2020/09/02

正誤表

下記の通り、誤記がありましたので訂正いたします。
なお、31 版カタログ・プロトコルは廃止となっております。
最新の情報については小社ホームページにてご確認ください。

	正誤箇所	誤	正
別冊 プロトコル	14 ページ WI38 細胞を用いた生細胞蛍光イメージング (2)溶液調製 4)SPiDER-βGal working solution	SPiDER-βGal DMSO stock solution をHBSS で 1000 倍希釈する。	SPiDER-βGal DMSO stock solution と Bafilomycin A1 DMSO stock solution を培地または HBSS で 1000 倍希釈する。
別冊 プロトコル	75 ページ 使用製品 カルシウムプローブ	Fura 3 Fura 3-AM Fura 3-AM special packaging Fura 4-AM Fura 4-AM special packaging	Fluo 3 Fluo 3-AM Fluo 3-AM special packaging Fluo 4-AM Fluo 4-AM special packaging
本誌	371 ページ 性質	Carboxy-EG$_6$-undecanethiol と Hydroxy-EG$_3$-undecanethiol の 9:1 混合で作製した SAMs に	Carboxy-EG$_6$-undecanethiol と Hydroxy-EG$_3$-undecanethiol の 1:9 混合で作製した SAMs に
本誌	375 ページ 性質	Carboxy-EG$_6$-undecanethiol と Hydroxy-EG$_3$-undecanethiol の 9:1 混合で作製した SAMs に	Carboxy-EG$_6$-undecanethiol と Hydroxy-EG$_3$-undecanethiol の 1:9 混合で作製した SAMs に

以上

蛍光で細胞内 Ca を測定したい

使用製品

○スクリーニングキット：Wash タイプ

Calcium Kit - Fluo 3	[CS21]
Calcium Kit - Fluo 4	[CS22]
Calcium Kit - Fura 2	[CS23]

○スクリーニングキット：Non-Wash タイプ

Calcium Kit Ⅱ - Fluo 4	[CS32]
Calcium Kit Ⅱ - Fura 2	[CS33]
Calcium Kit Ⅱ - iCellux	[CS34]

解析装置

○カルシウムプローブ

Fura 2	[F014]
Fura 2-AM	[F015]
Fura 2-AM solution	[F016]
Fura 2-AM special packaging	[F025]
Fluo 3	[F019]
Fluo 3-AM	[F023]
Fluo 3-AM special packaging	[F026]
Fluo 4-AM	[F311]
Fluo 4-AM special packaging	[F312]
Rhod 2	[R001]
Rhod 2-AM	[R002]
Indo 1-AM solution	[I006]
Quin 2	[Q001]

I はじめに

カルシウムは細胞内で情報伝達物質として働く為、その挙動をリアルタイムに観察することは、研究者の長年の夢であった。1980 年、カリフォルニア大学の R. Y. Tsien らは、細胞内カルシウムの濃度測定法として Quin 2 を用いる方法を発表した [1]。その後も Tsien らは、Fura 2, Fluo 3, Indo 1, Rhod 2 など改良されたプローブを開発し [2,3]、これにより、カルシウム動態に関する研究は大きな発展を遂げた。

Tsien らの開発したプローブは次のような点で優れている。一つは、マグネシウムに対する選択性を向上するため BAPTA 構造を組み込んだことである。カルシウム選択性が高いのみならず、BAPTA は中性領域での pH 変動に対してカルシウム親和性が変化しにくいという特性も併せ持っている。これは同様に、カルシウム選択性が高いキレート試薬として知られている GEDTA のカルシウム親和性が、中性付近では変動するのとは対照的である (図 1)。もう一つ重要な点は、細胞膜透過性を付与するため、アセトキシメチル (AM) エステル体としたことである。AM エステル体は脂溶性が高いため、細胞膜を通過することができ、細胞内のエステラーゼで加水分解されると、細胞外に漏れだしにくい構造となる。このような特性が細胞内カルシウム濃度の測定に適した性能をもたらしている (図 2)。

カルシウムプローブを選択する際に重要な特性は、解離定数 (K_d) と励起・蛍光波長、及び、レシオメトリーが可能かどうかである。解離定数は、プローブとカルシウムの親和性を示す指標であり、測定したいカルシウム濃度域に近いものを選択する必要がある。適切でない K_d のプローブを用いると、小さなシグナル変化しか得られない (図 3)。

