

4 細胞内蛍光プローブ

蛍光および発光を利用して、細胞内の研究用に使用される試薬類を載せている。

細胞内カルシウムイオン測定用試薬はカルシウムイオンと結合することで蛍光特性が変化する試薬類である。細胞内部のカルシウムの分布、変化を調べることが出来る。

細胞内イオン測定用試薬はカルシウムイオン以外のイオンとの相互作用による蛍光特性の変化を持つ試薬類である。

関連試薬には、イオン以外の変化により特性が変わる蛍光プローブ、細胞内に変化を与える試薬類を分類した。

4-1 細胞内カルシウムイオン測定用試薬

Calcium Kit II - iCellux	81
Calcium Kit II - Fluo 4	82
Calcium Kit II - Fura 2	82
Calcium Kit - Fluo 4	83
Calcium Kit - Fura 2	83
Calcium Kit - Fluo 3	84
Fluo 4-AM	85
Fluo 4-AM special packaging	85
Fluo 3	86
Fluo 3-AM	87
Fluo 3-AM special packaging	87
Fura 2	88
Fura 2-AM	89
Fura 2-AM solution	89
Fura 2-AM special packaging	89
Indo 1-AM solution	90
Quin 2	91
Rhod 2	92
Rhod 2-AM	92
Coelenterazine-WS	93

4-2 ミトコンドリアの鉄イオンを検出したい

Mito-FerroGreen	94
BCECF	94
BCECF-AM	95
BCECF-AM special packaging	95
MQAE	96
Zinquin ethyl ester	97

4-3 関連試薬

BAPTA	98
BAPTA-AM solution	98
Caged ATP	99
DiBAC ₄ (3)	99
GEDTA(EGTA)	100
Ins(1,4,5)P ₃ (synthetic)	101
TPEN	101

表 各試薬の特性

色素名	検出	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	備 考
Fluo 3	蛍 光	508	527	Ca と錯体を形成し、蛍光を発する。
Fluo 4	//	495	518	Ca と錯体を形成し、蛍光を発する。
Fura 2	//	340/380	510	CaFree と Ca 錯体で異なる励起波長を持つ。
Indo 1	//	330	485(Ca Free) 410(Ca 錯体)	CaFree と Ca 錯体で異なる蛍光波長を持つ。
Quin 2	//	339	492	Ca と錯体を形成し、蛍光を発する。
Rhod 2	//	553	576	Ca と錯体を形成し、蛍光を発する。
Coelenterazine-WS	発 光			エコリンと Ca の存在下発光する。
Mito-FerroGreen	蛍 光	505	535	ミトコンドリア内鉄 (II) イオンと反応し蛍光を発する
BCECF	//	490	526	細胞内 pH 依存して蛍光強度が変化する。
MQAE	//	355	460	塩素イオン濃度に比例して蛍光が消光する。
Dansylaminoethyl-cyclen	//	323	528	亜鉛錯体を形成すると蛍光強度が強くなる。
Zinquin ethyl ester	//	368	490	亜鉛錯体を形成すると蛍光強度が強くなる。
BAPTA	—			細胞内カルシウムをマスキングする。
Caged ATP	—			347 nm の光で ATP を放出する。
DiBAC ₄ (3)	蛍 光	490	520	膜の電位差により蛍光強度が変化する。
GEDTA(EGTA)	—			細胞外のカルシウムをマスキングする。
Ins(1,4,5)P ₃ (synthetic)	—			細胞内の遊離 Ca の放出を促進する。
TPEN	—			細胞内の重金属をマスキングする。

Ca^{2+} の情報伝達物質としての働きは、筋収縮の研究から初めて明らかにされた。神経からの刺激が筋細胞に伝わると、筋小胞体から放出された Ca^{2+} がカルシウム受容タンパク質に取り込まれ、急激な構造変化を起こす。これがアクチンとミオシンの反応のきっかけとなって筋収縮がおこる。キレート剤を用いて Ca^{2+} を取り去ると筋肉は弛緩する。その他、代謝調節、生理活性物質の分泌現象などの細胞機能においても Ca^{2+} の重要性が認識され、その細胞内での挙動に着目した研究は大きな広がりを見せている。

Ca^{2+} の作用についての分子論的な理解のためには、細胞内での Ca^{2+} 濃度変化を測定する必要がある。1980 年に R. Y. Tsien らは細胞内カルシウムの濃度測定法として、蛍光プローブ Quin 2 を用いる方法を発表した。

BAPTA の分子構造に蛍光性発色団をうまく組み込み、 Mg^{2+} に対する 10^5 倍の選択性を可能とし、更に細胞膜の脂質二分子膜層を透過できる脂溶性のアセトキシメチルエステル体 (Quin 2-AM) を合成した点で彼らの創案は優れていた。

この方法は多くの研究者の関心を集めた。Quin 2 による Ca^{2+} 測定法が普及するに連れて、更に次のような改良が望まれた。

- 1) 励起波長が 339 nm と短波長のため、細胞自身の自己蛍光が無視できない。励起波長としては長波長側が望ましい。
- 2) Quin 2 錯体の蛍光量子収率は Dansyl 基と同程度と言うものの低い。細胞内への担持量を減らすため、蛍光強度の強いものが望ましい。

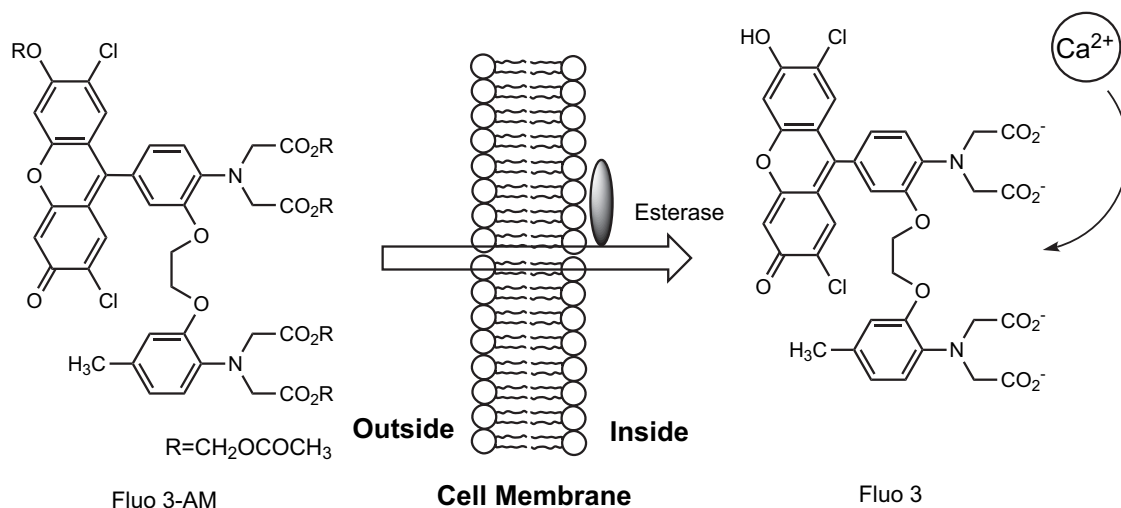
3) Quin 2 は Ca^{2+} と錯形成し蛍光強度の増大を示すが、励起・蛍光波長は変化しない。錯形成によって、波長変化があれば二波長蛍光測光ができる。

4) Quin 2 と Ca^{2+} の親和力は強く、 10^{-7} mol/l 以下のレベルには適するが $\mu\text{mol/l}$ レベルでは飽和傾向にある。やや親和力の低いものが望ましい。

5) Quin 2 と Mg^{2+} の解離定数は $1 \sim 2$ mmol/l で 399 nm の励起には少しの影響しかないが、重金属による消光作用等も考慮すると、より選択的なものが望ましい。

R. Y. Tsien らは、これらの要求を受けていくつかの蛍光プローブを合成した。その中から Quin 2 より蛍光強度が約 30 倍強く、 Ca^{2+} との錯形成により励起波長のシフトがあり、かつ Mg^{2+} 及び重金属に対する Ca^{2+} 選択性の大きな試薬として Fura 2 を見出した。さらに Indo 1, Fluo 3, Rhod 2 が開発された。その後、Fluo 3 のクロロ基 (Cl) をフルオロ基 (F) へと置き換えた Fluo 4 が開発され、アルゴンレーザー励起において蛍光強度が Fluo 3 の約 2 倍と高感度なものとなった。それぞれに細胞膜透過性の AM 体も用意されている。

下図に Fluo 3 のアセトキシメチルエステル体 Fluo 3-AM を用いたときの膜透過の模式図を示した。Fluo 3-AM は細胞内に取り込まれた後、細胞内のエステラーゼにより加水分解されて元の Fluo 3 になる。細胞内 Ca^{2+} は Fluo 3 とのキレーションにより蛍光性錯体となるので、蛍光強度変化として Ca^{2+} 濃度を測定できる ($\lambda_{\text{ex}}=508$ nm, $\lambda_{\text{em}}=530$ 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
細菌研究用
試薬
膜タン
パク質
ラベル
化剤
二価性
試薬
酸化
還元
イオン
電極
シンチ
レーター
生化学用
緩衝剤
キレート
比色/金属
試薬
水質
分析用
溶媒
抽出
高純度
溶媒
その他
機能性
有機材料

4-1 細胞内カルシウムイオン測定用試薬

Calcium Kit II - iCellux

同仁品コード：CS34
10 plates ￥59,800

Protocol: 「蛍光で細胞内の Ca を測定したい」

キット内容

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

取扱注意 1. 危険物第四類第三石油類 危等 III
2. 火気厳禁 3. 保存方法：冷凍、遮光

危険・有害性シンボルマーク (GHS 表示)
感嘆符



性質 Calcium Kit II - iCellux は、細胞内カルシウムイオン測定蛍光試薬と、その測定に必要な バッファー等を組み込んだキットである。薬剤低濃度領域のシグナル応答を大幅に向上し、96 穴、384 穴のマイクロプレートでの測定に最適化している。

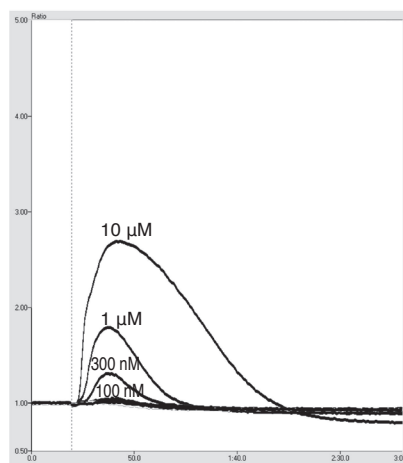
小社 Calcium Kit II シリーズと同様に、溶液中のバックグラウンド蛍光を消去するクエンチャー試薬を用いることで、カルシウムイオン測定蛍光試薬を細胞へ負荷した後の洗浄操作を行うことなく、細胞内カルシウム濃度変化を測定できる。洗浄操作が不要となるため、HEK293 細胞などの剥離しやすい細胞を使用する場合や、薬剤スクリーニングを行う場合に適している。また、細胞種や添加する薬剤などに応じて、製品に付属した Probenecid(陰イオントランスポーター阻害剤) 溶液を添加することが可能である。

ただし、細胞種や添加する薬剤によっては、「レスポンス

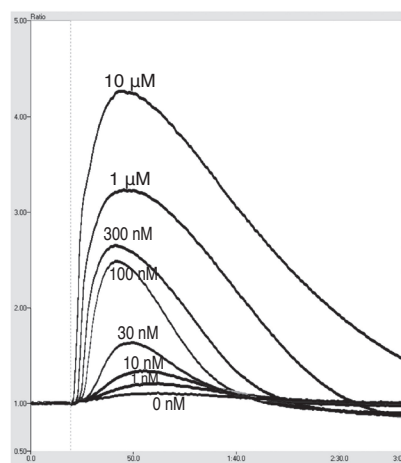
の高低」「リガンドとの相互作用」などが生じることがある。測定系に影響の少ない方法での測定を行いたい場合は、Wash タイプで姉妹品の「Calcium Kit - Fluo 4」をご使用いただきたい。本キットでは、96 穴プレート 10 枚分の測定が可能である。測定にはクリアボトムのプレートと下方励起・下方蛍光測定が可能なプレートリーダーを使用すること。

特長

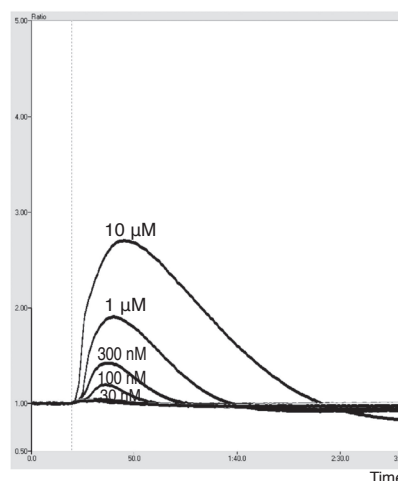
- 1) 薬剤低濃度領域のシグナル応答が向上 (小社 Calcium Kit II - Fluo 4 比較)
- 2) Ca^{2+} プローブを添加した後の洗浄操作は不要
- 3) Fluo 3 や Fluo 4 と同様の蛍光特性を有するプローブを使用
- 4) 96 穴、384 穴の両方のマイクロプレートに対応



Calcium Kit II - Fluo4



Calcium Kit II - iCellux



A社

測定装置：FDSS7000 EX

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

Calcium Probe インキュベーション時間：1 hour

(データ提供：浜松ホトニクス株式会社)

最新の情報は web へ 同仁化学 CS34 で検索

Calcium Kit II - Fluo 4

Protocol: 「蛍光で細胞内の Ca を測定したい」

同仁品コード: CS32
10 plates ¥50,500

キット内容

• Fluo 4-AM	50 µg × 10
• Dimethylsulfoxide	2 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
• Hanks' HEPES Buffer (10X)	6 ml × 1
• Quenching Buffer	55 ml × 1

