

AAT 研发的新型钙离子荧光探针 点亮你的科研之路

简介

Calbryte™520, Calbryte™590 和 Calbryte™630 提供最强大的均匀荧光测定工具, 用于检测细胞内钙动员。与现有的钙指示剂 (如 Fluo-3 AM, Fluo-4 AM 和 Rhod-2 AM) 相比, 这些钙敏感染料明显更亮, 并提供更高的信噪比, 大大提高了细胞内保留和负载效率。表达通过钙发出信号的 GPCR 或钙通道的细胞可以预装载穿过细胞膜的 Calbryte™ 520 AM, Calbryte™ 590 AM 或 Calbryte™ 630 AM。一旦进入细胞内, Cal520®AM, Calbryte™590 AM 或 Calbryte™630 AM 的亲脂性阻断 AM 基团被细胞内酯酶切割, 产生带负电荷的荧光 Calbryte™染料, 留在细胞内。它们与钙结合后的荧光大大增强。当用激动剂刺激细胞时, 该受体表达细胞内钙的释放, 这显著增加了 Calbryte™520, Calbryte™590 或 Calbryte™630 的荧光。高灵敏度和 > 100 倍荧光增强的特性使 Calbryte™520 AM, Calbryte™590 AM 或 Calbryte™630 AM 是测量细胞内钙的最强大指标。

除了方便的激发波长和钙的大荧光增强外, Calbryte™520, Calbryte™590 和 Calbryte™630 主要定位于细胞溶胶中, 不像 Rhod-2 主要位于线粒体中。此外, Calbryte™590 和 Calbryte™630 的 Ex / Em 波长使这些染料成为完美的钙指示剂, 可与绿色荧光蛋白 (GFP) 细胞系进行多色检测。此外, Calbryte™520, Calbryte™590 或 Calbryte™630 钙测定经过优化, 可与大多数现有荧光仪器兼容。Calbryte™520 可在 488 nm 处激发, 并与 FITC 滤光片组配合使用。Calbryte™590 经过优化, 可在 555 nm 激发, 并与 TRITC / Cy3 滤光片组配合使用。Calbryte™630 经过优化, 可在 594 nm 激发, 并与 TexasRed®滤光片组配合使用。光谱和钙结合特性总结如下 (参见表 1)。

表 1. Calbryte™520, Calbryte™590 或 Calbryte™630

试剂的光谱和 Ca²⁺ 结合特性

Ca ²⁺ Indicator	Excitation(nm)	Emission(nm)	K ^d (uM)
Calbryte™520	492nm	514nm	1.2
Calbryte™590	580nm	592nm	1.4
Calbryte™630	608nm	624nm	1.2

使用 Calbryte™520 AM , Calbryte™590 AM 或 Calbryte™630 AM 酯类

1. 使用 Calbryte™520, Calbryte™590 或 Calbryte™630 AM 酯类称重传感器:

Calbryte™AM 酯应在使用前在无水 DMSO 中重新配制。DMSO 储备溶液可以在 -20℃ 下储存（干燥）并避光。在这些条件下，AM 酯应稳定三个月。

以下是我们推荐的将 Calbryte™520 AM, Calbryte™590 AM 或 Calbryte™630 AM 酯加入活细胞的方案。该说明仅提供指南，应根据您的特定需求进行修改。

a) 在无水 DMSO 中制备 2 至 5mM Calbryte™ 520AM, Calbryte™ 590AM 或 Calbryte™ 630AM 酯的储备溶液。

b) 将 Calbryte™ 520 AM, Calbryte™ 590 AM 或 Calbryte™ 630 AM 溶解在 DMSO 中或将等份的指示剂储备溶液解冻至室温。在 Hanks 和 Hepes 缓冲液 (HHBS) 或您选择的缓冲液 (0.04% Pluronic®F-127) 中制备 10 至 20 μM 的染料工作溶液。细胞加载所需指示剂的确切浓度必须根据经验确定。

注意：非离子型洗涤剂 Pluronic®F-127 有时用于增加 Calbryte™ 520 AM, Calbryte™590 AM 或 Calbryte™630 AM 酯的水溶性。各种 Pluronic®F-127 解决方案可从 AAT Bioquest 获取。

c) 如果您的细胞（如 CHO 细胞）含有有机阴离子转运蛋白，可将丙磺舒 (1-2 mM) 添加到染料工作溶液中（最终浓度为 0.5-1 mM）

注意：各种 ReadUse™ 丙磺舒（包括水溶性钠盐和稳定溶液）均可从 AAT Bioquest 获取。

d) 将等体积的染料工作溶液（来自步骤 b 或 c）加入细胞板中。

e) 将染料加载板在细胞培养箱中孵育约 60 分钟，然后将板在室温下再孵育 15 分钟。

f) 用 HHBS 或您选择的含有阴离子转运蛋白抑制剂（如 1 mM 丙磺舒）的缓冲液替换染料工作溶液，以去除多余的染料。

g) 对于 Calbryte™ 520 AM，在 Ex / Em = 490 / 525nm 处进行钙测试，对于 Calbryte™ 590 AM，使用 540/590nm 进行钙测试，对于 Calbryte™ 630 AM，使用 610/640nm 进行钙测试。

