

Cal-630 AM, Cell Permeant 钙离子荧光探针

产品编号	产品名称	包装规格
NBS7648-50ug	Cal-630 AM, Cell Permeant 钙离子荧光探针	50ug
NBS7648-100ug	Cal-630 AM, Cell Permeant 钙离子荧光探针	2x50ug
NBS7648-500ug	Cal-630 AM, Cell Permeant 钙离子荧光探针	10x50ug

【务必注意】：初次使用离子探针的用户，强烈建议配合：Pluronic F-127, Cell Culture Tested 细胞培养级 (NBS2009-1g) 一起使用，以提高探针的水溶性和胞内加载性。

产品简介：

钙离子测定在各种生理活动中发挥着重要作用，与钙离子结合从而表现出光谱反应的荧光探针使得研究人员能够观察胞内游离钙离子水平变化，通过荧光显微镜、流式细胞仪、荧光光度计和荧光酶标板来检测。

新一代钙离子荧光探针：Cal-520，Cal-590 和 Cal-630 是最强大且均一的细胞内钙流 (Calcium mobilization) 测定用荧光探针，与传统的钙离子探针 (比如：Fluo-3 AM、Fluo-4 AM 和 Rhod-2 AM) 相比，具有明显改善的信噪比和细胞内滞留性。

Cal-520 AM，Cal-590 AM 和 Cal-630 AM 具有细胞膜渗透性，能够预加载进入细胞。一旦进入细胞后，亲脂阻断基团 AM 被酯酶裂解，产生带负电荷的荧光染料，留在细胞内部。一旦与钙离子结合后，它们的荧光显著加强。当细胞被激动剂刺激后，受体发出细胞内钙释放的信号，从而使得 Cal-520，Cal-590 和 Cal-630 的荧光增加。Cal-520 AM，Cal-590 AM 和 Cal-630 AM 的高灵敏度以及 >100 倍的荧光增强使其成为胞内钙离子测定的理想探针。高信噪比和更加的胞内滞留性使其成为评估 GPCR 和钙离子通道靶标以及筛选对应激动剂和拮抗剂的优秀工具。

Cal-520，Cal-590 和 Cal-630 基本定位在细胞质，不像 Rhod-2 主要定位在线粒体。Cal-590 和 Cal-630 的长激发/发射波长使其为完美的钙离子探针，能够与绿色荧光蛋白 (GFP) 标记细胞兼容多色检测。另外，Cal-520，Cal-590 和 Cal-630 也与绝大多数现存的荧光仪器兼容。Cal-520 在 488nm 处被良好激发，用 FITC 滤片检测；Cal-590 经优化在 555nm 处被良好激发，用 TRITC/Cy3 滤片检测；Cal-630 经优化在 594nm 处被良好激发，用 Texas Red 滤片检测；

产品特性:

- 1) 同义名: Cal-630, Acetoxymethyl Ester;
- 2) 分子量: 分子量: 1282.89
- 3) 解离常数: $K_d=792$ nM
- 4) 溶解性: DMSO
- 5) Ex/Em: 609/626

保存条件:

-20℃干燥避光保存, 有效期至少 1 年。

产品使用:**A, 试剂准备**

- 1) **配制 Pluronic F-127 母液:** 称取 100mg Pluronic F-127 粉末 (货号: NBS2009)) 中加入 500μl DMSO, 配制成 20%(w/v) DMSO 母液。溶解过程需要在 40-50℃加热 20-30min。溶液室温保存, 不用冷藏。如有结晶析出, 可以重新加热后溶解, 不影响使用。
- 2) **HHBS Buffer**(1X Hank' s Balanced Salt Solution with 20mM HEPES buffer, pH 7.2-7.4)或者其他生理缓冲液

B, 操作步骤

- 1) 用无水 DMSO 溶解 Cal-630 AM 配制成 2-5mM 的储存液, 或将已配好的 Cal-630 AM 储存液取出于室温回温。(如: 若配制成 4mM 的母液, 需向 50μgCal-630 AM 中加入 9.7μl 无水 DMSO)。
- 2) 用 HHBS 或其他生理缓冲液将 Cal-630 AM+DMSO 储存液稀释到含 0.04% Pluronic F-127 的 10-20μM 染色工作液。

【注①】: 添加一定量的 20% Pluronic F-127 溶液到 Cal-630 AM+DMSO 储存液, 使 Pluronic F-127 的浓度约为 0.04%。Pluronic F-127 可以防止 AM 探针在溶液中聚合并促使探针更好进入细胞。但 Pluronic F-127 可降低 AM 探针的稳定性, 因此只建议在配制工作液时加入, 不建议加入储存液长期保存。

【注②】: Cal-630 AM 应用在大部分细胞的推荐加载浓度为 4-5μM, 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。

【注③】: Cal-630 AM 工作液需现配现用, 避免反复冻存。

- 3) **【可选】**如果细胞内 (比如 CHO 细胞) 含有机阴离子转运体, 丙磺舒 (Probenecid,

1-2mM) 可能需要加入上述染色工作液内 (在孔内的最终浓度为 0.5-1mM), 以降低去酯化探针的泄露水平。

【注①】: 我司提供多种丙磺舒包括水溶性的丙磺舒 (NBS2008-154MG), 能降低有机溶剂的使用。

4) 加入等体积的染色工作液到细胞培养孔内, 37°C 孵育 60-90min。然后, 室温再孵育 30min。

【注①】: 某些细胞系探针的加载时间长于 2h 能提供更好的信号。

5) 吸掉染色工作液, 并用 HHBS 或其他生理缓冲液 (如有必要, 使用含转运体抑制剂如 1mM 丙磺舒的缓冲液) 清洗细胞 1~2 次, 以去除残留探针。

6) 之后在 HHBS 或其他生理缓冲液 (如有必要, 使用含转运体抑制剂如 1mM 丙磺舒的缓冲液) 中, 用合适的激发/发射波长来检测荧光 (见产品特性: Cal-630 AM 的激发和发射光谱)。

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 (AM) 易吸潮, 冰箱取出后请在干燥的环境放至室温后再开封。由于试剂微量, 开封前请将其短暂离心, 以保证粉末落入管底。
3. Cal-630, AM 在 4°C、冰浴等较低温度情况下会凝固而粘在离心管管底、管壁或管盖内, 可在 20-25°C 温育片刻至全部融解后使用。
4. Cal-630, AM 第一次使用, 建议储存液现配现用, 分装成单次用量, 严格做到 $\leq -20^{\circ}\text{C}$ 密封干燥冻存, 以防止受潮。为了保证良好的实验效果, 尽量在短时间内使用。
5. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

附录 I Cal-520, Cal-590 或 Cal-630 钙离子探针的波长和钙离子结合特性

产品编号	产品名称	激发波长 (nm)	发射波长 (nm)	解离常数 Kd (nM)
<u>NBS7646</u>	<u>Cal-520</u>	492	515	320
<u>NBS7647</u>	<u>Cal-590</u>	574	588	561
<u>NBS7648</u>	<u>Cal-630</u>	609	626	792