Calcium Kit II - Fura 2

Protocol: 「蛍光で細胞内の Ca を測定したい」

同仁品コード: CS33
10 plates ¥40,200

キット内容

• Fura 2-AM	50 µg × 10
• Dimethylsulfoxide	2 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
• Hanks' HEPES Buffer (10X)	6 ml × 1
• Quenching Buffer	55 ml × 1

取扱注意 1. 危険物第四類第三石油類 危等III
2. 火気厳禁 3. 保存方法: 冷凍, 遮光

危険・有害性シンボルマーク (GHS 表示)
感嘆符



性質 Calcium Kit II - Fluo 4 および Fura 2 は、細胞内 Ca^{2+} 測定試薬である Fluo 4 および Fura 2-AM と、その測定に必要な Buffer 等を組み込んだキットである。

細胞種や添加する薬剤などに応じて、Pluronic F-127 または Cremophor EL (Ca プローブの溶解補助剤)、Probenecid (陰イオントランスポーターの阻害剤) の各濃度を任意に設定でき、細胞を培養したマイクロプレートに直接添加できる。

細胞外に存在する Ca プローブの蛍光を消去する試薬が組み込まれているので、従来のような細胞の洗浄操作が不要である。

短時間で多くのサンプルを処理することができ、High Throughput Screening (HTS) に適している。

ただし、細胞種や添加する薬剤によっては、「レスポンスの高低」「リガンドとの相互作用」などが生じることがある。測定系に影響の少ない方法で測定を行いたい場合は、

Wash タイプの「Calcium Kit - Fluo 4」「Calcium Kit - Fura 2」をご使用いただきたい。

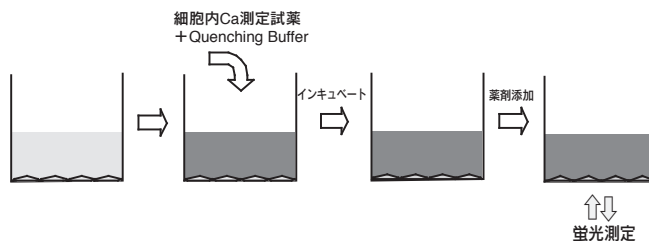
調製した Loading Buffer で 96 穴プレート 10 枚分の測定が可能である。測定にはクリアボトムプレートと下方励起・下方蛍光測定が可能なプレートリーダーを使用すること。

特長

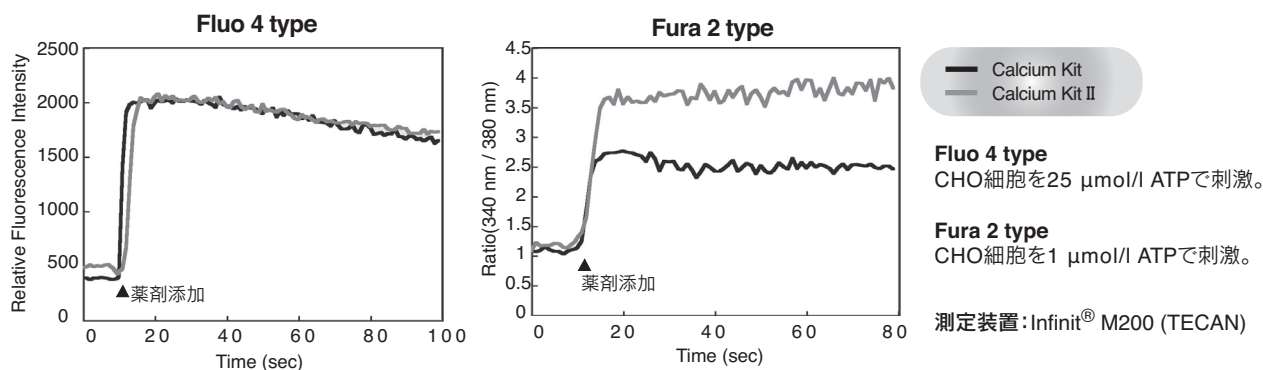
- 1) 細胞内 Ca^{2+} 測定に必要な試薬が全て揃ったフルキット
- 2) Ca プローブは 1 プレート毎に小分け済み [10 plates/kit]
- 3) プローブ溶解補助剤・漏れ出し防止剤の濃度は任意に設定可能
- 4) 洗浄操作を必要としない Non-Wash タイプ

* 使用方法はプロトコルをご覧ください。

Calcium Kit II



測定例



最新の情報は web へ 同仁化学 CS32/CS33 で検索

Calcium Kit - Fluo 4

同仁品コード：CS22
10 plates ￥41,200

Protocol: 「蛍光で細胞内の Ca を測定したい」

キット内容

• Fluo 4-AM 50 µg × 10
• Dimethylsulfoxide 2 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
• Recording Medium(2X) 100 ml × 1

Calcium Kit - Fura 2

同仁品コード：CS23
10 plates ￥31,200

Protocol: 「蛍光で細胞内の Ca を測定したい」

キット内容

• Fura 2-AM 50 µg × 10
• Dimethylsulfoxide 2 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
• Recording Medium(2X) 100 ml × 1

取扱注意 1. 危険物第四類第三石油類 危等Ⅲ
2. 火気厳禁 3. 保存方法：冷凍、遮光

危険・有害性シンボルマーク (GHS 表示)
感嘆符



性質 Calcium Kit - Fluo 4 および Fura 2 は、細胞内 Ca^{2+} 測定試薬である Fluo 4 および Fura 2-AM と、その測定に必要な Buffer 等を組み込んだスクリーニングキットである。

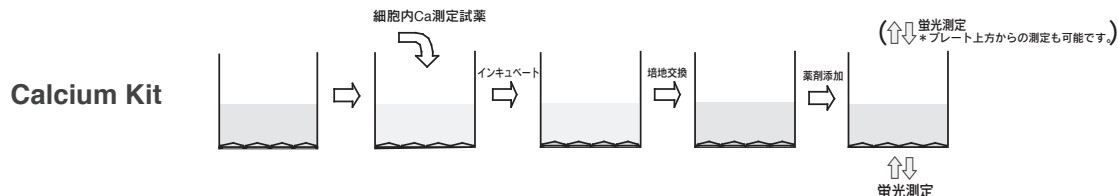
細胞種や添加する薬剤などに応じて、Pluronic F-127 または Cremophor EL (Ca プローブの溶解補助剤)、Probenecid (陰イオントランスポーターの阻害剤) の各濃度を任意に設定できる。

ハイスループットスクリーニングに用いられる各種蛍光プレートリーダーやインジェクターを備えた蛍光プレートリーダーにてリアルタイムで測定可能である。

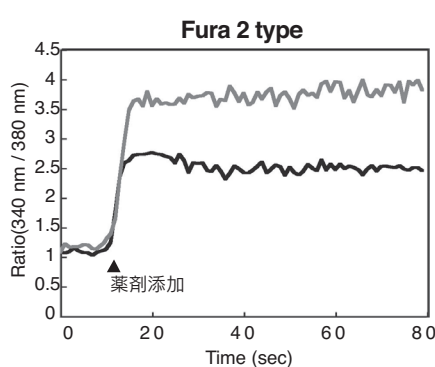
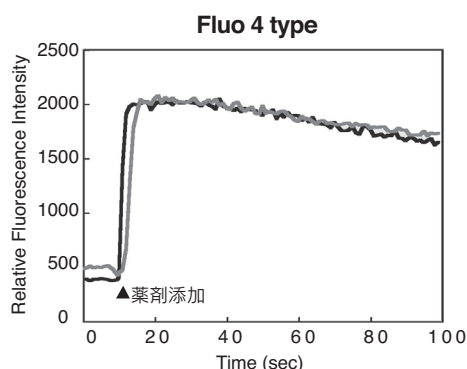
特長

- 1) 細胞内 Ca^{2+} 測定に必要な試薬が全て揃ったフルキット
- 2) Ca プローブは 1 プレート毎に小分け済み [10 plates/kit]
- 3) プローブ溶解補助剤・漏れ出し防止剤の濃度は任意に設定可能
- 4) 測定系に影響の少ない Wash タイプ

* 使用方法はプロトコルをご覧ください。



測定例



— Calcium Kit
— Calcium Kit II

Fluo 4 type

CHO細胞を25 µmol/l ATPで刺激。

Fura 2 type

CHO細胞を1 µmol/l ATPで刺激。

測定装置: Infit® M200 (TECAN)

最新の情報は web へ 同仁化学 CS22/CS23 で検索

Calcium Kit - Fluo 3

同仁品コード：CS21
2000 assays ¥71,100

Protocol: 「蛍光で細胞内の Ca を測定したい」

キット内容

• Fluo 3-AM	1 mg × 1	• 5% Cremophor EL	5 ml × 1
• Dimethylsulfoxide	2 ml × 1	• 250 mmol/l Probenecid	2.5 ml × 1
• 5% Pluronic F-127	5 ml × 1	• Recording Medium(2X)	100 ml × 2

取扱注意 1. 危険物第四類第三石油類 危等III
2. 火気厳禁 3. 保存方法：冷凍，遮光

危険・有害性シンボルマーク (GHS 表示)
感嘆符



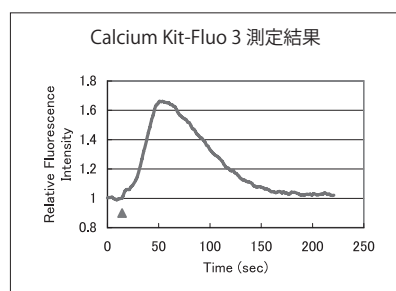
性質 Calcium Kit - Fluo 3 は、細胞内 Ca^{2+} 測定試薬である Fluo 3-AM と、その測定に必要な Buffer 等を組み込んだスクリーニングに最適なキットとなっている。細胞種や添加する薬剤などに応じて、Pluronic F-127 または Cremophor EL(Fluo 3-AM の溶解補助剤)、Probenecid(陰イオントランスポーターの阻害剤)の各濃度を任意に設定することが可能である。1 キットで 2,000 アッセイ(96 穴プレート 20 枚分)の測定が可能である。

特長

- 1) キットには Probenecid や界面活性剤を組み込んであり、任意に濃度設定が可能である。
- 2) ハイスループットスクリーニングに用いられる各種蛍光プレートリーダーで測定可能である。
- 3) 96 穴マイクロプレート、384 穴マイクロプレートの両方に対応している。

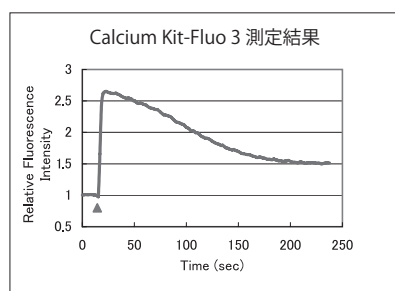
* 使用方法はプロトコルをご覧ください。

測定例



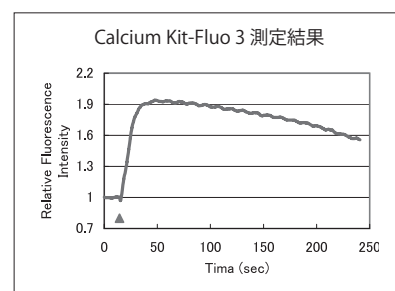
▲刺激物の添加

メラニン凝集ホルモン (MCH) 受容体を発現させた CHO 細胞 (チャイニーズハムスター卵巣細胞, 15,000 cells/well) を 10 nmol/l MCH で刺激した。



▲刺激物の添加

orexin B 受容体を発現させた CHO 細胞 (チャイニーズハムスター卵巣細胞, 15,000 cells/well) を 10 nmol/l orexin で刺激した。



▲刺激物の添加

SH-SY5Y 細胞 (ヒト神経芽腫細胞 15,000 cells/well) を 0.1 $\mu\text{mol/l}$ ionomycin で刺激した。

参考文献

- 1) A. Minta, J. P. Y. Kao and R. Y. Tsien, "Fluorescent Indicators for Cytosolic Calcium Based on Rhodamine and Fluorescein Chromophores", *J. Biol. Chem.*, 1989, 264, 8171.
- 2) J. P. Y. Kao, A. T. Harootunian and R. Y. Tsien, "Photochemically Generated Cytosolic Calcium Pulses and Their Detection by Fluo-3", *J. Biol. Chem.*, 1989, 264, 8179.
- 3) M. Eberhard and P. Erne, "Kinetics of Calcium Binding to Fluo-3 determined by Stopped-Flow Fluorescence", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1989, 163, 309.
- 4) S. R. Adams, J. P. Y. Kao and R. Y. Tsien, "Biologically Useful Chelators That Take Up Ca^{2+} Upon Illumination", *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, 111, 7957.
- 5) A. Saavedra-Molina, S. Uribe and T. M. Devlin, "Control of Mitochondrial Matrix Calcium: Studies Using Fluo-3 as a Fluorescent Calcium Indicator", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1990, 167, 148.
- 6) D. A. Williams, "Quantitative Intracellular Calcium Imaging with Laser-scanning Confocal Microscopy", *Cell Calcium*, 1990, 11, 589.
- 7) P. A. Vandenberghe and J. L. Ceuppens, "Flow Cytometric Measurement of Cytoplasmic Free Calcium in Human Peripheral Blood T Lymphocytes with Fluo-3, A New Fluorescent Calcium Indicator", *J. Immunol. Methods*, 1990, 127, 197.
- 8) J. Vergara, M. DiFranco, D. Compagnon and B. A. Suarez-Isla, "Imaging of Calcium Transients in Skeletal Muscle Fibers", *Biophys. J.*, 1991, 59, 12.
- 9) Y. Sei and P. K. Arora, "Quantitative Analysis of Calcium (Ca^{2+}) Mobilization after Stimulation with Mitogens or Anti-CD3 Antibodies Simultaneous Fluo-3 and Immunofluorescence Flow Cytometry", *J. Immunol. Methods*, 1991, 137, 237.

