

FerroOrange

货号: F374 规格: 1 tube / 3 tubes

胞内亚铁离子荧光探针
Technical Manual

概述

铁是生物体内最丰富的过渡金属元素，它参与各种生理过程活动。近年来，活细胞中的游离铁受到广泛关注，游离铁最常以其稳定的氧化还原态存在，即亚铁离子 (Fe^{2+}) 和铁离子 (Fe^{3+})。对研究者来说，在研究细胞内的还原环境，金属转运蛋白和 Fe^{2+} 的水溶性时，了解 Fe^{2+} 的行为比了解 Fe^{3+} 的行为更为重要。FerroOrange作为一种新型的荧光探针，可对活细胞内的 Fe^{2+} 进行荧光成像。

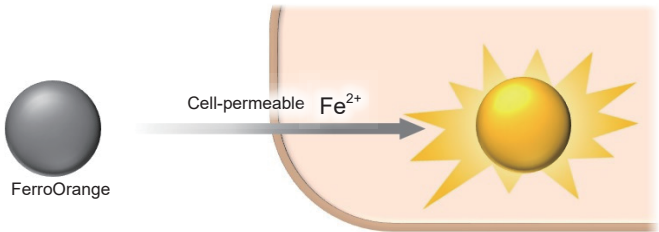


图1. FerroOrange检测胞内 Fe^{2+}

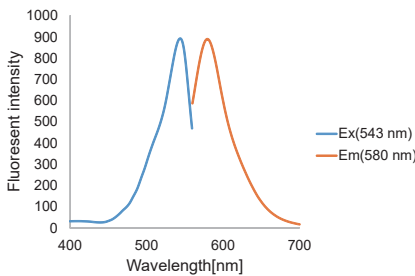


图2. FerroOrange荧光图谱

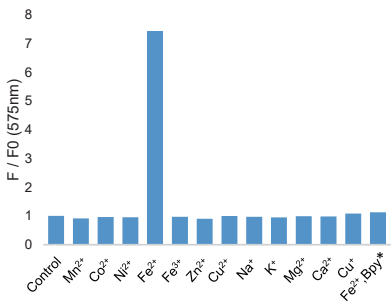


图3. FerroOrange与金属离子的选择性
Bpy: 2,2'-Bipyridyl (铁整合剂)

试剂内含

	1 tube	3 tubes
FerroOrange	24 $\mu\text{g} \times 1$	24 $\mu\text{g} \times 3$

储存条件

在0-5 避光保存。

所需的设备
和材料

- 二甲基亚砜 (DMSO)，二甲基甲酰胺 (DMF) 或乙醇
- HBSS
- 无血清培养基
- 微量移液器

溶液制备

在含有24 μg FerroOrange的管中加入35 μl DMSO，用移液器吹打混匀，配制得到1 mmol/l FerroOrange溶液。用HBSS溶液稀释1 mmol/l 的FerroOrange溶液，制备得到1 $\mu\text{mol/l}$ 的FerroOrange工作液。

- * DMF或乙醇也可以代替DMSO进行制备。
- * 1 mmol/l FerroOrange储存液在 -20 稳定1个月。1 $\mu\text{mol/l}$ FerroOrange工作液不稳定。需要现配现用，并尽快使用。
- * 必要时，可使用无血清培养基代替HBSS，血清会增加背景。

操作步骤

1. 接种细胞于荧光培养皿中，在37 $^{\circ}\text{C}$ ，5% CO_2 培养箱中过夜培养。
2. 弃去上清液，并用HBSS或无血清培养基洗涤细胞3次。
3. 更换含有药物的培养基，在37 $^{\circ}\text{C}$ ，5% CO_2 培养箱中培养。
* 请根据药物特性优化培养时间。
4. 去除培养基，用HBSS或无血清培养基清洗3次。
5. 加入浓度为1 $\mu\text{mol/l}$ 的FerroOrange工作液，在37 $^{\circ}\text{C}$ ，5% CO_2 培养箱中培养30分钟。
* 无需清洗，培养后直接进行观察。
6. 在荧光显微镜下观察细胞。

