

## 钙离子荧光探针 Fluo-8®, AM

### 简介

钙在各种细胞中充当通用的第二信使。生命的开始，受精的行为，是由  $\text{Ca}^{2+}$  调节。所有类型细胞的许多功能由  $\text{Ca}^{2+}$  或多或少地调节。自从 20 世纪 20 年代，科学家们试图测量  $\text{Ca}^{2+}$ ，但由于  $\text{Ca}^{2+}$  探针的有限性，很少有人成功。首先 Ridgway 和 Ashley 通过将发光蛋白水母发光蛋白注射到巨人体内进行可靠的  $\text{Ca}^{2+}$  测量藤壶的肌纤维。随后，在 20 世纪 80 年代，Tsien 及其同事制作了各种荧光指示剂。其中基于荧光素的  $\text{Ca}^{2+}$  试剂（如 Fluo-3 和 Fluo-4）提供了值得信赖的方法。测量  $\text{Ca}^{2+}$ 。由于这些  $\text{Ca}^{2+}$  探针的发展，对  $\text{Ca}^{2+}$  的研究相关的细胞内现象已近飙升。

### Fluo-8®钙指示剂，最亮的钙染料

自引入以来，Fluo-3 成像及其类似物（如 Fluo-4）揭示了  $\text{Ca}^{2+}$  信号传导中许多基本过程的空间动力学。Fluo-3 和 Fluo-4 也已广泛用于流式细胞术和基于微孔板（如 FLIPR™）的钙检测。然而，弱信号和苛刻的染料加载条件限制了它们在某些细胞分析中的应用。我们开发了 Fluo-8® 系列钙检测试剂，以解决 Fluo-3 和 Fluo-4 的这些局限性。

Fluo-3 和 Fluo-4 在细胞应用中最重要特性是它们的吸收光谱与氩离子激光源在 488nm 激发相容，并且响应  $\text{Ca}^{2+}$  结合的荧光强度增加

非常大。我们的 Fluo-8®Ca<sup>2+</sup> 检测试剂保留了这两个有价值的特性。Fluo-8®试剂的吸收峰和发射峰分别为 490 nm 和 514 nm。它们可以用 488nm 的氩离子激光很好地激发，并且它们发射的荧光（波长 514nm）随着 Ca<sup>2+</sup>的增加而增加。Fluo-8®在与 Ca<sup>2+</sup>结合后确定荧光增加 > 200 倍。由于刺激后许多细胞中 Ca<sup>2+</sup>的增加范围通常为 5 至 10 倍，因此 Fluo-8®是该区域中高灵敏度使用的优异探针。Fluo-8®的 K<sub>d</sub> 估计为 389 nM（22°C，pH7.0-7.5），但该值可能受 pH，粘度和体内条件下结合蛋白的显著影响。

除了方便的 488 nm 激发波长和钙的大荧光增强外，Fluo-8®在细胞中比 Fluo-3 和 Fluo-4 更亮，如图 1 所示。此外，Fluo-8®更容易装入比 Fluo-3 和 Fluo-4 活细胞，两者都需要 37° C 才能获得最佳的细胞负载。Fluo-8®试剂具有较低的温度依赖性细胞负载特性，在室温或 37° C 下也能得到相似的结果。这一特性使 Fluo-8®更适合 HTS 应用。

表 1. Fluo-8®钙检测试剂的光谱和 Ca<sup>2+</sup>结合特性

| Ca <sup>2+</sup> Indicator | Excitation | Emission | K <sub>d</sub> of Ca <sup>2+</sup> -binding |
|----------------------------|------------|----------|---|
| Fluo-8®                    | 490 nm     | 514 nm   | 389 nM                                      |
| Fluo-8H™                   | 490 nm     | 514 nm   | 232 nM                                      |
| Fluo-8L™                   | 490 nm     | 514 nm   | 1.86 uM                                     |

与 Fluo-3 和 Fluo-4 相比，我们的 Fluo-8®钙检测试剂具有以下优势：

- 1、方便的波长：最大激发波长@ 490 nm；最大发射@ ~514 nm。
- 2、增强强度：比 Fluo-4 AM 亮 2 倍；比 Fluo-3 AM 亮 4 倍。
- 3、加载速度更快：在室温下加载染料（而不是 Fluo-4 AM 所需的 37°C）。
- 4、多功能  $\text{Ca}^{2+}$  结合 Kd，如表 1 所示。
- 5、多功能包装尺寸，满足您的特殊需求：1 毫克；10x50  $\mu\text{g}$ ；20x50  $\mu\text{g}$ ；HTS 包。