最新の情報は web へ 同仁化学 CS21 で検索

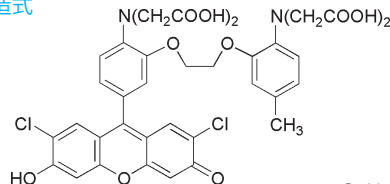
Fluo 3

1-[2-Amino-5-(2,7-dichloro-6-hydroxy-3-oxo-9-xanthenyl)phenoxy]-2-(2-amino-5-methylphenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid
〔CAS No. 123632-39-3〕

同仁品コード：F019
1 mg ￥27,700 345-05721

規格 (1) 性状：赤褐色～暗赤褐色粉末又は固体
(2) 純度 (HPLC)：70.0% 以上
(3) アルカリ溶状：試験適合
(4) 蛍光スペクトル：試験適合
溶解例 1 mg/50 μ l (0.1 mol/l - KOH)
取扱注意 1. 保存方法：冷凍, 遮光

構造式



$C_{36}H_{30}Cl_2N_2O_{13}=769.53$

性質 Fluo 3 の蛍光特性は励起波長 508 nm、蛍光波長 527 nm の可視光のため、蛍光顕微鏡やフローサイトメーターにとって使い易い。また励起光による細胞の損傷、細胞由来の蛍光バックグラウンドなども軽減できる。Fluo 3 は Ca^{2+} 結合による蛍光強度の増加が大きく、約 40 倍にも達する。 Ca^{2+} 親和力は Fura 2 よりも若干弱い ($K_d=0.4 \mu\text{mol/l}$)、Fura 2 よりも高いレベルの $\mu\text{mol/l}$ オーダーから低濃度に渡って、 Ca^{2+} 濃度を高感度にモニターできる。

なお、本製品は遊離酸であるため、試薬水溶液を調製する場合にはアルカリ性溶液に溶解する。細胞膜透過性のタイプとしては、Fluo 3-AM(Code: F023) や Fluo 3-AM special packaging(Code: F026) がある。

【注意】

本品は、通常、チューブ底面にフィルム状に付着した状態となっております。
稀に、輸送中の振動等により本品がチューブ底面から外れ、チューブ壁面やキャップ裏に付着している場合がございます。内容物を下に落としてから開封をしてご使用ください。

参考文献

最新の情報は web へ 同仁化学 F019 で検索

- 1) A. Minta, J. P. Y. Kao and R. Y. Tsien, "Fluorescent Indicators for Cytosolic Calcium Based on Rhodamine and Fluorescein Chromophores", *J. Biol. Chem.*, 1989, 264 (14), 8171.
- 2) J. P. Kao, A. T. Harootunian and R. Y. Tsien, "Photochemically Generated Cytosolic Calcium Pulses and Their Detection by Fluo-3", *J. Biol. Chem.*, 1989, 264, 8179.
- 3) M. Eberhard and P. Erne, "Kinetics of Calcium Binding to Fluo-3 by Stopped-Flow Fluorescence", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1989, 163, 309.
- 4) A. Hernandez-Cruz, F. Sala and P. R. Adams, "Subcellular Calcium Transients Visualized by Confocal Microscopy in a Voltage-clamped Vertebrate Neuron", *Science*, 1990, 247, 858.
- 5) A. H. Cornell-Bell, S. M. Finkbeiner, M. S. Cooper and S. J. Smith, "Glutamate Induces Calcium Waves in Cultured Astrocytes: Long-Range Glial Signaling", *Science*, 1990, 247, 470.
- 6) D. A. Williams, "Quantitative Intracellular Calcium Imaging with Laser-scanning Confocal Microscopy", *Cell Calcium*, 1990, 11, 589.
- 7) D. A. Williams, S. H. Cody, C. A. Gehring, R. W. Parish and P. J. Harris, "Confocal Imaging of Ionised Calcium in Living Plant Cells", *Cell Calcium*, 1990, 11, 291.
- 8) P. A. Vandenberghe and J. L. Ceuppens, "Flow Cytometric Measurement of Cytoplasmic Free Calcium in Human Peripheral Blood T Lymphocytes with Fluo-3, A New Fluorescent Calcium Indicator", *J. Immunol. Methods*, 1990, 127, 197.
- 9) 河内秀幸, 南川哲寛, 高松哲郎, "高速走査共焦点レーザー顕微鏡による心室筋対細胞間のカルシウム波伝播の解析", 心筋の構造と代謝, 1991, 13, 63.
- 10) M. Iino, H. Kasai and T. Yamazawa, "Visualization of Neural Control of Intracellular Ca^{2+} Concentration in Single Vascular Smooth Muscle Cells *in situ*", *EMBO J.*, 1994, 13 (21), 5026.
- 11) M. E. Dailey and S. J. Smith, "Spontaneous Ca^{2+} Transients in Developing Hippocampal Pyramidal Cells", *J. Neurobiol.*, 1994, 25(3), 243.
- 12) M. Burnier, G. Centeno, E. Burki and H. R. Brunner, "Confocal Microscopy to Analyze Cytosolic and Nuclear Calcium in Cultured Vascular Cells", *Am. J. Physiol.*, 1994, 266, C1118.
- 13) E. Donnadieu and L. Y. W. Bourguignon, " Ca^{2+} Signaling in Endothelial Cells Stimulated by Bradykinin: Ca^{2+} Measurement in the Mitochondria and the Cytosol by Confocal Microscopy", *Cell Calcium*, 1996, 20 (1), 53.
- 14) M. Ikeda, H. Ariyoshi, J. Kambayashi, K. Fujitani, N. Shinoki, M. Sakon, T. Kawasaki and M. Monden, "Separate Analysis of Nuclear and Cytosolic Ca^{2+} Concentrations in Human Umbilical Vein Endothelial Cells", *J. Cell. Biochem.*, 1996, 63 (1), 23.
- 15) J. E. Merritt, S. A. McCarthy, M. P. A. Davies and K. E. Moores, "Use of Fluo-3 to Measure Cytosolic Ca^{2+} in Platelets and Neutrophils Loading Cells with the Dye, Calibration of Traces, Measurements in the Presence of Plasma, and Buffering of Cytosolic Ca^{2+} ", *Biochem. J.*, 1990, 269, 513.

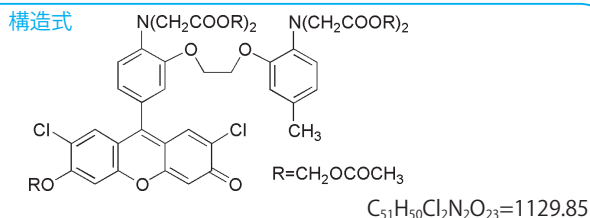
細胞
増殖/毒性
酸化
ストレス
分子
生物学
細胞内
蛍光プローブ
細胞
染色
細菌研究用
試薬
膜タン
パク質
ラベル
化剤
二価性
試薬
酸化
還元
イオン
電極
シンチ
レーター
生化学用
緩衝剤
キレート
比色/金属
試薬
水質
分析用
溶媒
抽出
高純度
溶媒
その他
機能的
有機材料

Fluo 3-AM

1-[2-Amino-5-(2,7-dichloro-6-acetoxymethoxy-3-oxo-9-xanthenyl)phenoxy]-2-(2-amino-5-methylphenoxy)ethane-*N,N,N,N*-tetraacetic acid, tetra(acetoxymethyl) ester
[CAS No. 121714-22-5]

同仁品コード：F023
1 mg ¥37,100

- 規格** (1) 性状：赤色粉末又は固体
(2) 純度 (HPLC)：85.0% 以上
(3) アセトニトリル溶状：試験適合
(4) 蛍光スペクトル：試験適合
(5) NMR スペクトル：試験適合
- 溶解例** 1 mg/0.5 ml (アセトニトリル)、
1 mg/ml (ジメチルスルホキシド)
- 取扱注意** 1. 保存方法：冷凍、遮光

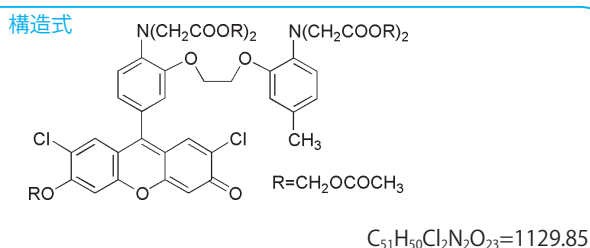


Fluo 3-AM special packaging

1-[2-Amino-5-(2,7-dichloro-6-acetoxymethoxy-3-oxo-9-xanthenyl)phenoxy]-2-(2-amino-5-methylphenoxy)ethane-*N,N,N,N*-tetraacetic acid, tetra(acetoxymethyl) ester
[CAS No. 121714-22-5]

同仁品コード：F026
50 µg × 8 ¥27,000 349-06961

- 規格** (1) 性状：赤色固体
(2) 純度 (HPLC)：85.0% 以上
(3) アセトニトリル溶状：試験適合
(4) 蛍光スペクトル：試験適合
(5) NMR スペクトル：試験適合
- 溶解例** 1 mg/0.5 ml (アセトニトリル)、
1 mg/ml (ジメチルスルホキシド)
- 取扱注意** 1. 危険物第四類第三石油類 危等 III
2. 火気厳禁 3. 保存方法：冷凍、遮光
- 危険・有害性シンボルマーク (GHS 表示)**
感嘆符



性質 Fluo 3-AM は Fluo 3 のカルボキシル基を脂溶性のアセトキシメチルエステル体にして細胞膜透過性としたものである。細胞懸濁液に混ぜるだけで容易に細胞内に取り込まれ、細胞内のエステラーゼにより加水分解されて Fluo 3 を再生し、細胞内 Ca^{2+} を蛍光モニターできる。
Fluo 3-AM special packaging には溶解用 DMSO (1 ml) が添付されている。

【注意】
本品は、通常、チューブ底面にフィルム状に付着した状態となっております。
稀に、輸送中の振動等により本品がチューブ底面から外れ、チューブ壁面やキャップ裏に付着している場合がございます。内容物を下に落としてから開封をしてご使用ください。

参考文献

- 1) A. Minta, J. P. Y. Kao and R. Y. Tsien, "Fluorescent Indicators for Cytosolic Calcium Based on Rhodamine and Fluorescein Chromophores", *J. Biol. Chem.*, 1989, 264 (14), 8171.
- 2) J. P. Kao, A. T. Harootyan and R. Y. Tsien, "Photochemically Generated Cytosolic Calcium Pulses and Their Detection by Fluo-3", *J. Biol. Chem.*, 1989, 264, 8179.
- 3) M. Eberhard and P. Erne, "Kinetics of Calcium Binding to Fluo-3 by Stopped-Flow Fluorescence", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1989, 163, 309.
- 4) A. Hernandez-Cruz, F. Sala and P. R. Adams, "Subcellular Calcium Transients Visualized by Confocal Microscopy in a Voltage-clamped Vertebrate Neuron", *Science*, 1990, 247, 858.
- 5) A. H. Cornell-Bell, S. M. Finkbeiner, M. S. Cooper and S. J. Smith, "Glutamate Induces Calcium Waves in Cultured Astrocytes: Long-Range Glial Signaling", *Science*, 1990, 247, 470.
- 6) D. A. Williams, "Quantitative Intracellular Calcium Imaging with Laser-scanning Confocal Microscopy", *Cell Calcium*, 1990, 11, 589.
- 7) D. A. Williams, S. H. Cody, C. A. Gehring, R. W. Parish and P. J. Harris, "Confocal Imaging of Ionised Calcium in Living Plant Cells", *Cell Calcium*, 1990, 11, 291.
- 8) P. A. Vandenberghe and J. L. Ceuppens, "Flow Cytometric Measurement of Cytoplasmic Free Calcium in Human Peripheral Blood T Lymphocytes with Fluo-3, A New Fluorescent Calcium Indicator", *J. Immunol. Methods*, 1990, 127, 197.
- 9) 河内秀幸, 南川哲寛, 高松哲郎, "高速走査共焦点レーザー顕微鏡による心室筋対細胞間のカルシウム波伝播の解析", 心筋の構造と代謝, 1991, 13, 63.
- 10) M. Iino, H. Kasai and T. Yamazawa, "Visualization of Neural Control of Intracellular Ca^{2+} Concentration in Single Vascular Smooth Muscle Cells *in situ*", *EMBO J.*, 1994, 13 (21), 5026.
- 11) M. E. Dailey and S. J. Smith, "Spontaneous Ca^{2+} Transients in Developing Hippocampal Pyramidal Cells", *J. Neurobiol.*, 1994, 25(3), 243.
- 12) M. Burnier, G. Centeno, E. Burki and H. R. Brunner, "Confocal Microscopy to Analyze Cytosolic and Nuclear Calcium in Cultured Vascular Cells", *Am. J. Physiol.*, 1994, 266, C1118.
- 13) E. Donnadieu and L. Y. W. Bourguignon, " Ca^{2+} Signaling in Endothelial Cells Stimulated by Bradykinin: Ca^{2+} Measurement in the Mitochondria and the Cytosol by Confocal Microscopy", *Cell Calcium*, 1996, 20 (1), 53.
- 14) M. Ikeda, H. Ariyoshi, K. Kambayashi, K. Fujitani, N. Shinoki, M. Sakon, T. Kawasaki and M. Monden, "Separate Analysis of Nuclear and Cytosolic Ca^{2+} Concentrations in Human Umbilical Vein Endothelial Cells", *J. Cell. Biochem.*, 1996, 63 (1), 23.
- 15) J. E. Merritt, S. A. McCarthy, M. P. A. Davies and K. E. Moores, "Use of Fluo-3 to Measure Cytosolic Ca^{2+} in Platelets and Neutrophils Loading Cells with the Dye, Calibration of Traces, Measurements in the Presence of Plasma, and Buffering of Cytosolic Ca^{2+} ", *Biochem. J.*, 1990, 269, 513.