实验例

用FerroOrange检测HeLa细胞中的 Fe^{2+}

1. 将HeLa细胞接种在 μ -Slide 8孔板 (ibidi)中, 在37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中过夜培养。
2. 用无血清培养基洗涤3次后更换新鲜的无血清培养基。
3. 将硫酸亚铁(II) 铵(用ddH $_2\text{O}$ 配制, 浓度为10 mmol/l) 加入细胞中, 终浓度: 100 $\mu\text{mol/l}$ 。
4. 在37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中培养30分钟后, 用HBSS洗涤3次。
5. 将含有FerroOrange (1 $\mu\text{mol/l}$) 和2,2'-Bipyridyl (Bpy) (100 $\mu\text{mol/l}$) 的HBSS溶液加到细胞中, 在37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中培养30分钟。
6. 在激光共聚焦显微镜下观察细胞。

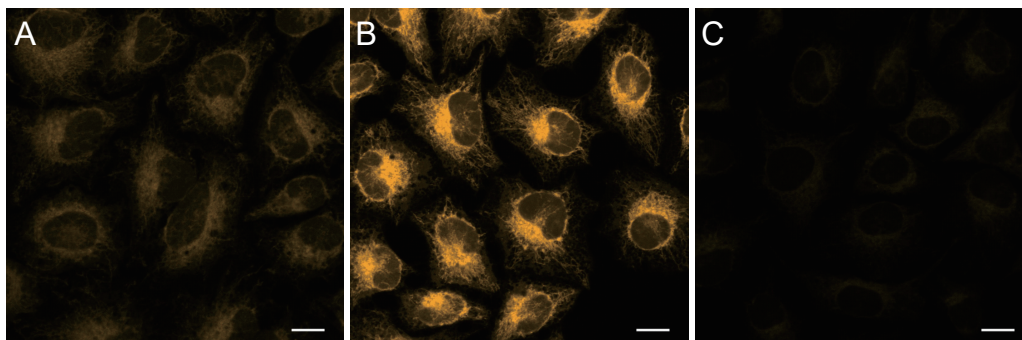


图4. FerroOrange检测细胞内 Fe^{2+}

Ex/Em = 561 nm/570 - 620 nm

A: 对照组

B: 硫酸亚铁(II) 铵处理

C: 硫酸亚铁(II) 铵和2,2'-Bipyridyl (Bpy) 处理

比例尺: 20 μm

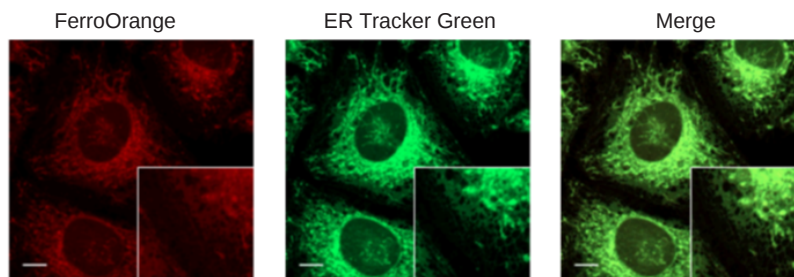
与对照组的细胞相比, 用硫酸亚铁(II) 铵处理的HeLa细胞的FerroOrange荧光强度增加。相反, 在用Bpy处理的细胞中, 其荧光强度降低。因此, 证明FerroOrange与细胞内 Fe^{2+} 反应。

与其它染料共染

FerroOrange与各种细胞内的染色试剂共染

用不同试剂染色HeLa细胞, 清洗细胞。然后将FerroOrange加到细胞中, 并用荧光显微镜观察。

1、与ER染色试剂共染



< 检测条件 >

FerroOrange:

