

# 細胞内 pH を測定したい

## 使用製品

BCECF	[B031]
BCECF-AM	[B262]
BCECF-AM Special Packaging	[B221]

## 解析装置

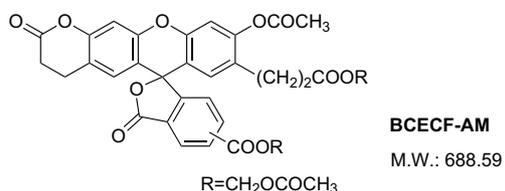
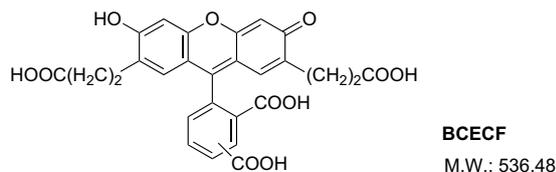


## I はじめに

細胞内 pH(pH<sub>i</sub>) は種々の細胞において、細胞内 Ca<sup>2+</sup> などと共に細胞機能の調節因子として働いていると考えられている。そのため、pH<sub>i</sub> の測定は細胞内反応の制御機構を理解するために重要である。従来 pH<sub>i</sub> は pH 電極や弱酸、弱塩基色素などを用いて測定されてきたが、測定感度、応答速度、検体数、操作の煩雑さ等の点において不十分であった。

pH 感受性の蛍光指示薬を導入して pH<sub>i</sub> を測定する方法は、5-Carboxyfluorescein 等が知られているが、色素の細胞外への漏出や中性域での検量線の直線性等が問題であった。Fluorescein 誘導体である BCECF の pKa は 6.98<sup>3)</sup> であり、その蛍光強度と pH との間には pH6.4 ~ 8.0 の範囲内で良好な直線関係があり、最も一般的に使用されている。ここでは蛍光性 pH 指示薬、特に BCECF を用いた実験について述べる。

BCECF の励起波長は 500 nm、蛍光測定波長は 530 nm であり、また 440 nm に等吸収点を持っているので、励起二波長測光も可能である。BCECF は高い親水性を有し細胞膜を透過しない。細胞内へ導入する際には、BCECF-AM を用いる。



## II BCECF の細胞内への負荷および測定方法<sup>1)</sup>

0.2 ~ 10 μmol/l の BCECF-AM(Code: B221, B262) を細胞浮遊液に加え、37°C で 15 ~ 60 分間インキュベーションして、BCECF を細胞内に導入する。中性 pH 付近における BCECF-AM の蛍光 (励起波長 500 nm) は微弱であるが、細胞内エステラーゼによって加水分解されて生じる BCECF は強い蛍光を示すので、負荷がうまくいっていれば細胞が黄白色を帯びているのが肉眼でも確認できる。

負荷量については、BCECF による蛍光が細胞や組織の自家蛍光の 5 ~ 6 倍以上あるのが望ましいが、負荷量が多すぎると細胞機能が抑制を受けるとの報告もある<sup>1)</sup>。

BCECF は細胞外への漏出が比較的少ないとされているが、ヒト血小板では色素導入後 2 時間で最高 20% に及ぶ色素の漏出を認めることがあり、BCECF 導入後速やかに測定する必要がある。蛍光分光光度計は恒温、攪拌装置が付属したものが望ましい。また、励起二波長測光を行うと、試薬の photobleaching や細胞外への漏出等の影響を除くことができ、再現性の良いデータが得られる。

測定後、蛍光シグナルのキャリブレーションを行い、pH<sub>i</sub> を求める。

## III 方法

### 1. ヒト好中球の細胞内 pH 測定

#### (1) 試薬

- ・好中球 (ヒト血液より調製)
- ・HEPES 緩衝液 (153 mmol/l NaCl, 5 mmol/l KCl, 5 mmol/l グルコース, 20 mmol/l HEPES(Code: GB10), pH7.4)
- ・BCECF-AM special packaging(Code: B221)
- ・キャリブレーション用緩衝液 (130 mmol/l KCl, 10 mmol/l NaCl, 1 mmol/l MgSO<sub>4</sub>, 10 mmol/l Na-MOPS)
- ・nigericin

#### (2) 付加及び測定法

- 1) HEPES 緩衝液に 4 × 10<sup>7</sup> cells/ml の濃度になるように懸濁する。
- 2) 1 mmol/l BCECF-AM solution を最終濃度 3 μmol/l になるように加え、37°C で 30 分間インキュベーションする。
- 3) 細胞外液中の BCECF-AM や凝集をおこした好中球を取り除くために HEPES 緩衝液で十分洗浄する。
- 4) BCECF を負荷した細胞を、3 × 10<sup>7</sup> cells/ml の濃度で緩衝液に懸濁して細胞浮遊液とする。
- 5) この細胞浮遊液の適量を取り、3 × 10<sup>6</sup> cells/ml とし、蛍光分光光度計で励起波長 500 nm、蛍光波長 530 nm で測定を行う。
- 6) 37°C、10 分間プレインキュベーションした後刺激剤を添加して、蛍光強度の変化を記録する。

#### (3) キャリブレーション<sup>3)</sup>

- 1) キャリブレーション用緩衝液の pH を例えば 6.6, 7.0, 7.2, 7.4, 7.8, 8.2 になるように正確に調整する。
- 2) 細胞浮遊液から細胞を分取 (3 × 10<sup>6</sup> cells/ml) し、遠心により洗浄した後、前述の既知キャリブレーション用緩衝液 1 ml に懸濁する。
- 3) nigericin を最終濃度 10 μg/ml となるように加え、10 分ほどインキュベートして蛍光強度を測定する。
- 4) 横軸に緩衝液の pH、縦軸に蛍光強度をプロットする。

## 2. 注意事項

- 1) BCECF を導入しにくい細胞系では、Fura 2 の場合と同様に Pluronic® F-127 等の界面活性剤を使用して下さい<sup>4)</sup>。
- 2) 励起二波長測光については、参考文献<sup>1,5)</sup>を参照して下さい。
- 3) nigericin は、エタノールで 2 mg/ml のストック溶液を調製しておくとう便利です。

## 参考文献

- 1) 尾崎由基男, 久米章司 著, 新化学実験講座 8 細胞内情報と細胞応答, 142 (東京化学同人).
- 2) J. A. Thomas, et al., *Biochemistry*, **1979**, *18*, 2210.
- 3) T. J. Rink, et al., *J. Cell Biol.*, **1982**, *95*, 189.
- 4) H. Ozaki, et al., *Jpn. J. Pharmacol.*, **1987**, *45*, 429.
- 5) I. Kurtz, *J. Clin. Invest.*, **1987**, *80*, 928.

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