最新の情報は [web](#) へ 同仁化学 F023/F026 [で検索](#)

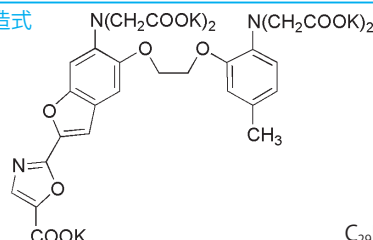
Fura 2

1-[6-Amino-2-(5-carboxy-2-oxazolyl)-5-benzofuranyloxy]-2-(2-amino-5-methylphenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid, pentapotassium salt
〔CAS No. 96314-98-6〕

同仁品コード：F014
1 mg ￥27,400 347-05421

規格 (1) 性状：黄色～橙黄色粉末又は固体
(2) 純度 (HPLC)：98.0% 以上
(3) 蛍光スペクトル：試験適合
(4) NMR スペクトル：試験適合
溶解例 1 mg/0.25 ml (水)

構造式


 $C_{29}H_{22}K_5N_3O_{14}=831.99$

性質 Fura 2 は R. Y. Tsien らにより開発され、Quin 2 よりもやや解離定数が大きく ($K_d=224$ nmol/l)、1 μ mol/l 付近までの Ca^{2+} 濃度を計測できる。また、吸収も大きく蛍光の量子収率も高いので 30 μ mol/l Quin 2 に相当する蛍光強度を僅か 1 μ mol/l の Fura 2 で達成できるため、細胞内に入る蛍光色素の量を Quin 2 の場合の 1/30 に減らすことができる。もう一つの大きな特長は Ca^{2+} 結合により励起波長のピークが顕著にブルーシフト (362 nm $\rightarrow$ 335 nm) することで、335 nm 付近で励起した場合には Ca^{2+} 濃度の上昇に伴い蛍光強度が増大するのに対し、370 ~ 380 nm 付近で励起した時は逆に蛍光強度が減少する。したがって、適当な二波長を選択して励起し、その時の蛍光強度の比をとるとそれが色素の濃度、光源の強度、細胞の大きさ等に関係なく Ca^{2+} 濃度と対応づけられる。

励起波長を自動的に切り替えて蛍光強度を測定し、演算処

理まで行う Ca^{2+} 測定の専用装置も市販されている。使用時の光退色などについての注意は文献 10) が参考になる。細胞膜透過性のタイプとしては、Fura 2-AM (Code : F015)、Fura 2-AM solution (Code : F016)、Fura 2-AM special packaging (Code : F025) がある。

【注意】

本品は、通常、チューブ底面にフィルム状に付着した状態となっております。
稀に、輸送中の振動等により本品がチューブ底面から外れ、チューブ壁面やキャップ裏に付着している場合がございます。
内容物を下に落としてから開封をしてご使用ください。

参考文献

最新の情報は [web](#) へ [同仁化学 F014](#) で検索

- 1) G. Grynkiewicz, M. Poenie and R. Y. Tsien, "A New Generation of Ca^{2+} Indicators with Greatly Improved Fluorescence Properties", *J. Biol. Chem.*, 1985, 260, 3440.
- 2) D. A. Williams, K. E. Fogarty, R. Y. Tsien and F. S. Fay, "Calcium Gradients in Single Smooth Muscle Cells Revealed by the Digital Imaging Microscope Using Fura-2", *Nature*, 1985, 318, 558.
- 3) R. Y. Tsien, T. J. Rink and M. Poenie, "Measurement of Cytosolic Free Ca^{2+} in Individual Small Cells Using Fluorescence Microscopy with Dual Excitation Wavelengths", *Cell Calcium*, 1985, 6, 145.
- 4) D. A. Williams and F. S. Fay, "Intracellular Calibration of the Fluorescent Calcium Indicator Fura-2", *Cell Calcium*, 1990, 11, 75.
- 5) W. Almers and E. Neher, "The Ca Signal from Fura-2 Loaded Mast Cells Depends Strongly on the Method of Dye-loading", *FEBS Lett.*, 1985, 192, 13.
- 6) G. H. R. Rao, J. D. Peller and J. G. White, "Measurement of Ionized Calcium in Blood Platelets with a New Generation Calcium Indicator", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1985, 132, 652.
- 7) H. Ozaki, K. Sato, T. Satoh and H. Karaki, "Simultaneous Recordings of Calcium Signals and Mechanical Activity Using Fluorescent Dye Fura 2 in Isolated Strips of Vascular Smooth Muscle", *Jpn. J. Pharmacol.*, 1987, 45, 429.
- 8) M. Mitsui, A. Abe, M. Tajimi and H. Karaki, "Leakage of the Fluorescent Ca^{2+} Indicator Fura-2 in Smooth Muscle", *Jpn. J. Pharmacol.*, 1993, 61, 165.
- 9) 宮川厚夫, 牧野徹, 玉川彰, 尾崎一穂, "ビデオ画像処理を用いた蛍光性カルシウム指示薬 Fura-2 による細胞内遊離カルシウムイオン濃度分布の測定", *分析化学*, 1989, 38, 643.
- 10) P. L. Becker, and F. S. Fay, "Photobleaching of fura-2 and its effect on determination of calcium concentrations", *American Journal of Physiology*, 1987, 253, 613.

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
細菌研究用試薬
膜タンパク質
ラベル化剤
二価性試薬
酸化還元
イオン電極
シンチレーター
生化学用緩衝剤
キレート
比色/金属試薬
水質分析用溶媒抽出
高純度溶媒
その他
機能性有機材料

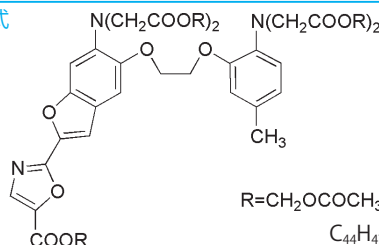
Fura 2-AM

1-[6-Amino-2-(5-carboxy-2-oxazolyl)-5-benzofuranyloxy]-2-(2-amino-5-methylphenoxy)
ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid, pentaacetoxymethyl ester
[CAS No. 108964-32-5]

同仁品コード：F015
1 mg ￥31,800

- 規格** (1) 性状：黄色～橙黄色結晶性粉末または固体
(2) 純度 (HPLC)：98.0% 以上
(3) 蛍光スペクトル：試験適合
(4) NMR スペクトル：試験適合
- 取扱注意** 1. 保存方法：冷凍，遮光

構造式



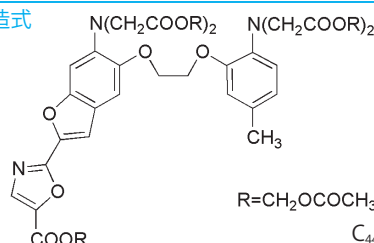
Fura 2-AM solution

1-[6-Amino-2-(5-carboxy-2-oxazolyl)-5-benzofuranyloxy]-2-(2-amino-5-methylphenoxy)
ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid, pentaacetoxymethyl ester, DMSO solution
[CAS No. 108964-32-5(Fura 2-AM)]

同仁品コード：F016
1 ml ￥43,700 343-05401

- 規格** (1) 性状：黄色液体
(2) 純度 (HPLC)：98.0% 以上
(3) 蛍光スペクトル：試験適合
- 取扱注意** 1. 危険物第四類第三石油類 危等Ⅲ
2. 火気厳禁 3. 保存方法：冷凍，遮光

構造式



危険・有害性シンボルマーク (GHS 表示)
感嘆符



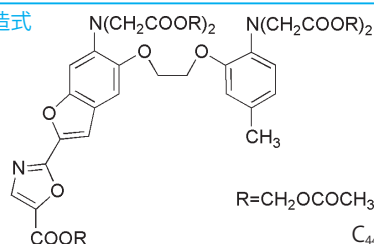
Fura 2-AM special packaging

1-[6-Amino-2-(5-carboxy-2-oxazolyl)-5-benzofuranyloxy]-2-(2-amino-5-methyl-
phenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid, pentaacetoxymethyl ester
[CAS No. 108964-32-5]

同仁品コード：F025
50 μg × 8 ￥20,600 348-05831

- 規格** (1) 性状：黄色～橙黄色固体
(2) 純度 (HPLC)：98.0% 以上
(3) 蛍光スペクトル：試験適合
(4) NMR スペクトル：試験適合
- 取扱注意** 1. 危険物第四類第三石油類 危等Ⅲ
2. 火気厳禁 3. 保存方法：冷凍，遮光

構造式



危険・有害性シンボルマーク (GHS 表示)
感嘆符



性質 Fura 2-AM は、Fura 2 のカルボキシシル基をアセトキシメチルエステル体として膜透過性を高めたものである。これを細胞懸濁液に混ぜるだけで容易に細胞内に取り込まれ、細胞内エステラーゼにより分解されて Ca²⁺ 結合能を持つ Fura 2 となる。試薬溶液の調製の際、微量を秤量することは手間がかかり、吸湿などで劣化する原因にもなりかねない。そこで、1 mmol/l Fura 2-AM(DMSO) 溶液 (Code:F016) や、使い易いように少量分包した Fura 2-AM(special packaging)(Code：F025) としている。special packaging には、溶解用 DMSO が 1 ml 添付されている。

【注意】

本品は、通常、チューブ底面にフィルム状に付着した状態となっております。
稀に、輸送中の振動等により本品がチューブ底面から外れ、チューブ壁面やキャップ裏に付着している場合がございます。内容物を下に落としてから開封をしてご使用ください。

参考文献

- 1) G. Grynkiewicz, M. Poenie and R. Y. Tsien, "A New Generation of Ca²⁺ Indicators with Greatly Improved Fluorescence Properties", *J. Biol. Chem.*, 1985, 260, 3440.
- 2) D. A. Williams, K. E. Fogarty, R. Y. Tsien and F. S. Fay, "Calcium Gradients in Single Smooth Muscle Cells Revealed by the Digital Imaging Microscope Using Fura-2", *Nature*, 1985, 318, 558.
- 3) R. Y. Tsien, T. J. Rink and M. Poenie, "Measurement of Cytosolic Free Ca²⁺ in Individual Small Cells Using Fluorescence Microscopy with Dual Excitation Wavelengths", *Cell Calcium*, 1985, 6, 145.

最新の情報は web へ 同仁化学 F015/F016/F025 で検索

Indo 1-AM solution

1-[2-Amino-5-(6-carboxy-2-indolyl)phenoxy]-2-(2-amino-5-methylphenoxy)ethane-
N,N,N',N'-tetraacetic acid, pentaacetoxymethyl ester, DMSO solution
 [CAS No. 112926-02-0(Indo 1-AM)]

同仁品コード：I006
 1 ml ￥40,400 348-05571

規格

- (1) 性状：微黄青蛍光色液体
 (2) 純度 (HPLC)：97.0% 以上
 (3) 蛍光スペクトル：試験適合

取扱注意

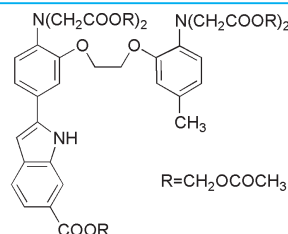
1. 危険物第四類第三石油類 危等III
 2. 火気厳禁 3. 保存方法：冷凍、遮光

危険・有害性シンボルマーク (GHS 表示)

感嘆符



構造式


 $C_{47}H_{51}N_3O_{22}=1009.91$

性質 1 mmol/l Indo 1-AM DMSO 溶液。

Indo 1-AM は、Fura 2-AM、Quin 2-AM と同様に膜透過性の化合物で細胞内に入り、エステラーゼにより加水分解され、 Ca^{2+} 結合能を持つ Indo 1 となる。Fura 2 と同程度の吸収及び蛍光量子収率を持っている。Fura 2 の Ca^{2+} Free

と Ca^{2+} 錯体の励起波長は別々であるが蛍光波長は 500 nm 前後で重なる。それに比べて Indo 1 の Ca^{2+} Free と Ca^{2+} 錯体の励起波長は 330 nm 前後と同じであるが、蛍光波長はそれぞれ 485 nm と 410 nm と異なる特長を持っている。