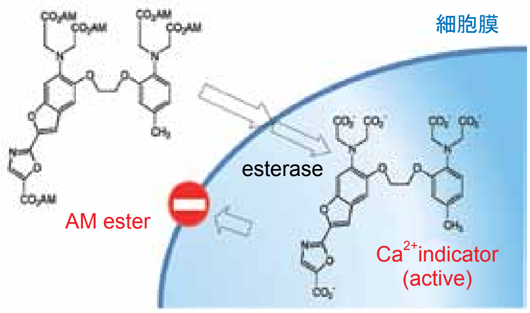

図 2 AM エステル体の細胞導入の模式図

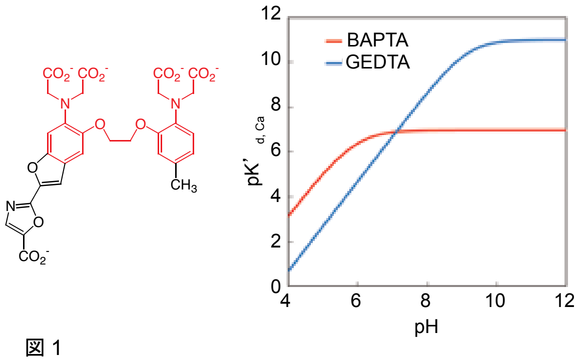

図 1
左 : Fura 2 の構造に含まれる BAPTA 部分 (赤)
右 : BAPTA と GEDTA のカルシウム親和性の pH 依存性

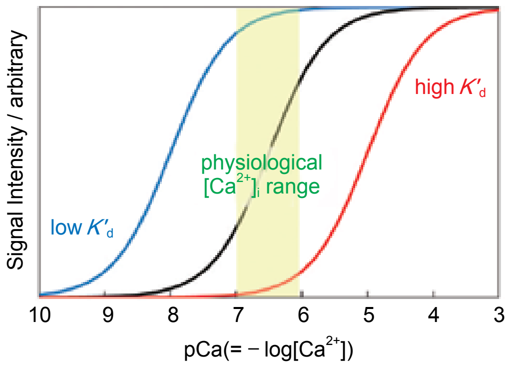

図 3 カルシウム濃度とシグナル強度の関係

表 1　カルシウム蛍光プローブの種類と蛍光特性

品名	励起波長	蛍光波長	Ca 錯体解離定数 (K_d)	文献
Quin 2	339 nm	492 nm	115 nmol/l	1)
Fura 2	340 nm/380 nm	510 nm	224 nmol/l	2)
Fluo 3	508 nm	527 nm	0.4 μmol/l	3)
Indo 1	330 nm	Ca free : 485 nm Ca bind : 410 nm	250 nmol/l	2)
Rhod 2	553 nm	576 nm	1.0 μmol/l	3)
Fluo 4	495 nm	518 nm	345 nmol/l	4)

励起・蛍光波長は、測定する実験系や機器に合わせて選択する必要がある。細胞へのダメージや自家蛍光が問題となる場合は、より長波長のものが望ましい。Ar レーザー (488 nm) を励起光源に用いる機器では Fluo 4 は Fluo 3 の 2 倍の蛍光強度変化が得られる [4]。これは、Fluo 4 の極大励起波長が Ar レーザーにより適しているためである (表 1)。Fura 2 や Indo 1 は、レシオメトリー可能なカルシウムプローブである。Fluo 3 や Rhod 2 などがカルシウム濃度変化によって、その蛍光強度が変化するのみであるのに対し、Fura 2 や Indo 1 は、励起スペクトルや蛍光スペクトルの形状が変化する (図 4)。増加する波長と減少する波長の蛍光強度の比は、色素濃度や光源の強度、細胞の大きさに依存しないため、正確なカルシウム濃度の測定が可能である。

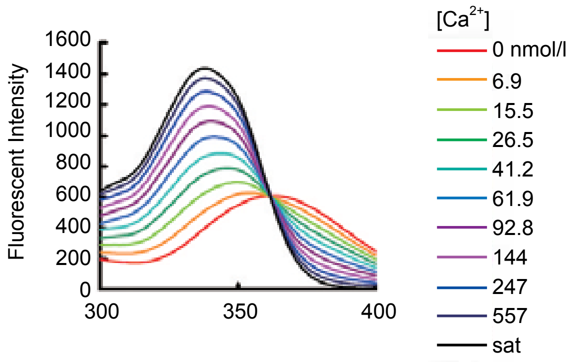

図 4 Fura 2 の励起スペクトル

カルシウムプローブの AM 体 (粉末) は、水溶性が低いため細胞に負荷する際には DMSO に溶かし、適当な緩衝液に分散させ、細胞に添加する。しかしながら、AM エステル体の DMSO 溶液は、緩衝液中で顆粒状となり細胞への取り込み効率は、極端に悪くなってしまう。この問題の解決策として、カルシウムプローブ溶解補助剤の Pluronic® F-127 や Cremophor® EL を少量添加する方法がある。補助剤の作用で AM 体顆粒が極めて小さくなり、細胞への取り込み効率が格段に上昇することが知られている。細胞内エステラーゼの働きで、AM エステル体が加水分解されたカルシウムプローブは、細胞内に留まり蓄積する。ただし、細胞の排出機構によって、その濃度は時間とともに減少していく。この際、陰イオントランスポーター阻害剤の Probenecid を添加することで、その漏出スピードを遅らせることが可能である。ただし、細胞機能への影響を考慮し、添加量は実験系に合わせて検討する必要がある。なお、小社ではこれら Pluronic® F-127、Cremophor® EL および Probenecid 各濃度を任意に設定できる Calcium Kit を販売している。このキットには、測定系に影響の少ない Wash タイプと洗浄操作が不要な Non-Wash タイプの 2 種類があり、目的に応じて選択いただきたい。

