

### はじめに

鉄は、生体内で最も多く存在する遷移金属元素であり、様々な生理活性を示すことが報告されています。近年、タンパク非結合型の鉄イオン（自由鉄）としての存在が注目されており、その高い反応性は細胞損傷や細胞死にも関与していることが示唆されています。自由鉄は安定な化学種である鉄(II)イオン及び鉄(III)イオンとして存在しますが、生細胞内において、細胞内還元的環境、水溶性、トランスポーターの存在等を考慮すると鉄(III)イオンよりも鉄(II)イオンの挙動を知ることが重要であると考えられています。FerroOrangeは、細胞内の鉄(II)イオンと選択的に反応し強い蛍光( $\lambda_{ex} : 543 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} : 580 \text{ nm}$ )を発する試薬であり、細胞内鉄(II)イオンのライブセルイメージングに利用することが可能です。

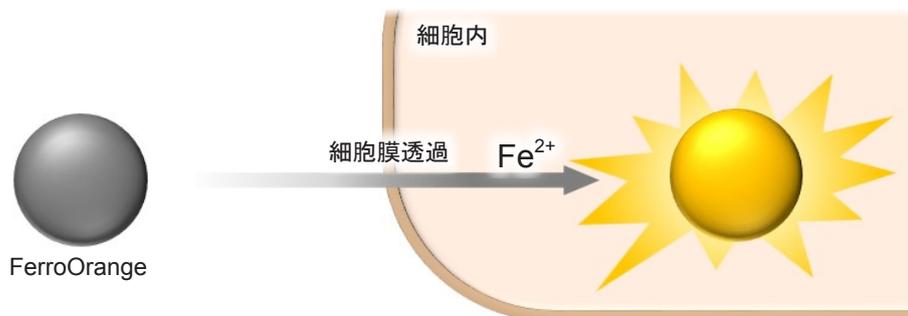


図 1 FerroOrange による細胞内鉄(II)の検出

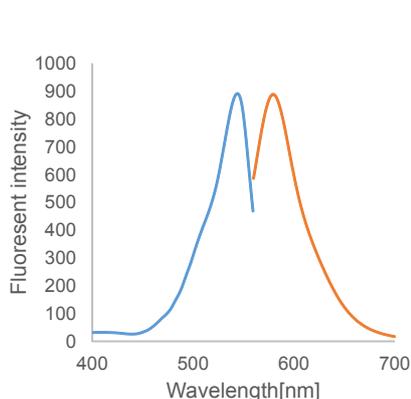


図 2 FerroOrange の励起、蛍光スペクトル

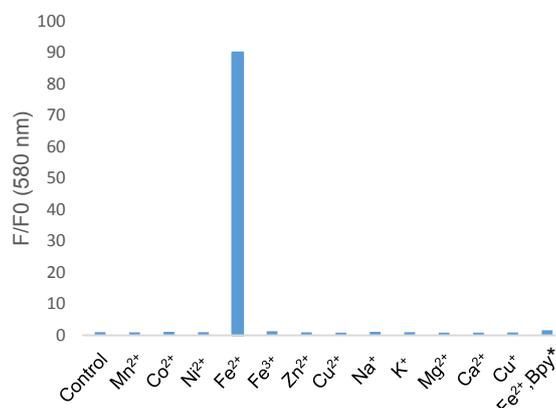


図 3 FerroOrange の金属イオン選択性  
\*Bpy; 2,2'-Bipyridyl

### 内容

	1 tube	3 tubes
FerroOrange	24 $\mu\text{g} \times 1$	24 $\mu\text{g} \times 3$

### 保存条件

- 遮光、冷蔵保存してください。

### 必要なもの

- Dimethyl sulfoxide (DMSO)、Dimethylformamide (DMF) またはエタノール
- HBSS
- 無血清培地
- マイクロピペット

### 溶液調製

#### 1 $\mu\text{mol/L}$ FerroOrange working solution の調製方法

FerroOrange 24  $\mu\text{g}$  を含むマイクロチューブに 35  $\mu\text{L}$  の DMSO を加え、ピペッティングにより溶解し、1 mmol/L FerroOrange 溶液を調整する。調製した溶液を HBSS で希釈し 1  $\mu\text{mol/L}$  working solution とする。

