

はじめに

近年、硫黄原子が連結したパースルフィドやポリスルフィドのようなサルフェン硫黄 (Sulfane Sulfur) を含む分子種が生体内に多く存在していることが明らかにされています。このような分子種は、硫化水素の産生や貯蔵、放出だけでなく、S-スルフヒドリル化などのタンパク質内チオールをターゲットとしたシグナル伝達にも関与していることが示唆されており、非常に注目されています。SSP4 (Sulfane Sulfur Probe 4) は、サルフェン硫黄と特異的に反応して強い蛍光 ($\lambda_{ex}=482\text{ nm}$, $\lambda_{em}=515\text{ nm}$) を発する試薬であり、サルフェン硫黄含有分子種の蛍光検出や細胞内解析に有用です。

※本試薬を細胞内サルフェン硫黄含有分子の解析に利用する場合、試薬を細胞内に導入するためカチオン性界面活性剤である Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) を使用してください。

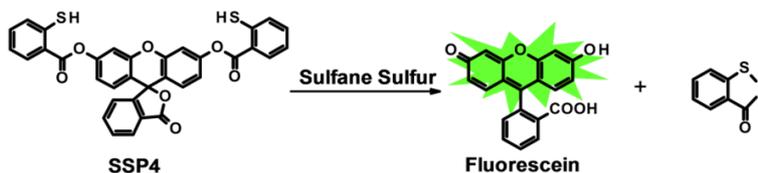


Fig. 1 SSP4 とサルフェン硫黄の反応

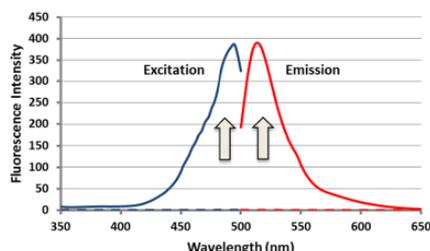


Fig. 2 サルフェン硫黄との反応に伴う SSP4 の励起および蛍光スペクトル変化

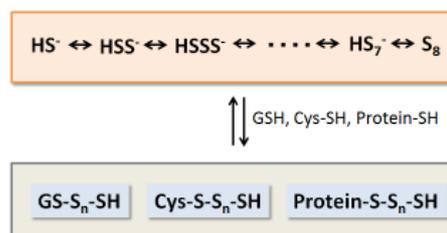


Fig. 3 サルフェン硫黄 (Sulfane Sulfur) を含む分子種

内容

SSP4 1 mg x 1

保存条件

遮光、-20°C以下で保存してください。

必要なもの

- Dimethyl sulfoxide (DMSO)
- 無血清培地
- PBS
- Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)
- マイクロピペット

溶液調製

- 10 mmol/l SSP 4 Stock Solution

SSP4 1mg を含むチューブに DMSO 165 μ l を添加し、ピペッティングにより溶解する。
※この溶液を少量小分けし、-20 °C以下で保存してください。約 2 ヶ月間は安定です。

- 0.5 mmol/l CTAB を含む無血清培地

CTAB 36.4mg を 1.5ml 遠心チューブに秤量し、超純水 1 ml を添加する。ドライヤーなどで加温溶解し、100 mmol/l CTAB 水溶液とする。この水溶液を無血清培地で 200 倍希釈し、0.5 mmol/l CTAB を含む無血清培地とする。

- SSP4 Working Solution

終濃度が 5-20 μ mol/l となるように 10 mmol/l SSP4 Stock Solution を、0.5 mmol/l CTAB を含む無血清培地に添加する。

例：10 mmol/l SSP4 Stock Solution 10 μ l を 0.5 mmol/l CTAB を含む無血清培地 5 ml に添加すると、20 μ mol/l SSP4 Working Solution となる。

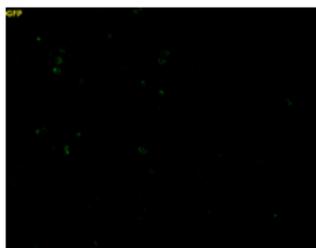
操作

- 1) 蛍光顕微鏡観察が可能なプレートあるいはディッシュに細胞を播種し、培養する。
- 2) 上清を除去した後、細胞を無血清培地で洗浄する。
- 3) 調製した SSP4 Working Solution を細胞に添加し、CO₂ インキュベーター (37°C) 内で 15 分間静置する。
- 4) 上清を除去した後、PBS で 2 回洗浄する。
- 5) PBS を添加し、蛍光顕微鏡で観察する。

実験例 1

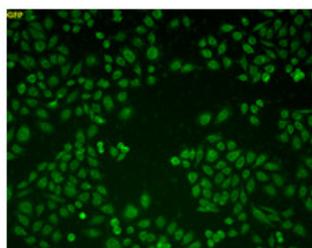
-サルフェン硫黄ドナーおよびサルフェン硫黄消去剤添加による細胞内サルフェン硫黄量変化の解析-