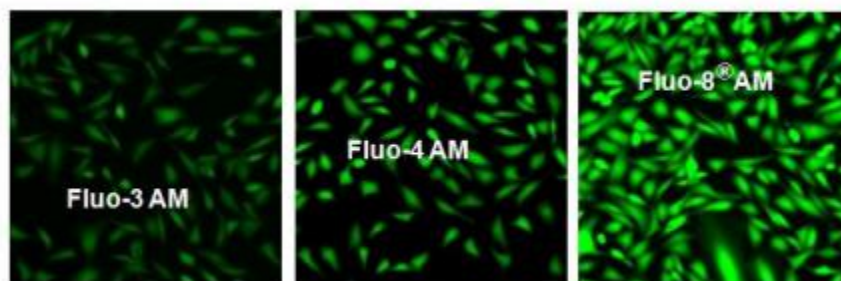


图 1. 将 U2OS 细胞以 40,000 个细胞/100  $\mu\text{L}$ /孔接种过夜，置于 96 孔黑色壁/透明底板中。除去生长培养基，将细胞分别与 37  $^{\circ}\text{C}$ ，5%  $\text{CO}_2$  培养箱中的浓度为 4  $\mu\text{M}$  的 100  $\mu\text{L}$  Fluo-3AM，Fluo-4AM 和 Fluo-8®AM 在 HHBS 中孵育。持续 1 小时。将细胞用 200  $\mu\text{L}$  HHBS 洗涤两次，然后使用 FITC 通道用荧光显微镜（Olympus IX71）成像。

## 使用 Fluo-8®AM 酯类

1. 使用 Fluo-8®AM 酯的称重传感器：

AM 酯是非极性酯，其易于穿过活细胞膜，并且通过活细胞内的细胞酯酶快速水解。AM 酯广泛用于非侵入性地将各种极性荧光探针装载

到活细胞中。但是，使用 AM 酯时必须小心，因为它们易于水解，特别是在溶液中。它们应在使用前重新配制成高质量的无水二甲基亚砜 (DMSO)。DMSO 储备溶液可以在  $-20^{\circ}\text{C}$  下干燥储存并避光。在这些条件下，AM 酯应该稳定数月。

以下是我们推荐的将 Fluo-8®AM 酯加入活细胞的方案。该步骤仅提供指南，应根据您的特定需求进行修改。

a) 在高质量无水 DMSO 中制备 2 至 5 mM Fluo-8®AM 酯原液。

b) 在实验当天，将 Fluo-8®溶解在 DMSO 中或将等份的指示剂储备溶液解冻至室内温度。在 Hanks 和 HEPES 缓冲液 (HHBS) 或您的缓冲液中准备 1 到  $10\ \mu\text{M}$  的工作溶液选择 0.02% Pluronic®F-127。对于大多数细胞系，Fluo-8®试剂的浓度范围为 4-5  $\mu\text{M}$ 。细胞加载所需指示剂的确切浓度必须根据经验确定。避免因过载和潜在染料毒性引起的任何伪影，建议使用最小染料浓度可以产生足够的信号强度。

注意：非离子型洗涤剂 Pluronic®F-127 有时用于增加 Fluo-8®AM 的水溶性酯。各种 Pluronic®F-127 解决方案可从 AAT Bioquest 购买。

c) 如果您的细胞含有有机阴离子转运蛋白，丙磺舒 (1-2.5 mM) 或磺吡酮 (0.1-0.25 mM) 可能是添加到细胞培养基中以减少脱酯化指示剂的泄漏。

注意：可以购买各种 RaddiUse™丙磺舒，包括水溶性钠盐和稳定溶液来自 AAT Bioquest。

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或室温下孵育 20 分钟至 1 小时。

注意：降低加载温度可能会减少指示符的划分。

f) 用您选择的 HHBS 或缓冲液替换染料工作溶液（含有阴离子转运蛋白抑制剂，如 2.5 mM 丙磺舒（如果适用）去除多余的探针。

g) 在  $E_x / E_m = 490 / 525\text{nm}$  处进行实验

2. 测量细胞内钙响应：见图 1。

## 使用 Screen Quest™Fluo-8 NW 钙测定试剂盒进行 HTS 应用

可以通过直接测量受体介导的 cAMP 积累或改变细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度来检测 GPCR 活化。通过  $G_q$  偶联的 GPCR 靶标产生细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  的增加，可以使用 Fluo-8 试剂和荧光酶标仪的组合测量。荧光成像平板读取器（例如，FLIPR，FDSS 或 BMG NovoStar）具有冷却的 CCD 相机成像系统，其同时收集来自微孔板（96 和 384 孔）的每个孔的信号。这些读板器可以亚秒间隔读取，这使得能够捕获响应的动力学，并且具有可以对连续液体添加进行编程的集成移液器。除了它们对 GPCR 靶标的强大应用外，我们的 Screen Quest Fluo-8 钙测定试剂盒也可用于表征钙离子通道和筛选钙离子通道靶向化合物。

