FerroOrange

胞内亚铁离子荧光探针

货号: F374　规格: 1 tube / 3 tubes

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。

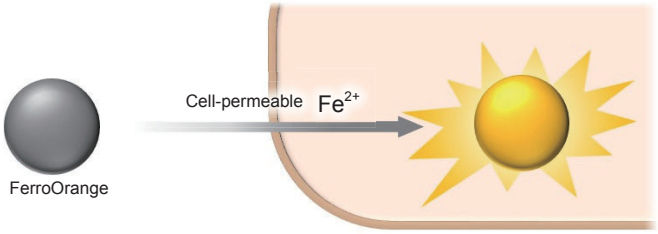


图1. FerroOrange检测胞内Fe^{2+}

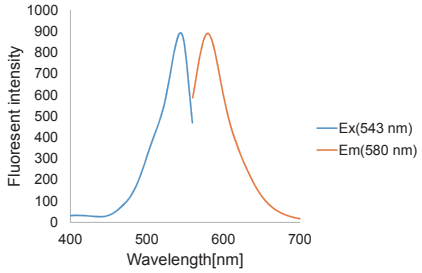


图2. FerroOrange荧光图谱

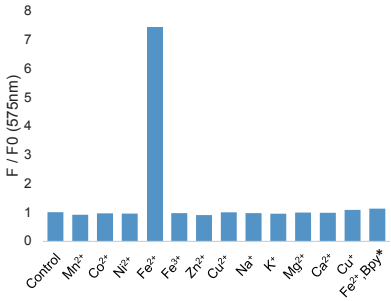


图3. FerroOrange与金属离子的选择性
Bpy: 2,2'-Bipyridyl (铁螯合剂)

试剂内含

	1 tube	3 tubes
FerroOrange	24 μg×1	24 μg×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 μmol/l 的FerroOrange工作液。
* DMF或乙醇也可以代替DMSO进行制备。 该溶液在-20°C稳定1个月。
1 μmol/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°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°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 μmol/l的FerroOrange工作液，在37°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°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_2O配制，浓度为10 mmol/l) 加入细胞中，终浓度: 100 μmol/l。
4. 在37°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 μmol/l) 和2,2'-Bipyridyl (Bpy) (100 μmol/l) 的HBSS溶液加到细胞中，在37°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。

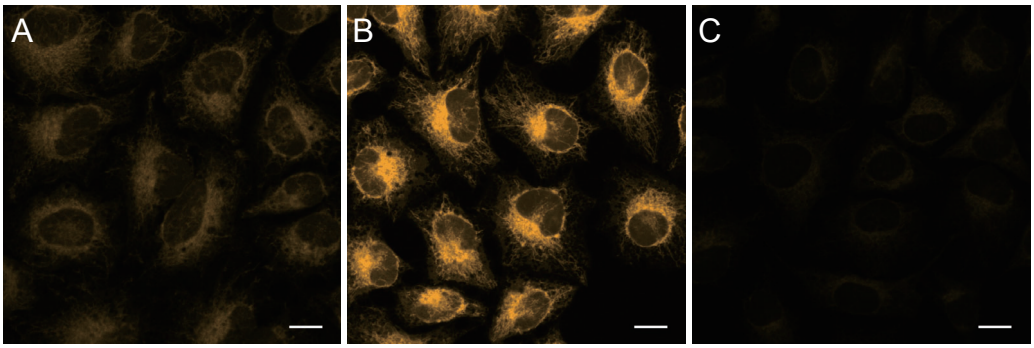


图4. FerroOrange检测细胞内Fe^{2+}

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。

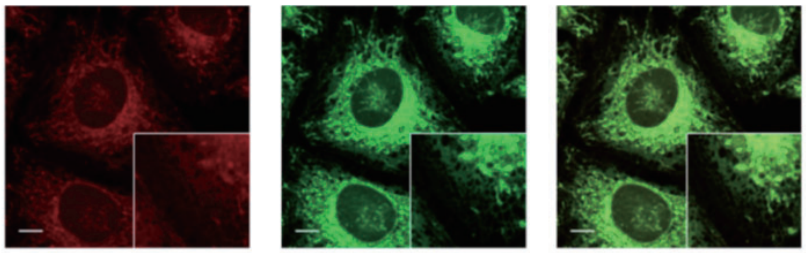
与其它染料共染

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

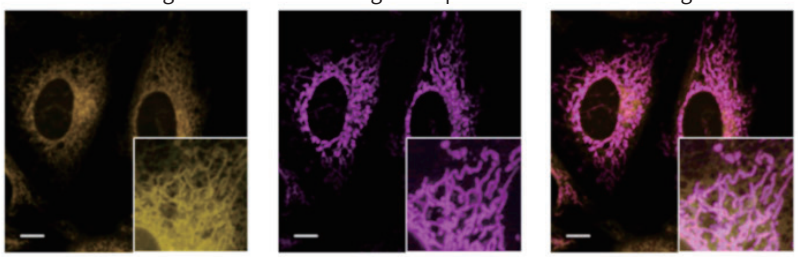
FerroOrange　ER Tracker Green　Merge



＜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

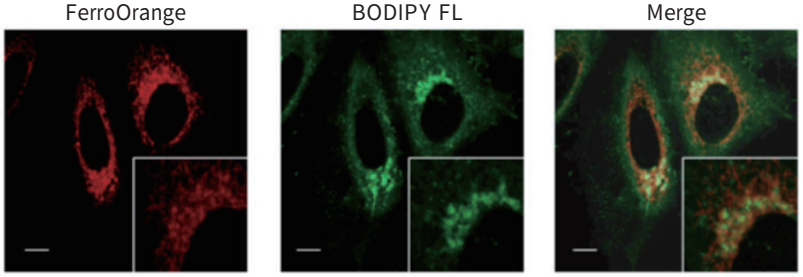
FerroOrange　MitoBright Deep Red　Merge



＜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

FerroOrange　BODIPY FL　Merge



＜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。

Q&A

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 μmol/l，可在1-5 μmol/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°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。

