

Coelenterazine 400a 腔肠素 400a

产品信息

产品名称	产品编号	规格
Coelenterazine 400a 腔肠素 400a	40905ES02	1×500 µg
	40905ES03	2×500 µg

背景描述

腔肠素 (Coelenterazine) 是自然界中资源最丰富的天然荧光素, 是绝大多数海洋发光生物 (超过 75%) 的光能贮存分子。腔肠素可作为许多荧光素酶的底物, 比如海肾荧光素酶 (Rluc), *Gaussia* 分泌型荧光素酶 (Gluc), 以及包括水母发光蛋白 (aequorin) 和蕈枝螅发光蛋白 (Obelia) 在内的光蛋白 (Photoproteins)。其发光原理是: 以腔肠素为底物的荧光素酶在有分子氧的条件下, 氧化腔肠素, 产生高能量的中间产物, 并在此过程中发射蓝色光, 峰值发射波长约为 450~480 nm。

腔肠素作为水母发光蛋白复合物 (Aequorin) 的组成成分, 只有与钙离子 (Ca^{2+}) 结合后, 才能被氧化生成高能量产物 Coelenteramide, 同时释放出 CO_2 和蓝色荧光 (~466 nm)。其具有以下几个优点: 1) 能检测较大范围的 Ca^{2+} 浓度 (0.1-100 μM); 2) 样品无自体荧光, 背景荧光较低, 尽管信号较荧光钙离子指示剂弱, 但信噪比更高, 因此具有较高灵敏度; 3) Aequorin 能够稳定维持在细胞内, 能够进行数小时至数天 Ca^{2+} 的监测。

腔肠素具有能量转移 (Bioluminescence Resonance Energy Transfer, BRET) 的特性: 在底物腔肠素存在的情况下, 荧光素酶 (如 Rluc) 催化底物发生蓝光, 能量转移到 EYFP (增强的黄色荧光蛋白), 发出绿光 (~530 nm)。通过 Rluc 融合蛋白和 EYFP 融合蛋白两者间的相互关系研究蛋白-蛋白之间的相互作用。BRET 的信号可通过比较绿光和蓝光的量来进行测定, 消减了因细胞数、细胞类型和其他实验变量而引起的数据变量。

主要应用

活体成像; 报告基因检测; 检测细胞/组织内活性氧 (ROS) 水平: 细胞和组织内的超氧阴离子和过氧化亚硝基阴离子能够增强腔肠素在酶非依赖性的氧化体系中自发荧光; 高通量筛选; 监测活细胞内钙离子水平。

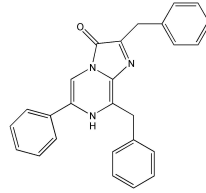
产品描述

腔肠素 400a (Coelenterazine 400a) 系天然腔肠素衍生物, 是海肾荧光素酶 (Rluc) 的良好底物, 但不能被 *Gaussia* 分泌型荧光素酶 (Gluc) 氧化。它的最大发射波长在 400 nm 左右, 对 GFP 受体蛋白的信号干扰最小, 使得其成为 BRET 研究的首选腔肠素类底物。

产品性质

英文别名 (English synonym)	DeepBlueC™; Di-dehydro Coelenterazine
CAS 号 (CAS NO.)	70217-82-2
分子式 (Formula)	$\text{C}_{26}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}$
分子量 (Molecular weight)	391.48 g/mol
外观 (Appearance)	黄色至橘色粉末
溶解性 (Solubility)	溶于甲醇和乙醇, 不溶于 DMSO
纯度 (Purity) (TLC)	>98%

结构 (Structure)



运输和保存方法

冰袋运输。粉末-20℃避光干燥保存，最好保存在惰性气体环境下，避免接触空气。有效期1年。

腔肠素 400a 工作液的配制

腔肠素 400a 溶解特性：不溶于水。目前毒性最低的溶剂是 100%乙醇，可配制浓度为 0.1-1 mg/ml。加入 pH 低于 7.0 的酸性缓冲液（碱性 pH 会快速降解底物）稀释成低浓度工作液。**切忌溶于 DMSO。**

