

はじめに

ミトコンドリアは酸素を利用し ATP を合成することで細胞に必要なエネルギーを産出しており、重要なオルガネラの一つです¹⁾。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)}。そのため、ミトコンドリア活性の指標の一つとしてよく用いられているミトコンドリア膜電位はミトコンドリア関連疾患の有望なターゲットとして広く研究されています。

低分子蛍光色素である JC-1 や Tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE)、Tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM) は、ミトコンドリア膜電位を観察する際に広く使用されていますが、Paraformaldehyde (PFA) 固定に対応できない、光退色がおこるといった課題があり、再現性の高いデータの取得を困難にします。

MT-1 MitoMP Detection Kit は、これらの課題を克服したミトコンドリア膜電位検出キットです。本キットは、JC-1 よりも感度良くミトコンドリア膜電位の変化を観察することができ、染色した細胞に対して PFA 固定を行ってもミトコンドリア膜電位を検出可能です。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

MT-1 Dye 20 μ l x 3

Imaging Buffer (10x) 11 ml x 1

保存条件

遮光、-20°C にて保存して下さい。

必要なもの
(キット以外)

- ー培地または HBSS
- ーマイクロピペット (100–1000 μ l, 0.5–10 μ l)
- ーマイクロチューブ

溶液調製

Imaging Buffer solution の調製

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

※ 使用する当日に必要な分量を調製し、その日の内にご使用ください。

MT-1 working solution の調製

MT-1 Dye を血清入りもしくは不含培地で 1000 倍希釈し、MT-1 working solution を調製する。

※ Working solution は保存できません。調製したその日の内にご使用ください。

操作

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、5% CO₂ 存在下、37 °C 設定のインキュベーター内で一晚培養する。
2. 調製した MT-1 working solution を添加する。
3. インキュベーター内 (37 °C、5% CO₂ 存在下) で、30 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. ミトコンドリア膜電位変化を誘導する。
6. 上澄み液を除去し、HBSS を用いて細胞を 2 回洗浄する。
7. Imaging Buffer solution を加え、蛍光顕微鏡にて細胞を観察する。

実験例 1

HeLa 細胞のミトコンドリア膜電位検出

1. 100 μ l の HeLa 細胞 (2.4×10^5 cells/ml) を 96 well black plate (clear bottom) に MEM 培地 (10% fetal bovine serum, 1% penicillin-streptomycin) で播種し、インキュベーター内 (37 °C、5% CO₂ 存在下) で一晚培養した。
 2. 培地を取り除き、MEM 培地で希釈した MT-1 working solution (1000 倍希釈) を 100 μ l 添加し、インキュベーター (37 °C、5% CO₂ 存在下) にて 30 分間インキュベートした。
 3. 上澄み液を取り除き、100 μ l の HBSS で細胞を 2 回洗浄した。
 4. MEM 培地で希釈した 0, 1, 5 μ mol/l の Carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenyl hydrazone (FCCP) 溶液を 100 μ l 添加し、インキュベーター内 (37 °C、5% CO₂ 存在下) で 30 分間インキュベートした。
 5. 上澄み液を除去し、100 μ l の HBSS で細胞を 2 回洗浄した。
 6. 100 μ l の Imaging Buffer solution を加え、蛍光顕微鏡で観察した。
- ※ 取得した画像の蛍光強度の数値化は KEYENCE 社マクロセルカウントを用いた。

