

細胞内塩化物イオンを測定したい

使用製品

MQAE [M024]

解析装置



I はじめに

細胞膜を介する塩化物イオンの輸送は、細胞の生理機能に関係し、生物学的に重要な研究課題である。従来、細胞内の塩化物イオン濃度の測定には同位体をトレーサーとする方法や、イオン選択性電極を用いる方法等^{1,2)}が知られているが、応答速度や使いやすさに問題があった。

これらの問題を解決するため、SPQ³⁻⁷⁾やMQAE⁶⁻⁹⁾のような蛍光試薬を用いる方法が開発され、さまざまな細胞中の塩化物イオン濃度の測定に利用されている。SPQやMQAEは塩化物イオン濃度の増加とともに蛍光強度が減少する。蛍光強度と塩化物イオン濃度との関係は Stern-Volmer 則に従い、次式により示される。

$$F_0/F = 1 + K_q[Cl^-]$$

F_0 : 試薬の蛍光強度
 F : Cl^- 存在下の蛍光強度
 K_q : 消光係数 (mol^{-1})

塩化物イオンによる SPQ や MQAE の蛍光強度の減少速度は 1 msec 以下であり、十分な応答速度である。また、塩化物イオンがない場合の蛍光強度は SPQ と MQAE はほぼ同じであるが、MQAE の消光係数は SPQ の約 1.5 倍である⁷⁾(図 1)。従って、塩化物イオンの濃度変化に対する感度は MQAE の方が優れている。SPQ や MQAE の蛍光強度は、塩化物イオンだけでなく Br^- , I^- や SCN^- イオンにより大きく減少する⁷⁾。また、クエン酸のような有機酸によってもやや減少するが、生体内のアニオン (NO_3^- , SO_4^{2-} , HCO_3^- や PO_4^{3-}) による影響はない⁷⁾(表 1)。

SPQ や MQAE は高い水溶性と膜透過性を持っているが、これらの蛍光試薬を細胞内に導入する際には、細胞の種類によって導入方法を工夫する必要がある。一般に、神経細胞の場合には、これらの蛍光試薬を含む緩衝液中で培養するだけで細胞内に蛍光試薬が導入できる。一方、腎細胞の場合には導入が難しく^{7,10,11)}、界面活性剤や低張液ショックを用いたり、マイクロインジェクションにより導入する必要がある¹²⁾。ここでは、ラット培養海馬神経細胞への導入及び細胞内塩化物イオン濃度の測定例について述べる⁸⁾。

表 1 MQAE の蛍光強度に対する陰イオンの影響

	励起波長 (nm)	蛍光波長 (nm)	消光係数 (M^{-1})				
			Cl^-	Br^-	I^-	SCN^-	citrate
MQAE	355	458	200	293	456	410	41

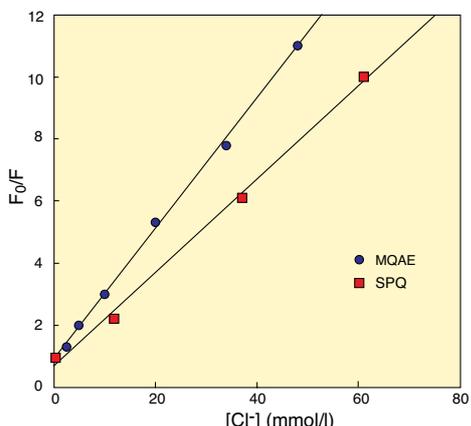
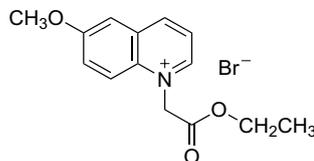


図 1 Stern-Volmer Plot



MQAE
M.W.: 326.19

II 試薬

● 分別用培地 -1

DME 基礎培地 (pH7.4 ± 0.05)	
10 mmol	TES(Code: GB18)
10 mmol	HEPES(Code: GB10)
2 mmol	L- グルタミン
100 µg/ml	ストレプトマイシン
100 IU/ml	ペニシリン G
10%	ウマ血清
10%	ウシ胎児血清

