

はじめに

生体内の早期の細胞毒性や酸化ストレス、アポトーシスを議論する上で、ミトコンドリアは重要なオルガネラの一つです¹⁾。ミトコンドリアは酸素を利用し ATP を合成することで生体に必要なエネルギーを産出しており、ミトコンドリア活性の低下や機能障害は、癌や老化、アルツハイマー病やパーキンソン病等の神経変性疾患などと密接に関わることが知られています^{2),3)}。

ミトコンドリア膜電位を観察する際に良く使用されている低分子蛍光色素 JC-1 は、ミトコンドリアの膜電位によりミトコンドリアへ集積します。また、ミトコンドリア膜電位依存的に蓄積が起きることで、JC-1 の蛍光特性が緑色 (約 530 nm) から赤色 (約 590 nm) へ変化します。ミトコンドリアの膜電位が高い場合、ミトコンドリア内での色素濃度が上昇し色素が凝集を起こすことで、赤色の蛍光を発し、ミトコンドリアの膜電位が低い場合、色素濃度が低く JC-1 が monomer で存在するため、緑色の蛍光を発します。

JC-1 MitoMP Detection Kit は、ミトコンドリア膜電位を測定できるキットです。従来、JC-1 は染色溶液調製の際、溶けづらい等の課題がありますが、本キットは溶液調製方法によりそれを克服しております。さらに、本キットに含まれる Imaging Buffer を用いることにより、蛍光バックグラウンドを抑えながら細胞にダメージを与えにくい状態で、細胞を観察することができます。

キット内容	JC-1 Dye	100 nmol	x 1
	Imaging Buffer (10x)	6 mL	x 1

保存条件 0-5 °C で保存して下さい。

必要なもの (キット以外)

- Dimethyl sulfoxide (DMSO)
- 培地または HBSS
- マイクロピペット
- マイクロチューブ

溶液調製

1-2 mmol/L JC-1 DMSO stock solution の調製

100 nmol の JC-1 を含むチューブに 表 1 に示す DMSO を加え、ピペッティングにより溶解し、1-2 mmol/L JC-1 DMSO stock solution を調製する。溶解後は -20 °C で保存してください。

※ DMSO stock solution 調製後、使用時以外はできるだけ光に当てず、冷凍にて保存を行うと、一ヶ月間使用可能です。

表 1 各 JC-1 濃度における DMSO 添加

JC-1濃度	DMSO添加量
1 mmol/L	100 μ L
2 mmol/L	50 μ L

1-15 μ mol/L JC-1 working solution の調製

調製した JC-1 DMSO stock solution をマイクロピペットを用いてマイクロチューブに量り取る。その後、目的量の培地をマイクロピペットにて前述のマイクロチューブに移し、即座にピペッティングを 10 回行い、溶液を均一にする。

(例) 2 μ mol/L JC-1 working solution を調製する場合、1 mmol/L の DMSO stock solution をマイクロチューブに 2 μ L 量り取り、そこへ 1 mL の培地を添加する。添加直後にピペッティングを 10 回行い、溶液を均一にする。

※ Working solution を調製する際に使用する溶液は、室温に戻して使用して下さい。

※ 培地中に調製した DMSO stock solution を添加すると、色素が析出する可能性があります。上記操作手順にて調製して下さい。

※ 染色度合いが悪い場合は、Working solution の使用濃度や染色時間の検討を行ってください。

※ 調製した Working solution は、その日の内にご使用ください。

Imaging Buffer solution の調製

Imaging Buffer (10x) を、超純水を用いて 10 倍に希釈する。

※ 調製する際は、使用する当日に必要な分量を調製して下さい。

※ 希釈液は、その日の内にご使用ください。

1. 細胞をディッシュまたはチャンバースライドに播種し、37 °C、5% CO₂ インキュベーター内で一晩培養する。
2. 調製した JC-1 working solution を添加する。
3. 5% CO₂ インキュベーター内で、30-60 分間インキュベートする。
4. 上澄み液を除去し、HBSS を用いて細胞を 2 回洗浄する。
5. Imaging Buffer solution を加え、蛍光顕微鏡にて細胞を観察する。

実験例 1 Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone (CCCP) で処理した HeLa 細胞を用いたミトコンドリア膜電位の検出