参考文献

最新の情報は web へ 同仁化学 I006 で検索

- 1) R. Y. Tsien, "New Calcium Indicators and Buffers with High Selectivity against Magnesium and Protons: Design, Synthesis, and Properties of Prototype Structures", *Biochemistry*, 1980, 19, 2396.
- 2) G. Grynkiewicz, M. Poenie and R. Y. Tsien, "A New Generation of Ca^{2+} Indicators with Greatly Improved Fluorescence Properties", *J. Biol. Chem.*, 1985, 260(6), 3440.
- 3) A. Luckhoff, "Measuring Cytosolic Free Calcium Concentration in Endothelial Cells with Indo-1: the Pitfall of Using the Ratio of Two Fluorescence Intensities Recorded at Different Wavelengths", *Cell. Calcium*, 1986, 7, 233.
- 4) K. G. Lazzari, P. J. Proto and E. R. Simons, "Simultaneous Measurement of Stimulus-induced Changes in Cytoplasmic Ca^{2+} and in Membrane Potential of Human Neutrophils", *J. Biol. Chem.*, 1986, 261, 9710.
- 5) M. K. Bijsterbosch, K. P. Rigley and G. G. B. Klaus, "Cross-linking of Surface Immunoglobulin on B Lymphocytes Induces Both Intracellular Ca^{2+} Release and Ca^{2+} Influx: Analysis with Indo-1", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1986, 137, 500.
- 6) P. S. Rabinovitch, C. H. June, A. Grossmann and J. A. Ledbetter, "Heterogeneity Among T Cells in Intracellular Free Calcium Responses After Mitogen Stimulation with Pha or Anti-CD3. Simultaneous Use of Indo-1 and Immunofluorescence with Flow Cytometry", *J. Immunol.*, 1986, 137, 952.
- 7) T. Sugiyama, M. Yoshizumi, F. Takaku, H. Urabe, M. Tsukakoshi, T. Kasuya and Y. Yazaki, "The Elevation of the Cytoplasmic Calcium Ions in Vascular Smooth Muscle Cells in SHR Measurement of the Free Calcium Ions in Single Living Cells by Lasermicrofluorometry", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1986, 141, 340.
- 8) A. P. Jackson, M. P. Timmerman, C. R. Bagshaw and C. C. Ashley, "The Kinetics of Calcium Binding to Fura-2 and Indo-1", *FEBS Lett.*, 1987, 216, 35.
- 9) D. S. Bush, A. K. Biswas and R. L. Jones, "Measurement of Cytoplasmic Ca^{2+} and H^+ in Barley Aleurone Protoplasts", *Plant Cell. Tissue and Organ Culture*, 1988, 12, 159.
- 10) K. Higashi and J. B. Hoek, "Ethanol Causes Desensitization of Receptor-mediated Phospholipase C Activation in Isolated Hepatocytes", *J. Biol. Chem.*, 1991, 266, 2178.
- 11) 東克謙, 塚田勝比古, 埜村智之, 倉知美幸, 山田潤一, 武内俊彦, "分離肝細胞における細胞内 Ca^{2+} 動態 - エタノールとホルモンの相互作用についての検討 -", *アルコール代謝と肝*, 1991, 10, 156.
- 12) E. Muller-Ackermann, U. Panne and R. Niessner, "A Fiber Optic Sensor Array for the Fluorimetric Detection of Heavy Metals", *Anal. Methods Instrum.*, 1995, 2(4), 182.
- 13) W. J. M. Scheenen, L. R. Makijngs, L. R. Gross, T. Pozzan and R. Y. Tsien, "Photodegradation of Indo-1 and Its Effect on Apparent Ca^{2+} Concentrations", *Chem. Biol.*, 1996, 3(9), 765.

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
細菌研究用
試薬
膜タン
パク質
ラベル
化剤
二価性
試薬
酸化
還元
イオン
電極
シンチ
レーター
生化学用
緩衝剤
キレート
比色/金属
試薬
水質
分析用
溶媒
抽出
高純度
溶媒
その他
機能的
有機材料

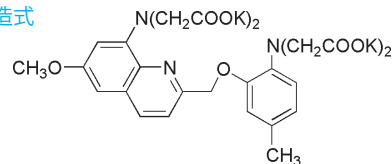
Quin 2

8-Amino-2-[(2-amino-5-methylphenoxy)methyl]-6-methoxyquinoline-*N,N,N,N*-tetraacetic acid, tetrapotassium salt
[CAS No. 73630-23-6]

同仁品コード：Q001
50 mg ￥26,000 340-04713

- 規格**
- (1) 性状：淡黄色粉末
 - (2) 純度 (HPLC)：95.0% 以上
 - (3) 水溶状：試験適合
 - (4) モル吸光係数 (無水物換算)：34,000 以上 (240 nm 付近)
- 溶解例** 84 mg/100 ml(水)
- 取扱注意** 1. 保存方法：遮光

構造式



$C_{26}H_{23}K_4N_3O_{10}=693.87$

性質 Quin 2 は R. Y. Tsien らによって合成されたカルシウムに特異的な蛍光指示薬で、カルシウムと錯形成することによって強い蛍光を示す。マグネシウムとの反応は無視できる。カルシウム選択性の GEDTA の分子構造に蛍光性のキノリン骨格を組み込むことにより、 Mg^{2+} に対して約 10^5 倍の選択性を可能とした ($\log K_{Ca}=7.1$, $\log K_{Mg}=2.7$)。メトキシ基の存在によって、高い蛍光量子収率を示す (Ca 錯体の

$\phi=0.14$)。カルシウム錯体の蛍光励起波長は 339 nm、蛍光波長は 492 nm である。

和田らは、高濃度食塩溶液 (5 mol/l NaCl) 中の微量カルシウムの蛍光検出フローインジェクション分析法に Quin 2 を適用し、 10^{-6} mol レベルの Ca^{2+} の迅速定量を可能とした。食塩電解隔膜法の電解槽のモニター法として有用である。

参考文献

- 1) R. Y. Tsien, "New Calcium Indicators and Buffers with High Selectivity against Magnesium and Protons: Design, Synthesis, and Properties of Prototype Structures", *Biochemistry*, 1980, 19 (11), 2396.
- 2) R. Y. Tsien, T. Pozzan and T. J. Rink, "Calcium Homeostasis in Intact Lymphocytes: Cytoplasmic Free Calcium Monitored with a New, Intracellularly Trapped Fluorescent Indicator", *J. Cell Biol.*, 1982, 94, 325.
- 3) 和田弘子, 渥美博充, 中川元吉, 高濃度食塩溶液中の微量カルシウムの蛍光検出フローインジェクション定量, *Chem. Express.*, 1989, 4, 381.
- 4) M. B. Feinstein, J. J. Egan, R. I. Sha'afi and J. White, "The Cytoplasmic Concentration of Free Calcium in Platelets Is Controlled by Stimulators of Cyclic AMP Production (PGD2, PGE1, FORSKOLIN)", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1983, 113, 598.
- 5) N. Miyoshi, K. Hara, S. Kimura, K. Nakanishi and M. Fukuda, "A New Method of Determining Intracellular Free Ca^{2+} Concentration Using Quin 2-fluorescence", *Photochem. Photobiol.*, 1991, 53 (3), 415.

最新の情報は web へ 同仁化学 Q001 で検索

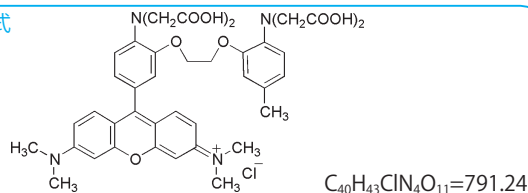
Rhod 2

1-[2-Amino-5-(3-dimethylamino-6-dimethylammonio-9-xanthenyl)phenoxy]-2-(2-amino-5-methylphenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid, chloride
[CAS No. 132523-91-2]

同仁品コード：R001
1 mg ¥33,800 344-05811

規格 (1) 性状：暗紫色固体
(2) 純度 (HPLC)：60.0% 以上
(3) アルカリ溶状：試験適合
溶解例 50 mg/ml(0.1 mol/l-NaOH)
取扱注意 1. 保存方法：冷凍、遮光

構造式



性質 Quin 2, Fura 2, Indo 1 等の初期に開発された細胞内 Ca²⁺ 蛍光プローブは、いずれも励起光に紫外外部光を必要としているため、この励起光による細胞の損傷、細胞由来の蛍光バックグラウンドの増加等の問題がある。

Tsien らは励起に可視部光を用いる指示薬の開発を試み、Rhod 2 を得ている。Rhod 2 は分子内にローダミン骨格の蛍光色素を持つ細胞内 Ca²⁺ のインジケーターである。励起波長 553 nm、蛍光波長 576 nm であり、同時に開発された Fluo 3 よりも 50 nm 程度長波長にシフトしている。蛍光顕微鏡、フローサイトメーター等にとって使い易い波長であり、前述の問題点が解消できる。細胞内 Ca²⁺ の研究に極めて有力な手段を提供するものと期待される。

Fura 2 に比べると蛍光強度は強く、光源として He-Ne

レーザー (531 nm) を使用することができ、Ca²⁺ 結合による蛍光強度の増加も大きく、約 40 倍に達する。Rhod 2 の Ca²⁺ 親和力 (K_d=1.0 μmol/l) は Fluo 3 よりもさらに弱いのので、Fura 2 等で測定困難な高 Ca²⁺ 濃度をモニターすることができ。

【注意】

本品は、通常、チューブ底面にフィルム状に付着した状態となっております。

稀に、輸送中の振動等により本品がチューブ底面から外れ、チューブ壁面やキャップ裏に付着している場合がございます。内容物を下に落としてから開封をしてご使用ください。

参考文献

- 1) M. Burnier, G. Centeno, E. Burki and H. R. Brunner, "Confocal Microscopy to Analyze Cytosolic and Nuclear Calcium in Cultured Vascular Cells", *Am. J. Physiol.*, 1994, 266, C1118.
- 2) J. Vergara, M. Difranco, D. Compagnon and B. A. Suarez-Isla, "Imaging of Calcium Transients in Skeletal Muscle Fibers", *Biophys. J.*, 1991, 59, 12.
- 3) T. Meyer, T. Wensel and L. Stryer, "Kinetics of Calcium Channel Opening by Inositol 1,4,5-Trisphosphate", *Biochemistry*, 1990, 29, 32.
- 4) A. Minta, J. P. Y. Kao and R. Y. Tsien, "Fluorescent Indicators for Cytosolic Calcium Based on Rhodamine and Fluorescein Chromophores", *J. Biol. Chem.*, 1989, 264(14), 8171.

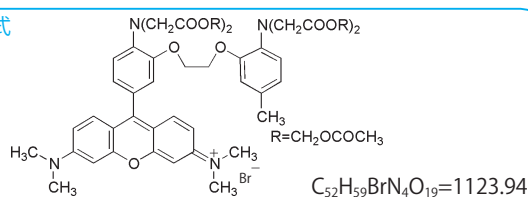
Rhod 2-AM

1-[2-Amino-5-(3-dimethylamino-6-dimethylammonio-9-xanthenyl)phenoxy]-2-(2-amino-5-methylphenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid, tetraacetoxymethyl ester, bromide
[CAS No. 145037-81-6]

同仁品コード：R002
1 mg ¥53,200 341-05821

規格 (1) 性状：暗紫色固体
(2) クロロホルム溶状：試験適合
(3) 蛍光スペクトル：試験適合
(4) NMR スペクトル：試験適合
溶解例 1 mg/ml(DMSO), 50 mg/ml(クロロホルム)
取扱注意 1. 保存方法：冷凍、遮光

構造式



性質 Rhod 2-AM は他のプローブと同様に 4 つのカルボキシル基のすべてを脂溶性のアセトキシメチルエステル体にして細胞膜透過性としたものである。容易に細胞内に取り込ませることができる。細胞内のエステラーゼにより加水分解をうけて、Rhod 2 となり、細胞内 Ca²⁺ をモニターできる。

【注意】

本品は、通常、チューブ底面にフィルム状に付着した状態となっております。

稀に、輸送中の振動等により本品がチューブ底面から外れ、チューブ壁面やキャップ裏に付着している場合がございます。内容物を下に落としてから開封をしてご使用ください。

参考文献

- 1) M. Burnier, G. Centeno, E. Burki and H. R. Brunner, "Confocal Microscopy to Analyze Cytosolic and Nuclear Calcium in Cultured Vascular Cells", *Am. J. Physiol.*, 1994, 266, C1118.
- 2) J. Vergara, M. Difranco, D. Compagnon and B. A. Suarez-Isla, "Imaging of Calcium Transients in Skeletal Muscle Fibers", *Biophys. J.*, 1991, 59, 12.
- 3) T. Meyer, T. Wensel and L. Stryer, "Kinetics of Calcium Channel Opening by Inositol 1,4,5-Trisphosphate", *Biochemistry*, 1990, 29, 32.
- 4) A. Minta, J. P. Y. Kao and R. Y. Tsien, "Fluorescent Indicators for Cytosolic Calcium Based on Rhodamine and Fluorescein Chromophores", *J. Biol. Chem.*, 1989, 264(14), 8171.
- 5) D. R. Trollinger, W. E. Cascio and J. J. Lemasters, "Selective Loading of Rhod 2 into Mitochondria Shows Mitochondrial Ca²⁺ Transients during the Contractile Cycle in Adult Rabbit Cardiac Myocytes", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1997, 236, 738.

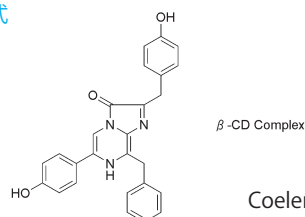
最新の情報は web へ 同仁化学 R001/R002 で検索

Coelenterazine-WS

Coelenterazine β -Cyclodextrin complex同仁品コード：C397
1 mg ￥14,700

- 規格** (1) 性状：微黄褐色～黄褐色固体
(2) リン酸緩衝液溶状：試験適合
(3) IR スペクトル：試験適合
- 取扱注意** 1. 保存方法：冷凍、遮光

構造式



性質 セレンテラジンを発光部分として持つ発光タンパク質エクオリンは、カルシウムイオンと特異的に結合して発光するため、細胞内カルシウムイオンの発光分析法として広く用いられている。しかしながら、セレンテラジンは中性の pH 領域にいて水溶性が低く、またそれ自身脂溶性が高いため細胞表面への吸着がみられるなど、細胞系で使用する場合に幾つかの問題点があった。Coelenterazine-WS は、セレンテラジンに包接化合物を添加して水溶性としたもので、中性領域における水溶性が飛躍的に向上し、そのため種々のバッファー溶液にも容易に溶解することができる。更に、

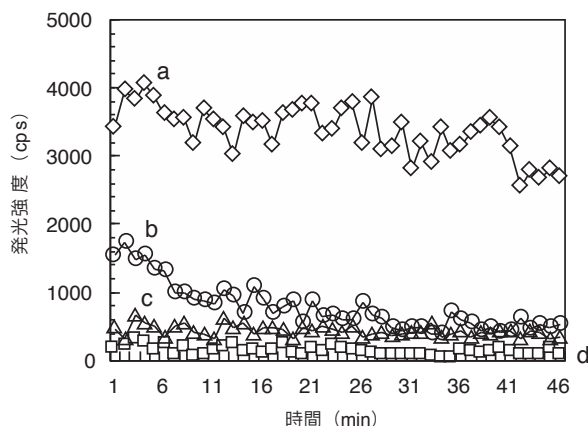
細胞への導入が容易になることにより、エクオリンの発光性能を増加することができる¹⁾。

【注意】

本品は、通常、チューブ底面にフィルム状に付着した状態となっております。

稀に、輸送中の振動等により本品がチューブ底面から外れ、チューブ壁面やキャップ裏に付着している場合がございます。

内容物を下に落としてから開封をしてご使用ください。



- a) Triton X-100を加え酵母細胞を破壊後、Coelenterazine-WSを加え測定したもの。
b) Triton X-100を加え酵母細胞を破壊後、セレンテラジン(メタノール溶液)を加え測定したもの。
c) Coelenterazine-WSを用いたもの。
d) セレンテラジン(メタノール溶液)を用いたもの。
(順天堂大学、島田先生提供)

参考文献

- 1) K. Teranishi and O. Shimomura, "Solubilizing Coelenterazine in Water with Hydroxypropyl- β -cyclodextrin", *Biosci. Biotech. Biochem.*, 1997, 61, 1219.

