

膜電位を測定したい

使用製品

DiBAC₄(3) [D545]

解析装置



I はじめに

細胞膜やオルガネラ膜の電位変化は情報伝達、エネルギーの産生などに関係しており、細胞の活動を議論するのに重要である。膜電位感受性色素は、電位変化に応じて再分布し吸収や蛍光の変化を起こす色素であり、膜電位の変化をモニターできる。

DiBAC₄(3)を細胞外液に添加してインキュベートすると、膜電位に応じた細胞膜内外の分布を示す。刺激によって細胞膜が脱分極すると、細胞質中へさらに色素が取り込まれる。取り込まれた色素は細胞内タンパクや細胞内膜に結合して、蛍光強度を増強を起こす(図1)¹⁾。その蛍光強度の変化を測定することで、膜電位をモニターできる。

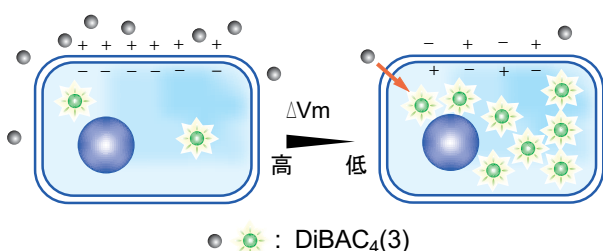


図1 膜電位変化によるDiBAC₄(3)の再分布モデル画像

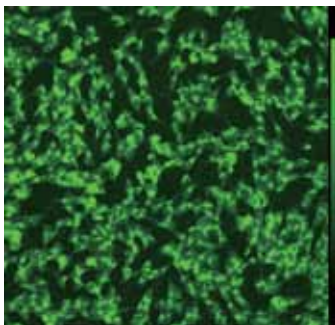


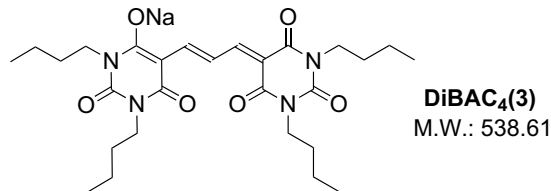
図2 DiBAC₄(3)で染色した細胞の蛍光顕微鏡画像

SH-SY5Y(Human Neuroblastoma Cell)に1 μmol/l DiBAC₄(3)[Hanks' -HEPES 溶液]を加え無刺激で10分後に観察した(B 励起)。画像提供 浜松ホトニクス株式会社。

Braunerらは、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ることを報告している²⁾。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と報告されている²⁾。

DiBAC₄(3)は、Bis-oxonol型のアニオン性膜電位感受性色素であり、DiBAC₄(5)やDiSBAC₂(3)などの他のBis-oxonol型や、スチリル系のdi-4-ANNEPS、シアニン系のDiOC₆(3)などの膜電位感受性色素に比べ、高い電位応答性を持っている²⁾。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³⁾、共焦点レーザー顕微鏡観察⁴⁾などで利用可能である。他にもカルシウムイオン濃度と膜電位の相関解析⁵⁾、抗生物質に対する細胞の生存率の分析³⁾、ATP感受性カリウムイオンチャネルの活性評価^{6,8)}などの研究に応用されている。最近では、High Throughput Screening (HTS)での細胞応答検出にも、頻繁に使用されている⁷⁾。

-Cellstain- Rh123(Code: R233)は細胞膜を透過してミトコンドリアを染色する色素⁹⁾として知られている。ミトコンドリア膜電位が低いほど累積しやすく、より強くミトコンドリアを染色すると考えられている。



II 蛍光顕微鏡を用いた膜電位測定方法⁴⁾

1. 使用試薬

- DiBAC₄(3)(Code: D545)
- Dulbecco's MEM (DMEM)
- FBS(fetal bovine serum)

2. 方法

- 1) 培養した細胞を測定するDMEMに移す。
- 2) FBSを添加する。(濃度範囲が2 ~ 15%で一定になるようにする)
- 3) DiBAC₄(3)を添加する。(濃度範囲が1 ~ 5 μmol/lで一定になるようにする)
- 4) 刺激による蛍光強度変化を蛍光顕微鏡で観察する。(Arレーザー(488 nm)の共焦点レーザー顕微鏡)DiBAC₄(3)の蛍光は温度により変化するため、一定温度(37°C)で測定する。細胞膜の電位が変化することで細胞質中の蛍光強度が変化することを観察できる。