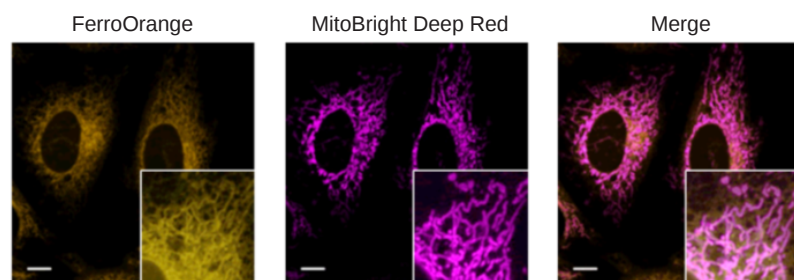
Ex: 561 nm/Em: 570 - 620 nm

ER Tracker Green (ER染色试剂):

Ex: 488 nm/Em: 510 - 555 nm

标尺: 10 μm

2、与线粒体染色试剂共染



< 检测条件 >

FerroOrange:

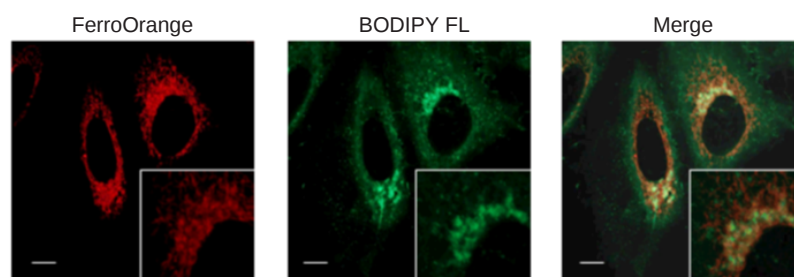
Ex: 561 nm/Em: 570 - 620 nm

MitoBright Deep Red (线粒体染色试剂):

Ex: 640 nm/Em: 650 - 700 nm

标尺: 10 μm

3、与高尔基体染色试剂的共染



< 检测条件 >

FerroOrange:

Ex: 561 nm/Em: 570 - 620 nm

BODIPY FL (高尔基体染色试剂):

Ex: 488 nm/Em: 510 - 555 nm

标尺: 10 μm

该产品在Dr. Hideko Nagasawa 和 Dr. Tasuku Hirayama (岐阜药科大学) 的指导下研制。

Q1：如果发生铁死亡，细胞膜破裂，FerroOrange的荧光是否存在？

A1：由于FerroOrange是活细胞探针，对死细胞无法发挥出探针的正常性能。

Q2：FerroOrange只能检测游离铁吗？是否可以检测某些如铁硫蛋白里的结合铁？

A2：FerroOrange只能检测游离的二价铁，不能检测结合铁。

Q3：FerroOrange适合用哪些仪器检测？

A3：见下表：

Ex (nm)	Em (nm)	荧光显微镜	流式细胞仪 (FL2)	荧光酶标仪
543	580	○		○

我们建议使用绿色激发光 (Ex: 532 nm) 激发FerroOrange。

Q4：染色时需要注意什么？

A4：注意事项如下，

1、FerroOrange染色后是否需要更换培养基？

更换培养基会导致FerroOrange泄漏到细胞外，因此染色后不要更换培养基。

2、对照实验。

为了检查铁检测的实验条件，建议准备1个加入铁螯合剂Bpy (2,2'-Bipyridine) 或硫酸亚铁(II) 铵的样品，并观察FerroOrange荧光强度的变化。

3、细胞染色后荧光强度弱的解决办法。

根据细胞种类的不同，染色程度也有差异。

如果荧光强度弱，建议FerroOrange Working Solution的浓度高于推荐的1 $\mu\text{mol/l}$ ，可在1-5 $\mu\text{mol/l}$ 范围内摸索最佳染色浓度。