II カルシウム蛍光プローブの細胞への負荷方法

カルシウム蛍光プローブはアセトキシメチル基を持っているため、細胞と一定時間インキュベーションするだけで細胞内に導入することができる。ここでは Fura 2-AM を中心に記載するが、他の Fluo 3-AM、Fluo 4-AM、Rhod 2-AM 等も基本的には同様の操作で細胞に負荷できる。

＜測定例 1 ＞ CHO 細胞と Fura 2-AM を用いたカルシウムイオン測定

(1) 細胞
- CHO 細胞（チャイニーズハムスター細胞）

(2) 試薬とプレート
- Fura 2-AM (Code: F015)
- 培養液（DMEM）
- レコーディングメディウム (20 mmol/l HEPES, 115 mmol/l NaCl, 5.4 mmol/l KCl, 0.8 mmol/l $MgCl_2$, 1.8 mmol/l $CaCl_2$, 13.8 mmol/l glucose, pH7.4)
- 薬剤（ATP）
- 96 穴 オプティカルボトムプレート（Nunc）

(3) 方法

1) 細胞の準備
細胞を 1 ウェルあたり 40,000 cells になるようプレートに分注し、CO_2 インキュベーター下で一晩培養する。

2)Fura 2-AM DMSO 溶液の調製
1 mmol/l になるよう Fura 2-AM（分子量 1001.85）に DMSO を添加し、超音波やボルテックスを用いてよく溶解する。

3)Loading Buffer の調製
Fura 2-AM DMSO 溶液をレコーディングメディウムに 3.3 ～ 5 μmol/l になるよう加え、超音波を用いて溶解する。

4) 細胞の培養液を Loading Buffer へ置換して、37℃で 30 ～ 60 分間インキュベートする。

※細胞によっては、Fura 2-AM を取り込みにくいものもある。その場合は Cremophor® EL や Pluronic® F-127 などの界面活性剤を最終濃度 0.01 ～ 0.05% 程度添加すると取り込み易くなる。

5) インキュベーション後、新しいレコーディングメディウムと交換し、薬剤添加による蛍光強度変化を測定する (λ_{ex}=340 nm/380 nm, λ_{em}=510 nm)。

(4) 測定結果

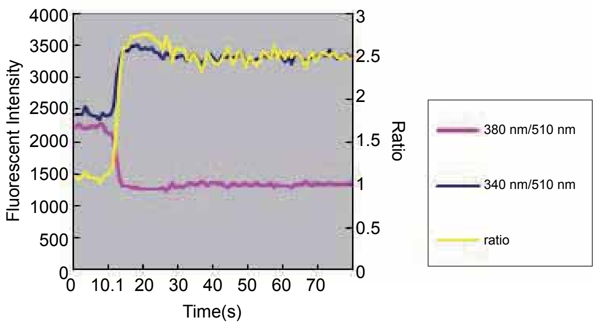

図 5　CHO 細胞へ ATP(1 μmol/l) による刺激を与えた場合のカルシウムイオン濃度変化

＜測定例 2 ＞ ラット心臓由来 H9c2 細胞と Fura 2-AM を用いたカルシウムイオン測定 [5]

(1) 細胞
- H9c2 細胞（ラット心臓由来）

(2) 試薬
- Fura 2-AM (Code: F015)
- DMSO (Code: LU08)
- 培養液（DMEM）
- Earle's balanced salt solution(EBSS) (26 mmol/l $NaHCO_3$,1 mmol/l NaH_2PO_4, 5.4 mmol/l KCl, 116 mmol/l NaCl, 5.5 mmol/l glucose, 2 mmol/l $CaCl_2$, pH 7.4)
- 薬剤（H_2O_2）
- Pluronic® F-127

(3) 方法

1)1 mmol/l になるよう Fura 2-AM（分子量 1001.85）に DMSO を添加し、超音波やボルテックスを用いてよく溶解する。

2)Fura 2-AM DMSO 溶液を EBSS に 5 μmol/l になるよう加え、0.01% Pluronic® F-127 を添加後、超音波溶解する。

3) 細胞の培養液を Loading Buffer へ置換して、37℃で 20 分間インキュベートする。

4) インキュベーション後、新しい EBSS で 4 回洗浄し、薬剤添加による蛍光強度変化を測定する (λ_{ex}=340 nm/380 nm, λ_{em}=510 nm)。