2. 测量细胞内钙响应：

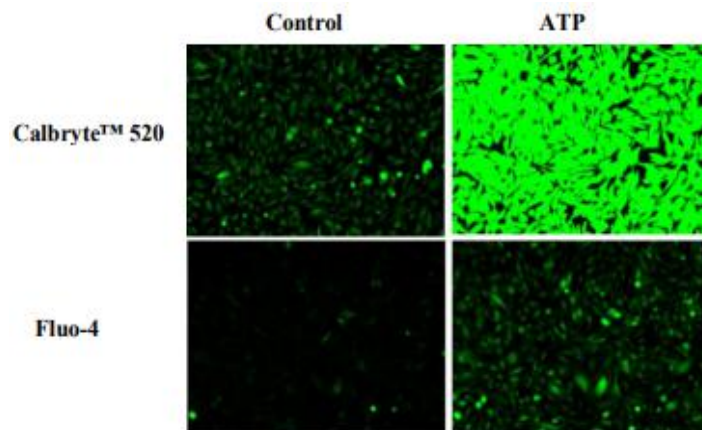


图 1. CHO-K1 细胞中内源性 P2Y 受体对 ATP 的反应。将 CHO-K1 细胞以每孔 100 μL 每孔 40,000 个细胞接种过夜，在 96 孔黑色壁/透明底板中。将含有丙磺舒的 HHBS 中的 100 μL Fluo-4AM 或 Calbryte™ 520AM 加入孔中，并将细胞在 37℃ 下孵育 45 分钟。用 200 μL HHBS 替换染料加载培养基，加入 50 μL 50 μM ATP，并使用 FITC 通道用荧光显微镜（Keyence）成像。

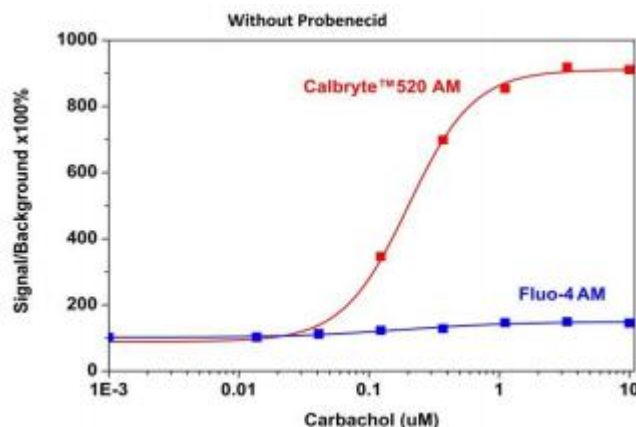


图 2. 用 Calbryte™ 520 或 Fluo-4 AM 测量的 CHO-M1 细胞中外源 M1 受体的卡巴胆碱刺激的钙响应。在 96 孔黑壁/透明底板中，将 CHO-M1 细胞以每 100 μL/孔 40,000 个细胞接种过夜。将 100 μL Fluo-4AM 或不含丙磺舒的 Calbryte™ 520AM 加入细胞中，并将细胞在 37℃ 下孵育 45 分钟。通过 FlexStation 3（Molecular Devices）添加 Carbachol（50 μL/孔）以达到最终指示的浓度。

