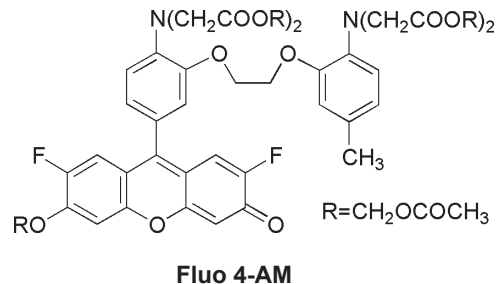


## はじめに

Calcium Kit - Fluo 4 は、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  測定試薬である Fluo 4-AM と、その測定に必要な Buffer 等を組み込んだスクリーニングキットです。細胞種や添加する薬剤などに応じて、Pluronic® F-127 または Cremophor® EL (Fluo 4-AM の溶解補助剤)、Probenecid (陰イオントランスポーターの阻害剤) の各濃度を任意に設定できます。ハイスループットスクリーニングに用いられる蛍光プレートリーダーやインジェクターを備えた各種プレートリーダーでは薬剤添加による細胞内カルシウムイオン濃度変化をリアルタイムで測定可能です。

## キット内容

- Fluo 4-AM .....	50 $\mu\text{g}$ $\times$ 10
- Dimethylsulfoxide .....	2 ml $\times$ 1
- Recording Medium (2X) .....	100 ml $\times$ 1
- 250 mmol/l Probenecid .....	1.3 ml $\times$ 1
- 5% Pluronic® F-127 .....	2.5 ml $\times$ 1
- 5% Cremophor® EL .....	2.5 ml $\times$ 1



- \* 必要に応じて細胞洗浄用の PBS をご用意下さい。  
キットには組み込まれておりません。
- \* 96 穴プレート 10 枚分の測定が可能です。

## 保存条件

冷凍にて保存してください。ご購入後、1 年以内にご使用ください。

## 使用上の注意

- Fluo 4-AM Dimethylsulfoxide 溶液、Loading Buffer 及び Recording Medium は、用時調製してください。
- Fluo 4-AM を Dimethylsulfoxide に溶かした状態で長期保存しますと、Fluo 4-AM が分解する可能性がございます。Loading Buffer は、出来るだけ 1 回の操作で使い切ることをお勧めします。
- 細胞内カルシウムイオンの濃度をより正確に測定したい場合は、姉妹品 Calcium Kit - Fura 2 のご使用をお勧めします。ただし、340 nm/380 nm の二波長励起出来る装置が必要になります。

\* 本製品には、ガラス製容器を使用しております。保護手袋を着用するなど、お取り扱いに際してはご注意ください。

## プロトコール

## 1. 細胞の培養

- マイクロプレートの各ウェルに細胞浮遊液を分注し、炭酸ガスインキュベーター内で一晩培養する。
- \* 付着細胞を使用する際は、96 穴プレートでは 15,000 ~ 40,000 cells/well、384 穴プレートでは 5,000 ~ 15,000 cells/well 程度の細胞を一晩培養して使用することをお勧めします。
- \* 培養に用いる培地の量は、96 穴プレートで 100  $\mu\text{l}$ /well、384 穴プレートで 25  $\mu\text{l}$ /well をお勧めします。

## 2. Loading Buffer の調製 (96 穴マイクロプレート 1 枚分)

- 1) 添付の Dimethylsulfoxide から 50  $\mu\text{l}$  を分取し、Fluo 4-AM 1 本 (50  $\mu\text{g}$ ) に加え、よく溶解する。
- 2) 10 ml スケールの容器を準備する。Recording Medium (2X) 5 ml を取り、測定条件に応じて、任意の量 \* の 5% Pluronic® F-127 (または 5% Cremophor® EL)、250 mmol/l Probenecid を添加し、これに全量が 10 ml となるように純水を加え、よく混合する (本キットは予め、測定に最適な pH7.4 付近となるよう構成してあります)。
- 3) Fluo 4-AM の Dimethylsulfoxide 溶液 (50  $\mu\text{l}$ ) を添加して、超音波などでよく溶解し、Loading Buffer とする。

\* 推奨濃度を Probenecid: 1.25 mmol/l、Pluronic® F-127: 0.04 % としてありますが、濃度の変更は可能です。

Loading Buffer 10 ml を調製する場合、Probenecid、Pluronic® F-127 (または Cremophor® EL) のアッセイ時の最終濃度と、添加量の関係は以下ようになります。

250 mmol/l Probenecid 溶液の添加量と最終濃度					
添加量 ( $\mu\text{l}$ )	20	30	40	50	60
最終濃度 (mmol/l)	0.50	0.75	1.00	1.25	1.50

5% Pluronic® F-127 (5% Cremophor® EL) 溶液の添加量と最終濃度					
添加量 ( $\mu\text{l}$ )	20	40	60	80	100
最終濃度 (%)	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05

### 3. Recording Medium (1X) の調製 (96 穴マイクロプレート 1 枚分)

- 1) 別途、10 ml スケールの容器を準備する。Recording Medium (2X) 5 ml に、測定条件に応じて、任意の量 \* 250 mmol/l Probenecid を添加し、これに全量が 10 ml となるように純水を加え、よく混合する (本キットは予め、測定に最適な pH7.4 付近となるよう構成してあります)。
- 2) 37°C インキュベーター中で加温しておく。

\* 推奨濃度を Probenecid: 1.25 mmol/l としておりますが、濃度の変更は可能です。

Recording Medium (1X) 10 ml を調製する場合、Probenecid のアッセイ時の最終濃度と、添加量の関係は以下ようになります。

250 mmol/l Probenecid 溶液の添加量と最終濃度					
添加量 (μl)	20	30	40	50	60
最終濃度 (mmol/l)	0.50	0.75	1.00	1.25	1.50

### 4. 細胞への Fluo 4-AM のロード

- 1) 細胞を傷つけないように培地を取り除いた後、96 穴プレートで 100 μl/well、384 穴プレートで 25 μl/well の Loading Buffer を、それぞれのウェルに加える (必要に応じて、Loading Buffer を添加する前に、37°C に加温した PBS で細胞を洗浄して下さい)。
- 2) 37°C で 1 時間、インキュベートする。
- 3) 細胞を傷つけないように Loading Buffer を取り除き、予め 37°C に加温しておいた Recording Medium (1X) を、96 穴プレートで 100 μl/well、384 穴プレートで 25 μl/well ずつ加える (必要に応じて、Recording Medium を添加する前に、37°C に加温した PBS で細胞を洗浄して下さい)。
- 4) 薬剤添加による蛍光強度変化を、各種蛍光プレートリーダーで測定する。  
( $\lambda_{\text{ex}} = 480 \sim 500 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 518 \text{ nm}$ )

Pluronic および Cremophor は、BASF 社の登録商標です。

株式会社 同仁化学研究所  
熊本県上益城郡益城町田原 2025-5 〒 861-2202  
Tel:096-286-1515 Fax:096-286-1525 URL:www.dojindo.co.jp  
ドージン・イースト (東京) Tel:03-3578-9651 Fax:03-3578-9650