

# ミトコンドリアの鉄イオンを検出したい

## 使用製品

Mito-FerroGreen

[M489]

## 解析装置



### I はじめに

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 ( $\lambda_{ex} : 505 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} : 535 \text{ nm}$ ) 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。

本製品は、岐阜薬科大学薬化学研究室 永澤秀子先生、平山祐先生のご指導の下、製品化している。

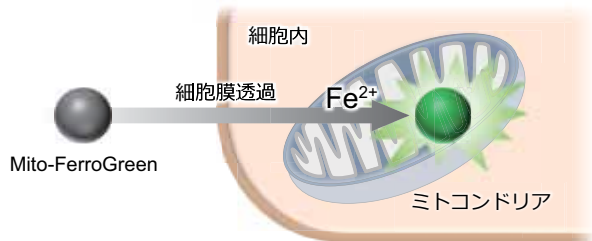


図1 Mito-FerroGreen によるミトコンドリア鉄(II)の検出

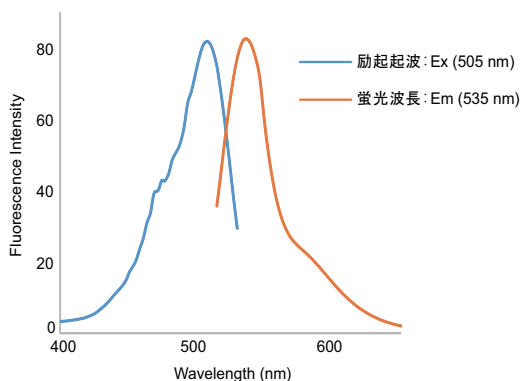


図2 Mito-FerroGreen の励起、蛍光スペクトル

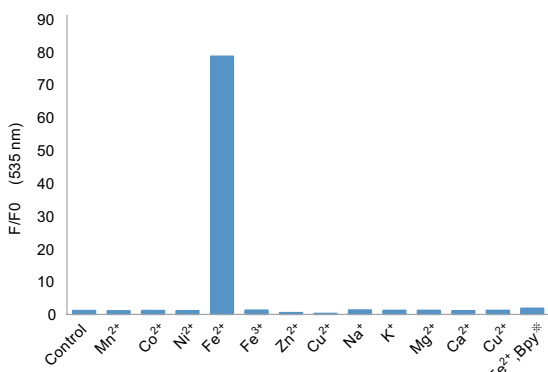


図3 Mito-FerroGreen の金属イオン選択性  
※ Bpy; 2,2'-Bipyridyl

### II キット内容

Mito-FerroGreen 50  $\mu\text{g} \times 2$

製品以外に必要なもの

- ・ Dimethyl sulfoxide (DMSO) または Ethanol
- ・ HBSS
- ・ 無血清培地
- ・ マイクロピペット

### III Mito-FerroGreen の操作方法

#### (1) 溶液調製

5  $\mu\text{mol/l}$  Mito-FerroGreen working solution の調製

Mito-FerroGreen 50  $\mu\text{g}$  を含むマイクロチューブに 53  $\mu\text{l}$  の DMSO を加えピペティングにより溶解し、1 mmol/l MitoFerro-Green 溶液を調製する。調製した溶液を HBSS で希釈し 5  $\mu\text{mol/l}$  working solution とする。

※ 1 mmol/l Mito-FerroGreen DMSO 溶液及び 5  $\mu\text{mol/l}$  working solution は不安定なため、細胞試料に添加する直前に調製し、直ちに染色に使用すること。試薬溶液は分解によりバックグラウンドが上昇するため、余った試薬溶液の保存はできない。尚、DMSO の代わりに Ethanol も使用可能。Ethanol の場合は冷凍で 2 週間の保存安定性を確認している。

※ 希釈に用いる HBSS は無血清培地に変更可能。

#### (2) 操作

- 1) 細胞をディッシュに播種し、37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養する。
- 2) 培地を取り除き、HBSS で 3 回洗浄する。
- 3) 調製した 5  $\mu\text{mol/l}$  Mito-FerroGreen working solution を添加し、37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内に 30 分間静置する。
- 4) 溶液を取り除き、HBSS で 3 回洗浄する。
- 5) 刺激剤を含む培地を添加し、37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内に静置する。  
※ 刺激の条件に応じてインキュベーター時間を設定すること。
- 6) 細胞を蛍光顕微鏡で観察する。