細胞 増殖/毒性
酸化 ストレス
分子 生物学
細胞内 蛍光プローブ
細胞 染色
ミトコンドリア 関連試薬
細菌研究用 試薬
膜タンパク質 可溶化剤
ラベル 化剤
二価性 試薬
イオン 電極
その他
機能性 有機材料

＜測定例 3＞
ヒト T リンパ球と Fluo 3 を用いたカルシウムイオン濃度測定 [6)]

(1) 細胞
・ヒト T リンパ球
(2) 試薬
・Fluo 3-AM(Code: F023)
・DMSO (Code: LU08)
・Pluronic® F-127
・ウシ胎児血清 (FCS)
・HBSS(Hanks' balanced salt solution)
・HEPES buffered saline(137 mmol/l NaCl, 5 mmol/l KCl,1 mmol/l Na_2HPO_4, 5 mmol/l glucose, 1 mmol/l $CaCl_2$,0.5 mmol/l $MgCl_2$, 1 g/l bovine serum albumin, 10 mmol/l HEPES, pH7.4)
(3) 方法
1) Fluo 3-AM を 2 mmol/l の濃度で DMSO に溶解する。Pluronic® F-127 を 37.5 mg/ml の濃度になるように加える。
2) 最終濃度 4 μmol/l の Fluo 3-AM を含む HBSS 中で、T リンパ球を 37℃で 20 分間インキュベートする。
3) 次に 1%の FCS を含む HBSS で 1/5 に希釈し、37℃で 40 分間インキュベートする。
4) その後、HEPES buffered saline で細胞を 3 回洗浄し、1×10^5 cells/ml になるように懸濁する。
5) 37℃の恒温槽で 10 分間インキュベートした後で、測定する (λ_{ex}=508 nm, λ_{em}=527 nm)。

＜測定例 4＞
Wash タイプの Calcium Kit-Fluo 4, Calcium Kit-Fura 2 を用いたカルシウムイオン濃度測定

・Calcium Kit － Fluo 4（Code: CS22）
・Calcium Kit － Fura 2（Code: CS23）

(1）キット内容 (Fluo 4, Fura 2 共通) [10 plates/kit]

・Fluo 4-AM (Fura 2-AM)	50 μg×10
・Dimethylsulfoxide	2 ml×1
・Recording Medium (2x)	100 ml×1
・5% Pluronic® F-127	2.5 ml×1
・5% Cremophor® EL	2.5 ml×1
・250 mmol/l Probenecid	1.3 ml×1

※ 細胞洗浄用の PBS はキットに組み込まれていないため、必要に応じて用意いただきたい。

(2) 測定方法
1) 細胞の培養
・付着細胞を使用する際は、96 穴プレートでは 15,000 ～ 40,000 cells/well、384 穴プレートでは 5,000 ～ 15,000 cells/well 程度の細胞を一晩培養して使用することが望ましい。
・培養に用いる培地の量は、96 穴プレートで 100 μl/well、384 穴プレートで 25 μl/well が望ましい。
2) Loading Buffer の調製 (マイクロプレート 1 枚分)
・添付の Dimethylsulfoxide(DMSO) から 50 μl を分取し、Fluo 4-AM (または Fura 2-AM) 1 本 (50 μg) に加え、よく溶解する。
・10 ml スケールの容器を準備する。Recording Medium (2x)5 ml に、測定条件に応じて任意の量※の 5% Pluronic®F-127 (または 5% Cremophor® EL)、250 mmol/l Probenecid を添加し、全量が 10 ml となるように純水を加え、よく混合する。(本キットは、予め測定に最適な pH7.4 付近となるように構成してある。)
・Fluo 4-AM (または Fura 2-AM) の DMSO 溶液 (50 μl) を添加して超音波などでよく溶解し、Loading Buffer とする。
※ Probenecid: 1.25 mmol/l、Pluronic® F-127(または Cremophor®EL): 0.04 % を推奨濃度としてあるが、濃度の変更は可能である。
Loading Buffer 10 ml を調製する場合、Probenecid、Pluronic® F-127(または Cremophor® EL) のアッセイ時の最終濃度と添加量の関係は表 2、表 3 のようになる。

表 2 250 mmol/l Probenecid 溶液の添加量と最終濃度

添加量 (μl)	20	30	40	50	60
最終濃度 (mmol/l)	0.50	0.75	1.00	1.25	1.50

表 3 5% Pluronic® F127(または 5% Cremophor® EL) 溶液の添加量と最終濃度

添加量 (μl)	20	40	60	80	100
最終濃度 (%)	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05