● 増殖用培地

DME 基礎培地 (pH7.4 ± 0.05)	
10 mmol	TES
10 mmol	HEPES
2 mmol	L- グルタミン
100 µg/ml	ストレプトマイシン
100 IU/ml	ペニシリン G
10%	ウマ血清

● 分別用培地 -2

DME 基礎培地 (pH7.4 ± 0.05)	
10 mmol	TES
10 mmol	HEPES
2 mmol	L- グルタミン
20 µmol	L-arabinoside
100 µg/ml	ストレプトマイシン
100 IU/ml	ペニシリン G
10%	ウマ血清

● 蛍光試薬導入用緩衝液

Krebs-HEPES 緩衝液 (pH7.3 ± 0.05)	
20 mmol	HEPES
128 mmol	NaCl
2.5 mmol	KCl
2.7 mmol	CaCl ₂
1 mmol	MgSO ₄
16 mmol	グルコース
5 mmol	MQAE (Code: M024)

● 検量線作成用緩衝液⁴⁾

Krebs-HEPES 緩衝液 (pH7.3 ± 0.05)	
20 mmol	HEPES
0 mmol	Na ⁺
135 mmol	K ⁺
1~135 mmol	Cl ⁻
135~1 mmol	NO ₃ ⁻
5 µmol	nigericin
10 µmol	valinomycin
10 µmol	トリブチルスズ

※塩化物イオン濃度と硝酸イオン濃度の和を 135 mmol/l とするように調製する。また、ナトリウム塩は用いない。

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

●洗浄・測定用緩衝液

Krebs-HEPES 緩衝液 (pH7.3±0.05)		
20 mmol	HEPES	
128 mmol	NaCl	
2.5 mmol	KCl	
2.7 mmol	CaCl ₂	
1 mmol	MgSO ₄	
16 mmol	グルコース	

III 方法

1. 細胞内塩化物イオン濃度の蛍光測定法

- 1) ラット海馬神経細胞の取得¹³⁾
Wistar ラットの 18 日齢の胚から Banker と Cowan の報文に記載の方法により取得する。
- 2) 細胞培養
ポリ-L-リジンをコートしたカバーガラス上に細胞を播種し、培養ディッシュのなかで分別用培地 -1 中で、4 日間培養する (37°C、5% 炭酸ガス)。
- 3) 細胞培養
増殖用培地中で 7~14 日間培養する。(37°C、5% 炭酸ガス)。培養開始 4 日目に分別用培地 -2 に変更し、24 時間培養する。(37°C、5% 炭酸ガス)。次に、増殖用培地中で培養を継続する。
- 4) 洗浄用緩衝液で 3 回洗浄する。
- 5) 蛍光試薬の細胞内への導入
蛍光試薬導入用緩衝液中で 37°C、1 時間培養する。
- 6) 洗浄用緩衝液で 5 回以上洗浄する。
- 7) 蛍光測定
32°C の測定用培地にて蛍光顕微鏡 (励起波長 360 nm、蛍光波長 510 nm) により蛍光測定を行う。
- 8) 蛍光測定 / 刺激物質
例：終濃度 0.3 mmol/l ethacrynic acid 添加。
32°C の測定用培地中にて蛍光顕微鏡 (励起波長 360 nm、蛍光波長 510 nm) により蛍光測定を行う。

