

## 新型钙离子荧光探针与 Fluo-3、Fluo-4 相比有什么优点？

新型钙离子荧光探针与 Fluo-3、Fluo-4 相比有什么优点？钙离子 ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 是普遍存在的第二信使，负责调节细胞和生物的许多生理和生物过程。在神经肌肉接头信号通路中， $\text{Ca}^{2+}$  促进运动神经元中神经递质乙酰胆碱的释放，以激活与运动有关的骨骼肌。钙充当细胞信号分子，监测酶活性，离子通道渗透性和离子泵活性；并在人类发育过程中促进健康和适当的骨形成。钙的多功能性的持续发现以及随之而来的研究钙参与许多突出的生理过程的需求引发了 Fluo-3 和 Fluo-4  $\text{Ca}^{2+}$  指示探针的开发，用于钙瞬变的可视化和量化。自 20 世纪 80 年代发现以来，新型  $\text{Ca}^{2+}$  荧光探针的研究和开发有所增加，其功能和灵敏度与 Fluo-3 和 Fluo-4 相关。虽然 Fluo-3 和 Fluo-4 在市场上占主导地位，但这两种探针依旧存在诸如高背景干扰等缺点。为了提高对这些新型  $\text{Ca}^{2+}$  荧光探针的认识，越来越多的比较研究强调了与 Fluo-3 和 Fluo-4 相比，这些新开发的  $\text{Ca}^{2+}$  荧光探针（如 Cal-520®）的优点。

伦敦开放大学生命，健康和化学科学系成员最近进行的一项比较研究使用成熟的 Fluo-4 (Molecular Probes) 研究了精选的新型  $\text{Ca}^{2+}$  指标的光谱特征。在测试的新型“绿色” $\text{Ca}^{2+}$  指标中，有 AAT Bioquest 的 **Cal-520® (货号: 21130)** 和 Enzo Life Science 的 FluoForte。在相同的测试条件下，评估每种  $\text{Ca}^{2+}$  探针的细胞内染料保留和荧光能力。Rietdorf 博士及其团队的研究结果揭示了 Cal-520® 优于 Fluo-4 和其他市场上的  $\text{Ca}^{2+}$  荧光探针。Cal-520® 具有极亮的起始荧光（比 Fluo-4 高 25%；图 1）和卓越的荧光强度 ( $\Delta f / f_0$ ；图 2)。Cal-520® 在成像过程中荧光损失最小，培养后 Cal-520® 完全染色保留，证明了其在长时间成像应用中的稳定性和适用性（图 3 和图 4）。

## Starting Fluorescence

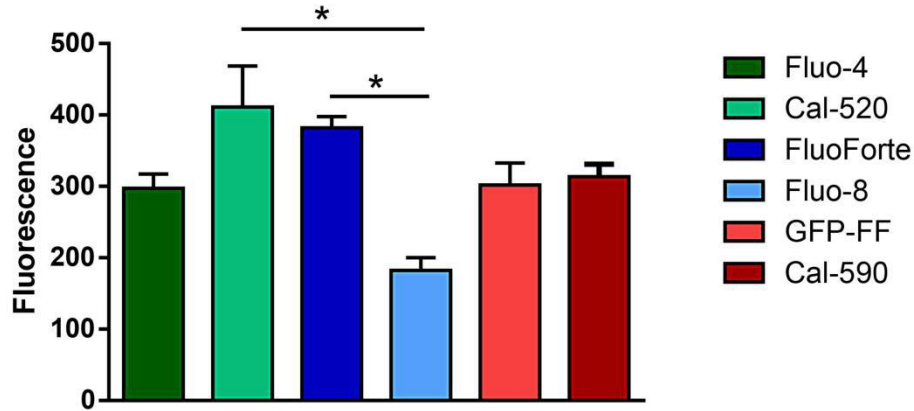


图 1. 使用相似的加载条件和暴露时间时, 钙指示剂的荧光开始。来自 Katja Reitdorf, Tala Chehab, Sarah Allman 和 Martin D. Bootman 的图表。 “市场上新型改进的  $\text{Ca}^{2+}$  荧光探针与 fluo-4 的比较研究。”