Q5：使用荧光酶标仪的操作步骤

A5：请参考下面的实验例进行检测：

<测定样品>。

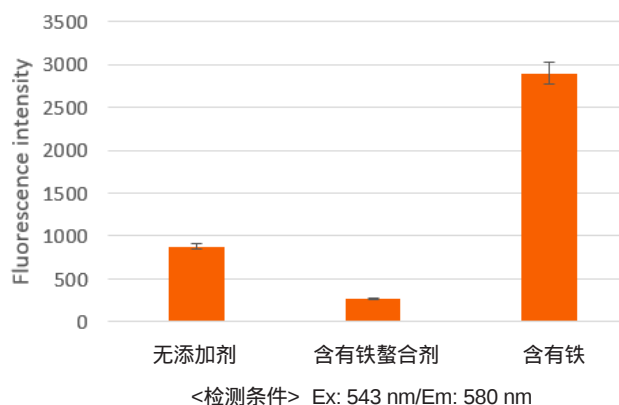
样品A：无添加剂(仅HeLa细胞)。

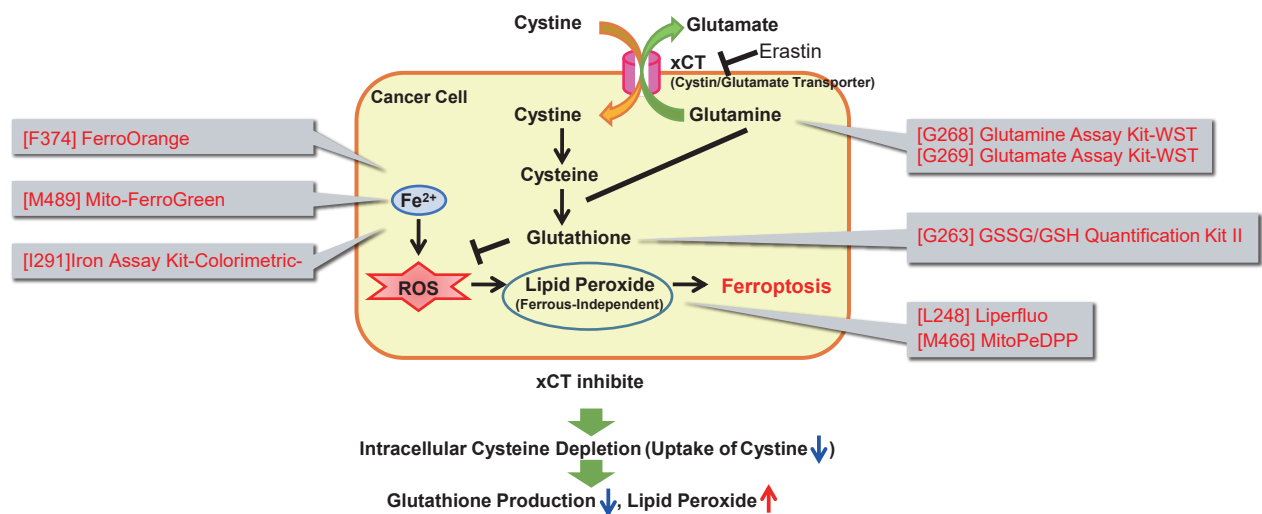
样品B：含有铁螯合剂2,2'-Bipyridyl(Bpy)的HeLa细胞。

样品C：含有硫酸亚铁(II) 铵的HeLa细胞。

<检测步骤>

- 1、在96孔透明底黑板上接种100 μl HeLa细胞，细胞数量为10,000个细胞/孔，在37 $^{\circ}\text{C}$ ，5% CO_2 培养箱中过夜培养。
- 2、用100 μl 不含FBS的MEM培养基清洗样品C的细胞3次。
- 3、向样品C中加入100 μl 含有硫酸亚铁(II) 铵的MEM(不含FBS)培养基 (终浓度: 100 $\mu\text{mol/l}$)，在37 $^{\circ}\text{C}$ ，5% CO_2 培养箱中静置30分钟。
- 4、用100 μl HBSS清洗所有孔的细胞3次。
- 5、向样品A和C中加入100 μl 的1 $\mu\text{mol/l}$ FerroOrange Working Solution，向样品B中加入100 μl 含有FerroOrange (终浓度：1 $\mu\text{mol/l}$)和Bpy(终浓度：100 $\mu\text{mol/l}$)的HBSS溶液，在37 $^{\circ}\text{C}$ ，5% CO_2 培养箱中培养30分钟。
- 6、用多功能酶标仪检测各样品的荧光强度 (Ex:543 nm/Em:580 nm)。





参考文献

1. Maintaining Iron Homeostasis Is the Key Role of Lysosomal Acidity for Cell Proliferation, <i>Molecular Cell</i> , 2020 , 77(3), 645-655.e7	293T cells (人肾上皮细胞系)
2. Versatile iron-vitamin K3 derivative-based nanoscale coordination polymer augments tumor ferroptotic therapy, <i>Nano Research</i> , 2020 , doi.org/10.1007/s12274-020-3241-7	CT26 cells (小鼠结肠癌细胞)
3. Induction of ferroptosis in response to graphene quantum dots through mitochondrial oxidative stress in microglia, <i>Part. Fibre. Toxicol.</i> , 2020 , 17(1): 30. doi: 10.1186/s12989-020-00363-1	BV2 cells (小鼠小胶质瘤细胞)
4. FTY720 induces ferroptosis and autophagy via PP2A/AMPK pathway in multiple myeloma cells, <i>Life Sciences</i> , 2020 , 260, 118077	Multiple Myeloma cells (多发性骨髓瘤细胞)
