

はじめに

近年、硫化水素 (H₂S) が血管拡張や細胞保護、インスリン分泌や神経伝達調節など様々な生理活性を示すことが明らかにされ、一酸化窒素 (NO) や一酸化炭素 (CO) に続く重要なシグナル分子として注目されています。硫化水素は、NO や CO と同様にガス状分子として認知されていますが、その pKa は約 7 であり生理的 pH では約 80% が硫化水素イオン (HS⁻) の状態で存在します。また、硫化水素イオンは、生体内で様々な結合形態や構造をとるため、その作用機序の詳細に関しては未だ不明であり、硫化水素を中心とした硫黄の生体内機能の解明が待ち望まれています。

-SulfoBiotics- HSip-1 は、硫化水素と反応し強い蛍光 (λ_{ex} 491 nm, λ_{em} 516 nm) を生じます。また、生体内に豊富に存在するグルタチオンやシステインとは反応しないため選択的な硫化水素の定量が可能です。-SulfoBiotics- HSip-1 DA は、細胞膜透過型であり、細胞イメージング用として細胞内硫化水素を蛍光モニターできます。

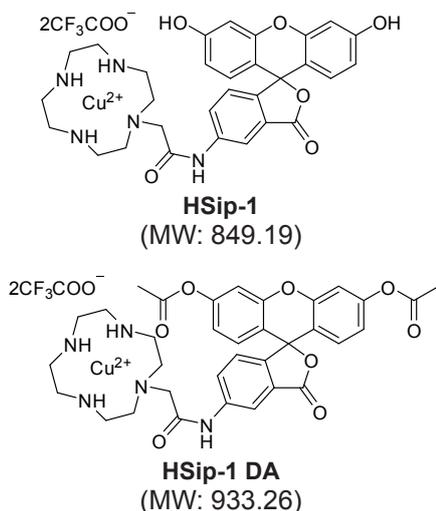
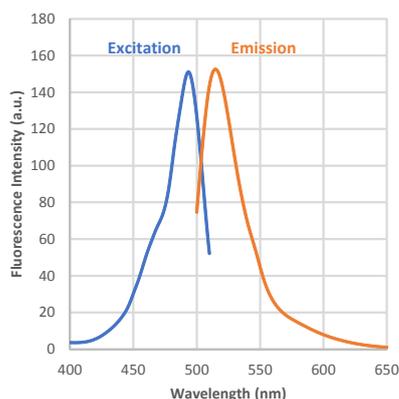


図 1 HSip-1 と HSip-1 DA の構造



λ_{ex} : 491 nm
 λ_{em} : 516 nm

<推奨フィルター>
 励起 : 470 ~ 500 nm
 蛍光 : 500 ~ 550 nm

図 2 硫化水素と反応後の HSip-1 の励起・蛍光スペクトル

内容 - HSip-1 1 mg x 1
 - HSip-1 DA 50 µg x 1

保存条件 - HSip-1 冷暗所にて保存してください。
 - HSip-1 DA 0-5°Cにて保存してください。

必要なもの - Dimethyl sulfoxide (DMSO)
 - 無血清培地
 - HBSS
 - PBS
 - マイクロピペット

溶液調製 **10 mmol/l HSip-1 stock solution の調製**
 HSip-1 1 mg を含むチューブに超純水 117 µl を添加し、ピペティングにより溶解する。
 ※溶解後は、-20 °C以下で保存してください。調製後は1ヶ月間安定です。

1 mmol/l HSip-1 DA stock solution の調製
 HSip-1 DA 50 µg を含むチューブに DMSO 53 µl を添加し、ピペティングにより溶解する。
 ※溶解後は、-20 °C以下で保存してください。調製後は1か月間安定です。

実験例 1 **HSip-1 を用いた硫化水素の検出**

- 1) 調製した 10 mmol/l HSip-1 stock solution を PBS で希釈し、200 µmol/l HSip-1 working solution を調製した。
- 2) 硫化ナトリウム (-SulfoBiotics- Sodium Sulfide (Na₂S)) を 7.8 mg 秤量し、超純水 (窒素バブリング処理済) 1 ml を添加して溶解し、100 mmol/l Na₂S 水溶液を調製した。
- 3) 100 mmol/l Na₂S 水溶液 20 µl に、超純水 980 µl を添加して 2 mmol/l Na₂S を調製した。
- 4) 3) で調製した溶液 100 µl に、超純水 900 µl を添加して 200 µmol/l Na₂S 溶液を調製した。
- 5) 4) で調製した溶液を順次 2 倍希釈し、Na₂S 標準液 (200, 100, 50, 25, 12.5, 6.3, 3.2, 0 µmol/l) を調製した。
- 6) 調製した Na₂S 標準液 300 µl に、200 µmol/l HSip-1 working solution 350 µl を添加し、ボルテックスにより混合した (全量 650 µl)。
- 7) 30 分間室温でインキュベートした後、96 穴マイクロプレートに各溶液を 200 µl ずつ添加した。
- 8) マイクロプレートリーダーで、516 nm の蛍光強度 (Ex: 491 nm) を測定した。

