

Screen Quest™免洗 Fluo-8 钙检测试剂盒

基本信息

货号: 36314(1 plate), 36315(10 plates), 36316(100 plates)

储存条件: 保存在冰箱, 避光

适用仪器: FLIPR, FDSS, NOVOSTar, FlexStation, ViewLux, IN Cell

Analyzer, ArrayScan

简介

Screen Quest™Fluo-8 NW 钙测定试剂盒提供均匀的荧光测定, 用于检测细胞内钙动员。表达通过钙发出信号 GPCR 的细胞预加载可以穿过细胞膜的 Fluo-8 NW。一旦进入细胞内, Fluo-8 NW 的亲脂性阻断基团被酯酶裂解, 导致带电荷的荧光染料留在细胞内。与钙结合后, 其荧光大大增强。当用激动剂刺激细胞时, 该受体发出细胞内钙的释放信号, 这显著增加了 Fluo-8 NW 的荧光。Fluo-8 NW 具有较长的波长, 高灵敏度和 > 100 倍荧光增强的特性, 是测量细胞钙的理想指标。

Screen Quest™Fluo-8 NW 钙测定试剂盒为监测 G 蛋白偶联受体和钙通道提供了一种优化的检测方法。该测定可以以方便的 96 孔或 384 孔微量滴定板形式进行, 并且易于适应自动化。

该试剂盒的优势

信号强度增加: Fluo-8 NW 是最亮的钙指示剂, 比 Fluo-4 AM 亮 2 倍以上, 比 Fluo-3 AM 亮 4 倍。

灵活的染料加载: 在室温下加入染料 (而不是 37° C, 这是 Fluo-4 AM 所需的)。

方便: 配方具有极短的手动操作时间。无需洗涤步骤。

多种应用: 与许多细胞系和靶标兼容, 无需配体或靶标干扰。

试剂盒套件

Components	Amount		
	Cat.#36314(1 plate)	Cat.#36315(10 plates)	Cat.#36316(100 plates)
Component A: Fluo-8 NW	1 vial, lyophilized	1 vial, lyophilized	10 vials, lyophilized
Component B: 10X Pluronic® F127 Plus	1 bottle(1 ml/bottle)	10 bottles(1 ml/bottle)	10 bottles(10 ml/bottle)
Component C: HHBS (Hanks with 20mM Hepes)	1 bottle(9 ml)	1 bottle(100 ml)	Not included

一个单板的检测方案

简要概述

在含有 0.5-1%FBS 的生长培养基中制备细胞

添加 Fluo-8NW 染料加载液 (100 μ L/孔/ 96 孔板或 25 μ L/孔/ 384 孔板)

在室温下孵育 1 小时

监测 Ex / Em = 490 / 525nm 处的荧光强度

警告：不要添加额外的丙磺舒。

具体步骤

1. 准备细胞

1.1 对于贴壁细胞：在生长培养基平板中细胞过夜，对于 96 孔板，具有 0.5-1% FBS，40,000 至 80,000 个细胞/孔/100 μ L，或者对于 384 孔板，在 10,000 至 20,000 个细胞/孔/25 μ L。

1.2 对于非粘附细胞：从培养基中离心细胞，后将细胞沉淀悬浮于等量的 HHBS 和 Fluo-8 NW 染料加载溶液中（见下面的步骤 2.4），125,000 至 250,000 细胞/孔/100 μ L 用于 96 孔 poly-D 赖氨酸平板或 30,000 至 60,000 细胞/孔/25 μ L 用于 384 孔聚-D 赖氨酸平板。在实验之前，制动器关闭的情况下以 800rpm 离心 2 分钟。

注意：应根据个体评估每个细胞系，以确定细胞内钙动员的最佳细胞密度。

2. 准备 Fluo-8 NW 染料加载溶液

2.1 使用前在室温下解冻 1 瓶 Fluo-8 NW (组分 A), 1 瓶 10XPluronic®F127Plus (组分 B) 和 HHBS (组分 C)。

2.2 制备 Fluo-8 NW 储备溶液:

将 20 μ L (对于 Cat# 36314) 或 200 μ L (对于 Cat# 36315 和 #36316) DMSO 加入到 Fluo-8 NW (组分 A) 的小瓶中, 并完全混合。

