

QuicGSH3.0

表 1. 製品情報

品番	品名	容量	保存	安定性
A401-1	QuicGSH3.0	25 nmol × 5 本	湿気を避け、遮光冷凍保存	未開封で約 1 年
A401-2		25 nmol × 2 本		

1. QuicGSH3.0 について

QuicGSH3.0 は還元型グルタチオン濃度の増減に伴い、2 波長の蛍光強度比が変化する蛍光プローブです。グルタチオン非存在下では最大蛍光波長は 625 nm ですが、グルタチオンと反応することで 625 nm の蛍光が弱くなり、

最大蛍光波長が 582 nm の蛍光強度が上昇します。そのため、582 nm と 625 nm の 2 波長の蛍光強度比からグルタチオン濃度を算出できます。

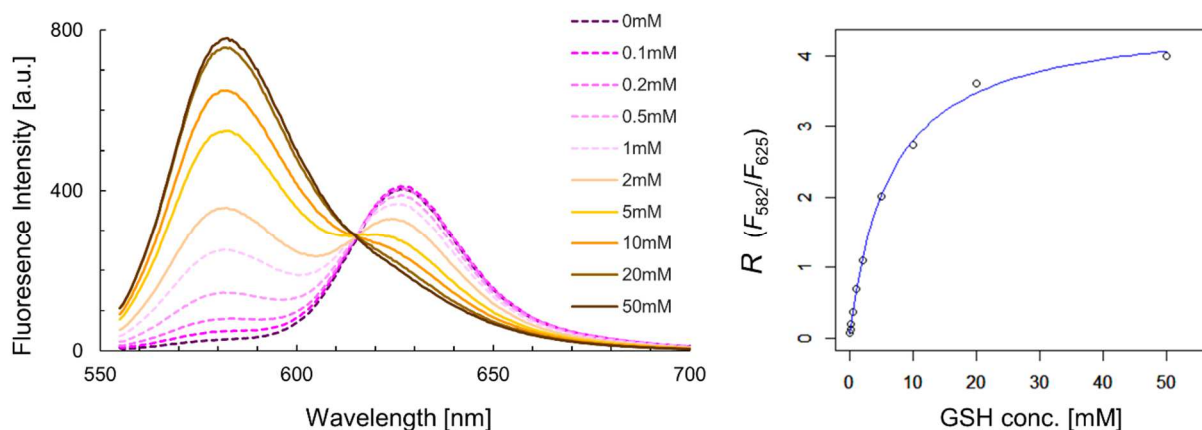


図 1. QuicGSH3.0 の蛍光スペクトル (左) と 582, 625 nm の蛍光強度比の変化 (右)

蛍光分光光度計で測定した蛍光強度の変化 (励起波長 550 nm)。還元型グルタチオン (GSH) の濃度によって蛍光スペクトル、2 波長での蛍光強度比が変化します。

■ 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°C 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。溶液中で保存した試薬の活性は保証しておりません。

2. 細胞のレシオイメージングに必要な光学系等

励起にはおよそ 530–550 nm の波長の光が必要です。レシオイメージングを行うためには 582 nm と 625 nm をそれぞれピークとする蛍光強度を測定し、その比率を求める必要があります。細胞内のグルタチオン濃度を求めるためには、スペクトルイメージングが可能な検出器のある蛍光顕微鏡、または蛍光フィルターホイールのある蛍光顕微鏡が便利です。蛍光フィルターのみを切り替え

る蛍光フィルターホイールがなく、フィルターキューブしか設置できない蛍光顕微鏡でも、表2でご紹介するフィルターセットを2つ使用すればレシオイメージングが可能です。

※波長域は異なりますが、Fura-2 等によるカルシウムのレシオイメージングが論文等で多数報告されていますので、それらの光学系、画像処理ソフトウェアの使用法等もご参考としてください。

表2. 顕微鏡ごとに必要な光学フィルター等

顕微鏡	必要なもの	撮影方法
(A)スペクトルイメージング可能な顕微鏡	530-550 nm の励起光源 (532 nm レーザー等)	560-590 nm の蛍光と 620-670 nm の蛍光を それぞれ撮影
(B)蛍光フィルターホイールのある蛍光顕微鏡	(1) 蛍光フィルターキューブに設置した 励起光フィルター Semrock FF01-520/44 とダイクロイックミラー Semrock FF552-Di02 のセット (2) 蛍光フィルターホイールに2つの蛍光フィルターをセット (Semrock FF01-572/28 および FF01-650/60)	蛍光フィルターキューブは 固定し、蛍光フィルター ホイールの2つのフィルタ を切り替えて2波長を撮影
(C)通常の蛍光顕微鏡	以下をセットした蛍光フィルターキューブを2つ設置 (1) 励起光フィルター Semrock FF01-520/44, ダイクロイックミラー Semrock FF552-Di02 および蛍光フィルター Semrock FF01-572/28 (2) 励起光フィルター Semrock FF01-520/44, ダイクロイックミラー Semrock FF552-Di02 および蛍光フィルター Semrock FF01-650/60	2つのフィルターキューブ を切り替えて2波長を撮影