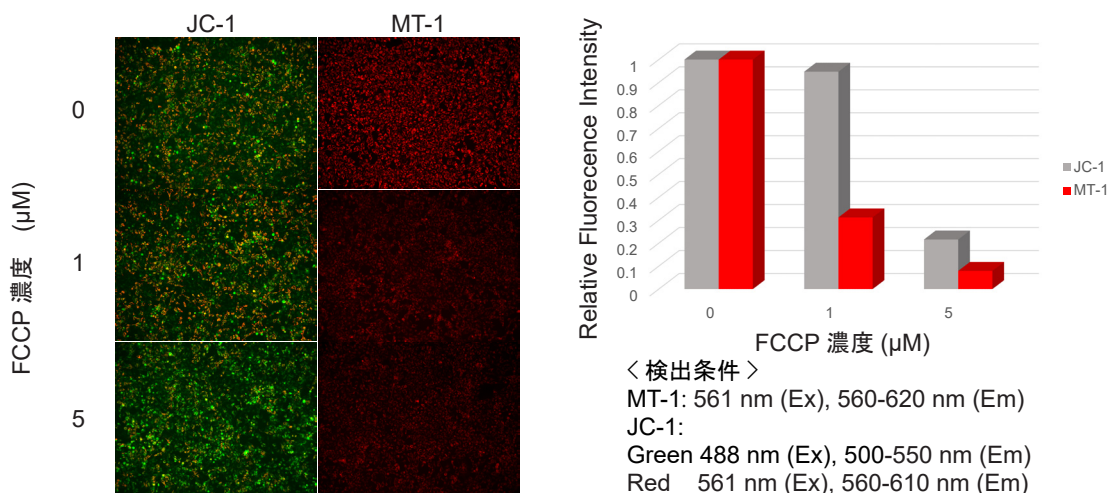
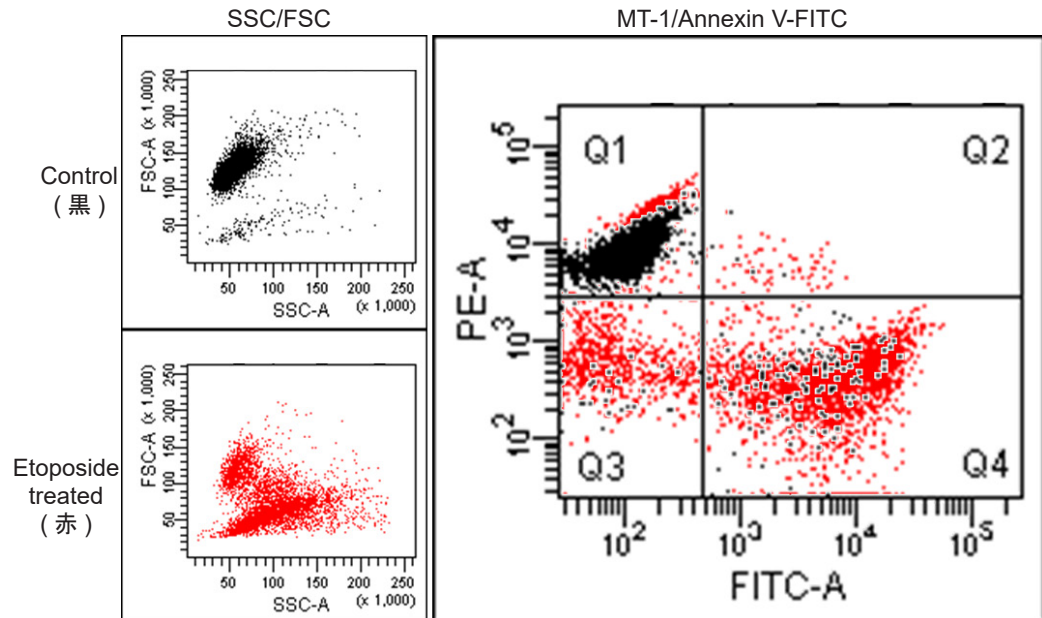


図 1. FCCP で処理した HeLa 細胞のミトコンドリア膜電位の検出

実験例 2 アポトーシス誘導によるミトコンドリア膜電位の変化の観察

1. 1 ml の HL60 細胞懸濁液 (1.0×10^6 cells/ml, RPMI, 10% fetal bovine serum、1% penicillin-streptomycin) を 5 ml チューブに加えた。
2. 遠心操作 (200xg, 3 分間) により培地を取り除き、RPMI 培地で希釈した MT-1 working solution (1000 倍希釈) を 1 ml 添加し、インキュベーター内 (37 °C、5% CO₂ 存在下) にて 30 分間インキュベートした。
3. 遠心操作 (200xg, 3 分間) により上清を除去し、1 ml の HBSS で細胞を 2 回洗浄した。
4. RPMI 培地で希釈した 50 μmol/l の Etoposide 溶液を 1 ml 添加し、インキュベーター内 (37 °C、5% CO₂ 存在下) で 24 時間インキュベートした。
5. サンプルを 100 μl 採取し、そこへ FITC Annexin V (Becton Dickinson 社製、Cat. No. 51-65874X) 5 μl 添加し、室温にて 15 分間インキュベートした。
6. 400 μl の Imaging Buffer solution を加え、フローサイトメーターで観察した。



<検出条件>

Annexin V-FITC:

488 nm (Ex), 500–550 nm (Em)

MT-1:

561 nm (Ex), 560–610 nm (Em)

図 2 フローサイトメーターを用いた HL60 細胞の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, 1081–1092.
- 2) Matsuda, N. et al., *J. Cell Biol.*, **2010**, 189, 211.
- 3) Wang, J. L. et al., *PNAS*, **2000**, 97, 7124–7129.

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

MT13 : MT-1 MitoMP Detection Kit