最新の情報は webへ 同仁化学 C397 で検索

4-2 ミトコンドリアの鉄イオンを検出したい

Mito-FerroGreen

 同仁品コード：M489
 50 µg × 2 ￥25,000

Protocol: 「ミトコンドリアの鉄イオンを検出したい」

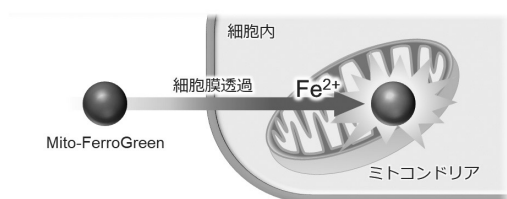
規格 純度 (HPLC): 90.0% 以上
 蛍光スペクトル: 試験適合

取扱注意 1. 保存方法: 冷凍, 遮光 2. 窒素置換, 吸湿注意

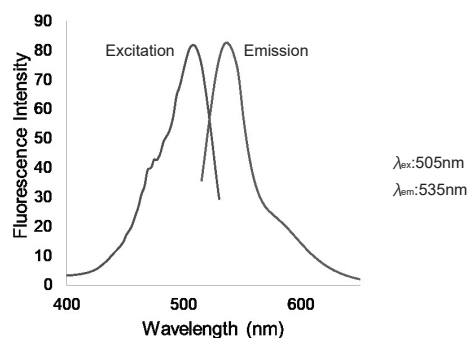
性質 鉄は、生体内で最も多く存在する遷移金属元素であり、様々な生理活性を示すことが報告されている。近年、タンパク非結合型の鉄イオン（自由鉄）としての存在が注目されており、その高い反応性は細胞損傷や細胞死にも関与していることが示唆されている。自由鉄は安定な化学種である鉄 (II) イオン及び鉄 (III) イオンとして存在するが、生細胞内において、細胞内還元的環境、水溶性、トランスポーター

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る。Mito-FerroGreen は、FeS クラスターやヘム合成の場として知られるミトコンドリア内の鉄 (II) イオンと選択的に反応し強い蛍光 (λ_{ex} : 505 nm, λ_{em} : 535 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ある。

反応原理



蛍光特性



最新の情報は web へ 同仁化学 M489 で検索

BCECF

 2',7'-Bis(carboxyethyl)-4 or 5-carboxyfluorescein
 [CAS No. 85138-49-4]

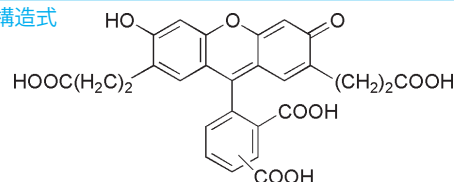
 同仁品コード：B031
 5 mg ￥13,600 345-05184

規格 (1) 性状: 橙色～赤茶褐色粉末
 (2) 純度 (HPLC): 85.0% 以上
 (3) メチルアルコール溶状: 試験適合
 (4) 蛍光スペクトル: 試験適合
 (5) IR スペクトル: 試験適合
 (6) NMR スペクトル: 試験適合

溶解例 2 mg/ml (メチルアルコール)

取扱注意 1. 保存方法: 遮光

構造式


 $C_{27}H_{20}O_{11}=520.44$

性質 細胞内部に色素を取り込ませて細胞内の pH 変化を調べる方法として 5-カルボキシフルオレセインが知られているが、リンパ球のように $pK_a=7.0$ の細胞に用いると、色素の細胞内からの溶出が早く測定が困難である。BCECF

はカルボキシエチル基を 2 個導入し、細胞内からの溶出を少なくしている。細胞内 pH 変化の研究に適している ($\lambda_{ex}=490$ nm, $\lambda_{em}=526$ nm)。

最新の情報は web へ 同仁化学 B031 で検索

BCECF-AM

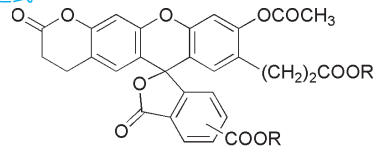
3'-O-Acetyl-2',7'-bis(carboxyethyl)-5 or 6-carboxyfluorescein, diacetoxymethyl ester
[CAS No. 117464-70-7]

Protocol: 「細胞内 pH を測定したい」

同仁品コード: B262
1 mg ¥32,600

- 規格** (1) 性状: 淡橙色～淡褐色粉末または固体
(2) 純度 (HPLC): 90.0% 以上
(3) 蛍光スペクトル: 試験適合
(4) NMR スペクトル: 試験適合
- 取扱注意** 1. 保存方法: 冷凍, 遮光, 2. 吸湿注意

構造式



R=CH₂OCOCH₃

C₃₅H₂₈O₁₅=688.59

BCECF-AM special packaging

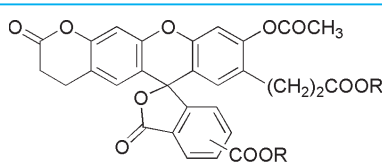
3'-O-Acetyl-2',7'-bis(carboxyethyl)-5 or 6-carboxyfluorescein, diacetoxymethyl ester
[CAS No. 117464-70-7]

Protocol: 「細胞内 pH を測定したい」

同仁品コード: B221
50 µg × 8 ¥16,700 349-08161

- 規格** (1) 性状: 白色～微黄色固体
(2) 純度 (HPLC): 90.0% 以上
(3) 蛍光スペクトル: 試験適合
(4) NMR スペクトル: 試験適合
- 取扱注意** 1. 危険物第四類第三石油類 危等 III
2. 火気厳禁 3. 保存方法: 冷凍, 遮光
- 危険・有害性シンボルマーク (GHS 表示)**
感嘆符

構造式



R=CH₂OCOCH₃

C₃₅H₂₈O₁₅=688.59

性質 BCECF の pK_a は 6.97 で、pH と 蛍光強度との間には pH6.4 ~ 7.6 の範囲内で直線関係がみられ、細胞内 pH 測定に適している。BCECF は励起光 (500 nm) 照射によって分解されない。BCECF は、イオン化しているために細胞膜を透過できないが、BCECF-AM は、疎水性が増大し容易に細胞膜を透過する。細胞内に入った BCECF-AM はエステラーゼにより加水分解を受け、膜不透過性の BCECF に戻る。中性 pH 付近における BCECF-AM の 蛍光 (励起光波長 500 nm) は微弱であるが、BCECF は強い 蛍光を示すので、加水分解の過程を 蛍光強度 (蛍光波長 530 nm) の

変化としてモニターできる。

BCECF-AM special packaging には 溶解用 DMSO (1 ml) が添付されている。

【注意】

本品は、通常、チューブ底面にフィルム状に付着した状態となっております。

稀に、輸送中の振動等により本品がチューブ底面から外れ、チューブ壁面やキャップ裏に付着している場合がございます。内容物を下に落としてから開封をしてご使用ください。

参考文献

- 1) R. A. Steinhart and D. Mazia, "Development of K⁺-conductance and Membrane Potentials in Unfertilized Sea Urchin Eggs After Exposure to NH₄OH", *Nature*, 1973, 241, 400.
- 2) T. J. Rink, R. Y. Tsien and T. Pozzan, "Cytoplasmic pH and Free Mg²⁺ in Lymphocytes", *J. Cell Biol.*, 1982, 95, 189.
- 3) A. M. Paradiso, R. Y. Tsien and T. E. Machen, "Na⁺-H⁺ Exchange in Gastric Glands as Measured with a Cytoplasmic-trapped, Fluorescent pH Indicator", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, 81, 7436.
- 4) S. Grinstein, B. Elder and W. Furuya, "Phorbol Ester-induces Changes of Cytoplasmic pH in Neutrophils: Role of Exocytosis in Na⁺-H⁺ Exchange", *Am. J. Physiol.*, 1985, 248, C379.
- 5) G. B. Zavoico, E. J. Cragoe and M. B. Feinstein, "Regulation of Intracellular pH in Human Platelets", *J. Biol. Chem.*, 1986, 261(28), 13160.
- 6) G. R. Bright, W. Fisher, J. Rogowska and L. Taylor, "Fluorescence Ratio Imaging Microscopy: Temporal and Spatial Measurements of Cytoplasmic pH", *J. Cell Biol.*, 1987, 104, 1019.
- 7) C. Aalkjaer and E. J. Cragoe Jr, "Intracellular pH Regulation in Resting and Contracting Segments of Rat Mesenteric Resistance Vessels", *J. Physiol.*, 1988, 402, 391.
- 8) K. Tsujimoto, M. Semadeni, M. Huflejt and L. Packer, "Intracellular pH of Halobacteria Can Be Determined by the Fluorescent Dye 2',7'-bis(carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1988, 155, 123.
- 9) M. A. Kolber, R. R. Quinones, R. E. Gress and P. A. Henkart, "Measurement of Cytotoxicity by Target Cell Release and Retention of the Fluorescent Dye Bis-carboxyethyl-carboxyfluorescein(BCECF)", *J. Immunol. Methods*, 1988, 108, 255.
- 10) H. Harada, Y. Kanai, M. Anzai and Y. Suketa, "cAMP Activates Cl⁻/HCO₃⁻ Exchange for Regulation of Intracellular pH in Renal Epithelial Cells", *Biochim. Biophys. Acta*, 1991, 1092, 404.
- 11) C. C. Freudenrich, E. Murphy, L. A. Levy, R. E. London and M. Lieberman, "Intracellular pH Modulates Cytosolic Free Magnesium in Cultured Chicken Heart Cells", *Am. J. Physiol.*, 1992, 262(4), C1024.
- 12) K. Khodakhah and D. Ogden, "Functional Heterogeneity of Calcium Release by Inositol Triphosphate in Single Purkinje Neurons, Cultured Cerebellar Astrocytes, and Peripheral Tissues", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, 90, 4976.

最新の情報は web へ 同仁化学 B262/B221 で検索

MQAE

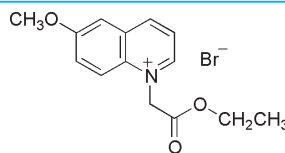
N-Ethoxycarbonylmethyl-6-methoxyquinolinium bromide
[CAS No. 124505-60-8]

Protocol: 「細胞内塩化物イオンを測定したい」

同仁品コード：M024
50 mg ￥16,100 348-06051

- 規格** (1) 性状：微黄色～黄色粉末
(2) 純度 (HPLC)：95.0% 以上
(3) IR スペクトル：試験適合
- 溶解例** 3 mg/ml(水：アセトニトリル = 1：1)
- 取扱注意** 1. 保存方法：冷蔵

構造式



$C_{14}H_{16}BrNO_3=326.19$

性質 細胞膜を介する塩素イオンの輸送は、細胞の多くの生理機能に関係し、生物学的に大変重要な研究課題である。ここに紹介する MQAE は高感度蛍光試薬であり、 Cl^- によりその蛍光強度が減少する。MQAE の Cl^- に対する消光係数は、SPQ の約 2 倍であり、 Cl^- の濃度変化に対する感度は SPQ よりも優れている。また、MQAE の蛍光波長は

$\lambda_{ex}=355\text{ nm}$, $\lambda_{em}=460\text{ nm}$ で蛍光強度は SPQ と同程度であり、0 ~ 50 mmol/l の Cl^- 濃度が測定できる。

さらに、MQAE は高い水溶性と膜透過性を持ち、細胞膜内に容易に導入できる。MQAE の蛍光強度は他の生体内アニオン、pH 等に影響されず $[Cl^-]$ の変化を蛍光強度で追跡できる。

参考文献

- 1) 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.
- 2) 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 Rathippocampal Neurons", *Neurosci. Lett.*, 1991, 134, 75.
- 3) T. Nakamura, H. Kaneko and N. Nishida, "Direct Measurement of Chloride Concentration in Newt Olfactory Receptors with the Fluorescent Probe", *Neurosci. Lett.*, 1997, 237, 5.

