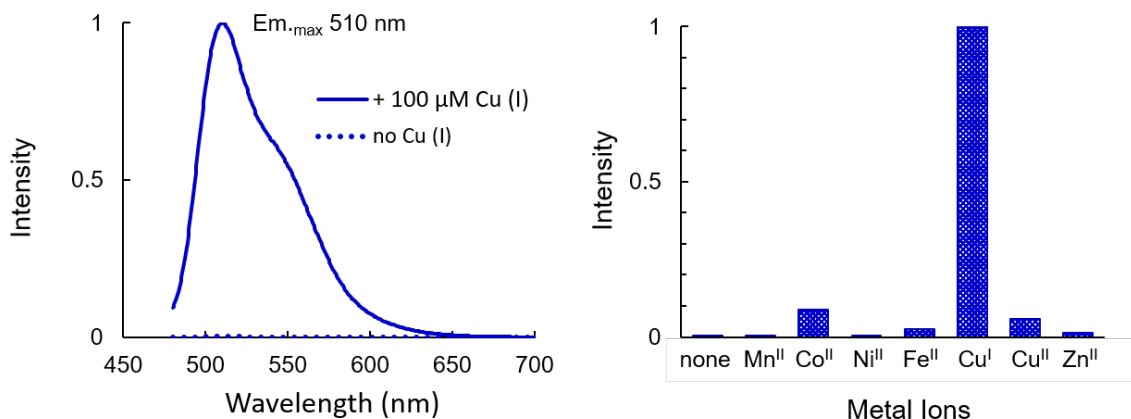


図 1. (左) Cu^I による CopperGREEN の蛍光スペクトル変化。50 mM Hepes, 2 mM グルタチオン, pH 7.4 溶液中の 5 μM CopperGREEN の蛍光スペクトル。Cu^I との反応により 100 倍以上の蛍光強度増大が検出されます。(右) 各種金属イオンに対する CopperGREEN の選択性。50 mM Hepes, pH 7.4 に各金属イオンを 20 μM 加えた溶液中での 1 μM CopperGREEN の蛍光強度。Cu^I 存在下でのみ蛍光強度が増大します。

■ 試薬の保存

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おりません。

2. プロトコル

■ ご用意いただくもの

- ・ Dimethyl sulfoxide (DMSO)
- ・ 適切な洗浄および観察用バッファー (例: PBS pH 7.4, HBSS など)

■ 試薬の調製

1. CopperGREEN は無色の粉末です。輸送中の振動で粉末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、チューブの底に集めてください。
2. 室温に戻した1バイアルを DMSO 50 μ L 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。溶液も無色透明になります。酸性溶液中では分解されやすいため、希釈時は中性のバッファーを使用し、希釈後はすぐにご使用ください。

■ 細胞染色例

HeLa 細胞に取り込まれた銅イオンの観察

1. ポリリジンコートしたガラスボトムディッシュに HeLa 細胞を播種し一晩培養します。続いて 100 μ M CuCl_2 を含む DMEM (細胞培養メディウム) 中で約 12 時間培養します。この細胞を 200 μ M EDTA を含む PBS で2回洗浄し、細胞外の Cu^{2+} を除きます。細胞がはがれないよう優しく洗浄してください。
2. CopperGREEN の 1 mM ストック溶液を培養メディウムで希釈し、終濃度 5 μ M の染色液を作成します。
3. 培養容器に染色液を加え、37°Cで3時間インキュベートします。

※ 弊社の検討では2時間程度の反応で蛍光シグナルが検出されはじめ、約3時間で十分なシグナルが得られました。細胞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。

4. 染色した細胞を洗浄バッファーで2回洗浄し、観察バッファーに置き換えます。
5. 蛍光顕微鏡で細胞を観察します。

※ 条件によっては酸性オルガネラで分解された CopperGREEN が蛍光を発することがあります。その場合は染色30分前から染色中にかけて、培地に 10 mM NH_4Cl または 100 nM bafilomycin A1 を添加してください。リソソーム等の酸性化を抑え、非特異的な蛍光シグナルを減らすことができます。

■ 蛍光観察

銅 (I) と反応した CopperGREEN は 440–490 nm 付近の波長の光を吸収し、およそ 510 nm をピークとする蛍光を放出します。488 nm のレーザー励起、または B 励起または GFP, FITC 用等の蛍光フィルターキューブが適合します。

表 2. 関連製品

型番	品名	主な用途
AR2901-U5	FeRhoNox™-1	ゴルジに局在する Fe (II) イオンの検出に。
SK2001-01	ZnAF-2	亜鉛イオン (Zn^{2+}) の検出に。
SK2002-01	ZnAF-2 DA	細胞内の亜鉛の検出に。
GC3004-01	OxiORANGE™	オレンジ色蛍光による細胞内の hROS の検出に。
GC3006-01	HySOx	細胞内の次亜塩素酸の検出に。
GC3007-01	HYDROP™	細胞内の過酸化水素 (H_2O_2) の検出に。
SK3001-01	HPF	ヒドロキシラジカルやパーオキシナイトライドの検出に
SK3002-01	APF	ヒドロキシラジカルやパーオキシナイトライド、次亜塩素酸の検出に
SK3003-01	NiSPY-3	パーオキシナイトライド (ONOO^-) の検出に