- 1) 96-well black clear bottom plate に CHO 細胞 を血清入り培地 (DMEM) 10^4 cells/well となるように播種し、CO₂ インキュベーター (37°C) 内で一晩培養した。
- 2) 上清を除去した後、無血清培地 (DMEM) で細胞を 2 回洗浄した。
- 3) 100 μmol/l サルフェン硫黄ドナー Na₂S₃ (Sodium trisulfide)、あるいは 1 mmol/l サルフェン硫黄消去剤 NaCN (Sodium cyanide) を含む無血清培地 (DMEM) 100 μl を各ウェルに添加し、CO₂ インキュベーター (37°C) 内で 15 分間静置した。
- 4) 上清を除去した後、無血清培地 (DMEM) で細胞を 2 回洗浄した。
- 5) 20 μmol/l SSP4 Working Solution 100 μl をウェルに添加し、CO₂ インキュベーター (37°C) 内で 15 分間静置した。
- 6) 上清を除去した後、PBS で細胞を 2 回洗浄した。
- 7) PBS 100 μl をウェルに添加した後、蛍光顕微鏡を用いて細胞を観察した。

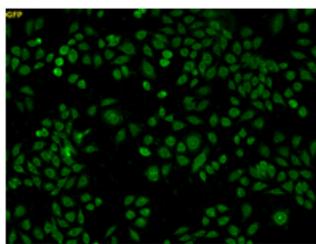


未処理

Na₂S₃ (サルフェン硫黄ドナー) で処理した細胞内に強い蛍光が観察された。



100 μmol/l Na₂S₃ 処理 (露光時間 1000 msec)



未処理

NaCN (サルフェン硫黄消去剤) で処理した細胞内には、未処理の細胞 (内因性のサルフェン硫黄) で観察された蛍光が観察されなかった。

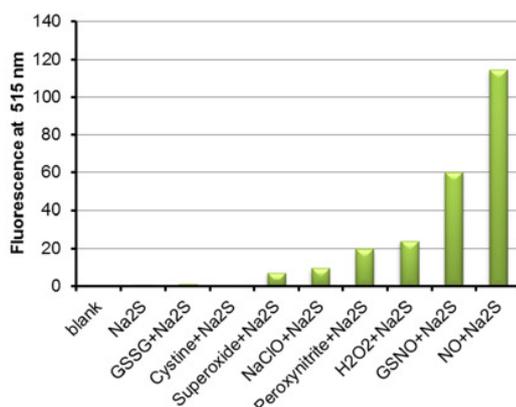


1 mmol/l NaCN 処理 (露光時間 2000 msec)

実験例 2

-硫化水素 (H₂S) と活性酸素 (窒素) 種との反応によるサルフェン硫黄含有物質の生成確認-

- 1) 100 μmol/l 活性酸素 (窒素) 種と 100 μmol/l Na₂S を含む溶液 (PBS) を室温で 10 分間静置した。
- 2) 操作 1) の溶液に、終濃度が 10 μmol/l となるように 10 mmol/l SSP4 Stock Solution を添加し、室温で 30 分間静置した。
- 3) 操作 2) の溶液の 515 nm 蛍光強度 (λ_{ex}=482 nm) を、蛍光分光高度計を用いて測定した。



硫化水素 (H₂S) と各活性酸素 (窒素) 種との反応によってサルフェン硫黄含有分子が生成されることが確認された。また、その中でも硫化水素 (H₂S) と一酸化窒素 (NO) の反応は非常に効率が高いことが示された。本試薬は、サルフェン硫黄含有分子の生成解析にも有用である。

参考文献

- 1) W. Chen, C. Liu, B. Peng, Y. Zhao, A. Pacheco and M. Xian, *Chem. Sci.*, **2013**, *4*, 2892.
- 2) T. Ida, T. Sawa, H. Ihara, Y. Tsuchiya, Y. Watanabe, Y. Kumagai, M. Suematsu, H. Motohashi, S. Fujii, T. Matsunaga, M. Yamamoto, K. Ono, N. O. Devarie-Baez, M. Xian, J. M. Fukuto, and T. Akaike, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **2014**, *111*, 7606.
- 3) E. Marutani, M. Sakaguchi, W. Chen, K. Sasakura, J. Liu, M. Xian, K. Hanaoka, T. Nagano, and F. Ichinose, *Med. Chem. Commun.*, **2014**, *5*, 1577.
- 4) M. Sakaguchi, E. Marutani, H-S. Shin, W. Chen, K. Hanaoka, M. Xian, and F. Ichinose, *Anesthesiology*. **2014**, *121*, 1248.

ご質問・ご要望は下記までお問い合わせください。

<開発元>

Dojindo Molecular Technologies, Inc.
30W Gude Dr, Suite 260, Rockville, Maryland, 20850 U.S.A.
Tel: +1-301-987-2667, Fax: +1-301-987-2687
URL: www.dojindo.com

<委託製造元>

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 〒 861-2202
Tel:096-286-1515 Fax:096-286-1525 URL:www.dojindo.co.jp/
ドージン・イースト (東京) Tel:03-3578-9651 Fax:03-3578-9650