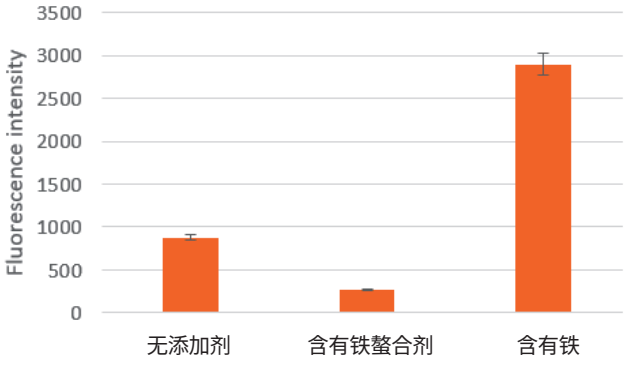
3、向样品C中加入100 μl含有硫酸亚铁(Ⅱ) 铵的MEM(不含FBS)培养基 (终浓度: 100 μmol/l)，在37°C，5% CO_2培养箱中静置30分钟。

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 μmol/l FerroOrange Working Solution，向样品B中加入100 μl含有FerroOrange (终浓度：1 μmol/l)和Bpy(终浓度：100 μmol/l)的HBSS溶液，在37°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

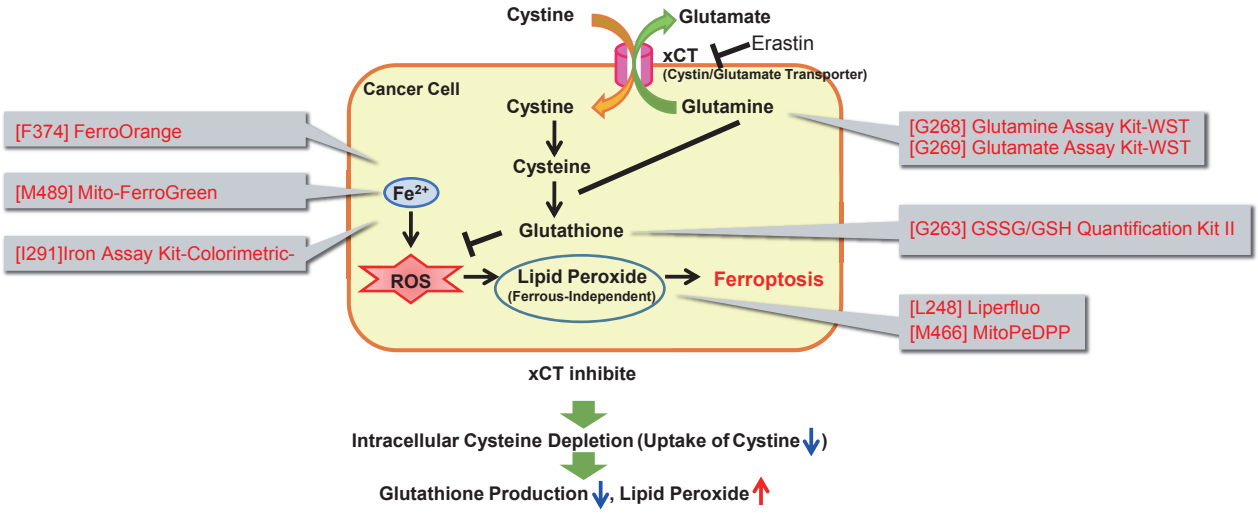
(Ex:543 nm/Em:580 nm)。



<检测条件> Ex: 543 nm/Em: 580 nm

关联产品

有关铁死亡研究的关联产品



参考文献

1. Maintaining Iron Homeostasis Is the Key Role of Lysosomal Acidity for Cell Proliferation, *Molecular Cell*, **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, *Nano Research*, **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, *Part. Fibre. Toxicol.*, **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, *Life Sciences*, **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, *Environmental Pollution*, **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, *Molecular Neurobiology*, **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, *J. Cell Mol. Med.*, **2020**, 24:12065-12081	HEI-OC1 cells (耳蜗毛细胞)
8. Cytoglobin promotes sensitivity to ferroptosis by regulating p53 - YAP1 axis in colon cancer cells, *J. Cell. Mol. Med.*, **2021**, 00, 1-12	HCT 116 cells (人结肠癌细胞)
9. Dihydroartemisinin-loaded Magnetic Nanoparticles for Enhanced Chemodynamic Therapy, *Front. Pharmacol.*, **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, *Cell Death Discovery*, **2020**, *6*,119, doi.org/10.1038/s41420-020-00356-1	Periodontal Ligament Fibroblasts cells (牙周膜成纤维细胞)

DOJINDO

科学指南针
中国大型科研服务机构

郑州费曼生物科技有限公司
Zhengzhou Feynman Biotechnology Co., Ltd
商城网址：mall.shiyanjia.com
电话 Tel：400-831-0631