最新の情報は web へ 同仁化学 M024 で検索

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
細菌研究用
試薬
膜タン
パク質
ラベル
化剤
二価性
試薬
酸化
還元
イオン
電極
シンチ
レーター
生化学用
緩衝剤
キレート
比色/金属
試薬
水質
分析用
溶媒
抽出
高純度
溶媒
その他
機能性
有機材料

Zinquin ethyl ester

Ethyl [[2-methyl-8-[[[4-methylphenyl)sulfonyl]amino]-6-quinolinyloxy]acetate
[CAS No. 181530-09-6]

Protocol: 「細胞内 Zn をイメージングしたい」

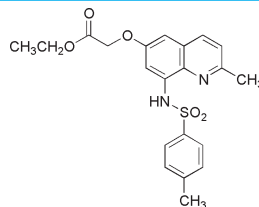
同仁品コード: Z215
1 mg ¥25,600 347-07121

規格 (1) 性状: 白色～微青色固体
(2) 純度 (HPLC): 98.0% 以上
(3) ジメチルスルホキシド溶状: 試験適合
(4) 蛍光プランク: 試験適合

溶解例 1 mg/0.5 ml (ジメチルスルホキシド)

取扱注意 1. 保存方法: 冷凍

構造式

C₂₁H₂₂N₂O₅S=414.48

性質 TSQ をもとに考案された亜鉛蛍光プローブである。その亜鉛錯体は $\lambda_{ex}=368$ nm, $\lambda_{em}=490$ nm の蛍光特性をもつ。プローブ自体も蛍光を有するが、その強度は錯体形成時に比べ 30 分の 1 以下と非常に弱く、実用に際してさほど問題とならない。脂溶性が高く、膜透過性を持つため細胞内の亜鉛の検出に適しているが、使用時にはまず DMSO やエタノールなどの有機溶媒に溶解する必要がある。

亜鉛イオン選択性は非常に高く、アルカリ金属や他の二価金属イオンに対しては、バックグラウンド程度の蛍光しか与えない。唯一カドミウム錯体は、亜鉛錯体に比して 40% 程度の蛍光強度を与えるが、生体内の存在量を考慮すると通常

は問題とならない。

アポトーシスと亜鉛イオンとの相関を指摘する報文もあり、本製品はその意味で、アポトーシス研究の一助となり得る。

【注意】

本品は、通常、チューブ底面にフィルム状に付着した状態となっております。

稀に、輸送中の振動等により本品がチューブ底面から外れ、チューブ壁面やキャップ裏に付着している場合がございます。内容物を下に落としてから開封をしてご使用ください。

参考文献

- 1) P. Coyle, P. D. Zalewski, J. C. Philcox, I. J. Forbes, A. D. Ward, S. F. Lincoln, I. Mahadevan and A. M. Roife, "Measurement of Zinc in Hepatocytes by Using a Fluorescent Probe, Zinquin: Relationship to Metallothionein and Intracellular Zinc", *Biochem. J.*, 1993, 303, 781.
- 2) P. D. Zalewski, I. J. Forbes and W. H. Betts, "Correlation of Apoptosis with Change in Intracellular Labile Zn(II) Using Zinquin [(2-Methyl-8-*p*-Toluenesulphonamido-6-Quinolyl)oxy]-Acetic Acid], a New Specific Fluorescent Probe for Zn(II)", *Biochem. J.*, 1993, 296, 403.
- 3) P. D. Zalewski, S. H. Millard, I. J. Forbes, O. Kapaniris, A. Slavotinek, W. H. Betts, A. D. Ward, S. F. Lincoln and I. Mahadevan, "Video Image Analysis of Labile Zinc in Viable Pancreatic Islet Cells Using a Specific Fluorescent Probe for Zinc", *J. Histochem. Cytochem.*, 1994, 42(7), 877.
- 4) P. Coyle, P. D. Zalewski, J. C. Philcox, I. J. Forbes, A. D. Ward, S. F. Lincoln, I. Mahadevan and A. M. Roife, "Measurement of Zinc in Hepatocytes by Using a Fluorescent Probe, Zinquin: Relationship to Metallothionein and Intracellular Zinc", *Biochem. J.*, 1994, 303, 781.
- 5) P. D. Zalewski, I. J. Forbes, R. F. Seemark, R. Borlinghaus, W. H. Betts, S. F. Lincoln and A. D. Ward, "Flux of Intracellular Labile Zinc During Apoptosis (Gene-Directed Cell Death) Revealed by a Specific Chemical Probe, Zinquin", *Chem. Biol.*, 1994, 1(3), 153.
- 6) I. A. Brand and J. Kleinke, "Intercellular Zinc Movement and Its Effect on the Carbohydrate Metabolism of Isolated Rat Hepatocytes", *J. Biol. Chem.*, 1996, 271(4), 1941.
- 7) N. W. Hausen, A. Fischer, H. Kirchner and L. Rink, "Interaction of Zinc Ions with Human Peripheral Blood Mononuclear Cells", *Cell. Immunol.*, 1996, 171, 255.
- 8) P. D. Zalewski, X. Jian, L. L. Soon, W. G. Breed, R. F. Seemark, S. F. Lincoln, A. D. Ward and F. -Z. Sun, "Changes in Distribution of Labile Zinc in Mouse Spermatozoa During Maturation in the Epididymis Assessed by the Fluorophore Zinquin", *Reprod. Fertil. Dev.*, 1996, 8, 1097.
- 9) R. D. Palmiter, T. B. Cole and S. D. Findley, "ZnT-2, a Mammalian Protein That Confers Resistance to Zinc by Facilitating Vesicular Sequestration", *EMBO J.*, 1996, 15, 1784.
- 10) D. Berendji, V. Kolb-Bachofen, K. L. Meyer, O. Grapenthin, H. Weber, V. Wahn and K.-D. Kroncke, "Nitric Oxide Mediates Intracytoplasmic and Intracellular Zinc Release", *FEBS Lett.*, 1997, 405, 37.
- 11) M. Tsuda, K. Imaizumi, T. Katayama, K. Kitagawa, A. Wanaka, M. Tohyama and T. Takagi, "Expression of Zinc Transporter Gene, ZnT-1, Is Induced After Transient Forebrain Ischemia in the Gerbil", *J. Neurosci.*, 1997, 17, 6678.

最新の情報は web へ 同仁化学 Z215 で検索

4-3 関連試薬

BAPTA

O,O'-Bis(2-aminophenyl)ethyleneglycol-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid, tetrapotassium salt, hydrate
〔CAS No. 85233-19-8(free acid)〕

同仁品コード：B019
100 mg ￥4,200 341-05061
500 mg ￥14,700 347-05063

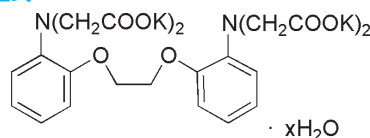
規格

- (1) 性状：白色粉末又は結晶性粉末
- (2) 純度（滴定，無水物換算）：95.0% 以上
- (3) 水溶状：試験適合
- (4) pH(25℃)：8.0～9.5
- (5) 水分：3.5～14.0%
- (6) 強熱残分（硫酸塩）：46.0～53.0%
- (7) IR スペクトル：試験適合

溶解例

1.8 g/50 ml(水)

構造式



$C_{22}H_{20}K_4N_2O_{10}$ (分子量は無水物として計算) = 628.79

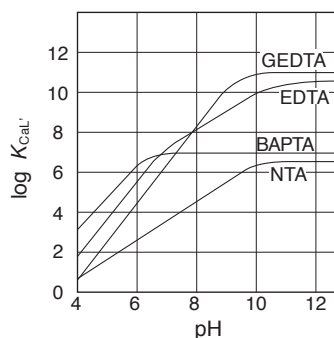
性質 酸解離定数は $pK_{a3}=5.47$, $pK_{a4}=6.36$ であり、金属イオンとの安定度定数は $\log K_{Ca}=6.97$, $\log K_{Mg}=1.77$ である。したがって、中性付近での Ca^{2+} に対する選択的キレート剤である。

カルシウムを選択的につかまえるキレート剤として、古くから GEDTA が知られている。筋収縮の研究におけるカルシウムの重要性は、GEDTA によって初めて明らかにされた。生理的な pH 条件 (pH ~ 7) で実験したい場合は、

GEDTA の酸解離定数をさらに 2～3 桁下げて、プロトン付加の副反応をおさえる必要がある。

Tsien らは脂肪族アミンに代えて芳香族アミンを用いたキレート剤、BAPTA を合成し、この要求を実現した。下に GEDTA と BAPTA の各定数値の比較を示し、種々の Ca^{2+} 錯体の条件定数と pH の関係を図に示した。BAPTA は中性付近でもプロトンの影響を受けにくいことがわかる。

測定原理



種々の Ca^{2+} 錯体の条件定数と pH の関係

	$\log K_{Mg}$	$\log K_{Ca}$	pK_{a3}	pK_{a4}
GEDTA(EGTA)	5.31	11.00	8.96	9.58
BAPTA	1.77	6.97	5.47	6.36

BAPTA-AM solution

O,O'-Bis(2-aminophenyl)ethyleneglycol-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid, tetraacetoxymethyl ester, DMSO solution
〔CAS No. 126150-97-8(BAPTA-AM)〕
50 mmol/l DMSO 溶液

同仁品コード：B035
1 ml ￥23,900 348-05451

規格

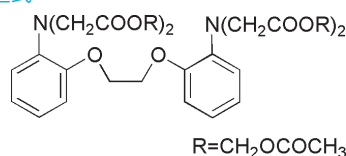
- (1) 性状：無色液体
 - (2) 純度 (HPLC)：98.0% 以上
- 取扱注意** 1. 危険物第四類第三石油類 危等 III
2. 火気厳禁 3. 保存方法：冷凍，遮光

危険・有害性シンボルマーク (GHS 表示)

感嘆符



構造式



$C_{34}H_{40}N_2O_{18}$ = 764.68

性質 BAPTA-AM は BAPTA のカルボキシル基をすべてアセトキシメチルエステル化したもので、細胞内に容易に取り込ませることができる。細胞内エステラーゼによりエステル

は分解され、本体の BAPTA としての機能を細胞内で示すようになる。生成した BAPTA は細胞内に保持される。

参考文献

- 1) R. Y. Tsien, "New Calcium Indicators and Buffers with High Selectivity against Magnesium and Protons: Design, Synthesis, and Properties of Prototype Structures", *Biochemistry*, 1980, 19 (11), 2396.
- 2) R. Y. Tsien, "A Non-disruptive Technique for Loading Calcium Buffers and Indicators into Cells", *Nature*, 1981, 290, 527.
- 3) J. I. Korenbrot, D. L. Ochs, J. A. Williams, D. L. Miller and J. E. Brown, "The Use of Tetracarboxylate Fluorescent Indicators in the Measurement and Control of Intracellular Free Calcium Ions", *Soc. Gen. Physiol. Ser.*, 1986, 40, 347.

最新の情報は web へ 同仁化学 B019/B035 で検索

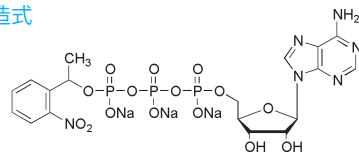
Caged ATP

P^3 -[1-(2-Nitrophenyl)ethyl]adenosine 5'-triphosphate, trisodium salt
[CAS No. 67030-27-7(free acid)]

Protocol: 「細胞内目的部位に ATP を局部添加したい」

- 規格** (1) 性状：白色粉末
(2) 純度 (HPLC)：98.0% 以上
(3) ATP 含量 (HPLC)：0.1% 以下
(4) NMR スペクトル：試験適合
- 取扱注意** 1. 保存方法：冷凍、遮光

構造式



$C_{18}H_{20}N_6Na_3O_{15}P_3=722.27$

性質 Caged ATP は Caged 化合物として最も歴史が古く、筋収縮を始め ATP が関与するあらゆる反応のトリガーとして利用されている。ミオシンヘッドとアクチン繊維からなる cross-bridge の反応メカニズムの解明等に Caged 化合物のなかでも最も汎用されている化合物である。例えばその他にも 筋小胞体の Ca ATPase の研究やラット心筋の ATP 感受性カリウムチャネルの研究など ATP を要求す

る多くの生体反応メカニズム解明に役立っている。また、DNA 修復メカニズムの研究や、ATP 結合タンパクの構造と機能に関する研究にも利用されている。5 mmol/l の Caged ATP を用いた場合、40%を活性化するのに要する光エネルギーは、10 mm² 当り 20 mJ (347 nm) である。

* 使用方法是プロトコルをご覧ください。

参考文献

- 1) J. H. Kaplan, B. F. III and J. F. Hoffman, "Rapid Photolytic Release of Adenosine 5'-triphosphate from a Protected Analogue: Utilization by the Na: K Pump of Human Red Blood Cell Ghosts", *Biochemistry*, 1978, 17, 1929.
- 2) E. Ohtsuka, H. Uemura, T. Doi, T. Miyake, S. Nishikawa and M. Ikehara, "A New Method for 3' Labelling of Polyribonucleotides by Phosphorylation with RNA Ligase and Its Application to the 3'-Modification for Joining Reactions", *Nucleic Acids Res.*, 1979, 6, 443.
- 3) J. A. McCray, L. Herbet, T. Kihara and D. R. Trentham, "A New Approach to Time-resolved Studies of ATP-requiring Biological Systems: Laser Flash Photolysis Caged ATP", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, 77, 7237.
- 4) Y. E. Goldman, M. G. Hibberd, J. A. McCray and D. R. Trentham, "Relaxation of Muscle Fibres by Photolysis of Caged ATP", *Nature*, 1982, 300, 701.
- 5) D. H. Pierce, A. Scarpa, M. R. Topp and J. K. Blasie, "Kinetics of Calcium Uptake by Isolated Sarcoplasmic Reticulum Vesicles Using Flash Photolysis of Caged Adenosine 5'-Triphosphate", *Biochemistry*, 1983, 22, 5254.
- 6) 杉晴夫, "アクチンとミオシンの構造と両者間の相互作用", 生体の科学, 1983, 34, 334.
- 7) B. F. Iii, "Na⁺ Movement in a Single Turnover of the Na Pump", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, 81, 5310.
- 8) Y. E. Goldman, "Laser Pulsed Release of ATP and Other Optical Methods in the Study of Muscle Contraction", *Soc. Gen. Physiol. Ser.*, 1986, 40, 397.
- 9) J. W. Walker, G. P. Reid, J. A. McCray and D. R. Trentham, "Photolabile 1-(2-Nitrophenyl)ethyl Phosphate Esters of Adenine Nucleotide Analogues. Synthesis and Mechanism of Photolysis", *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, 110, 7170.
- 10) J. W. Walker, G. P. Reid and D. R. Trentham, "[16] Synthesis and Properties of Caged Nucleotides", *Methods in Enzymol.*, 1989, 172, 288.
- 11) K. Horiuti, T. Sakoda, M. Takei and K. Yamada, "Effects of Ethylene Glycol on the Kinetics of Contraction on Flash Photolysis of Caged ATP in Rat Psoas Muscle Fibres", *J. Muscle. Res. and Cell Motility*, 1992, 13, 199.
- 12) Z. Lu, R. L. Moss and J. W. Walker, "Tension Transients Initiated by Photogenerations of MgADP in Skinned Skeletal Muscle Fibers", *J. Gen. Physiol.*, 1993, 101, 867.

