

一般研究用

# SSip-1 DA

表 1. 製品情報

品番	品名	容量	保存	安定性
A402-1	SSip-1 DA	60 nmol×3 本	遮光冷凍保存 DMSO 溶解後は使い切り	未開封で 約 1 年

## 1. はじめに

活性硫黄とも言われるサルフェン硫黄 (sulfane sulfur)、パースルフィド (persulfide, R-S-SH)、ポリスルフィド (polysulfide, R-S-S<sub>n</sub>-S-R) および多硫化水素 (ポリ硫化水素, polysulfide, H<sub>2</sub>S<sub>n</sub>) は細胞中に豊富に存在し、生体内の還元環境の維持などの生理活性が注目されています。SSip-1 DA は分子内 FRET の原理を利用し、細胞中に存在する μM オーダーのサルフェン硫黄に

応じて可逆的に蛍光を発する蛍光プローブです。サルフェン硫黄に対して高い特異性があり、硫化水素、システイン残基や硫黄酸化物とはほとんど反応しません。試薬は膜透過性と細胞内滞留性を両立したジアセチル (DA) 体で、細胞内のサルフェン硫黄の時間変化を追跡するライブセルイメージングに適しています。

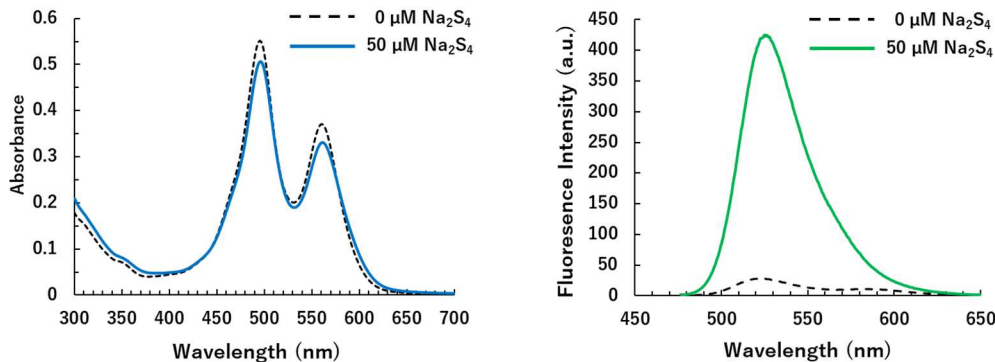


図 1 SSip-1 の吸収・蛍光スペクトル。

0.1 M リン酸バッファー (pH 7.4) 中で測定した 50 μM Na<sub>2</sub>S<sub>4</sub> 反応前 (点線) および反応後 (実線) のスペクトル。最大吸収波長は 495 nm, 最大蛍光波長は 525 nm。

## ■ 試薬の保存

色素は窒素封入、乾燥状態で出荷しております。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)
- ・ Bovine Serum Albumin (BSA)等のタンパク溶液
- ・ 適切な洗浄および観察用バッファー（例: PBS pH7.4, HBSS など）

溶媒として、dimethyl sulfoxide (DMSO) をご用意ください。SSip-1 DA は紫色の固体です。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 (60 nmol) に DMSO 60  $\mu$ L を加え、ピペッティングを 5 回以上繰り返して完全に溶解してください。これが 1 mM 溶液となります。SSip-1 DA 溶液は赤紫色となります。

※SSip-1 DA はバッファー内で凝集しやすい特性があります。染色液内に SSip-1 DA が凝集したまま測定しますと十分な蛍光が得られません。染色液内で SSip-1 DA を拡散させるためには、1 mg/mL BSA 等のタンパクの添加が必要です。弊社の検討では 10% FBS よりも 1 mg/mL BSA の方が強い蛍光が得られています。

## 3. 細胞染色例

### A549 細胞内のサルフェン硫黄の検出例

1. SSip-1 DA の 1 mM DMSO 溶液を 1 mg/mL BSA を添加した HBSS などで希釈し、終濃度 10  $\mu$ M の染色液を作成します。

※ SSip-1 DA は還元型グルタチオン (GSH) に

よって蛍光が消失します。細胞内 GSH は細胞の種類等によって大きく異なるため、各細胞により適切な色素濃度およびインキュベーション時間の最適化が必要です。弊社での検討では、A549 細胞（ヒト肺がん由来細胞株）で 10  $\mu$ M, 37°C, 60 分で良好な結果が確認できています。

※また、細胞の栄養状態によっても細胞内 GSH が異なります。そのため、同じ実験系でも細胞の栄養状態によっても結果が大きく異なる可能性も考えられますので、この点も十分にご留意ください。

2. 培養細胞より液体培地を除去し、HBSS などの洗浄バッファーで 2 回洗浄を行います。
3. 培養容器に染色液を加え、37°C で 60 分間インキュベーションします。
4. 染色した細胞を洗浄バッファーで 2 回洗浄します。
5. 洗浄後、適切な観察バッファーに置き換えます。
6.  $\text{Na}_2\text{S}_4$ などを添加することで細胞を刺激し、蛍光顕微鏡で観察します。

※ 同検討では、10  $\mu$ M  $\text{Na}_2\text{S}_4$  添加後約 60 分で十分な蛍光が確認できています。

### ■ 蛍光観察

励起波長は 488 nm から 495 nm 付近の青色光が適しています。蛍光波長はおおよそ 525 nm をピークに検出されます。蛍光顕微鏡では一般的な B 励起フィルター (GPF, FITC 用など) が使用できます。

## 参考文献

上記プロトコルは 1 例です。以下の文献の使用例等もご参照ください。

D. Ezeriņa, Y. Takano, K. Hanaoka, Y. Urano, T. P. Dick (2018) *Cell Chem. Biol.* **25**: 1–13 DOI: 10.1016/j.chembiol.2018.01.011

R. Miyamoto, S. Koike, Y. Takano, N. Shibuya, Y. Kimura, K. Hanaoka, Y. Urano, Y. Ogasawara, H. Kimura (2017) *Sci. Rep.*, **7**: 45995 DOI: 10.1038/srep45995

Y. Takano, K. Hanaoka, K. Shimamoto, R. Miyamoto, T. Komatsu, T. Ueno, T. Terai, H. Kimura, T. Nagano, Y. Urano (2017) *Chem. Commun.*, **53**: 1064-1067 DOI: 10.1039/C6CC08372B

表 2. 関連製品

型番	品名	主な用途
A401-1	QuicGSH3.0	還元型グルタチオンの定量に。
SK1002-01	DAF-2 DA	緑色蛍光による細胞内での NO の検出、イメージングに。
SK1004-01	DAF-FM DA	緑色蛍光による細胞内での NO の検出、イメージングに。
SK1006-01	DAR-4M AM	オレンジ色蛍光による細胞内での NO の検出、イメージングに。
SK3001-01 SK3001-02	HPF	ヒドロキシラジカル ( $\cdot\text{OH}$ )、パーオキシナイトライト ( $\text{ONOO}^-$ ) の検出に。
SK3002-01 SK3002-02	APF	ヒドロキシラジカル ( $\cdot\text{OH}$ )、パーオキシナイトライト ( $\text{ONOO}^-$ )、次亜塩素酸 ( $\text{HClO}$ ) の検出に。
SK3003-01	NiSPY-3	パーオキシナイトライト ( $\text{ONOO}^-$ ) 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	次亜塩素酸 ( $\text{HClO}$ ) の検出に。
GC3007-01	HYDROP™	細胞内の過酸化水素の検出に。