

富士フイルム和光純薬株式会社
株式会社 同仁化学研究所

Fura 2-AM を用いた Calcium イオン濃度変化測定

Tecan Infinite® M200 を用いた蛍光測定

はじめに

カルシウムイオンは情報伝達に重要な役割を担っている。細胞内カルシウムイオンの動態を観察・測定することによりその役割について解明する研究が多くなされてきている。細胞内カルシウム動態をモニタリングする蛍光プローブは、カルシウムイオン選択的な錯体形成挙動を示す BAPTA 構造を持っており、Fura 2、Fluo 4、Rhod 2 などさまざまなものがある。これらのプローブは、生細胞内へ取り込ませるよう脂溶性を高めたアセトキシメチル (AM) 体が用いられている。アセトキシメチル基は細胞内でエステラーゼにより加水分解され、細胞内へ分散される。各種プローブは各々の蛍光特性、カルシウムイオン解離定数、蛍光安定性などを考慮して目的に応じて使い分ける。その中でも Fura 2 の使用頻度が高く、その理由として以下の 2 点が挙げられる。

(1) 二波長励起により蛍光強度比をとることによって、バックグラウンド蛍光、細胞からの蛍光色素の漏れや光による色素の分解などによる色素量の変化を気にせず、細胞内カルシウムイオンの濃度をより正確に測定することができる。

(2) 他の色素に比べ脂溶性が低いため、高脂溶性の部分への吸着が少なくより均一に細胞質内に分散できる。

ここでは、Fura 2-AM を用いたカルシウムイオン濃度変化測定について述べる。

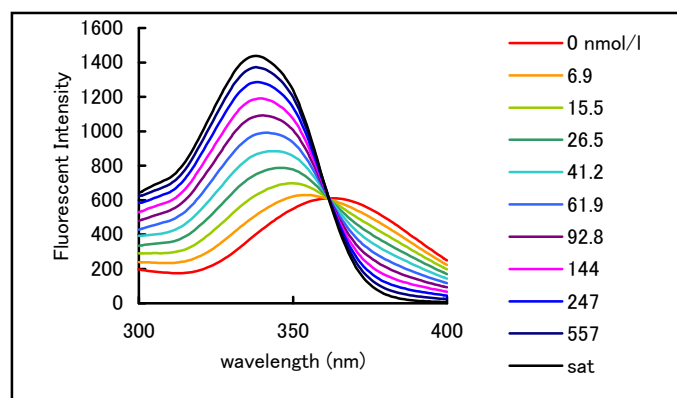
Fura 2 の蛍光特性

励起波長 : 340 nm / 380 nm、 蛍光波長 : 510 nm

カルシウムイオン濃度が高くなると 340 nm 励起の蛍光強度が上昇し、380 nm 励起の蛍光強度が低下する。そのときの蛍光強度比 ($R = F_{\text{ex. 340nm}} / F_{\text{ex. 380nm}}$) をとると、色素の濃度、光源の強度、細胞の大きさ等に関係なくカルシウムイオン濃度と対応づけられる。

Ca 錯体解離定数 (K_d) : 224 nmol/L

図. Fura 2 のカルシウムイオン濃度変化に対する励起波長変化



材料と方法

測定機器

- ・ Infinite M200

マイクロプレート

- ・ 96 ウェル オプティカルボトムブラックプレート (Nunc)

試薬および測定法

試薬

- ・ Fura 2-AM special packaging
- ・ Recording Medium
(20 mmol/L HEPES、115 mmol/L NaCl、5.4 mmol/L KCl、0.8 mmol/L MgCl₂、1.8 mmol/L CaCl₂、13.8 mmol/L glucose、pH 7.4)
- ・ 薬剤 (ATP、Carbachol)

試薬調製 (96 well プレート 1 枚分)

- ・ Fura 2-AM DMSO solution 調製
Fura 2-AM 50 μg (1 本) に DMSO 50 μL を添加し、ボルテックス等用いて溶解する。
- ・ Loading Buffer 調製
Recording Medium 10 mL に Fura 2-AM DMSO solution 50 μL 添加する。必要に応じて細胞内へカルシウムプローブを取り込みやすくする界面活性剤 Pluronic F-127 (0.04%)、細胞からカルシウムプローブを漏れ出しにくくする Probenecid (1.25 mmol/L) を添加する。

アッセイプロトコール (96 ウェルプレート 1 枚分)

- 1) 細胞の浮遊液を調整し、1 ウェルあたり 40,000 cells / 100 μL となるようにプレートに分注し、CO₂ インキュベーターで一晩培養する。
- 2) 細胞を傷つけないように培地を除去する。
- 3) 100 μL/well の Loading Buffer を、各ウェルに加える (必要に応じて、Loading Buffer を添加する前に、37°C に加温した PBS で細胞を洗浄する)。
- 4) 37°C で 1 時間、インキュベートする。
- 5) 細胞を傷つけないように Loading Buffer を除去する。
- 6) 予め 37°C に加温しておいた Recording Medium を、100 μL /well ずつ加える (必要に応じて、Recording Medium を添加する前に、37°C に加温した PBS で細胞を洗浄する)。
- 7) 薬剤添加による蛍光強度変化を、Infinite M200 にて測定する。

測定機器の設定

Infinite M200 (蛍光マイクロプレートリーダー)

Plate Definition 96well Flat Black microplate

Part of Plate Select rows

Well

Kinetic Cycle 100 cycles

Kinetic condition Handling for cycle 10

Injection Injector A injects 20 μ L with speed 200 μ L/sec.