注意: 20 μ L Fluo-8 NW 原液足以用于一个平板。如果管子密封, 未使用的 Fluo-8 NW 储备溶液可以等分并在 $<-20^{\circ}\text{C}$ 下储存超过一个月。避光, 避免反复冻融循环。

2.3 制备 1X 分析缓冲液:

A. 对于 Cat# 36314 (1 plate kit) 和 #36315 (10 plates kit), 通过将 9mL HHBS (组分 C) 加入 10X Pluronic F127 Plus (1mL, 组分 B) 中制备 1X 测定缓冲液, 并充分混合。

B. 对于 Cat# 36316 (100 plates kit), 通过将整瓶 10XPluronic®F127Plus (10 mL, 组分 B) 加入 90 mL HHBS 缓冲液 (不包括在试剂盒中) 中制备 1X 试剂缓冲液, 并将它们充分混合。

注意: 对于一个平板, 10 mL 的 1X 测定缓冲液就足够了。在 $<-20^{\circ}\text{C}$ 下等分并储存未使用的 1X 测定缓冲液。避光, 避免反复冻融循环。

2.4 制备 Fluo-8 NW 染料溶液: 将 20 μ L Fluo-8NW 储备溶液 (步骤 2.2) 加入 10mL 1x 测定缓冲液 (从步骤 2.3) 并混合。该工作溶液在室温下稳定至少 2 小时。

3. 运行钙检测

3.1 将 100 μ L/孔 (96 孔板) 或 25 μ L/孔 (384 孔板) 的 Fluo-8 NW 染料加载溶液 (来自步骤 2.4) 加入细胞板中。

注意: 在含有 5-10% FBS 的生长培养基中培养细胞以改善细胞生长。在这种情况下, 重要的是用 HHBS 缓冲液替换生长培养基以最小化背景荧光和化合物对血清

的干扰。 [我们为那些喜欢保持培养基去除步骤的人提供 2 个独立的中等去除钙测定试剂盒 (Cat# 36308 和 36309)]。

3.2 将染料加载板在细胞培养箱中孵育 30 分钟, 然后将板在室温下孵育 30 分钟。

注 1: 如果测定需要 37°C, 立即进行实验, 无需进一步室温孵育。

注 2: 如果细胞在室温下运行时间较长, 可在室温下孵育细胞板 1-2 小时 (建议孵育时间不超过 2 小时。)

3.3 用 HHBS 或所需缓冲液制备复合板。

3.4 通过监测 Ex / Em = 490/525 nm 处的荧光强度来运行钙通量测定。

注意: 在实验前进行信号测试很重要。不同的仪器有自己的强度范围。将信号测试强度调整到最大仪器强度计数的 10% 至 15% 的水平。例如, FLIPR-384 的最大荧光强度计数为 65,000, 因此应调整仪器设置以使信号测试强度在 7,000 到 10,000 左右。

数据分析

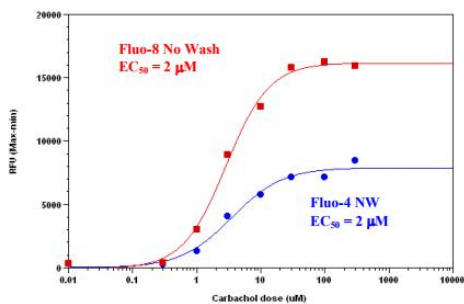


图 1. 使用 Screen Quest™ Fluo-8 No Wash Calcium Assay Kit 和 Fluo-4 NW Calcium Assay Kit 在 HEK-293 细胞中测量 Carbachol 剂量反应。将 HEK-293 细胞以 40,000 个细胞 /100 μ L/孔接种在 Costar 黑壁/透明底 96 孔板中过夜。使用 Screen Quest™ Fluo-8 No Wash 钙测定试剂盒或 Fluo-4 NW 试剂盒 (根据生产商的说明书) 在室温下将细胞与 100 μ L 染料上样溶液一起温育 1 小时。通过 NOVostar (BMG Labtech) 添加卡巴胆碱 (50 μ L/孔) 以达到最终指示的浓度。

订购信息

名称	货号	规格	价格
Screen Quest™ Calbryte 520™ 免丙磺舒和免洗钙检测试剂盒	36317	1 Plate	2340
Screen Quest™ Calbryte 520™ 免丙磺舒和免洗钙检测试剂盒	36318	10 Plates	8340
Screen Quest™ 免洗 Fluo-8 钙检测试剂盒	36314	1 Plate	1140