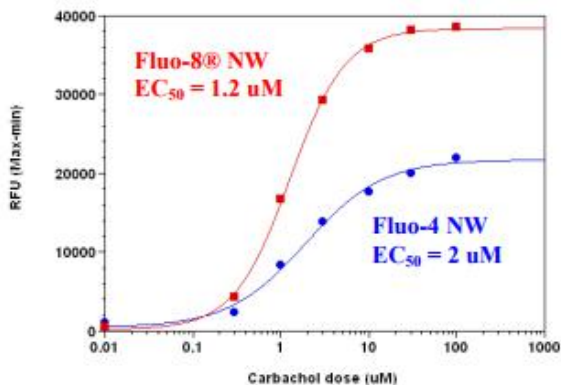


图 2. 使用 Screen Quest Fluo-8 NW 测定试剂盒和 Fluo-4 NW Assay 试剂盒在 HEK-293 细胞中测量卡巴胆碱剂量反应。将 HEK-293 细胞以 40,000 个细胞/100  $\mu\text{L}$ /孔接种过夜，置于 96 孔黑色壁/透明底板中。除去生长培养基，将细胞分别与 100  $\mu\text{L}$  的 Screen Quest 一起孵育，Fluo-8-NWcalcium 测定试剂盒和 Fluo-4 NW 试剂盒（根据制造商的说明书）在室温下保持 1 小时。通过 NOVOstar (BMG LabTech) 添加卡巴胆碱（25  $\mu\text{L}$ /孔）以达到最终指示的浓度。Fluo-8NW 的  $EC_{50}$  约为 1.2  $\mu\text{M}$ 。

---

与 Fluo-3 或 Fluo-4 的其他商业钙测定试剂盒相比，我们的 Screen Quest 钙测定试剂盒在 HTS 应用中具有以下优势：

- 广泛的应用：与 GPCR 和钙通道目标一起使用。
- 方便光谱波长：最大激发波长@490nm;最大发射@~514nm。
- 灵活的染料负载：室温下染料负载（而不是 Fluo-4AM 所需的 37 °C）。
- 无需清洗，无淬灭干扰您的目标。
- 强大的性能：启用钙测定使用 Fluo-4AM 或 Fluo-3AM 是不可能的。
- 最强信号强度：比 Fluo-4AM 亮 2 倍;比 Fluo-3AM 亮 4 倍。

### 使用 Fluo-8®盐

钙校准可以通过测量具有精确已知的游离  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\mu\text{M}$ ）的荧光强度来进行。可以使用基于 30mM MOPS EGTA  $\text{Ca}^{2+}$  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。人们可以简单地制作如下所列的 0 和 39  $\mu\text{M}$  钙原液，这两种溶液用于制备不同  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的连续溶液。

A. 0  $\mu\text{M}$  calcium: 30 mM MOPS + 100 mM KCl, pH 7.2 buffer + 10 mM EGTA

B. 39  $\mu\text{M}$  calcium: 30 mM MOPS + 100 mM KCl, pH 7.2 buffer + 10 mM EGTA + 10 mM  $\text{CaCl}_2$

要确定溶液的游离钙浓度或单波长钙指示剂的  $K_d$ ，使用以下等式：

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

其中  $F$  是在特定实验钙水平下指示剂的荧光强度， $F_{min}$  是不含钙时的荧光强度， $F_{max}$  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特性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。通过在存在的离子载体如 A-23187, 4-溴 A-23187 和离子霉素的情况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 digitonin 和 Triton 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。Fluo-8 试剂的  $K_d$  值列于表 1 中供您参考。

## 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。然而不幸的是，没有一种可以测量  $Ca^{2+}$  的最佳技术/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 Fluo-8® 钙检测试剂和 Screen Quest™ Fluo-8NW 钙测定试剂盒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，与荧光仪器的快速发展相结合。

正如可能预测的那样，许多研究人员的兴趣从细胞水平的  $Ca^{2+}$  分析转向亚细胞水平。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  $\text{Ca}^{2+}$  的细胞内异质性。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  $\text{Ca}^{2+}$  检测）的出现，细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  的测量显著加速。共聚焦激光扫描显微镜，以及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  $\text{Ca}^{2+}$  活性进行精确的空间和时间分析。

## 订购信息

| 名称                    | 货号    | 规格      | 价格   |
|-----------------------|-------|---------|------|
| 钙离子荧光探针 Fluo-8®, AM   | 21080 | 1 mg    | 2100 |
| 钙离子荧光探针 Fluo-8®, AM   | 21081 | 5x50 ug | 1140 |
| 钙离子荧光探针 Fluo-8®, 钠盐   | 21086 | 1 mg    | 3540 |
| 钙离子荧光探针 Fluo-8FF™, 钾盐 | 21103 | 1 mg    | 3540 |