

Fluo 4-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

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。ここでは、アルゴンレーザー励起（488 nm）が可能で、カルシウムとキレートした場合の蛍光強度変化が大きい Fluo 4-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。

Fluo 4-AM の蛍光特性

励起波長：495 nm、 蛍光波長：518 nm

Ca 錯体解離定数 (K_d)：360 nmol/L

測定原理

Fluo 4-AM は細胞内への移行を容易にするため、脂溶性のアセトキシメチル基が導入されている。Fluo 4-AM を培地中に添加すると容易に細胞内に取り込まれ、細胞内のエステラーゼにより加水分解される。加水分解された水溶性の Fluo 4 は細胞膜を透過しにくくなり、細胞内に拡散する。Fluo 4 の状態ではカルシウムと錯形成して強い蛍光を発するようになる。

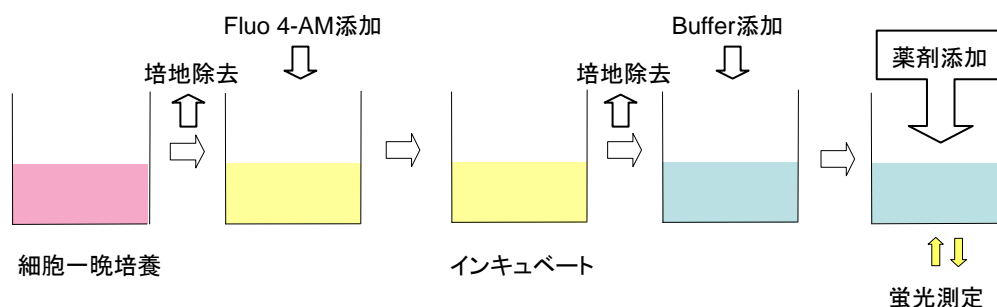


図 1 細胞内 Ca 測定法

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

- ・ Fluo 4-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)

試薬調製 (96 ウェルプレート 1 枚分)

- ・ Fluo 4-AM DMSO solution 調製
Fluo 4-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 Fluo 4-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、1well あたり 40,000 cells / 100 μL となるようプレートに分注し、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

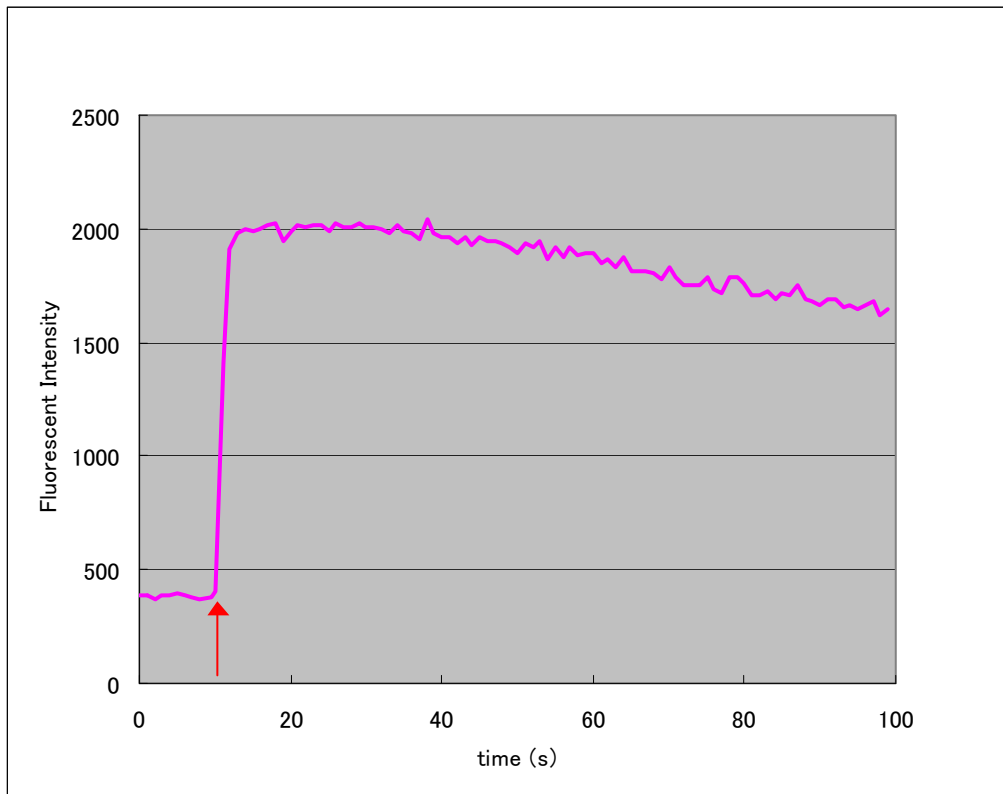
Infinite M200 (蛍光マイクロプレートリーダー)

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 μL with speed 100 μL/sec.
Fluorescence Intensity	Ex. 485 nm/Em. 535 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、ATP 刺激によるカルシウムイオン濃度変化を測定した。10 秒後に ATP を添加すると、蛍光強度が上昇し、細胞内のカルシウムイオン濃度が上昇していることを確認できた。（図 2）

図 2. CHO 細胞へ ATP (25 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



結論

Infinite M200 はインジェクターを備えることが可能なため、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。また、モノクロメータでの波長設定のため、更に蛍光特性に合致した波長での測定が可能であり、より高い蛍光強度での検出が可能である。

参考文献

- 1) 同仁化学研究所 はじめての細胞内 Ca^{2+} 測定プロトコル p. 4【実験例 1】

製品紹介 URL

- 1) 試薬 www.wako-chem.co.jp/siyaku/product/life/infinite200/index.htm#07
- 2) プレートリーダー www.wako-chem.co.jp/siyaku/kiki/multi/infinite_200pro/index.htm