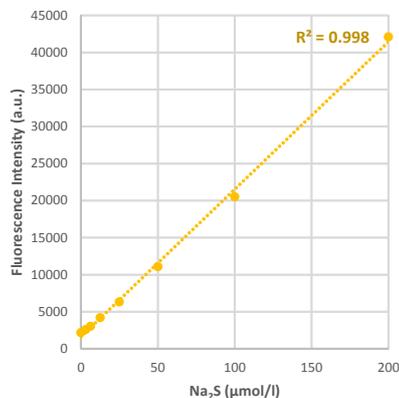


図3 硫化水素濃度に依存した 516 nm の蛍光強度変化

※ HeLa 細胞を用いた実験例を小社 HP にて紹介しております。小社 HP にアクセス後、SB21 で検索ください。

実験例 2 HSip-1 DA を用いた細胞内硫化水素蛍光イメージング

- 1) μ -slide 8 well (Ibidi) に HeLa 細胞を播種し 37°C、CO₂ インキュベーターにて一晩培養した。
- 2) 上清を除去した後、無血清培地 (MEM) で細胞を 2 回洗浄した。
- 3) 調製した 1 mmol/l HSip-1 DA stock solution を無血清培地 (MEM) で希釈し、5 μ mol/l HSip-1 DA working solution を調製した。
 ※細胞種により最適濃度が異なります。最適条件をご検討ください。
- 4) 5 μ mol/l HSip-1 DA working solution 200 μ l をウェルに添加し、CO₂ インキュベーター (37°C) 内で 30 分間静置した。
- 5) 上清を除去した後、HBSS で細胞を 2 回洗浄した。
- 6) 200 μ mol/l 硫化ナトリウム (-SulfoBiotics- Sodium Sulfide(Na₂S)) を含む HBSS 200 μ l を各ウェルに添加し、CO₂ インキュベーター (37°C) 内で 20 分間静置した。
- 7) 上清を除去した後、HBSS で細胞を 2 回洗浄した。
- 8) HBSS 200 μ l をウェルに添加した後、共焦点顕微鏡を用いて細胞を観察した。

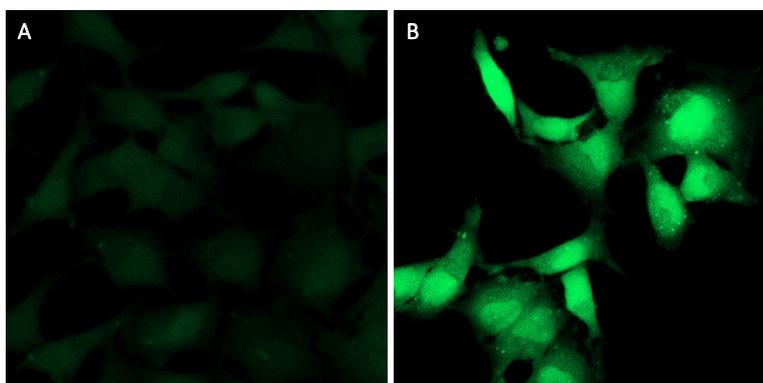


図 4 Na₂S 処理した HeLa 細胞の HSip-1 DA による硫化水素の検出 (A: 未処理、B: 200 μ mol/l Na₂S 処理)

本製品は、東京大学大学院 薬学系研究科 長野哲雄先生、花岡健二郎先生のご指導の下、製品化しました。

参考文献

- 1) K. Sasakura, K. Hanaoka, N. Shibuya, Y. Mikami, Y. Kimura, T. Komatsu, T. Ueno, T. Terai, H. Kimura, and T. Nagano, "Development of a Highly Selective Fluorescence Probe for Hydrogen Sulfide", *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, 133, 18003.

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

SB21: -SulfoBiotics- HSip-1
 SB22: -SulfoBiotics- HSip-1 DA