※Semrock 社製光学フィルターにつきましては日本国内では株式会社オプトライン様までお問い合わせください。

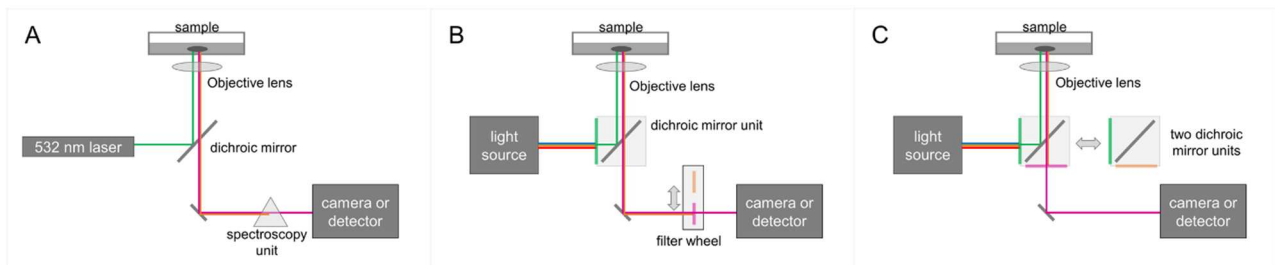


図2. 光学系の概念図

3. 細胞内のグルタチオン濃度測定例

■ ご用意いただくもの

- ・ Dimethyl sulfoxide (DMSO)
- ・ 還元型グルタチオン
- ・ 0.2 M リン酸バッファー (pH 7.4)
- ・ 適切な洗浄および観察用バッファー (例: PBS pH 7.4, HBSS など)
- ・ Pluronic F-127

- ・ 細胞観察容器 (35 mm ガラスボトムディッシュ、4分割型の 35 mm ガラスボトムディッシュ、または8ウェルのチェンバー付きカバーガラス等)

■ 試薬の調製

1. QuicGSH3.0 は青紫色の粉末です。輸送中の振動で試薬がキャップに付着していることがありますので、

バイアルをマイクロ遠心機等で遠心してから開封してください。

- 室温に戻した1バイアルを DMSO 25 μ L に溶解し、1 mM ストック溶液を作成します。ピペティングにより注意深く完全に溶解してください。溶解後は青みのある赤紫色の液体になります。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。

■検量線の作成

検量線は、ご使用の測定装置、測定条件ごとに作成する必要があります。まずは目的の細胞などが観察できるかを予備的に確認した後、その顕微鏡の測定条件において、以下の方法で検量線を作成してください。

- 2 μ M QuicGSH3.0 を含む濃度 0, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50 mM の還元型グルタチオン標準液を作成します。還元型グルタチオンは酸化されやすいため、必ず使用直前に粉末から溶解してください。まず 200 mM になるよう pH 7.4 の 0.1 M Tris-HCl バッファーまたは 0.2 M リン酸バッファーに溶解し、pH を合わせてから各濃度に希釈してください。
- 顕微鏡での細胞観察に用いるのと同じ容器に、それぞれ同量の各濃度の還元型グルタチオン標準液を加えます。3.5 cm ガラスボトムディッシュの場合は 2 mL、4 分割型の 3.5 cm ガラスボトムディッシュの場合は 0.5 mL ずつなど充分な量を加えてください。液面の高さが異なったり、表面張力によって液面が水平でない場合は正確な測定ができません。
- 画面全体の明るさにむらがない、ディッシュまたはウェルの中央付近を観察してください。顕微鏡の位相差像または微分干渉 (DIC) 像を観察しながらガラス面に焦点を合わせ (※1)、そこから正確に 5-50 μ m の一定の移動距離を決めて、溶液の内側へと (※2) 焦点位置を移動してください。
- それぞれのグルタチオン標準液ごとに、蛍光像を2つの波長域で撮影します。画面全体がほぼ均一な蛍光強度を持つ像であることを確認してください。
- 細胞の蛍光強度を求めるのと同じソフトウェアを使用し、画像の中央付近 (※3) の蛍光強度を求めます。それぞれのグルタチオン濃度ごと、波長ごとに、全て同一の場所の同一サイズの ROI (region of interest) を作成し、その蛍光輝度を求めてください。解析のために画像を書き出して別の PC で解析する場合、16 bit TIFF など最高画質の画像フォーマット (※4) を

使用してください。詳しくは各ソフトウェアの説明書などをご参照ください。

- それぞれの濃度において、2 波長での蛍光強度比 ($R = F_{\lambda 1}/F_{\lambda 2}$) を求めます。ここで、 $F_{\lambda 1}$ は短波長側での蛍光強度、 $F_{\lambda 2}$ は長波長側での蛍光強度です。
- グルタチオン濃度 0 mM における R の値を R_{\min} とし、グルタチオン濃度 30 mM での R の値を近似的に R_{\max} とし、各濃度での $(R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)$ を求めます。この値をグルタチオン濃度に対してプロットします (図3)。
- このプロットは0を通る直線になるはずですが、特に R_{\max} の見積もりが不正確な場合は濃度が高い領域で直線から外れてきます。低い濃度のみの検量線を使用するか、もしくは測定をやり直してください。切片が0の線形回帰で検量線を作成してください。