1. 200 μL の HeLa 細胞 (2.4×10^5 cells/mL) を μ -slide 8 well に MEM 培地 (10% fetal bovine serum、1% penicillin-streptomycin) で播種し、5% CO_2 インキュベーターで 37 $^\circ\text{C}$ 、一晩培養した。
2. 培地を取り除き、MEM 培地で希釈した 0、100 $\mu\text{mol/L}$ の CCCP 溶液を 200 μL 添加し、37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 インキュベーターで 1.5 時間インキュベートした。
3. 上澄み液を 100 μL 取り除き、MEM 培地で希釈した JC-1 working solution (4 $\mu\text{mol/L}$) を 100 μL 添加し、5% CO_2 インキュベーター (37 $^\circ\text{C}$) にて 30 分間インキュベートした。
4. 上澄みを除去し、200 μL の HBSS で細胞を 2 回洗浄した。
5. 200 μL の Imaging Buffer solution を加え、蛍光顕微鏡で観察した。

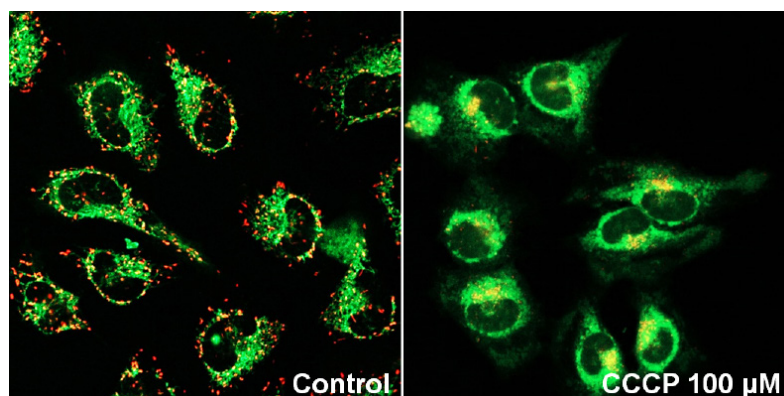


図 1 JC-1 による HeLa 細胞のミトコンドリア膜電位検出

<検出条件>

Green: 488 nm (Ex), 500-550 nm (Em)、Red: 561 nm (Ex), 560-610 nm (Em)

実験例 2 Carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenyl hydrazone (FCCP) で処理した HeLa 細胞を用いたミトコンドリア膜電位の検出

1. 200 μL の HeLa 細胞 (2.4×10^5 cells/mL) を μ -slide 8 well に MEM 培地 (10% fetal bovine serum、1% penicillin-streptomycin) で播種し、37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 インキュベーターで一晩培養した。
2. 培地を取り除き、MEM 培地で希釈した 0、100 $\mu\text{mol/L}$ の FCCP 溶液を 200 μL 添加し、37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 インキュベーターで 30 分間インキュベートした。
3. 上澄み液を 100 μL 取り除き、MEM 培地で希釈した JC-1 working solution (4 $\mu\text{mol/L}$) を 100 μL 添加し、37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 インキュベーターにて 30 分間インキュベートした。
4. 上澄みを除去し、200 μL の HBSS で細胞を 2 回洗浄した。
5. 200 μL の Imaging Buffer solution を加え、蛍光顕微鏡で観察した。

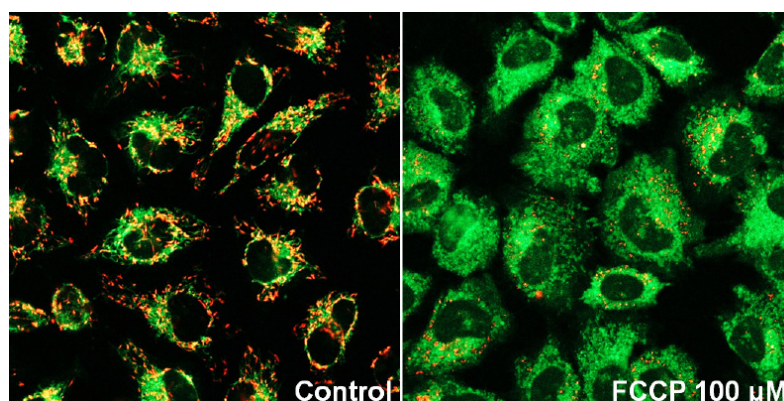


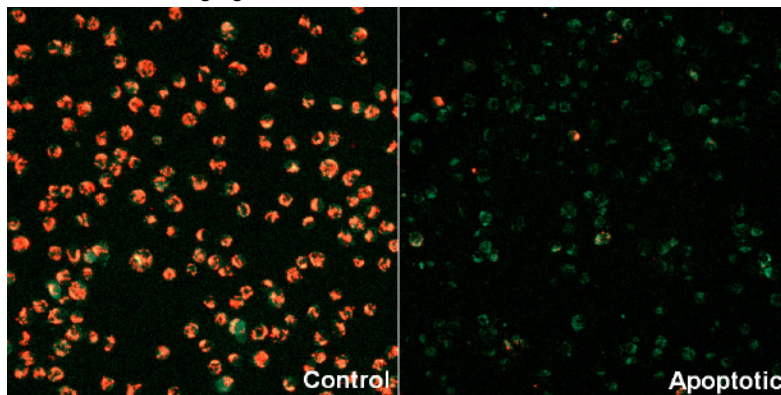
図 2 FCCP で処理した HeLa 細胞の JC-1 によるミトコンドリア膜電位の検出