3) Recording Medium (1x) の調製 (マイクロプレート 1 枚分)
・別途、10 ml スケールの容器を準備する。Recording Medium (2x) 5 ml に、測定条件に応じて任意の量の 250 mmol/l Probenecid を添加し、全量が 10 ml となるように純水を加え、よく混合する。(本キットは、予め測定に最適な pH7.4 付近となるように構成してある。)
・37℃ インキュベーター中で加温しておく。
※ 1.25 mmol/l を Probenecid の推奨濃度としてあるが、濃度の変更は可能である。Recording Medium (1x) 10 ml を調製する場合、Probenecid のアッセイ時の最終濃度と添加量の関係は表 4 のようになる。

表 4 250 mmol/l Probenecid 溶液の添加量と最終濃度

添加量 (μl)	20	30	40	50	60
最終濃度 (mmol/l)	0.50	0.75	1.00	1.25	1.50

4) 細胞への Fluo 4-AM (または Fura 2-AM) のロード
・細胞を傷つけないように培地を取り除いた後、96 穴プレートで 100 μl/well、384 穴プレートで 25 μl/well の Loading Buffer をそれぞれのウェルに加える。
※必要に応じて、Loading Buffer を添加する前に 37 ℃ に加温した PBS で細胞を洗浄する。
・37 ℃ で 1 時間インキュベートする。
・細胞を傷つけないように Loading Buffer を取り除き、予め 37 ℃に加温しておいた Recording Medium (1x) を、96 穴プレートで 100 μl/well、384 穴プレートで 25 μl/well ずつ加える。
※必要に応じて、Recording Medium (1x) を添加する前に 37℃に加温した PBS で細胞を洗浄する。
・薬剤添加による蛍光強度変化を各種蛍光プレートリーダーで測定する。(Fluo 4: λ_{ex}=480 ～ 500 nm, λ_{em}=518 nm, Fura 2: λ_{ex}=340 nm/380 nm, λ_{em}=510 nm)

(3) 測定結果

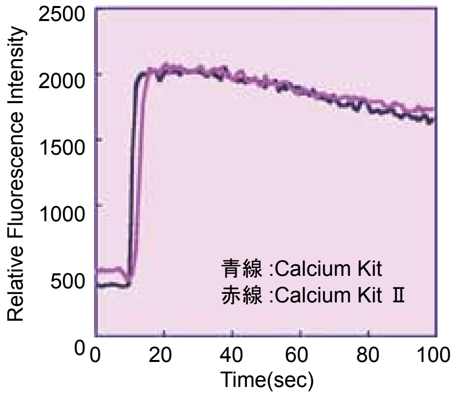

図 6 Fluo 4 type CHO 細胞を 25 μmol/l ATP で刺激

＜測定例 5＞
Non-Wash タイプの Calcium Kit Ⅱ－ Fluo 4、Calcium Kit Ⅱ –Fura 2 及び Calcium Kit Ⅱ -iCellux を用いたカルシウムイオン濃度測定

・Calcium Kit Ⅱ－ Fluo 4（Code: CS32）
・Calcium Kit Ⅱ－ Fura 2（Code: CS33）
・Calcium Kit Ⅱ－ iCellux（Code: CS34）

(1)Non-Wash タイプの特長

Non-Wash タイプのカルシウムキットは、溶液中のバックグラウンド蛍光を消光するクエンチャーを用いることで、カルシウムプローブを細胞へ負荷した後の洗浄操作を行うことなく、細胞内カルシウム濃度変化を測定できるよう設計されている※1)。洗浄操作が必要ない為、剥離しやすい細胞を使用する場合や、大量スクリーニング※2)を行う場合に適したキットである※3)。また、Calcium Kit Ⅱ－ iCellux は、薬剤低濃度領域のシグナル応答を向上したタイプの製品である。

※ 1) Non-Wash タイプでの測定には、クリアボトムの蛍光測定用マイクロプレートと下方励起、下方蛍光測定が可能なプレートリーダーが必要である。

※ 2) 大容量キットをご要望の場合は、小社マーケティング部まで、ご相談いただきたい。

※ 3) 薬剤とクエンチャーの相性により、稀に測定系に影響が出る場合があるのでご注意いただきたい。

(2) キット内容 (Fluo 4, Fura 2 共通) [10 plates/kit]

・Fluo 4-AM (Fura 2-AM)	50 μg × 10
・Dimethylsulfoxide	2 ml × 1
・Hanks' HEPES Buffer (10x)	6 ml × 1
・5 % Pluronic® F127	2.5 ml × 1
・5 % Cremophor® EL	2.5 ml × 1
・250 mmol/l Probenecid	1.3 ml × 1
・Quenching Buffer	55 ml × 1

キット内容（iCellux のみ）[10 plates/kit]

・Calcium Probe	× 10
・Dimethylsulfoxide	2 ml ×1
・250 mmol/l Probenecid	1.3 ml ×1
・Quenching Buffer	100 ml ×1