腔肠素 400a 保存特性：建议溶液现配现用！体外实验，需将稀释后的工作液室温放置 20-30 min，方可稳定工作。该工作液可室温稳定放置 3-4 h，有非常微弱的信号衰减发生。**不建议**储存液-20℃或更低温度保存，因为其高能量的二氧环丁酮结构即使在低温的情况下也会发生降解，导致荧光强度明显变弱。短时间保存条件：-70℃避光保存于塑料管内（溶液中不含有 Ca²⁺），且有惰性气体保护。

腔肠素工作液的配制：称取 1 mg 腔肠素 400a 粉末溶解于 1 ml 乙醇（或甲醇）中配置成浓度为 1 mg/ml 的母液。在使用时需将母液用合适的缓冲液（比如 PBS）稀释成需要浓度的工作液。比如常用的工作液浓度是 100 μM，可使用 391.5ul 的 1 mg/ml 的母液用 PBS 稀释到 10ml，得到一个 100uM 的溶液。

BRET 生物发光共振能量转移（可根据具体实验发生变动）

详细步骤可参考文献：Gersting SW, et al. Bioluminescence resonance energy transfer: an emerging tool for the detection of protein-protein interaction in living cells. *Methods Mol Biol.* 815:253-63 (2012)。

本步骤以 Rluc 的融合蛋白作为能量供体，YFP 的融合蛋白作为能量受体，两者同时电转化进入细胞，并通过加载腔肠素 400a 底物来启动氧化反应，通过分析两者 BRET 信号来研究两个蛋白之间的相互作用。

1. 按照正常流程将能表达两个融合蛋白的质粒，按照 3:1 的比例（YFP: Rluc）共电转染进入细胞。
2. 转染后 24 h 进行 BRET 信号的检测。吸去培养液（留约 30 μl）后，将 96 孔板放到荧光酶标仪上。
3. 至少在测定前 15 min 准备腔肠素 400a 工作液。
4. 用超纯水清洗注射泵后，让泵开始自动吸取配制好的 400a 工作液，按照每孔 70 μl 工作液的量顺序加入，使得每孔中底物的终浓度为 30 μM。进样结束后，孵育 2 min。之后立即进行双波长荧光信号读数，即 Rluc 信号（485 nm）和 BRET 信号（535 nm）。

BRET 信号值计算

为了能够进行数据评估，转染细胞的 Rluc 信号（485 nm）应当超过非转染对照细胞的（平均值+9×标准误差）的区间。

1. BRET-ratio（BRET 信号比）基于以下等式进行计算，

$$R = (I_A/I_D) - cf$$

R 代表 BRET 比值，I_D 表示受体 YFP 荧光信号的强度（535 nm），I_A 表示供体 Rluc 荧光信号的强度（485 nm），cf 表示校正因子（BRET_{control}/Rluc_{control}D），对照样本是指共转染 YFP 融合蛋白质粒和不含供体第二个研究蛋白的 Rluc 载体的细胞荧光信号。

2. 阳性对照，使用 YFP-Rluc 融合蛋白的 BRET 比值为 1.0。
3. 若蛋白之间有阳性反应，必须检测到：8 组蛋白样本中至少有一组能够产生超过设定阈值 0.1 以上的 BRET 信号比值。

注意事项

1. 粉末最好使用惰性气体（氮气或氩气），在密封良好的塑料管中避光保存于-20℃，长期保存于-70℃。管内即使存在少量空气，可能造成腔肠素 cp 氧化失活，造成在不同试验间的量化分析结果无法比较。
2. 本品接触空气，水或者任何氧化试剂会不稳定。
3. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
4. 本产品仅作科研用途！