Fluorescence Intensity (1) Ex. 340 nm/Em. 510 nm、Gain 100

Fluorescence Intensity (2) Ex. 380 nm/Em. 510 nm、Gain 100

Move Plate

結果

CHO 細胞(チャイニーズハムスター卵巣由来)を用いて、ATP¹⁾を10秒後に添加し、その蛍光変化からカルシウムイオンをモニタリングした。ATPを添加すると340nm励起の蛍光強度が上昇し、380nm励起の蛍光強度が減少しており、その比は上昇していることから、細胞内カルシウム濃度が高くなっていることが確認できた。(図1)

また、HEK293 細胞(ヒト胎児腎細胞)へ、アセチルコリン受容体を刺激する Carbachol²⁾を添加することでも同様の変化が見られた。(図2)

図1. CHO 細胞へ ATP (1 μ M) による刺激を与えた場合のカルシウムイオン濃度変化

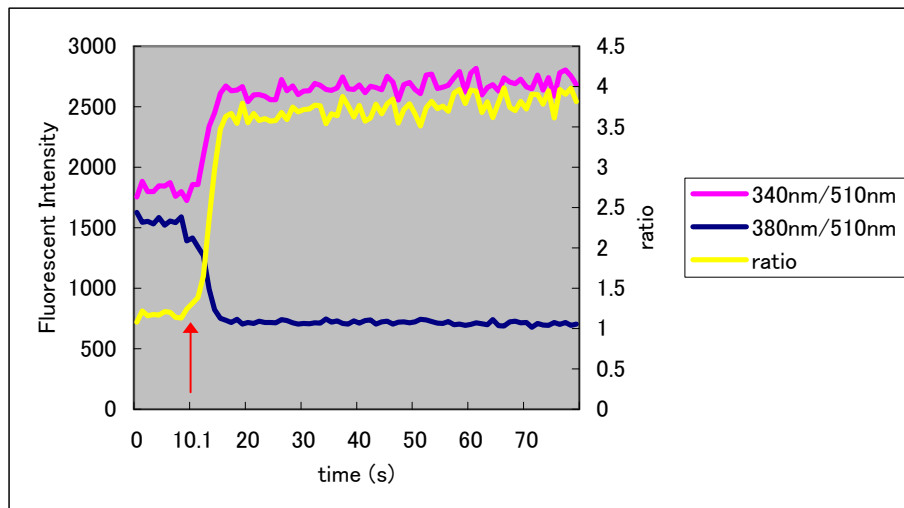
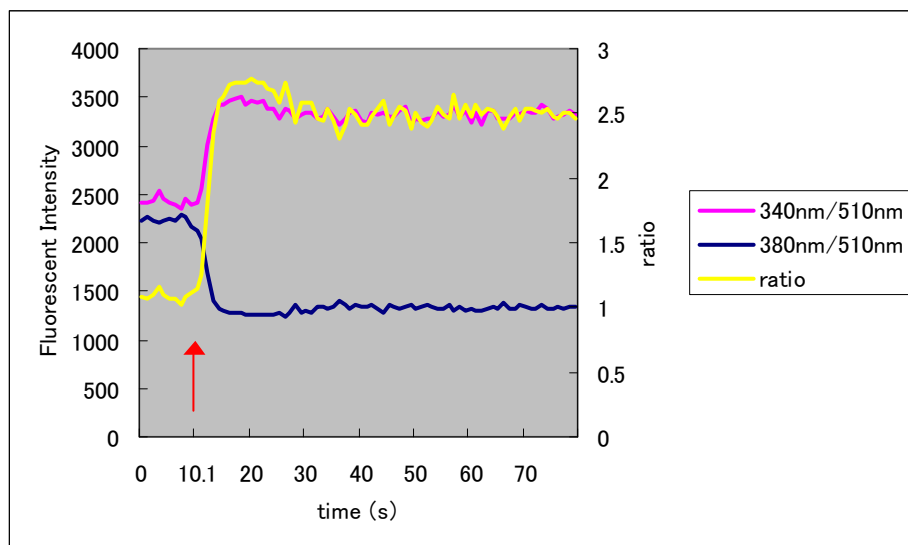


図 2. HEK293 細胞へ Carbachol (1mM) 刺激によるカルシウムイオン濃度変化



結論

Infinite M200 は二波長励起の測定が可能であり、また、インジェクターを備えることが可能のため、薬剤によるカルシウムイオン濃度変化がリアルタイムで確認できる。

正確なカルシウムイオン濃度を算出したい場合は、全プローブをカルシウムフリーにしたときの蛍光強度 (380nm 励起) および全プローブをカルシウム錯体にしたときの蛍光強度 (380nm 励起) をそれぞれ測定し、最後にマンガンイオンを細胞内へ取り込ませて自家蛍光を測定することで算出できる³⁾。

参考文献

- 1) G. Babnigg, T. Zagranichnaya, X. Wu and M. L. Villereal, *J. Biol. Chem.*, **2003**, *278*, 14872.
- 2) Y. Tawada, K. Furukawa and M. Shigekawa, *J. Biochem.*, **1988**, *104*, 795.
- 3) 同仁化学研究所 はじめての細胞内 Ca²⁺測定プロトコル

製品紹介 URL

- 1) 試薬 www.wako-chem.co.jp/siyaku/product/life/infinite200/index.htm#08
- 2) プレートリーダー www.wako-chem.co.jp/siyaku/kiki/multi/infinite_200pro/index.htm