(3) 測定方法

1) 細胞の培養

クリアボトムの蛍光測定用マイクロプレートに下記に従って細胞を播種する。

・付着細胞を使用する際は、96 穴プレートでは 15,000 cells/well、384 穴プレートでは 5,000 cells/well 程度、浮遊細胞を使用する際は、96 穴プレートでは 100,000 cells/well、384 穴プレートでは 25,000 cells/well 程度の細胞を一晩培養して使用することが望ましい。

・培養に用いる培地の量は、96 穴プレートで 100 μl/well、384 穴プレートで 25 μl/well が望ましい。

2) Loading Buffer の調製 (マイクロプレート 1 枚分)

・添付の Dimethylsulfoxide(DMSO) を用い、各プローブを溶解する。
  Fluo 4-AM または Fura 2-AM：1 本 (50 μg) に 50 μl
  Calcium Probe：1 本 に 10 μl

・10 ml スケールの容器を準備する。

表 5 250 mmol/l Probenecid 溶液の添加量と最終濃度

添加量 (μl)	40	60	80	100	120
最終濃度 (mmol/l)	0.50	0.75	1.00	1.25	1.50

表 6 5% Pluronic® F-127(または 5% Cremophor® EL)
溶液の添加量と最終濃度

添加量 (μl)	40	80	120	160	200
最終濃度 (%)	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05

<Code: CS32, CS33>

・Quenching Buffer 5 ml に、Hanks' HEPES Buffer (10x) 500 μl、測定条件に応じて任意の量※の 5% Pluronic®F-127 （または 5% Cremophor® EL)、250 mmol/l Probenecid を添加し、全量が 10 ml となるように純水を加え、よく混合する。

・Fluo 4-AM (または Fura 2-AM) の DMSO 溶液 (50 μl) を添加して超音波などでよく溶解し、Loading Buffer とする。

<Code: CS34>

・添付の 250 mmol/l Probenecid を任意の量 * 添加し、全量が 10 ml となるように Quenching Buffer を加え、よく混合する。

・Calcium Probe の Dimethylsulfoxide 溶液 10 μl を添加してよく混和溶解し、Loading Buffer とする。

(各キットは、予め測定に最適な pH7.4 付近となるように構成してあるが、必要に応じて HCl や NaOH 溶液で pH を調整すること。)　※ Probenecid: 1.25 mmol/l、Pluronic® F-127 (または Cremophor® EL): 0.04% を推奨濃度としてあるが、濃度の変更は可能である。Loading Buffer 10 ml を調製する場合、Probenecid、Pluronic® F-127 (または Cremophor® EL) のアッセイ時の最終濃度と添加量の関係は表 5、表 6 のようになる。

3) 細胞への各カルシウムプローブ のロード

・細胞を培養したままの状態で、培地は取り除かない。直接、培地と等量 (96 穴プレートで 100 μl/well、384 穴プレートで 25 μl/well) の Loading Buffer をそれぞれのウェル に加える。

・37℃で 1 時間インキュベートする。

・そのまま薬剤添加による蛍光強度変化を各種蛍光プレートリーダーで測定する。(Fluo 4: λ_{ex}=480 ～ 500 nm, λ_{em} =518 nm, Fura 2: λ_{ex}=340 nm/380 nm, λ_{em}=510 nm, iCellux: λ_{ex}=480 ～ 500nm, λ_{em}=520nm 付近)

(4) 測定結果

Ⅲ 細胞内カルシウム測定装置

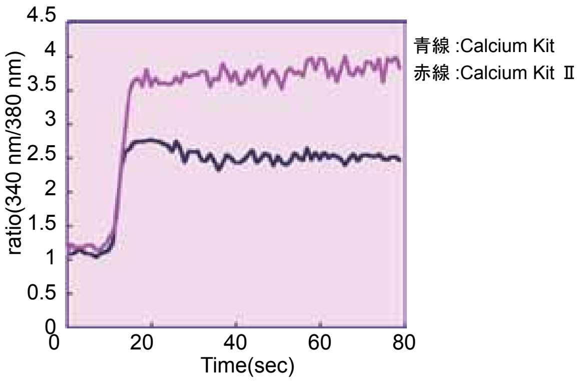

図 7　Fura 2 type
CHO 細胞を 1 μmol/l ATP で刺激した測定例 (Fura2 使用)

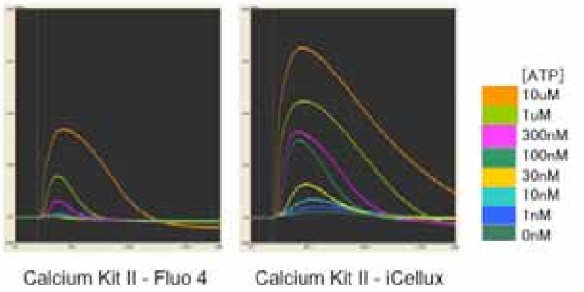

図 8　Calcium Kit II - iCellux 測定例
細胞：CHO-K1
プレート：NUNC 384 wells plate (Non-coating)
刺激薬剤：ATP,　Final: 1 nmol/l-10 μmol/l
Probenecid：final 1.25 mmol/l
（データ提供：浜松ホトニクス株式会社）