最新の情報は web へ 同仁化学 CC01 で検索

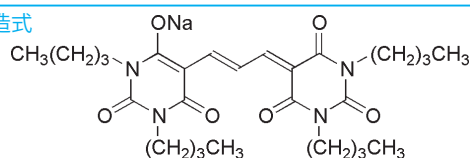
DiBAC₄(3)

Bis(1,3-dibutylbarbituric acid)trimethine oxonol, sodium salt
[CAS No. 70363-83-6(free acid)]

Protocol: 「膜電位を測定したい」

- 規格** (1) 性状：赤橙色～赤色粉末
(2) 純度 (HPLC)：98.0% 以上
(3) モル吸光係数：140,000 以上 (493 nm 付近)
(4) ジメチルスルホキシド溶状：試験適合
(5) IR スペクトル：試験適合
- 取扱注意** 1. 保存方法：冷蔵

構造式



$C_{27}H_{39}N_4NaO_6=538.61$

性質 Bis-oxonol 型のアニオン性膜電位感受性色素であり、細胞膜の脱分極に伴って、細胞質中への分布が増し、蛍光増強する。BICR/M1R-k 細胞 (ラット乳癌細胞) において、-25 ~ -90 mV の膜電位範囲で約 1%/mV の蛍光強度変化が得られたと報告されている。電位変化に伴う応答は 1 次の速度式に従い、その速度定数は、0.1 ~ 0.8/min とされる。Ar レーザー (488 nm) で励起可能なことから、フローサイ

トメトリー、共焦点レーザー顕微鏡観察などで利用可能である。膜電位測定以外にも、細胞の生存率やイオンチャネルの活性評価などに応用している例がある。High Throughput Screening(HTS) での細胞応答検出にも利用できる。

* 使用方法是プロトコルをご覧ください。

参考文献

- 1) D. E. Epps, M. L. Wolfe and V. Groppi, "Characterization of the Steady-state and Dynamic Fluorescence Properties of the Potential-sensitive Dye Bis-(1,3-dibutylbarbituric acid)trimethine oxonol(Dibac4(3)) in Model Systems and Cells", *Chem. Phys. Lipids*, 1994, 69, 137.

最新の情報は web へ 同仁化学 D545 で検索

GEDTA(EGTA)

O,O'-Bis(2-aminoethyl)ethyleneglycol-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid
[CAS No. 67-42-5]

同仁品コード：G002

5 g ￥3,600 348-01311
25 g ￥10,200 346-01312
100 g ￥30,600 342-01314

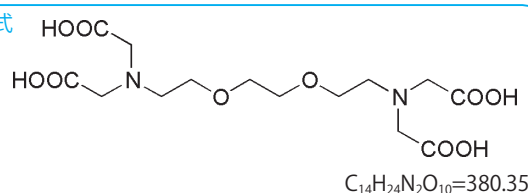
規格

- (1) 性状：白色結晶性粉末
- (2) 純度（滴定）：97.0% 以上
- (3) アルカリ溶状：試験適合
- (4) 強熱残分（硫酸塩）：0.10% 以下
- (5) 重金属（Pb として）：0.001% 以下
- (6) 鉄（Fe）：0.001% 以下

溶解例

1 g/10 ml(1 mol/l-NaOH) → 100 ml(水)

構造式



性質 グリコールエーテルジアミン四酢酸 (EGTA と同略する)。EDTA にくらべて有機溶媒 (DMF) には幾分溶けやすい。そのキレート生成定数は EDTA とあまり変わらないが、金属によってかなりの特異性があるので滴定用試薬として Cd, Zn 混合試料中の Cd の選択滴定や、Ca, Mg 共存下

の Ca を選択的に滴定できる。そのほか電位滴定、濾紙クロマトグラフィーにおける展開液への添加、酵素活性、生体膜、筋肉における生理機構の研究など生化学試薬として用途が広い。

参考文献

- 1) C. L. Luke and M. E. Campbell, "Photometric Determination of Magnesium in Electronic Nickel", *Anal. Chem.*, 1954, 26, 1778.
- 2) F. S. Sadek, R. W. Schmid and C. N. Reilly, "Visual EGTA Titration of Calcium in Thepresence of Magnesium", *Talanta*, 1959, 2, 38.
- 3) R. A. Burg and H. F. Conaghan, "Chelometric Determination of Calcium and Magnesium in Minerals", *Chem. Anal.*, 1960, 49, 100.
- 4) C. D. Dwivedi, K. N. Munshi and A. K. Dey, "Photometric Determination of Gallium, Indium, and Thallium Employing 4-(2-Pyridylazo) resorcinol", *Chem. Anal.*, 1966, 55, 13.
- 5) F. W. Czech and M. J. McCarthy, "Determination of Acetyl Peroxide in Aqueous Systems Containig Peracetic Acid and Hydrogen Peroxide", *Chem. Anal.*, 1966, 55, 11.
- 6) R. Pribil and V. Vesely, "Contributions to the Basic Problems of Complexometry-XX Determination of Calcium and Magnesium", *Talanta*, 1966, 13, 233.
- 7) 伊藤敦子, 上野景平, "ヒドロキシナフトールブルー (HNB) 指示薬を用いるカルシウム、マグネシウムの連続キレート滴定", *Jpn. Anal.*, 1970, 19, 393.
- 8) 丸山工作, "筋収縮の研究とキレート剤の役割", *Dojin News*, 1981, 18, 1.
- 9) T. Tatsumi and H. Fliss, "Hypochlorous Acid Mobilizes Intracellular Zinc in Isolated Rat Heart Myocytes", *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 1994, 26(4), 471.
- 10) H. Ohata, Y. Ujiki and K. Momose, "Confocal Imaging Analysis of ATP-Induced Ca²⁺ Response in Individual Endothelial Cells of the Artery in Situ", *Am. J. Physiol.*, 1997, 272(6), 1980.
- 11) I. Sakabe, S. Paul, W. Dansithong and T. Shinozawa, "Induction of Apoptosis in Neuro-2A Cells by Zn²⁺ Chelating", *Cell Struct. Funct.*, 1998, 23(2), 95.

最新の情報は web へ 同仁化学 G002 で検索

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
細菌研究用
試薬
膜タン
パク質
ラベル
化剤
二価性
試薬
酸化
還元
イオン
電極
シンチ
レーター
生化学用
緩衝剤
キレート
比色/金属
試薬
水質
分析用
溶媒
抽出
高純度
溶媒
その他
機能性
有機材料

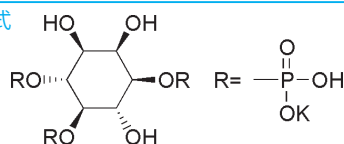
Ins(1,4,5)P₃ (synthetic)

D-myo-Inositol-1,4,5-triphosphate, tripotassium salt
[CAS No. 85166-31-0(free acid)]

同仁品コード：I007
100 µg ￥17,600 347-05781
1 mg ￥42,900 343-05783

- 規格** (1) 性状：無色ペレット状
(2) 薄層クロマトグラフィー：試験適合
- 取扱注意** 1. 保存方法：冷凍、遮光

構造式

C₆H₁₂K₃O₁₅P₃=534.37

性質 生体内情報伝達のメカニズムを解明する研究分野は、様々な展開を遂げている。今日までに単離されているイノシトールリン酸のうち、1,4,5-イノシトール三リン酸 (Ins(1,4,5)P₃) と 1,3,4,5-イノシトール四リン酸 (Ins(1,3,4,5)P₄) の2つが、細胞内セカンドメッセンジャーとして注目を集めている。

細胞がレセプターを介して、神経伝達物質、ホルモンなどの物質によって刺激を受けると、まず細胞膜中のホスファチジル-4,5-イノシトール二リン酸が加水分解され、Ins(1,4,5)P₃ が遊離される。Ins(1,4,5)P₃ は更に細胞内 Ca²⁺ の貯蔵部位 (ER) からの Ca²⁺ の遊離を促し、プロテインキナーゼ C を活性化してセカンドメッセンジャーとして働くものと考えられている。また、Ins(1,4,5)P₃ の代謝産物である Ins(1,3,4,5)P₄ もセカンドメッセンジャーとしての重要性が認められている。未知の分野だけに試薬も高純度で構造の

はっきりした安価なものが望まれているが、従来からイノシトールリン酸は天然からの単離供給に頼ってきたので、経済的、量的に制限されていた。

Ins(1,4,5)P₃ は化学合成品であり、現在市販されている天然由来の物と比較して物性は安定であり活性値も一定している。量的供給が可能になればこの分野での研究に大きく貢献することが期待される。

【注意】

本品は、通常、チューブ底面にフィルム状に付着した状態となっております。

稀に、輸送中の振動等により本品がチューブ底面から外れ、チューブ壁面やキャップ裏に付着している場合がございます。内容物を下に落としてから開封をしてご使用ください。

参考文献

- 1) M. Hirata, Y. Watanabe, T. Ishimatsu, T. Ikebe, Y. Kimura, K. Yamaguchi, S. Ozaki and T. Koga, "Synthetic Inositol Trisphosphate Analogs and Their Effects on Phosphatase, Kinase, and the Release of Ca²⁺", *J. Biol. Chem.*, 1989, 264, 20303.

最新の情報は web へ 同仁化学 I007 で検索

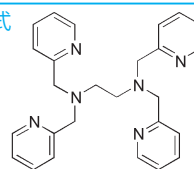
TPEN

N,N,N',N'-Tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine
[CAS No. 16858-02-9]

同仁品コード：T040
100 mg ￥20,200 340-05411

- 規格** (1) 性状：白色～微黄色結晶性粉末
(2) 純度 (滴定)：98.0% 以上
(3) ジメチルスルホキシド溶状：試験適合
(4) 融点：110～115℃
(5) IR スペクトル：試験適合
- 溶解例** 100 mg/10 ml(ジメチルスルホキシド)、
50 mg/80 ml(酢酸)

構造式

C₂₆H₂₈N₆=424.54

性質 Quin 2-AM による細胞内カルシウム測定の際に、亜鉛や鉄などの重金属イオンによって蛍光が消光され、カルシウム含量がみかけ上少く評価されることが指摘されている。膜透過性にすぐれた重金属マスキング剤としてはオフェナントロンもあるが、蛍光性のため Quin 2 錯体の蛍光測定への妨げとなる。Arslan らは Quin 2-AM による細胞内カルシウム測定を行い、TPEN が優れた重金属マスキング剤であることを明らかにした。TPEN は次にあげるような特長をもっている。

- 1) 脂溶性が高い。水にも適度に溶ける。
- 2) 生理的条件下では荷電がない。(pK_{a1}=2.85, pK_{a2}=3.32, pK_{a3}=4.85, pK_{a4}=7.19)
- 3) 重金属との親和性が高く、Ca, Mg との結合は無視できる。
- 4) 紫外部吸収極大波長は 260 nm にあり、波長 339 nm での励起の妨害とならない。金属イオンとの安定度定数は次の通りである。
logK_{Mn}=10.27, logK_{Fe}=14.61, logK_{Zn}=15.58,
logK_{Mg}=1.7, logK_{Ca}=4.4

参考文献

- 1) G. Anderegg and F. Wenk, "Pyridinderivate Als Komplexbildner VIII Die Herstellung Je Eines Neuen Vier- und Sechszahnigen Ligan-den", *Helv. Chim. Acta*, 1967, 50, 2330.
- 2) G. Anderegg, E. Hubmann, N. G. Podder and F. Wenk, "Pyridinderivate als Komplexbildner. XI. Die Thermodynamik der Metallkom-plexbildung mit Bis-, Tris- und Tetrakis[(2-pyridyl)methyl]-aminen", *Helv. Chim. Acta*, 1977, 60, 123.
- 3) P. Arslan, F. Di Virgilio, M. Beltrame, R. Y. Tsien and T. Pozzan, "Cytosolic Ca²⁺ Homeostasis in Ehrlich and Yoshida Carcinomas A, New Membrane-Permeant Chelator of Heavy Metals Reveals That These Ascites Tumor Cell Lines Have Normal Cytosolic Free Ca²⁺", *J. Biol. Chem.*, 1985, 260, 2719.
- 4) T. Tatsumi and H. Fliss, "Hypochlorous Acid Mobilizes Intracellular Zinc in Isolated Rat Heart Myocytes", *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 1994, 26(4), 471.
- 5) I. Sakabe, S. Paul, W. Dansithong and T. Shinowaza, "Induction of Apoptosis in Neuro-2A Cells by Zn²⁺ Chelating", *Cell Struct. Funct.*, 1998, 23(2), 95.

最新の情報は web へ 同仁化学 T040 で検索