<検出条件>

Green: 488 nm (Ex), 500-550 nm (Em)、Red: 561 nm (Ex), 560-610 nm (Em)

1. 2 mL の Jurkat 細胞 (1.0×10^6 cells/mL) を RPMI 培地 (10% fetal bovine serum、1% penicillin-streptomycin) で 5 mL チューブに加えた。
2. 培地を取り除き、RPMI 培地で希釈した 0、2.5 $\mu\text{g/mL}$ の Staurosporine 溶液を 2 mL 添加し、37 °C、5% CO₂ インキュベーターで 2.5 時間インキュベートした。
3. RPMI 培地で希釈した JC-1 working solution (4 $\mu\text{mol/L}$) を 2 mL 添加し、37 °C、5% CO₂ インキュベーターにて 30 分間インキュベートした。
4. 培地を除去し、2 mL の HBSS で細胞を 2 回洗浄した。
5. 2 mL の Imaging Buffer solution を加え、蛍光顕微鏡、プレートリーダー、フローサイトメーターで観察した。

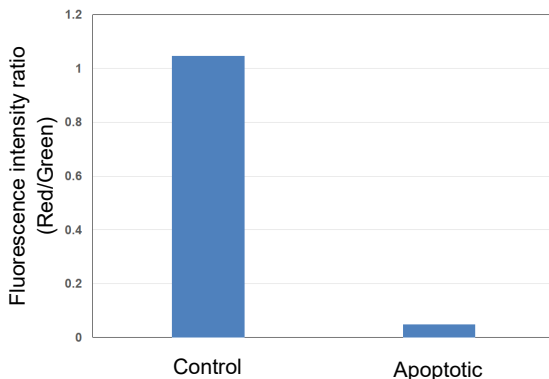
Fluorescence Imaging



<検出条件>
 Green: 488 nm (Ex), 500-550 nm (Em)
 Red : 561 nm (Ex), 560-610 nm (Em)

図 3 蛍光顕微鏡を用いた Jurkat 細胞のミトコンドリア膜電位検出

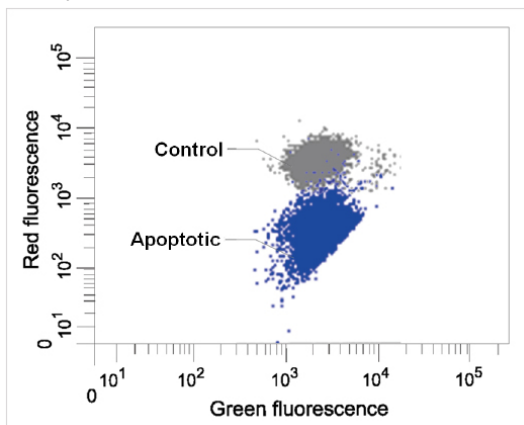
Plate Reader Detection



<検出条件>
 Green : 485 nm (Ex), 525-545 nm (Em)
 Red : 535 nm (Ex), 585-605 nm (Em)

図 4 プレートリーダーを用いたミトコンドリア膜電位検出

Flow Cytometer Detection



<検出条件>
 Green : 488 nm (Ex), 515-545 nm (Em)
 Red : 488 nm (Ex), 564-604 nm (Em)

図 5 フローサイトメーターを用いたミトコンドリア膜電位検出

参考文献

- 1) Ferri, K. F. et al., *J. Exp. Med.*, **2000**, 192, 1081.
- 2) Matsuda, N. et al., *J. Cell Biol.*, **2010**, 189, 211.
- 3) Wang, J. L. et al., *PNAS*, **2000**, 97, 7124.

本製品は試験・研究用途です。臨床診断用途には使用できません。
 ご質問・ご要望は下記までお問い合わせください。

DOJINDO 株式会社同仁化学研究所
 熊本県上益城郡益城町田原 2025-5
 熊本テクノリサーチパーク 〒 861-2202
 Tel:096-286-1515 (代表) Fax:096-286-1525
 E-mail: info@dojindo.co.jp URL: www.dojindo.co.jp

ドージン・イースト (東京)
 東京都港区芝大門 2-1-17 朝川ビル 7F 〒 105-0012
 Tel: 03-3578-9651 (代表) Fax: 03-3578-9650
 フリーダイヤル :0120-489548
 フリーファックス :0120-021557