

FerroFarRed™

表 1. 製品情報

品番	品名	容量	保存	安定性
GC903-01	FerroFarRed	50 nmol × 5 本	湿気を避け、遮光冷凍保存	未開封で約 1 年

1. はじめに

FerroFarRed は SiRhoNox-1, ER-SiRhoNox としても知られる遊離鉄 (II) イオン (Fe^{2+}) を深赤色の蛍光で検出可能な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、非可逆的に深赤色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。

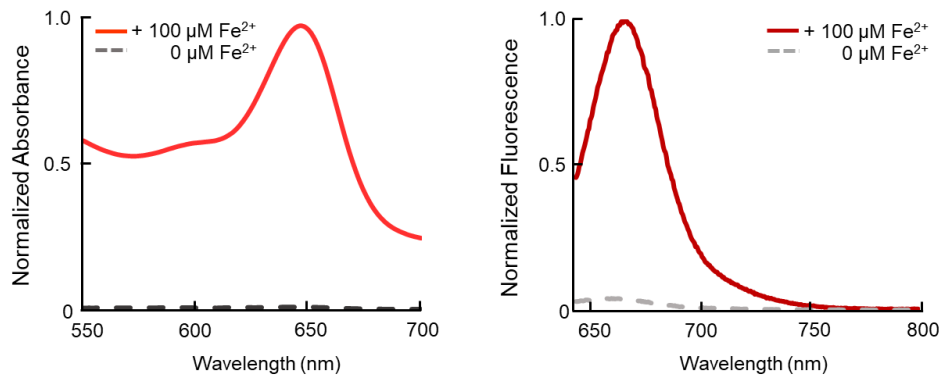


図 1. FerroFarRed の吸収および蛍光スペクトル。

0.05 M HEPES buffer (pH 7.4) 中で測定した $100 \mu M Fe^{2+}$ 反応前 (点線) および反応後 (実線) のスペクトル。吸収極大は 646 nm, 最大蛍光波長は 662 nm。

■ 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 $-20^{\circ}C$ 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)
- ・ 無血清細胞培養培地 (例: D-MEM など)

FerroFarRed は青色の固体です。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 (50 nmol) に DMSO 50 μ L を加え、ピペティングを 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。FerroFarRed 溶液は、ほぼ無色 (わずかに青色) となります。

3. 細胞染色例

HeLa 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細胞を播種し、一晩培養します。
2. HeLa 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 などの洗浄用バッファーで 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. FerroFarRed の 1 mM ストック溶液を無血清細胞培養培地で希釈し、終濃度 5 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 1 時間インキュベートします。
5. 染色した細胞を洗浄用バッファーで 1 回洗浄し、観察用バッファーに置き換えます。
6. 蛍光顕微鏡で細胞を観察します。

※ 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。HepG2 細胞では同条件で良好な結果が得られております。また、細胞がディッシュからはがれやすい場合は、ディッシュを poly-L-Lysine などで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。

※ 必要に応じて、 Fe^{2+} を予め細胞に投与しておくことで細胞内の Fe^{2+} の増加が確認できます。使用前に $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ を 100 mM になるように純水で溶解し、無血清細胞培養培地で終濃度 100 μ M に希釈し添加後 30 分間培養すると、細胞内の 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 FerroFarRed を添加してください。

※ FAS および FerroFarRed の希釈に関しては無血清培地のほか、HBSS でも使用できることを確認しております。

※ 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 FerroFarRed が反応する前に血清中の Fe^{2+} と FerroFarRed 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。

フローサイトメーターを使用した HepG2 細胞内の Fe^{2+} の測定

1. マルチウェルプレートに細胞を播種し、一晩培養します。
2. 細胞を培養しているマルチウェルプレートから液体培地を除去します。HBSS などの洗浄用バッファーで 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. FerroFarRed の 1 mM ストック溶液を無血清細胞培養培地で希釈し、終濃度 5 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 1 時間インキュベートします。
5. 染色した細胞を PBS で 1 回洗浄し、0.25%トリプシン-EDTA 液を加え、マルチウェルプレートから細胞を剥がします。
6. PBS で 0.25%トリプシン-EDTA 液を希釈した後、500 \times g で 5 分間遠心分離を行い、細胞を沈殿させます。

※ この際、血清を用いてトリプシンを中和しないでください。細胞内の Fe^{2+} と FerroFarRed が反応する前に血清中の Fe^{2+} と FerroFarRed 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。

7. 細胞を PBS に再懸濁させます。
8. 細胞懸濁液を 40 μ m セルストレーナーに通して凝集体を除去します。
9. フローサイトメーターを用いて測定します。

※ 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。

※ 必要に応じて、 Fe^{2+} を予め細胞に投与しておくことで細胞内の Fe^{2+} の増加が確認できます。使用直前に $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ を 100 mM になるように純水で溶解し、無血清細胞培養培地で終濃度 100 μ M に希釈し添加後 30 分間培養すると、細胞内の Fe^{2+} 濃度が上昇します。この後、洗浄用バッファなどで細胞外の Fe^{2+} を洗浄してから FerroFarRed を添加してください。

■ 蛍光観察

Fe^{2+} と反応した FerroFarRed は 600–670 nm 付近の波長の光を吸収し、約 660 nm をピークとする蛍光を放出します。レーザー顕微鏡やフローサイトメーターなどでは 635 nm 付近のレーザーによる励起が適しています。蛍光顕微鏡では一般的な Cy5 用などの蛍光フィルターが適合します。フローサイトメーターでは Allophycocyanin (APC) 用のフィルターが適合します。

■ 参考文献

- T. Hirayama, A. Miki, H. Nagasawa (2018) *Metallomics*. in press DOI: 10.1039/c8mt00212f
- K. Sakamoto, T. Suzuki, K. Takahashi, T. Koguchi, T. Hirayama, A. Mori, T. Nakahara, H. Nagasawa, K. Ishii (2018) *Exp. Eye Res.* **171**: 30-36 DOI: 10.1016/j.exer.2018.03.008
- T. Hirayama, H. Tsuboi, M. Niwa, A. Miki, S. Kadota, Y. Ikeshita, K. Okuda, H. Nagasawa (2017) *Chem. Sci.* **8**: 4858–4866 DOI: 10.1039/c6sc05457a

※ FerroFarRed は岐阜薬科大学 創薬化学大講座 薬化学研究室で開発された SiRhoNox-1 (ER-RhoNox) を製品化したものです。

表 2. 関連製品

型番	品名	主な用途
AR2901-U5	FeRhoNox™-1	ゴルジに局在する Fe ²⁺ の検出に。
GC902	CopperGREEN™	Cu ⁺ の検出に。
SK2001-01	ZnAF-2	Zn ²⁺ の検出に。
SK2002-01	ZnAF-2DA	細胞内の Zn ²⁺ 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。
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。
AR5101-U2	MAR	細胞の低酸素応答の検出に。