※ DMSO の代わりに DMF もしくはエタノールも使用可能です。調製後の 1 mmol/L FerroOrange 溶液は、製品添付のアルミラミジップに入れ、冷凍で保存していただければ 1 ヶ月間保存可能です。尚、1  $\mu\text{mol/L}$  working solution は不安定なため、細胞試料に添加する直前に調製し、直ちに染色に供して下さい。

※希釈に用いる HBSS は無血清培地に変更可能です。血清入り培地はバックグラウンド上昇の原因となるため、使用できません。

### 操作

1. 細胞をディッシュに播種し、5%  $\text{CO}_2$  存在下、37°C で培養する。
2. 培地を取り除き、無血清培地で 3 回洗浄する。
3. 刺激剤を含む培地を添加し、5%  $\text{CO}_2$  存在下、37°C で培養する。  
※刺激の条件に応じてインキュベーション時間を設定して下さい。
4. 溶液を取り除き、HBSS または無血清培地で 3 回洗浄する。
5. 1  $\mu\text{mol/L}$  FerroOrange working solution を添加し、5%  $\text{CO}_2$  インキュベーター内に 37°C で 30 分間静置する。  
※洗浄せずに観察を行って下さい。
6. 細胞を蛍光顕微鏡で観察する。

## 実験例 1

### FerroOrange を用いた細胞内鉄 (II) の検出

1.  $\mu$ -スライド 8 ウェル (ibidi 社製) に HeLa 細胞 ( $2.0 \times 10^4$  cells/well) を播種し、5%  $\text{CO}_2$  存在下、 $37^\circ\text{C}$  で一晩培養した。
2. 無血清培地 200  $\mu\text{L}$  で 3 回洗浄し、無血清培地 200  $\mu\text{L}$  を添加した。
3. 10 mmol/L となるように超純水で硫酸アンモニウム鉄 (II) 溶液を調製した。
4. 10 mmol/L 硫酸アンモニウム鉄 (II) 溶液 2  $\mu\text{L}$  をウェルに添加し (終濃度 100  $\mu\text{mol/L}$ )、溶液を均一にするため、ウェル内の溶液全量を一度マイクロピペットで吸い上げ、再び同じウェルにゆっくり戻した。  
**※硫酸アンモニウム鉄 (II) を添加する際は操作 4 の様に行ってください。マイクロチューブなどに予め無血清培地で 100  $\mu\text{mol/L}$  硫酸アンモニウム鉄 (II) 溶液を調製し細胞に添加する方法では、ボルテックスやピペティングによる混合操作で沈殿が生じる可能性があります。**
5. 5%  $\text{CO}_2$  存在下、インキュベーター内に  $37^\circ\text{C}$  で 30 分静置した後、硫酸アンモニウム鉄 (II) 溶液を除き、HBSS 200  $\mu\text{L}$  で 3 回洗浄した。
6. FerroOrange (1  $\mu\text{mol/L}$ ) 及び 2,2'-bipyridyl (Bpy) (100  $\mu\text{mol/L}$ ) を含む HBSS 溶液 200  $\mu\text{L}$  を添加し、5%  $\text{CO}_2$  存在下、 $37^\circ\text{C}$  で 30 分間インキュベートした。
7. 細胞を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