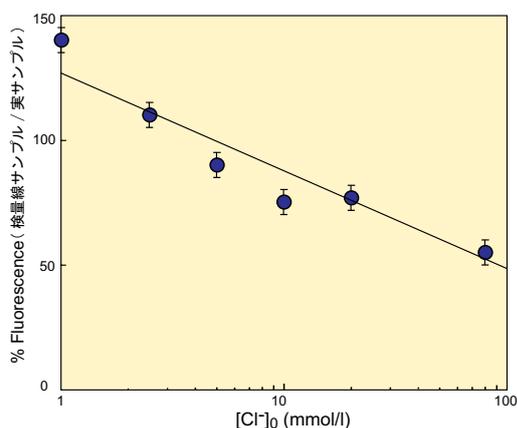


図 2 Cl⁻ 濃度による MQAE の蛍光強度の変化

2. 検量線の作成と細胞内の塩化物イオンの濃度の定量

- 1) の 1)~7) までと同様の処理を行う。
- 2) 蛍光測定
種々の塩化物イオンを含む検量線作成用培地を調製し、1. の 6) で洗浄した細胞に添加する。32°Cにて蛍光顕微鏡 (励起波長 360 nm、蛍光波長 510 nm) で蛍光測定を行う。
- 3) 検量線 (図 2)
1. の 7) の蛍光強度に対する種々の塩化物イオンを含む検量線作成用培地^{*}中の蛍光強度の比と塩化物イオン濃度をプロットする。この検量線から 32°Cにおける細胞内の塩化物イオン濃度を求める。
※検量線作成用緩衝液中の nigericin、valinomycin により細胞内へ強制的に Cl⁻ イオンを取り込ませる。

参考文献

- 1) K. Ishibashi, S. Sasaki and N. Yoshiyama, "Intracellular chloride activity of rabbit proximal straight tubule", *Am. J. Physiol.*, **1988**, 255(Renal Fluid Electrolyte Physiol. 24), F49.
- 2) B. A. Stanton, "Electroneutral NaCl transport by distal tubule : evidence for Na/HCl/HCO₃ exchange". *Am. J. Physiol.*, **1988**, 254(Renal Fluid Electrolyte Physiol. 23), F80.
- 3) N. P. Illsley and A. S. Verkman, "Membrane chloride transport measured using a chloride-sensitive fluorescent probe", *Biochemistry*, **1987**, 26, 1215.
- 4) R. Krapf, C. A. Berry and A. S. Verkman, "Estimation of intracellular chloride activity in isolated perfused rabbit proximal convoluted tubules using a fluorescent indicator", *Biophys. J.*, **1988**, 53, 955.
- 5) A. C. Engblom and K. E. O. Akerman, "Determination of chloride fluxes through membranes of living cells as measured with the fluorescent probe SPQ", *LAMBADA PROBES & DIAGNOSTICS, Appl. Fluorescence Technology*, **1990**, 11(3), 8.
- 6) A. S. Verkman, "Development and biological applications of chloridesensitive fluorescent indicators", *Am. J. Physiol.*, **1990**, 259, C375.
- 7) A. S. Verkman, M. C. Sellers, A. C. Chao, T. Leung and R. Ketcham, "Synthesis and characterization of improved chloride sensitive fluorescent indicators for biological applications", *Anal. Biochem.*, **1989**, 178, 355.
- 8) M. Inoue, M. Hara, X.-T. Zeng, T. Hirose, S. Ohnishi, T. Yasukura, T. Uriu, K. Omori, A. Minato and C. Inagaki, "An ATP-driven Cl⁻ pump regulates Cl⁻ concentrations in rat hippocampal neurons", *Neurosci. Lett.*, **1991**, 134, 75.
- 9) A. C. Engblom and K. E. O. Akerman, "Determination of the intracellular free chloride concentration in rat brain synaptoneurosomes using a chloride-sensitive fluorescent indicator", *Biochim. Biophys. Acta*, **1993**, 1153, 262.
- 10) A. C. Chao, J. A. Dix, M. Sellers and A. S. Verkman, "Fluorescence measurement of chloride transport in monolayer cultured cells: mechanisms of chloride transport in fibroblasts", *Biophys. J.*, **1989**, 56, 1071.
- 11) A. C. Chao, J. H. Widdicombe and A. S. Verkman, "Chloride transport mechanisms in cultured canine tracheal epithelial cells measured by an entrapped fluorescent indicator", *J. Membr. Biol.*, **1990**, 113, 193.
- 12) P. L. McNeil, "Incorporation of macromolecules into living cells". *Methods in Cell Biology*, edited by Y.-L. Wang and D. L. Taylor, San Diego CA : Academic, **1989**, 29, 153.
- 13) G. A. Banker and W. M. Cowan, "Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture", *Brain Res.*, **1977**, 126, 397.