5. PM2.5 induces ferroptosis in human endothelial cells through iron overload and redox imbalance, <i>Environmental Pollution</i> , 2019 , doi.org/10.1016/j.envpol.2019.07.105	Endothelial cells (血管内皮细胞)
6. Activation of p62-Keap1-Nrf2 Pathway Protects 6-Hydroxydopamine-Induced Ferroptosis in Dopaminergic Cells, <i>Molecular Neurobiology</i> , 2020 , 57(11), 4628-4641	SH-SY5Y cells (人神经母细胞瘤细胞)
7. Inhibition of ferroptosis protects House Ear Institute-Organ of Corti 1 cells and cochlear hair cells from cisplatin-induced ototoxicity, <i>J. Cell Mol. Med.</i> , 2020 , 24:12065-12081	HEI-OC1 cells (耳蜗毛细胞)
8. Cytochrome promotes sensitivity to ferroptosis by regulating p53 - YAP1 axis in colon cancer cells, <i>J. Cell. Mol. Med.</i> , 2021 , 00, 1-12	HCT 116 cells (人结肠癌细胞)
9. Dihydroartemisinin-loaded Magnetic Nanoparticles for Enhanced Chemodynamic Therapy, <i>Front. Pharmacol.</i> , 2020 , doi.org/10.3389/fphar.2020.00226	MCF-7/ADR cells (人乳腺癌细胞)
10. Periodontitis-level butyrate-induced ferroptosis in periodontal ligament fibroblasts by activation of ferritinophagy, <i>Cell Death Discovery</i> , 2020 , 6,119, doi.org/10.1038/s41420-020-00356-1	Periodontal Ligament Fibroblasts cells (牙周膜成纤维细胞)



网址 : <http://www.dojindo.cn> E-mail: info@dojindo.cn



如果您需要更多的信息或者有任何问题可以通过以下的方式联系我们 :

东仁化学科技 (上海) 有限公司

上海

上海市零陵路899号飞洲国际广场27楼J座

邮编 : 200030

电话 : 400-823-9388

北仁化学科技 (北京) 有限公司

北京

北京市朝阳区德外马甸裕民路12号元辰鑫大厦E1-210室

邮编 : 100029

电话 : 010-8225-1765

2024年4月