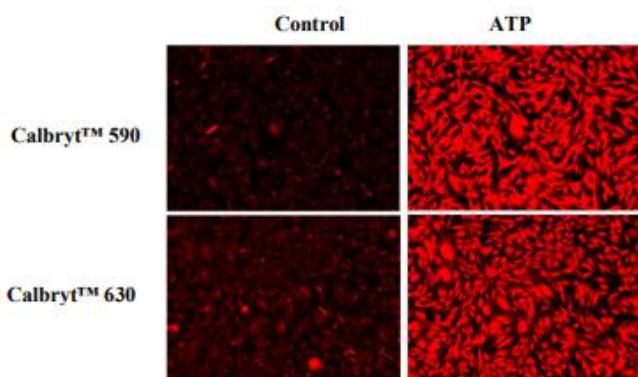


图 3. CHO-K 细胞中内源性 P2Y 受体对 ATP 的反应。在 96 孔黑壁/透明底板中，将 CHO-K 细胞以每 100 μ L/孔 40,000 个细胞接种过夜。将 100 μ L 具有 2mM 丙磺舒的 HbBS 中的 Calbryte™ 590AM 或 Calbryte™ 630AM 加入孔中，并将细胞在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 1 小时。将染料加载培养基替换为 200 μ L HbBS，用 50 μ L 50 μ M ATP 处理，并使用 TRITC 通道 (Calbryte™ 590) 和 Texas Red Channel (Calbryte™ 630) 用荧光显微镜 (Keence) 成像。

使用 Calbryte™520, Calbryte™590 或 Calbryte™630 盐

钙校准可以通过测量具有精确已知的游离 Ca^{2+} 浓度的溶液中的指示剂的盐形式 (荧光微板读数器中 25 至 50 μ M) 的荧光强度来进行。可以使用基于 30mM MOPS EGTA Ca^{2+} 缓冲液的校准溶液。通常，水含有微量的钙离子。强烈建议使用 30 mM MOPS + 100 mM KCl, pH 7.2 作为缓冲系统。我们可以简单地制作如下所列的 0 和 39 μ M 钙原液，这两种溶液用于制备不同 Ca^{2+} 浓度的系列溶液。

A. 0 μ M calcium: 30 mM MOPS + 100 mM KCl, pH 7.2 buffer + 10 mM EGTA

B. 39 μ M calcium: 30 mM MOPS + 100 mM KCl, pH 7.2 buffer + 10 mM EGTA + 10 mM CaCl_2

为了确定溶液的游离钙浓度或单波长钙指示剂的 K_d ，使用方程：

$$[\text{Ca}]_{\text{free}} = K_d[F - F_{\text{min}}]/[F_{\text{max}} - F]$$

其中 F 是特定实验钙水平下指示剂的荧光强度， F_{min} 是不存在钙时的荧光强度， F_{max} 是钙饱和探针的荧光强度。

解离常数 (K_d) 是探针对钙的亲合力的量度。与校准溶液相比，荧光指示剂的钙结合和光谱性质在细胞环境中变化非常显著。细胞内指标的原位反应校准通常产生显著高于体外测定的 K_d 值。通过在离子载体如 A-23187, 4-溴 A-23187 和离子霉素存在下将加载的细胞暴露于受控的 Ca^{2+} 缓冲液来进行原位校准。或者，细

胞透化剂如洋地黄皂苷或 X-100 可用于将指示剂暴露于细胞外培养基的受控 Ca^{2+} 水平。

结论

由于 Ca^{2+} 在生物学中的重要性，已经建立了许多用于分析细胞和/或亚细胞 Ca^{2+} 活性机制的技术/方法。尽管用于分析 Ca^{2+} 活性的每种方法都具有优于其他方法的某些优点，但每种方法也存在缺点。凭借上述出色的性能，我们相信 Calbryte™ 520, Calbryte™ 590 和 Calbryte™ 630 钙检测试剂为各种生物系统中的细胞内钙分析和监测提供了新的强大工具。

正如可能预测的那样， Ca^{2+} 分析中许多研究人员的兴趣从细胞水平转移到亚细胞水平。已经发现 Ca^{2+} 在整个细胞中均匀分布，并且在多种细胞（例如，卵母细胞，心肌细胞，肝细胞和外分泌细胞）中观察到 Ca^{2+} 的细胞内异质性（例如 Ca^{2+} waves and Ca^{2+} sparks）。随着 20 世纪 80 年代共聚焦激光扫描显微镜（CLSM）和 2000 年代先进的酶标仪（如 FLIPR, FDSS 和 NOVOSTar 专用于细胞内 Ca^{2+} 检测）的出现，细胞内 Ca^{2+} 的测量显著加速。共聚焦激光扫描显微镜和最近的多光子显微镜除了测量其浓度外，还允许在亚细胞水平上对细胞内 Ca^{2+} 信号传导进行精确的空间和时间分析。

名称	货号	规格	价格
新型钙离子荧光探针 Calbryte™ 530, AM	20720	2x50 ug	2340
新型钙离子荧光探针 Calbryte™ 590, AM	20700	2x50 ug	2340
新型钙离子荧光探针 Calbryte™-520L AM	20640	10x50 ug	3540
新型钙离子荧光探针 Calbryte™ 630, AM	20721	10x50 ug	4740