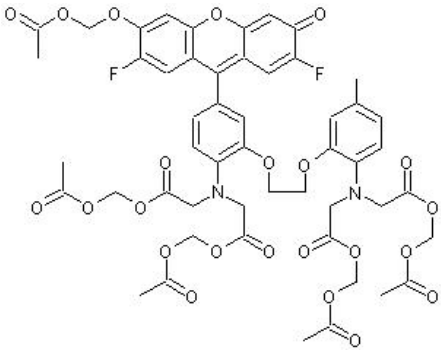
西安百萤生物科技有限公司(Xi'an Biolite Biotech, Ltd.)
西安经济技术开发区草堂科技园二区 9-20401
Tel: 029-68064558; Fax: 029-68064559.
http://www.xabiolite.cn

常见钙指标的 Meta 分析

钙是参与真核生理学的最普遍的离子之一，参与从骨发育到信号转导的重要过程，细胞内钙调节的紊乱可导致严重的神经和结构并发症。由于其重要性，钙在细胞水平上研究是一个相对较大的主题。为了可视化和量化细胞内钙，研究人员采用荧光钙指示剂（或染料），可以螯合自由漂浮的钙离子，以产生定量的荧光反应。当与荧光显微镜，酶标仪或流式细胞仪配对时，钙指示剂可用于成像和监测细胞内钙浓度。

荧光钙指示剂可以是基因或化学工程。遗传指标涉及在活细胞或动物中转染或表达 GFP 变体，而化学指示剂由基于 BAPTA 的小分子组成，其对钙离子具有高选择性。在这两大类钙指标中，化学指标主要受到青睐，因为它们的商业可用性，便利性和实验设计的灵活性。

目前选择的化学指标中有相当受欢迎的单波长钙指示剂，无论它们是否与钙结合，它们只会发出一种颜色的荧光。传统的绿色荧光钙指标包括 Fluo-3 及其改良版 Fluo-4。Fluo-4 是由 Gee 及其同事在 2000 年开发的。它本身基本上是一种非荧光底物，但一旦与钙结合，其荧光增加了 100 倍。其成像技术使研究人员能够发现钙信号传导中的许多相互作用，最近，它已被广泛应用于基于细胞的 HTS 分析中，用于药物发现。Fluo-4 是 Fluo-3 的类似物，其中两个氯原子被氟原子取代，



尽管 Fluo-3 进行了轻微的结构修改，但 Fluo-4 在产生更明亮和更敏感的信号方面取得了巨大进步，使 Fluo-4 成为共聚焦显微镜，流式细胞仪和微孔板筛选应用的理想选择。Fluo-4 的细胞渗透型 Fluo-4 AM 是一种流行的绿色荧光钙指示剂，不需要对背景噪音进行淬灭。

即使荧光增加了 100 倍，Fluo-4 AM 在一些领域也不乏问题。遇到的一个常见问题是由于电池泄漏导致的低信号背景比。为了解决这个问题，Fluo 系列的大多数指标将与一种试剂配对，该试剂可防止荧光反应离开细胞或溶解渗漏以减少背景信号。这些试剂的实例包括丙磺舒或磺胺吡喃酮抑制细胞膜中的阴离子转运蛋白，以防止钙的任何通过。常见的相容性表面活性剂是 Pluronic®多元醇，有助于将染料溶解在水溶液中。然而，这些物质的应用使细胞环境受到更多侵入性操作，并且可能影响整体细胞完整性或钙活性。为避免使用额外的试剂，可选择 Cal-520 AM。绿色染料 Cal-520 经过优化，可解决染料损失问题及其改善的细胞内保留，因此不需要额外的试剂来保持钙含量或抑制背景。CAL-520 在与 Fluo-3 和 Fluo-4 类似的光谱下实现更高的灵敏度和信号背景比。

除染料损失外，使用 Fluo-4 的另一个缺点是保持其使用所需的苛刻的细胞负载条件。另一种绿色染料 Fluo-8 可以在室温下装载细胞，而不是 Fluo-3 和 Fluo-4 所需的 37 摄氏度。由于 Fluo-8 的性能不依赖于温度，因此它是 HTS 应用的理想选择。Fluo-8 也以不同的解离常数（更高和更低）制备亲和力）和包装尺寸，包括 HTS 就绪尺寸。最后但同样重要的是，Fluo-8 发出的信号比 Fluo-4 强两倍。与 Cal-520 一样，Fluo-8 与 Fluo-4 具有非常相似的激发和发射峰，同时是进行绿色荧光成像的更容易获得的通用选择。

化学钙指示剂的另一个麻烦的方面是它们在细胞内分隔的倾向。一种表现出这种现象的染料是 Rhod-2 AM，一种流行的红钙指示剂。它的净正电荷促使许多类型的细胞中的线粒体被隔离。Rhod-2 在线粒体中的这种定位在其引入细胞后不久发生，导致活细胞内的荧光信号有限。Cal-590 被设计为保留在细胞的胞质溶胶中，而不是其线粒体，液泡或其他细胞器，同时保留 Rhod-2 的光谱波长。Cal-590 适用于红色染料成像的全面细胞成像。还有右旋糖酐形式钙指示剂可用于区

室化和细胞内染料保留中更有效的测量。向染料分子中加入大分子葡聚糖允许高溶解度同时保持低毒性，这使其在与染料缀合时作为区室化或渗漏的预防是完美的。选择使用葡聚糖时产生的唯一缺点是它必须通过贴片移液管或显微注射注入细胞。

除了增强的荧光和改善的细胞质保留外，Cal 系列染料（Cal-520，Cal-590 和 Cal-630）具有用于多重检测或多色检测的光谱质量。Cal-520 的激发最大值保持在 492，比其他绿色染料的激发最大值更接近氩激光 488 nm。这种接近 488 nm 的特性使 Cal-520 可与任何荧光仪器平台兼容。激发最大值分别为 573 和 608 nm，发射分别为 588 和 626 nm，红色 Cal-590 和 Cal-630 的长波长使它们与绿色荧光蛋白（GFP）细胞系以及 FITC 兼容 和 AlexaFluor 488 标记的抗体。