## Dynamic range

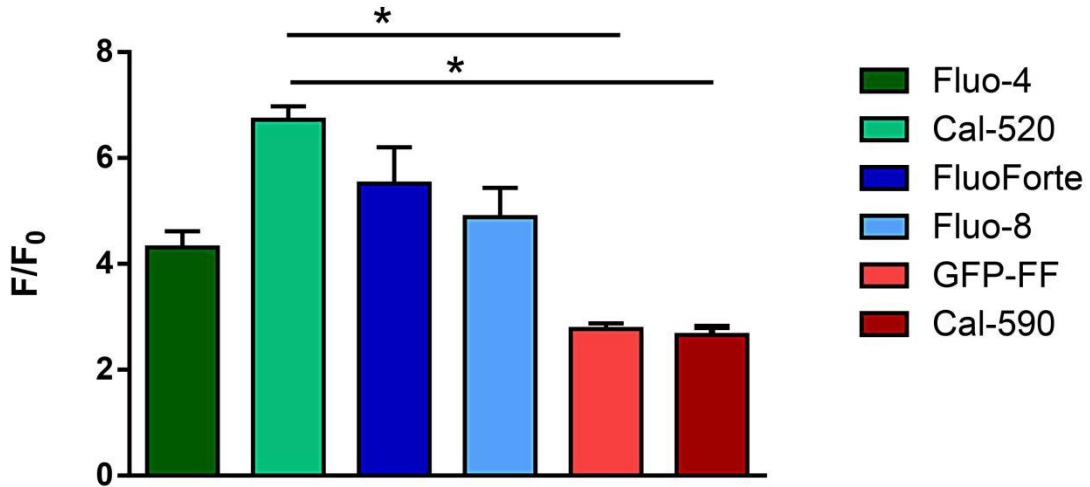


图 2. 钙指标的动态范围。来自 Katja Reitdorf, Tala Chehab, Sarah Allman 和 Martin D. Bootman 的图表。 “市场上新型改进的  $\text{Ca}^{2+}$  荧光探针与 fluo-4 的比较研究。”

## Loss of fluorescence during imaging experiments

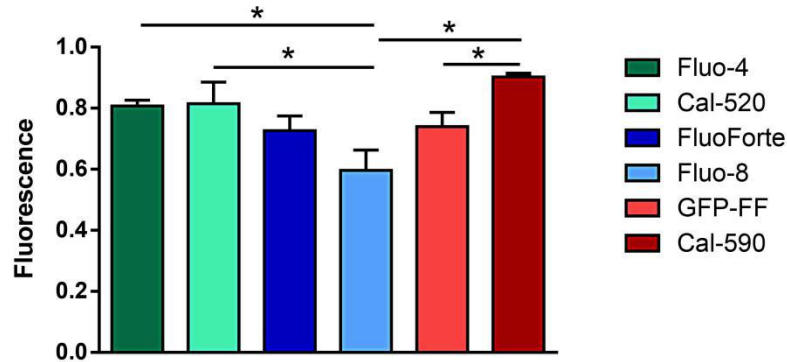


图 3. 成像实验中的荧光损失。来自 Katja Reitdorf, Tala Chehab, Sarah Allman 和 Martin D. Bootman 的图表。“市场上新型改进的  $\text{Ca}^{2+}$  荧光探针与 fluo-4 的比较研究。”

## Dye loss after 20 minutes at 37 °C

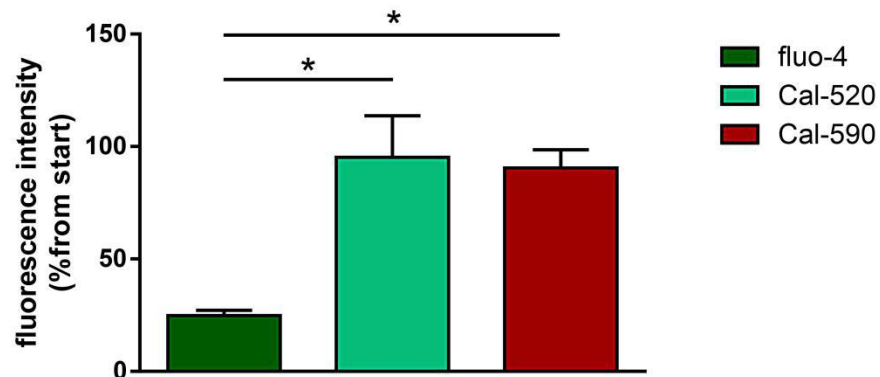


图 4. 在 37°C 温育 20 分钟后的染料损失。来自 Katja Reitdorf, Tala Chehab, Sarah Allman 和 Martin D. Bootman 的图表。“市场上新型改进的  $\text{Ca}^{2+}$  荧光探针与 fluo-4 的比较研究。”