- ※1 ガラス面に焦点が合わせにくい場合は、直径 1 μ m 程度の無蛍光のポリスチレンビーズをガラスに吸着させることで、ガラス面が見つけやすくなります。浮遊しているビーズはよく洗浄して除いてください。
- ※2 倒立型顕微鏡の場合は上方に焦点位置を移動させます。焦点位置の移動量を表示できない顕微鏡では、ガラス面からの散乱光などに影響されなくなる距離まで移動し、移動位置が毎回同じになるようにレボルバーの移動量を記録しておきます。焦点位置を調節するレボルバーには通常バックラッシュがありますので、レボルバーは行ったり来たりさせずに毎回同じ量だけ1方向に移動させます。
- ※3 レンズによっては、収差により周辺部の画質が低いことがあるため、中央付近で測定を行ってください。
- ※4 たとえば 12 bit のピクセル深度を持つカメラのデータを 8 bit TIFF にエクスポートすると、正しい輝度値が保存されません。

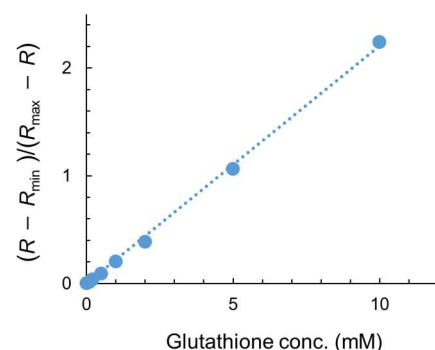


図3. 検量線の例

より正確な測定のためには、 R とグルタチオン濃度 [GSH] を以下の式にあてはめて非線形フィッティングを行い、パラメータ R_{\min} , R_{\max} , $K_{d,obs}$ を求めてください。

$$R = R_{\max} + \frac{R_{\min} - R_{\max}}{1 + \frac{[GSH]}{K_{d,obs}}}$$

この $K_{d,obs}$ は正確には $K_{d,obs} = K_d (F_{\lambda_{2,max}}/F_{\lambda_{2,min}})$ ただし K_d , $F_{\lambda_{2,max}}$, $F_{\lambda_{2,min}}$ はそれぞれ QuicGSH3.0 とグルタチオンとの解離定数 (= 3.0)、長波長側の測定波長におけるグルタチオンがないときの蛍光強度、飽和濃度のグルタチオン存在下での蛍光強度です。

■ 細胞観察例

A549 細胞内還元型グルタチオンの観察

1. ガラスボトムディッシュに A549 細胞を播種し一晩培養します。
2. QuicGSH3.0 の 1 mM DMSO 溶液を観察用バッファーで希釈し、終濃度 1 μ M の染色液を作成します。染色液に Pluronic F-127 を終濃度 0.01% になるように加えます。

3. 培養容器に染色液を加え、37°C で 10 分間インキュベートします。
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、検量線の作成と同じ条件にて 2 波長の蛍光画像を撮影します。
6. 得られた画像から 2 波長の蛍光強度比を求めます。
7. 前節の方法で求めた検量線と R_{\min} , R_{\max} の値から、グルタチオン濃度を算出します。

グルタチオン標準液の蛍光輝度から非線形フィッティングによってパラメータ R_{\min} , R_{\max} , $K_{d,obs}$ を求めた場合は、以下の式を用いてグルタチオン濃度をより正確に算出できます。

$$[GSH] = K_{d,obs} \frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R}$$

■ 参考文献

Keitaro Umezawa, Masafumi Yoshida, Mako Kamiya, Tatsuya Yamasoba and Yasuteru Urano (2017) *Nat. Chem.* **9**: 279-286. DOI: 10.1038/nchem.2648

表 2. 関連製品

型番	品名	主な用途
GC801	ProteoGREEN™-gGlu	細胞内グルタチオン代謝に関連する γ -glutamyltranspeptidase の検出に。
GC901	FeRhoNox™-1	ゴルジに局在する Fe (II) イオンの検出に。
GC902	CopperGREEN™	Cu (I) イオンの検出に。
SK3001-01	HPF	ヒドロキシラジカルやパーオキシナイトライトの検出に。
SK3002-01	APF	ヒドロキシラジカルやパーオキシナイトライト、次亜塩素酸の検出に。
SK3003-01	NiSPY-3	パーオキシナイトライト (ONOO ⁻) の検出に。
GC3004-01	OxiORANGE™	ヒドロキシラジカルや次亜塩素酸の検出に。オレンジ色の蛍光試薬。
GC3006-01	HySOx	細胞内の次亜塩素酸の検出に。
GC3007-01	HYDROPT™	細胞内の過酸化水素の検出に。