

Fluo-4, AM, Cell Permeant 细胞膜可渗透钙离子荧光探针

产品信息

产品名称	产品编号	规格
	40704ES50	50 µg
Fluo-4, AM, Cell Permeant 细胞膜可渗透钙离子荧光探针	40704ES72	5×50 µg
	40704ES80	1 mg

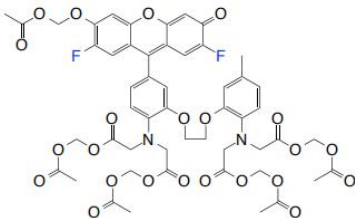
产品描述

细胞生物学实验中常使用 Fluo-3, AM 作为一种荧光探针来检测细胞内钙离子浓度变化。其检测原理基于 Fluo-3, AM 可穿透细胞膜进入细胞，之后被细胞内的酯酶剪切形成 Fluo-3，从而被滞留在细胞内。Fluo-3 游离配体几乎是非荧光性的，其荧光不会随钙离子浓度升高而增强。但是，当它与细胞内钙离子结合后可以产生较强的荧光，荧光会增加 60 至 80 倍。

Fluo-4, AM 是钙指示剂 Fluo-3, AM 的升级版本，主要变化为后者分子上的两个氯原子被 Fluo-4, AM 上的氟所取代，该结构上的微小变化使 Fluo-4, AM 加载更快，在相同浓度下检测信号更强。

本产品为 Fluo-4, AM 粉末状，用于细胞内钙离子检测时，Fluo-4, AM 的常用浓度为 0.5-5 µM。

产品性质

CAS 号 (CAS NO.)	273221-67-3
分子式 (Molecular Formula)	C ₅₁ H ₅₀ F ₂ N ₂ O ₂₃
分子量 (Molecular Weight)	1096.94
Ex/Em (nm, Ca ²⁺ -bound)	Ex/Em=494 nm/516 nm
纯度 (HPLC Purity)	≥90%
外观 (Appearance)	橙红色粉末
结构式 (Structure)	

运输与保存方法

室温运输。-20℃干燥避光保存，有效期一年。

注意事项

- 1) 荧光染料均存在淬灭问题，请尽量注意避光，以减缓荧光淬灭。
- 2) 乙酰氧基甲基酯 (Acetoxymethyl ester, AM) 容易吸潮，从冰箱取出后，请确认在干燥的环境放至室温后再开封。由于试剂极其微量，开封前请将其短暂离心，以保证粉末落入管底。
- 3) 第一次使用时，建议母液现配现用。且溶解后的试剂尽可能在短时间内使用，以保证实验效果。
- 4) 母液遇水极易分解，若单次不能用完，建议分装保存，例如 5µl/管，用封口膜封口，并严格做到≤-20℃密封干燥保存。
- 5) 建议您在正式实验前先摸索一下细胞量、钙离子荧光探针的终浓度、培养时间等，找到最佳实验条件。
- 6) 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
- 7) 本产品仅作科研用途！

需要试剂准备

1) (可选)配制 **Pluronic F-127 母液**: 100mg Pluronic F-127 粉末(Cat No. 60318ES60)中加入 0.5 mL DMSO, 配制成 20%(w/v) 的 DMSO 母液。溶解过程需要在 40-50℃加热 20-30 min。溶液室温保存, 不要冷藏。如果有结晶析出, 可以重新加热后溶解, 不影响使用。

2) Hanks•balanced salt solution

操作方法

1) **Fluo-4,AM 母液的配制**: 向 Fluo-4,AM 中加入适量 DMSO, 配制成 1-5 mM 的储存液, DMSO 的加入量根据 Fluo-4,AM (MW1096.94) 分子量进行计算(如: 若配制成 1 mM 的母液, 需向 50 μ g Fluo-4,AM 中加入 45.6 μ L DMSO)。

【注】: 溶解用的 DMSO 需要保证新鲜无水, 否则将会导致 AM 水解, 使荧光染料无法进入细胞, 影响实验效果。

2) **Fluo-4,AM 工作液的配制**: 利用 HBSS 将 Fluo-4,AM 稀释成 1-5 μ M 的工作液, 具体稀释方法如 1 mM 母液配制 1 mL 浓度为 4 μ M 工作液, 用 1 mL HBSS 溶液稀释 4 μ L 1 mM 母液即可。

【注】: ① 推荐该探针加载浓度在 4-5 μ M, 具体的使用浓度需根据实验要求进行优化。为了避免过度加载造成细胞毒性, 建议在取得有效结果的基础上尽量使用最低探针浓度。

② Fluo-4,AM 工作液需现配现用, 避免反复冻存。

3) (可选) 如果 Fluo-4 进入细胞的效果不好, 可向 Fluo-4, AM/DMSO 溶液中加入适量 20% Pluronic F-127 溶液, 最终稀释至其浓度为 0.04-0.05%, Pluronic F-127 可以防止 Fluo-4, AM 在 HBSS 中聚合并能帮助其进入细胞。同时, 可将丙磺舒 (1-2mM) 添加到染料工作溶液中(最终浓度为 0.5-1mM), 以减少脱酯化指标的泄漏。

【注】: Pluronic F-127 可降低 Fluo-4,AM 的稳定性, 因此只建议在配制工作液时加入, 不建议将其加入储存液长期保存。

4) 取出预培养的细胞, 除去培养基, 使用 HBSS 溶液洗涤细胞 3 次。

【注】: 如果使用含血清的培养基, 血清中的酯酶会分解 AM 基团, 从而降低 Fluo 4-AM 进入细胞的效果。另外含有酚红的培养基会使本底值略微偏高, 所以加工作液之前需尽量去除培养基残留。

5) 将 Fluo-4, AM 工作液加入细胞, 加入量以覆盖细胞为准。在 37℃培养 10-60 min, 然后除去 Fluo 4-AM 工作液。

【注】: ① 关于孵育的时间, 如果首次做实验不能确定, 建议先孵育 30 min, 看荧光效果: 如果细胞死亡较多, 适当缩短时间; 如果荧光强度太弱, 适当延长时间。

② 降低加载温度可能会减少探针 AM 酯运载技术造成的探针区室化。

6) 用 HBSS 溶液洗涤细胞 3 次, 以充分去除残留的 Fluo 4-AM 工作液。然后加入 HBSS 溶液覆盖细胞。

7) 37℃培养箱孵育约 20-30 min, 以确保 AM 基团在细胞内的完全去酯化作用。

【注】: (可选) 对于含有阴离子通道蛋白的细胞, 5-7 步骤中可加入有机阴离子转运抑制剂 probenecid (1-2.5mM) 或 sulfipyrazone(0.1-0.25 mM)到细胞外液以减少指示剂去酯后的渗漏。

8) 用激光共聚焦或荧光显微镜检测细胞, 激发波长 494 nm, 发射波长 516 nm。

【注】: Fluo-4, AM 进入胞内后, 经酯酶降解形成 Fluo-4, 并不是以共价结合的形式滞留在细胞质内。因此不可对加载染料的活细胞进行固定处理, 再进行 Ca^{2+} 水平检测。