

サルフェン硫黄を蛍光検出したい

使用製品

-SulfoBiotics- SSP4	[SB10]
DMSO	[LU08]

解析装置



I 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; 硫黄原子にのみ共有結合した硫黄の総称) 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る¹⁾。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-スルフィ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る²⁻³⁾。

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を発する試薬であり³⁾、サルフェン硫黄の蛍光検出や細胞内解析に利用することが可能である^{1,4-5)}。

※ 本試薬を細胞内サルフェン硫黄含有分子の解析に使用する場合は、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) を使用する。そのため、ライブセルイメージングには適用できない。

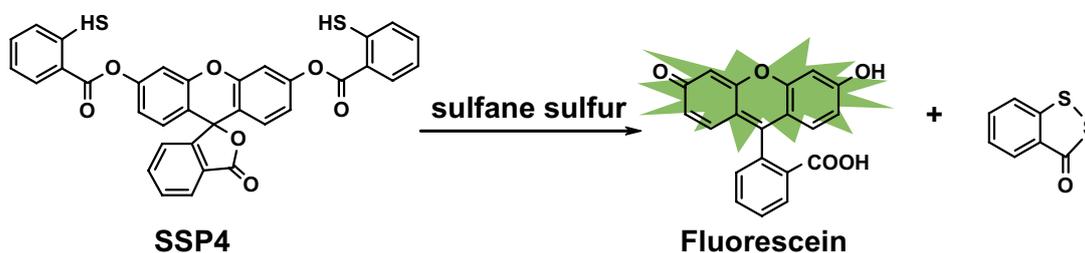


図1 SSP4を用いたサルフェン硫黄の検出原理

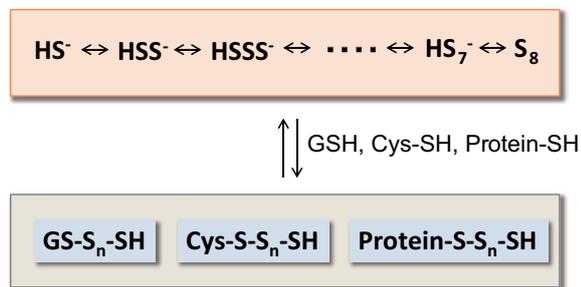


図2 生体内に存在するサルフェン硫黄含有分子種
※生体内のサルフェン硫黄含有分子種は、酸化還元および転移によって変化する

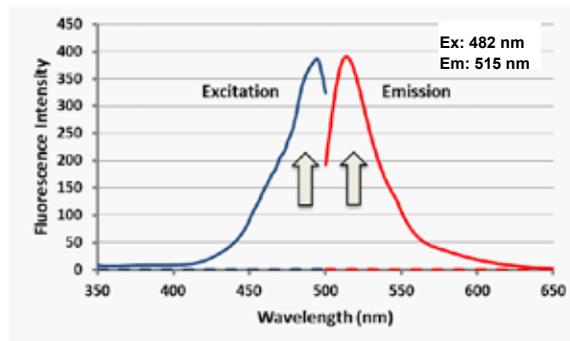


図3 サルフェン硫黄との反応による SSP4 の蛍光スペクトル変化

※ SSP4 10 μmol/l (PBS) にサルフェン硫黄ドナーである Na₂S₃ (Sodium trisulfide) を添加 (終濃度 100 μmol/l)

II SSP4 を用いた細胞内サルフェン硫黄の観察

1. 試薬類

- SSP4 (Code: SB10)
- DMSO (Code: LU08)
- 無血清培地
- PBS (-)
- Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)

- 0.5 mmol/l CTAB を含む無血清培地
CTAB 36.4 mg を 1.5 ml 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。

2. 溶液調製

- 10 mmol/l SSP4(DMSO) stock solution
SSP4 1mg を含むチューブに DMSO 165 μl を添加し、ピペッティングにより溶解する。

- SSP4 Working Solution
終濃度が 5 ~ 20 μmol/l となるように 10 mmol/l SSP4 (DMSO) 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 (DMSO) stock solution 10 μl を 0.5 mmol/l CTAB を含む無血清培地 5 ml に添加すると、20 μmol/l SSP4 working solution となる)

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

3. 方法

- 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>

サルフェン硫黄消去剤 NaCN (Sodium cyanide) 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 1.0 × 10⁴ cells/well (DMEM) 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) 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。