### IV 実験例

#### Mito-FerroGreen を用いたミトコンドリアの鉄(II)の検出

- 1)  $\mu$ -スライド 8 ウェル (ibidi 社製) に HeLa 細胞を播種し、37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で一晚培養した。
- 2) HBSS で 3 回洗浄し、培地成分を取り除いた。
- 3) 調製した 5  $\mu\text{mol/l}$  Mito-FerroGreen working solution 200  $\mu\text{l}$  を添加し、37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内に 30 分間静置した。
- 4) 溶液を取り除き、10 mmol/l となるように HBSS で調製した deferoxamine mesylate salt (sigma 社) 溶液を細胞に添加し、37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内に 30 分間静置した。
- 5) 溶液を取り除き、HBSS で 3 回洗浄した後、無血清培地に置換した。
- 6) 10 mmol/l となるように超純水で硫酸アンモニウム鉄(II) 溶液を調製し、終濃度 100  $\mu\text{mol/l}$  となるように添加し混合した。
- 7) 37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内に 1 時間静置した後、溶液を取り除き、HBSS で 3 回洗浄した。
- 8) 細胞を共焦点レーザー顕微鏡で観察した(図 4)。

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

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

ミトコンドリア染色試薬との共染色

- 1)  $\mu$ -スライド 8 ウェル (ibidi 社製) に HeLa 細胞を播種し、37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で一晩培養した。
- 2) HBSS で 3 回洗浄し、培地成分を取り除いた。
- 3) 終濃度 5  $\mu$ mol/l Mito-FerroGreen 及び 終濃度 200 nmol/l MitoBright Deep Red (Dojindo, MT08) となるように調製した HBSS 溶液 200  $\mu$ l を添加し、37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内に 30 分間静置した。
- 4) 溶液を取り除き、HBSS で 3 回洗浄した。
- 5) 無血清培地 200  $\mu$ l を添加した後、10 mmol/l となるように超純水で硫酸アンモニウム鉄 (II) 溶液を調製し、終濃度 100  $\mu$ mol/l となるように添加し混合した。
- 6) 37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内に 1 時間静置した後、溶液を取り除き、HBSS で 3 回洗浄した。
- 7) 細胞を共焦点レーザー顕微鏡で観察した(図 5)。

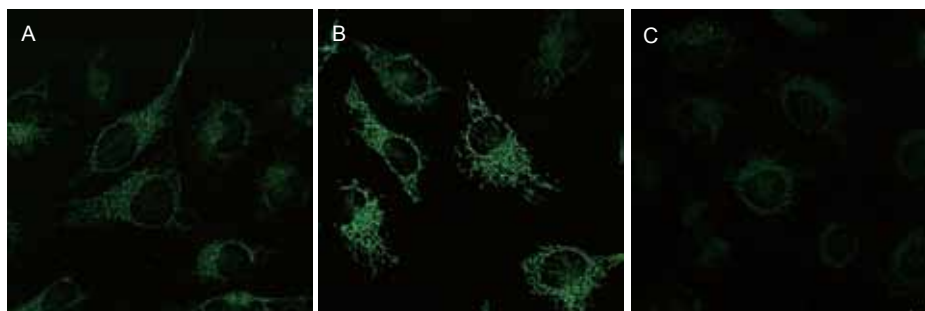


図 4 Mito-FerroGreen を用いたミトコンドリアの鉄 (II) の検出

A: 未処理の HeLa 細胞 B: 硫酸アンモニウム鉄 (II) 処理のみ C: 硫酸アンモニウム鉄 (II) 及び Deferoxamine 処理

<フィルター>

Ex/Em = 488 nm/ 500-550 nm

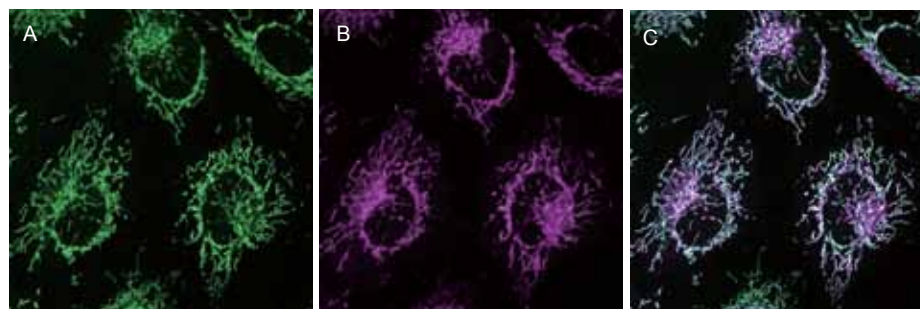


図 5 ミトコンドリア染色試薬との共染色

A: Mito-FerroGreen B: MitoBright Deep Red C: Merge

<フィルター>

Mito-FerroGreen (5  $\mu$ mol/l)

Ex/Em = 488 nm/ 500-550 nm

MitoBright Deep Red (200 nmol/l)

Ex/Em = 640 nm/ 656-700 nm

最新の測定データやアプリケーション、論文情報を小社 HP にて掲載。ご興味のある方は、小社 HP にて最新情報をご確認下さい。

Mito-FerroGreen 同仁 検索