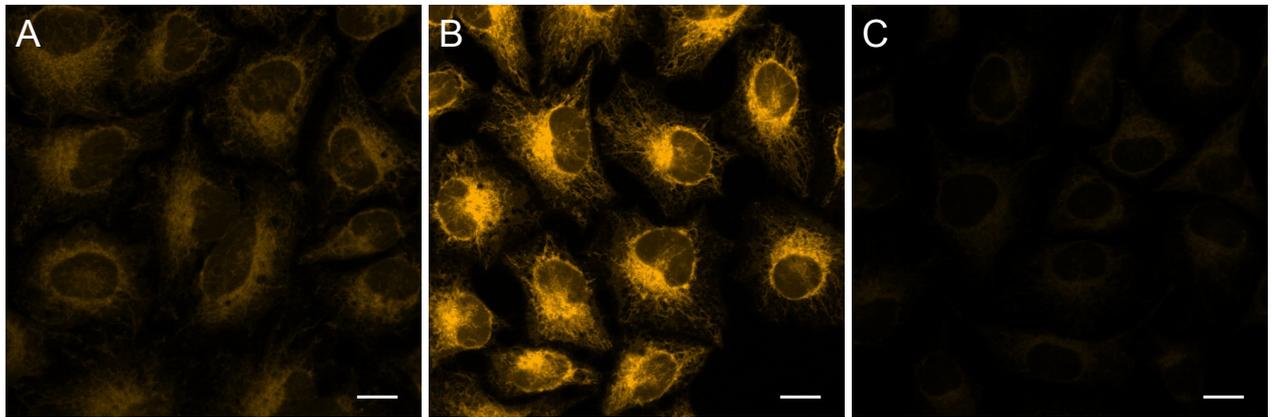


図 4 FerroOrange を用いた細胞内鉄 (II) の検出

Ex/Em = 561 nm/ 570–620 nm

A 未処理の HeLa 細胞

B 硫酸アンモニウム鉄 (II) 処理のみ

C 硫酸アンモニウム鉄 (II) 及び Bpy 処理

Scale bars 20  $\mu\text{m}$

硫酸アンモニウム鉄 (II) 添加群で蛍光強度が増大し、Bpy 添加により蛍光強度が低下したことから、FerroOrange が細胞内鉄 (II) と反応していることを確認した。

## 実験例 2

### FerroOrange を用いた内在性の細胞内鉄 (II) の検出

1.  $\mu$ -スライド 8 ウェル (ibidi 社製) に HeLa 細胞 ( $2.0 \times 10^4$  cells/well) を播種し、5%  $\text{CO}_2$  存在下、 $37^\circ\text{C}$  で一晩培養した。
2. HBSS 200  $\mu\text{L}$  で 3 回洗浄した。
3. FerroOrange (1  $\mu\text{mol/L}$ ) 及び Bpy (100  $\mu\text{mol/L}$ ) の HBSS 溶液 200  $\mu\text{L}$  を添加し、5%  $\text{CO}_2$  存在下、 $37^\circ\text{C}$  で 30 分間インキュベートした。
4. 細胞を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

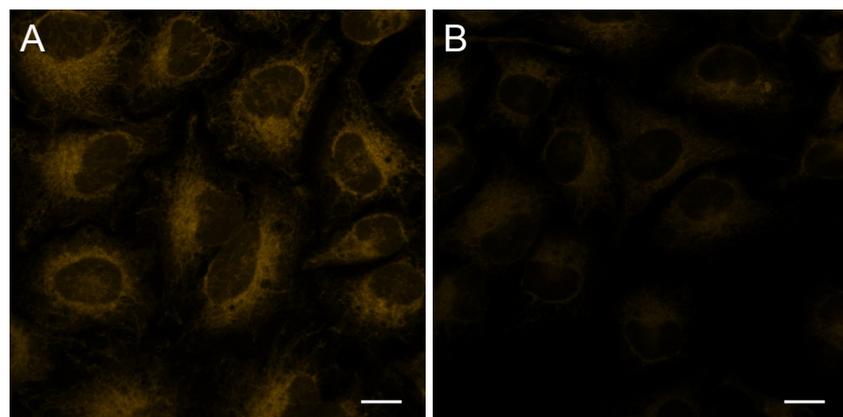


図 5 FerroOrange を用いた内在性の細胞内鉄 (II) の検出

Ex/Em = 561 nm/ 570–620 nm

A 未処理の HeLa 細胞

B Bpy 処理

Scale bars 20  $\mu\text{m}$

Bpy 添加により FerroOrange の蛍光強度が低下したことから、未処理の HeLa 細胞で観察された蛍光が内在性の細胞内鉄 (II) 由来であることが示唆された。

本製品は、岐阜薬科大学薬化学研究室 永澤秀子先生、平山祐先生のご指導の下、製品化しました。

ご質問・ご要望は下記までお問い合わせください。

**DOJINDO** 株式会社同仁化学研究所  
 熊本県上益城郡益城町田原 2025-5  
 熊本テクノリサーチパーク 〒 861-2202  
 Tel: 096-286-1515 (代表) Fax: 096-286-1525  
 E-mail: info@dojindo.co.jp URL: www.dojindo.co.jp

ドージン・イースト (東京)  
 東京都港区芝大門 2-1-17 朝川ビル 7F 〒 105-0012  
 Tel: 03-3578-9651 (代表) Fax: 03-3578-9650  
 フリーダイヤル : 0120-489548  
 フリーファックス : 0120-021557