(1) 蛍光プレートリーダー

マルチ測定モードを揃え、上方蛍光・下方蛍光を選択できる機種も多数登場している。細胞内カルシウムの薬剤応答は添加後、瞬時に起こる場合が多いので、インジェクター機能を搭載した機種で測定することが望ましい。また、Non-Wash タイプの Calcium Kit Ⅱを使用する場合は、下方蛍光機能が必要となる。

(2) 蛍光顕微鏡

倒立型で落射蛍光を利用できる顕微鏡が多い。通常の光源は水銀ランプが装着されているが、Fura 2 のように二波長励起の際は、比較的エネルギーの均一なキセノンランプの方がよい。目的の波長を得るには、干渉フィルターを用いる方法と分光器を用いる方法がある。前者は必要な波長フィルターをそれぞれ用意する必要があり、二波長励起の際はフィルターを交互に切り替えるための装置が必要である。分光器を用いた装置は 250 ～ 850 nm まで任意の波長の励起光をダイアル操作で作りだすことができる。毎秒 100 ～ 1,000 回の光路切換えができ、高速の [Ca^{2+}] 変化が測定できる。

(3) 顕微鏡画像処理

[Ca^{2+}] の二次元分布を見ることができる。[Ca^{2+}] の計算は画素毎に二波長分の蛍光像から TV カメラの固定ノイズパターンの値とバックグラウンド蛍光の分を差し引き、蛍光強度比を計算し、検量線を用いて濃度に変換する。結果は疑似カラーで表示することができる。連続的に測定した画像を次々切り換えていくことにより、経時的な変化を追うことができる。

IV. カルシウム蛍光プローブを用いる際の注意点

1) 蛍光プローブの AM 体 (粉末) は水溶性が低いため、細胞に負荷する際には DMSO に溶かし、適当な緩衝液に分散させ細胞に添加されます。一般に水中での溶解性を向上させるために低毒性の界面活性剤 (Cremophor® EL、Pluronic® F-127 など) がよく用いられます。
2) アセトキシメチル (AM) 基は水分があると加水分解しやすいので、密封し乾燥剤とともに冷凍して保存する。一般に市販されている DMSO は水分を含んでいる場合があるので、乾燥した DMSO を用いられます。小社の Fura 2-AM、Fluo 3-AM、Fluo 4-AM それぞれの special packaging には溶解用の DMSO が添付してあります。
3) 調製した DMSO 溶液を一度に使用しない場合は、使用量分ずつ小分けして冷凍保存されます。凍結融解を繰り返すと吸湿の危険性が高く試薬の分解が促進される場合があります。
4) 細胞にカルシウム蛍光プローブを負荷する際の緩衝液には血清やアミン類が入っていないものを使用します。血清はエステラーゼ活性を有している場合があり、アミン類はアセトキシメチル基の加水分解を促進したり、アセトキシメチル基とアミド結合を形成することがあります。
5) カルシウム蛍光プローブのアセトキシメチルエステルは、細胞内のエステラーゼの働きで切断され、カルボキシル基が生ずることでカルシウム結合性かつ水溶性の蛍光プローブになり細胞内に蓄積します。しかし、多くの細胞には排出機構が備わっており、細胞内の蛍光プローブは時間とともに徐々に減少していくため、実験に際しては蛍光強度の減少度合を確認する必要があります。
6) カルシウム蛍光プローブは Ca^{2+} 以外の多くの重金属イオン (Zn^{2+}, Mn^{2+}, Cd^{2+}など) とも結合し蛍光が変化します。重金属の消光効果を防ぐために、マスキング剤として TPEN (Code: T040) をあらかじめ添加する方法があります。
7) 生細胞内にはピリジンヌクレオチド（NADH、NADPH）やフラビンヌクレオチド（FAD、FMN）等の自家蛍光物質が存在します。NADH は励起波長 340 nm で蛍光波長 470 nm であり、これは Fura 2 の蛍光特性とほぼ同じ波長域にある。また、細胞外の Mn^{2+}の影響を受け蛍光が変化します。これを避けるには、蛍光比をとるか、長波長側に蛍光を持つ Fluo 3, Fluo 4 などの色素を用いて下さい。

V. 細胞内カルシウム濃度の算出

表 7 Fura 2 と各金属イオンの K_d値(単位 mol)

	Mn^{2+}	Cd^{2+}	Pb^{2+}	La^{3+}
K_d(mol)	5.3×10^{-9}	1.0×10^{-7}	4.2×10^{-12}	1.0×10^{-12}