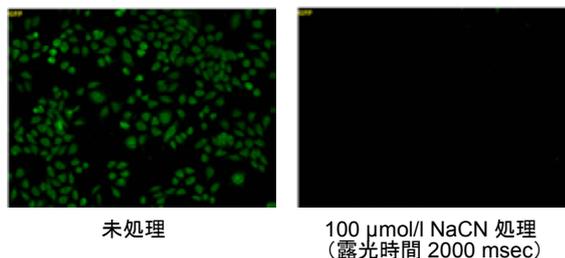


図 4 SSP4 を用いたサルフェン硫黄含有分子種の細胞内イメージング

<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 (DMSO) 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 における蛍光強度 (ex: 482 nm) を、蛍光分光光度計を用いて測定した。

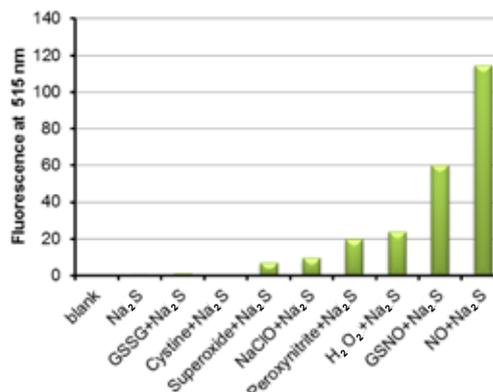


図 5 SSP4 を用いたサルフェン硫黄含有物質の蛍光検出

III 注意事項

SSP4 はデタージェントによってバックグラウンド蛍光を発生する場合がございます。

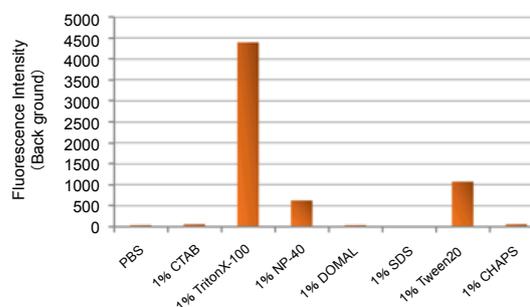


図 6 SSP4 10 μmol/l (1% Detergent/PBS) 中の 515 nm における蛍光強度 (Ex: 482 nm) を、プレートリーダーを用いて測定

※ TritonX-100 を使用する場合、0.1% 以下の濃度にしてください。
 ※ NP-40, Tween20 は 1% 濃度でも使用可能ですが、それ以下に希釈することでバックグラウンド蛍光を抑制することが可能です。

参考文献

- 1) 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, "Reactive cysteine persulfides and S-polythiolation regulate oxidative stress and redox signaling", *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **2014**, *111*, 7606.
- 2) Y. Kimura, Y. Mikami, K. Osumi, M. Tsugane, J. Oka and H. Kimura, "Polysulfides are possible H₂S-derived signaling molecules in rat brain", *FASEB J.*, **2013**, *27*, 2451.
- 3) S. Koike, Y. Ogasawara, N. Shibuya, H. Kimura and K. Ishii, "Polysulfide exerts a protective effect against cytotoxicity caused by *t*-butylhydroperoxide through Nrf2 signaling in neuroblastoma cells", *FEBS Lett.*, **2013**, *587*, 3548
- 4) W. Chen, C. Liu, B. Peng, Y. Zhao, A. Pacheco and M. Xian, "New fluorescent probe for sulfane sulfurs and the application in bioimaging", *Chem. Sci.*, **2013**, *4*, 2892.
- 5) E. Marutani, M. Sakaguchi, W. Chen, K. Sasakura, J. Liu, M. Xian, K. Hanaoka, T. Nagano and F. Ichinose, "Cytoprotective effects of hydrogen sulfide-releasing *N*-methyl-D-aspartate receptor antagonists mediated by intracellular sulfane sulfur", *Med. Chem. Commun.*, **2014**, *5*, 1577.
- 6) M. Sakaguchi, E. Marutani, H-S. Shin, W. Chen, K. Hanaoka, M. Xian and F. Ichinose, "Sodium Thiosulfate Attenuates Acute Lung Injury in Mice", *Anesthesiology*. **2014**, *121*, 1248.