III プレートリーダーを用いた膜電位測定方法⁸⁾

1. 使用試薬

- DiBAC₄(3) (Code: D545)
- アッセイ用緩衝液 (pH7.4; 20 mmol/l HEPES, 120 mmol/l NaCl, 2 mmol/l KCl, 2 mmol/l CaCl₂, 1 mmol/l MgCl₂, 5 mmol/l グルコース)

2. 方法

- 1) 細胞培養
マイクロプレート中で細胞を培養する。
- 2) 細胞洗浄
マイクロプレート中で培養した細胞を、5 μmol/lのDiBAC₄(3)を含むアッセイ用緩衝液200 μlで2回洗浄する。
- 3) 色素のロード
上記のDiBAC₄(3)を含むアッセイ用緩衝液180 μl中で、5%炭酸ガス存在下、37°Cで30分インキュベートする。
- 4) 測定
刺激による蛍光強度変化を蛍光プレートリーダーで測定する。DiBAC₄(3)の蛍光は温度により変化するため、一定温度(37°C)で測定する。DiBAC₄(3)を含むアッセイ用緩衝液に溶解した薬剤を20 μl加え、蛍光変化を30秒間隔で測定する。

IV 膜電位のキャリブレーション^{2, 10)}

1. 原理

膜電位が変化すると色素の分布が変わり、蛍光や吸収が変化する。この変化の大きさは、色素の分子数と細胞数の比・色素の全濃度・細胞の種類に依存する。膜電位のキャリブレーションは、目的とする細胞の膜電位を電極で直接測定し、その電位での蛍光や吸収強度を測定して比較することで行なう。

2. 使用試薬

- ・ DiBAC₄(3) (Code: D545)
- ・ Eagle-Dulbecco medium
- ・ PBS

3. 方法

- 1) 細胞を Eagle-Dulbecco medium で培養する。
- 2) 細胞を PBS 中、37°C で炭酸ガス存在下、30 ~ 60 分インキュベートする。インキュベート時間を変化させて異なった炭酸ガス濃度のサンプルを作る。
- 3) 最終濃度 2 μmol/l となるように DiBAC₄(3) を添加する。
- 4) 20 分後、それぞれの濃度における 517 nm での蛍光強度を測定し、その時の電位差を電極で直接測定する。
- 5) 蛍光強度と電位差を比較することでキャリブレーション曲線を描く。

4. 別法¹⁰⁾

カリウム拡散電位と蛍光や吸収強度を比較する方法がある。valinomycin はカリウム拡散電位を誘起する。カリウム拡散電位 (V) はネルンストの式より以下の式を与える。

$$V = -RT / F \log [K^+]_{in} / [K^+]_{out}$$

$$= -59 \log [K^+]_{in} / [K^+]_{out} \text{ (mV)}$$

よって、valinomycin の存在下、順次変化させた細胞外カリウムイオン濃度 $[K^+]_{out}$ と細胞内カリウムイオン濃度 $[K^+]_{in}$ とから拡散電位を計算し、それぞれの電位での蛍光や吸収強度を測定し、比較してキャリブレーション曲線を得ることができる。

参考文献

- 1) D. E. Epps, M. L. Wolfe, V. Groppi, *Chem. Phys. Lipids*, **1994**, *69*, 137.
- 2) T. Bräner, D. F. Hulser, R. J. Strasser, *Biochim. Biophys. Acta*, **1984**, *771*, 208.
- 3) D. J. Mason, R. Allman, J. M. Stark, D. Lloyd, *J. Microsc.*, **1994**, *176*, 8.
- 4) V. Dallsta, R. Getti, G. Orlandini, P. A. Rossi, B. M. Rotoli, R. Sala, O. Bussolati, G. C. Gazzola, *Exp. Cell Res.*, **1997**, *231*, 260.
- 5) T. T. Rohn, A. Sauvadet, C. Pavoine, F. Pecker, *Am. J. Physiol.*, **1997**, *273*, C909.
- 6) U. Langheinrich, J. Daut, *J. Physiol.*, **1997**, *502*, 397.
- 7) K. S. Schroeder, B. D. Neagle, *J. Biomol. Screening*, **1996**, *1*, 75.
- 8) M. Gopalakrishnan, K. L. Whiteaker, E. J. Molinari, R. Davis-Taber, V. E. S. Scott, C.-C. Shieh, S. A. Buckner, I. Milicic, J. C. Cain, S. Postl, J. P. Sullivan, J. Brioni, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1999**, *289*, 551.
- 9) L. V. Johnson, M. L. Walsh, L. B. Chen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1980**, *77*(2), 990.
- 10) V. Montana, D. L. Farkas, L. M. Loew, *Biochemistry*, **1989**, *28*, 4536.

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