开放大学还研究了两个新的“红色”  $\text{Ca}^{2+}$  探针，AAT Bioquest 的 **Cal-590™** (货号：20510) 和 Enzo Life Sciences GFP 认证的 FluoForte，与使用“绿色”  $\text{Ca}^{2+}$  指标进行的相同实验参数进行了研究。他们发现，“红色”  $\text{Ca}^{2+}$  荧光探针所需的激发波长越长，荧光信号越弱，荧光强度变化越小，动态范围越窄 (图 1-4)。这与我们研发 Cal-590™ 前的研究结果是相同的。因为 Fluo-4 和钙指示剂在信号饱和方面存在问题，而 Cal-590™ 恰好弥补了这些缺点。这项研究的实质暗

示 Cal-590™ 优于 GFP 认证的 FluoForte 作为多重 Ca<sup>2+</sup> 检测的第二种染料。两种染料在 488nm 处的激发通过 Enzo 的 GFP 认证的 FluoForte 显示出 Ca<sup>2+</sup> 敏感荧光，这表明背景干扰使得难以用于同时成像。相比之下，Cal-590™ 在被 488 nm 光激发时没有显示任何荧光，消除了在涉及 488 和 560 nm 激光同时激发的多重测定过程中的潜在串扰。

研究荧光 Ca<sup>2+</sup> 探针比较的另一个活跃领域是检测和观察 Ca<sup>2+</sup> 的局部亚细胞变化。在加利福尼亚大学欧文分校进行的这项研究中，荧光 Ca<sup>2+</sup> 探针的光谱特性和检测三磷酸肌醇 (IP3) 引起的局部 Ca<sup>2+</sup> 信号的灵敏度进行了评估。由于 Ca<sup>2+</sup> 通量迅速发生，因此利用灵敏的高速相机荧光显微镜检测和分析局部亚细胞 Ca<sup>2+</sup> 信号。在测试的许多新型“绿色”Ca<sup>2+</sup> 荧光探针中，有 AAT Bioquest 的 Cal-520® 和 Invitrogen 的 Oregon Green BAPTA-1 (OGB-1) 和 Fluo-4。使用乙酰氧基甲基 (AM) 酯形式将每种 Ca<sup>2+</sup> 荧光探针加载到人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞中以促进细胞内摄取。通过光解闪光诱导局部亚细胞 Ca<sup>2+</sup> 信号的刺激，所述光解闪光校准至产生可检测和可测量的局部响应所需的精确强度和持续时间，而不激发细胞溶质钙的全局升高。

从这项研究中收集的数据加强了 Cal-520® 作为一种新型“绿色”Ca<sup>2+</sup> 荧光探针的优势。Cal-520® 的低基线荧光和 Ca<sup>2+</sup> 结合时荧光的最大增加表明其具有较大的动态范围。Cal-520® 的大动态范围提高了检测灵敏度，检测了亚细胞 Ca<sup>2+</sup> 浓度的急剧变化。在动态分析中，例如监测 Ca<sup>2+</sup> 通量或 Ca<sup>2+</sup> 通道的开启/关闭，Cal-520® 的大动态范围非常适合于在这些 Ca<sup>2+</sup> 动力学分析过程中可能发生的较大荧光信号变化。在所有钙离子荧光探针中，Cal-520® 显示出最佳的动力学分辨率，检测信号强度的最快上升为 20-80%。

开放大学和 UCI 的比较研究证实了 Cal-520® 作为敏感和强大的钙离子荧光探针的卓越。Cal-500 染料系列为同时进行 Ca<sup>2+</sup> 成像提供了相当好的方法，因为 Cal-590™ 不能被 488 nm 光激发。此外，Cal-520® 和 Cal-590™ 具有优秀的抗漏性，可保持最佳的细胞内染料保留，提高信噪比，动态范围，并可连续产生强荧光信号。Cal-500 染料系列增强了体内和体外实验，从检测和监测钙瞬变到神经成像。