(1) 注意点

細胞内カルシウム濃度変化は、蛍光強度変化やレシオメトリーで議論することも多く、遊離のカルシウムイオン濃度は必要に応じて求められます。また、細胞内ではタンパク質濃度など細胞内環境の詳細を知ることは困難であり、正確な解離定数 K_d を求めることは極めて困難です。よって一般的には、ある種の Buffer 中で求めた解離定数 K_d から、擬似的に細胞内カルシウム濃度が算出されます。各プローブの K_d の文献値は表 1 を参照下さい。

(2) 方法

細胞内カルシウムイオン濃度をより正確に求めるためには、細胞外からの蛍光や、自家蛍光を除去することが必要である。具体的な方法としては、実験の最後にカルシウムイオノフォアと GEDTA(EGTA) を用いて、それぞれの波長で、Ca 非存在下と過剰存在下における蛍光強度を測定する。既知の解離定数 K_d を基に、以下の手法と式を用いることで細胞内カルシウム濃度を算出することができる。

ここでは、汎用されている Fura 2 と Fluo 3 を例に挙げ、細胞を用いた一般的な方法を示す。

○ F_{max} の求め方[5]

細胞内のカルシウムプローブを全て錯体として各波長の蛍光を測定する。

1) 細胞内に Fura 2（Fluo 3）を負荷した状態で、イオノマイシンなどのカルシウムイオノフォアを 4 μmol/l 加え、平衡化させた後、各波長の蛍光を測定する。→ F_{max}

○ F_{min} の求め方[5]

細胞内のカルシウムを全て取り去り、全プローブを Ca^{2+} free の状態にする。

2) 1) の操作に引き継き、最終濃度 10 mmol/l になるよう GEDTA を添加し、さらに終濃度 30 mmol/l になるように Tris を加え、pH8.3 にする。平衡化させた後、各波長の蛍光を測定する。→ F_{min}

○ F_{blank} (自家蛍光) の求め方

細胞の自家蛍光が測定に与える影響を考慮したい場合は、以下の方法で自家蛍光を測定し、すべての蛍光値から差し引くことで、細胞の持つ自家蛍光をキャンセルできる。

3) 過剰の Mn^{2+}を加える。加えた Mn^{2+}はカルシウムイオノフォアにより細胞内に入り込み、プローブと錯形成しプローブ由来の蛍光を消光する。各波長の蛍光を測定する。→ F_{blank}

○ Fura 2 の場合（二波長励起）

$$\mathbf{[Ca^{2+}]_i = K_d \times (R - R_{min})/(R_{max} - R) \times (F_{min}(380)/F_{max}(380))}$$

$[Ca^{2+}]_i$	: 細胞内 Ca^{2+} 濃度
K_d	: 解離定数 (224 nmol/l)[2]
R	: 二波長間の蛍光強度比 (F(340)/F(380))
R_{min}	: Ca^{2+} 非存在下の蛍光強度比（$F_{min}(340)/F_{min}(380)$）
R_{max}	: 過剰 Ca^{2+} 存在下の蛍光強度比 ($F_{max}(340)/F_{max}(380)$)

※ 細胞自体の自家蛍光を差し引く場合は、すべての蛍光値からその波長での F_{blank} を差し引く。

○ Fluo 3 の場合（一波長励起）

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \times (F - F_{min})/(F_{max} - F)$$

$[Ca^{2+}]_i$	: 細胞内 Ca^{2+} 濃度
K_d	: 解離定数 (0.4 μmol/l) [3]
F	: 蛍光強度 (527 nm の値)
F_{min}	: Ca^{2+} 非存在下の蛍光強度 (527 nm の値)
F_{max}	: 過剰 Ca^{2+} 存在下の蛍光強度 (527 nm の値)

※Fluo 3 の場合は、細胞の自家蛍光は式の性質上キャンセルされるため、測定する必要はない。

参考文献

1) R. Y. Tsien, *J. Biol. Chem.*, **1980**, *19*, 2396.
2) G. Grynkiewicz, M. Poenie, R. Y. Tsien, *J. Biol. Chem.*, **1985**, *260*, 3440.
3) A. Minta, J. P. Y. Kao, R.Y. Tsen, *J. Biol. Chem.*, **1989**, *264*, 8171.
4) K. R. Gee, K. A. Brown, W-N. U. Chen, J. Bishop-Stewart, D. Dray, I. Johnson, *Cell Calcium*, **2000**, *27*, 97.
5) Y. Ihara, Y. Urata, S. Goto, T. kondo, *Am. J. Physiol Cell Physiol*, **2006**, *290*, C208.
6) P. A. Vandenberghe, J. L. Ceuppens, *J. Immunological Methods*, **1990**, *127*, 197.