

ケラチンフィルムのUV感受性(ダメージ評価)試験(5 - FTSC)

1. 機器・試薬

- (1) 機器: 1,000 W 太陽光シミュレータ ORIEL製
シェーカー E-36 TAITEC製
蛍光プレートリーダー Fluoroskan Ascent LabSystem製
- (2) 試薬: Fluorescein-5-thiosemicarbazide(以下、5 - FTSCと記す) Ana Spec製
ジメチルスルホキシド 和光純薬製 蛍光分析用純溶媒
水酸化ナトリウム 和光純薬製 試薬特級
2-Morpholino ethanesulfonic acid, monohydrate(以下、MESと記す) 和光純薬製
20×SSC(3 M塩化ナトリウム、300 mMクエン酸ナトリウム) Invitrogen製
ラウリル硫酸ナトリウム(以下、SDSと記す) ナカライテスク製

2. フィルム処理

- (1) ケラチンフィルムの前処理(必要に応じて)
ケラチンフィルムを含むシャーレにイオン交換水3 mlを注ぎ、シェーカーで1 min振とう後、イオン交換水を廃棄する。これを6回繰り返した後、室温で一昼夜自然乾燥させる(遮光が望ましい)。
- (2) 紫外線照射
紫外線を遮光する為、ケラチンフィルムの表面半分をアルミホイルで覆い、1,000 W 太陽光シミュレータを用いて紫外線照射を行う。
紫外線強度は約2,000 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ とし、照射時間を、20 min, 1 hr, 2 hr, 3 hr の4水準とする。
〔注1〕 アルミホイルが飛ばされないように、シャーレ内に適合するように厚紙等で半円の形を作りそれをアルミホイルで包むと良い。
〔注2〕 太陽光シミュレータからUVが漏れる場合は、周囲をアルミホイル等で囲むと良い(信州大学では不要)。

3. 染色及び洗浄

- (1) 染色液の調製
5 - FTSCをジメチルスルホキシド溶液に溶解させ、5 mMの5 - FTSC溶液を調製する。次に水酸化ナトリウムを用いてpH5.5に調製した100 mM MES溶液に、先に調製した5 mM 5 - FTSC溶液を溶解させ、20 μM の5 - FTSC / 100 mM MES - NaOH (pH5.5)染色液を調製する。
- (2) 染色方法
20 μM の5 - FTSC / 100 mM MES - NaOH (pH5.5)染色液3 mlを、ケラチンフィルムを含むシャーレ上に注ぎ、シェーカーで15 min振とう(室温)後染色液を廃棄する。

(3) 洗浄方法

引き続き $2 \times \text{SSC} - 0.1\%$ SDS 溶液を 3 ml 注ぎ、シェーカーで 5 min 振とう(室温)する。洗浄液を換えて再度繰り返す。次に $0.2 \times \text{SSC} - 0.1\%$ SDS 溶液を 3 ml 注ぎ、50 で 20 min 静置する。洗浄液を換えて再度繰り返す。その後イオン交換水 3 ml を注ぎシェーカーで 1 min 振とう(室温)する。イオン交換水を換えて全部で 6 回繰り返した後、室温で自然乾燥させる。上記染色液の調製、染色、洗浄はできる限り遮光下において行う。

4. 蛍光プレートリーダーを用いた蛍光強度測定法

(1) 蛍光強度測定

6穴のプレート(NUNC社製)のフタ裏を用い、シリコンパッキンでフィルムがずれないように固定し、蛍光プレートリーダーで測定する。

[注1] 6穴のプレートリーダーで一度に複数枚のフィルムを測定すると、隣のフィルムの蛍光が影響するので、一度に測定するのは1枚とする。また6穴のうちどこか1箇所決めて必ずそこで測定すると良い。

[注2] 測定中にシャーレが回転することがあるので、シリコンパッキンをシャーレとフタの間に付けて測定すると良い。シリコンパッキンをプレートのフタに合わせて置き、その上にフタ付きの状態のシャーレを強く押し付けると密着する。

(2) 解析方法

測定したデータのうち、遮蔽部と照射部の境界部分及びフィルムの端の部分のデータを除き、遮蔽部・照射部各々の平均値を蛍光強度値とする。遮蔽部が同じ蛍光強度値を示し、照射部の蛍光強度値がUV照射時間に伴って増加する傾向が見られるかどうかを確認する。