

FerroOrange

表 1. 製品情報

品番	品名	容量	保存	安定性
GC904-01	FerroOrange	35 nmol × 5 本	湿気を避け、遮光冷凍保存	未開封で約 1 年
GC904-02		35 nmol × 1 本		

1. はじめに

FerroOrange は、遊離した鉄 (II) イオン (Fe^{2+}) をオレンジ色の蛍光で検出可能な ER 局在性の生細胞イメージング用蛍光プローブです。この試薬は Fe^{2+} と特異的に反応して非可逆的にオレンジの蛍光物質に変化するため、他の金属イオンと区別して Fe^{2+} のみを検出することができます。

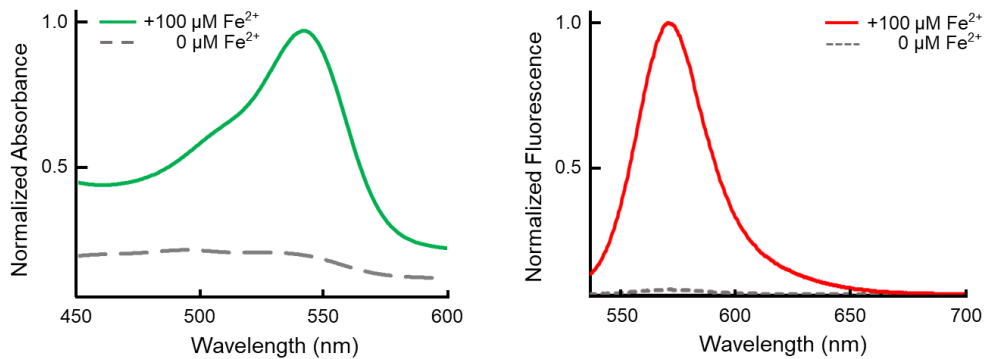


図 1. 0.05 M HEPES buffer (pH 7.4) 中での FerroOrange の吸収スペクトルおよび蛍光スペクトル。吸収極大は 542 nm, 最大蛍光波長は 572 nm に観察されます。

■ 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°C 以下で冷凍保存してください。Dimethyl sulfoxide (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. 試薬の準備

■ 用意するもの

- ・ 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)

溶媒して DMSO をご用意ください。FerroOrange は無色の粉末です。吸湿しないよう室温に戻したバイアルをマイクロ遠心機で遠心し、蓋などに付着している粉末を底に集めてから開封してください。

1 バイアル (35 nmol) に DMSO 35 μ L を加え、ピペッティングを 5 回以上繰り返し、完全に溶解して 1 mM 溶液を作成します。FerroOrange 溶液は、ほぼ無色となります。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または培地を使用し、希釈後はすぐにご使用ください。

3. 細胞染色例

HepG2 細胞内の遊離鉄 (II) イオン (Fe^{2+}) の観察

1. ガラスボトムディッシュに HepG2 細胞を播種し、一晚培養します。
2. HepG2 細胞を培養しているガラスボトムディッシュから液体培地を除去します。HBSS などのバッファーで 2 回洗浄し、細胞外の Fe^{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。
3. FerroOrange の 1 mM ストック溶液を HBSS または無血清培地で希釈し、終濃度 1 μ M の染色液を作成します。
4. 培養容器に染色液を加え、37°C で 30 分インキュベートします。
5. 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、観察します。

※ Fe^{2+} をあらかじめ細胞に投与しておく、ポジティブコントロールとして細胞内の Fe^{2+} の増加が確認できます。使用直前に純水を用いて 100 mM の $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ を作成し、HBSS で終濃度 100 μ M に希釈します。この溶液内で細胞を 30 分間培養すると、細胞内 Fe^{2+} 濃度が上昇します。この後、細胞外の Fe^{2+} を洗浄用バッファーなどで洗浄してから FerroOrange を添加してください。

※ 血清が入った状態での染色は避けてください。細胞内の Fe^{2+} と FerroOrange が反応する前に血清中の Fe^{2+} と FerroOrange が反応しますので、細胞内の Fe^{2+} が正しく検出できなくなります。

※ 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。また、細胞がディッシュからはがれやすい場合は、poly-L-lysine などをあらかじめコーティングしてから細胞を播種してください。

■ 蛍光観察

蛍光顕微鏡では Cy3 用等の一般的な G 励起フィルタで観察できます。レーザー顕微鏡やフローサイトメーターなどでは、532 nm または 514 nm, 561 nm でのレーザー励起が一般的ですが、488 nm レーザーでも励起が可能です。蛍光は 572 nm 付近で検出されます。フローサイトメーターでは phycoerythrin (PE) 用のフィルターで使用可能です。

※FerroOrange は岐阜薬科大学 創薬化学大講座 薬化学研究室の永澤秀子先生、平山祐先生のご指導・ご協力のもと五稜化薬株式会社が製品化しました。

表 2. 関連製品

型番	品名	主な用途
GC901	FeRhoNox™-1	ゴルジに局在する Fe ²⁺ イオンの検出に。
GC902	CopperGREEN™	Cu ⁺ イオンの検出に。
GC903-01	FerroFarRed™	ER に局在する Fe ²⁺ イオンの検出に。深赤色の蛍光試薬。
SK2001-01	ZnAF-2	Zn ²⁺ イオンの検出に。
SK2002-01	ZnAF-2 DA	細胞内の Zn 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を特異的に検出。
GC3007-01	HYDROP™	細胞内の過酸化水素を特異的に検出。
A101-01	MAR	細胞の低酸素応答の検出に。