

はじめに

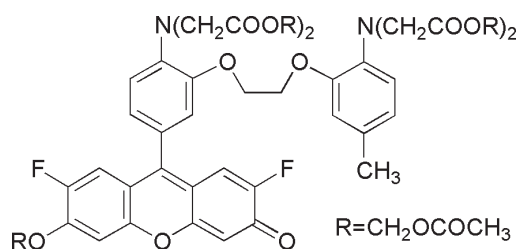
Calcium Kit II - Fluo 4 は、細胞内 Ca^{2+} 測定試薬である Fluo 4-AM と、その測定に必要な Buffer 等を組み込んだキットです。細胞種や添加する薬剤などに応じて、Pluronic® F-127 または Cremophor® EL (Fluo 4-AM の溶解補助剤)、Probenecid (陰イオントランスポーターの阻害剤) の各濃度を任意に設定でき、細胞を培養したマイクロプレートに直接添加できます。

細胞外に存在する Fluo 4 の蛍光を消去する試薬が組み込まれていますので、従来のような細胞の洗浄操作が不要です。短時間で多くのサンプルを処理することができ、High Throughput Screening (HTS) に適しています。ただし、細胞種や添加する薬剤によっては、「レスポンスの高低」「リガンドとの相互作用」などが生じることがあります。測定系に影響の少ない方法での測定を行いたい場合は、Wash タイプで姉妹品の「Calcium Kit - Fluo 4」をお勧めいたします。

本キットで調製した Loading Buffer で 96 穴プレート 10 枚分の測定が可能です。測定にはクリアボトムプレートと下方励起・下方蛍光測定が可能なプレートリーダーをご使用下さい。

キット内容

- Fluo 4-AM.....	50 μg \times 10
- Dimethylsulfoxide	2 ml \times 1
- Hanks' HEPES Buffer (10X)	6 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
- Quenching Buffer	55 ml \times 1



Fluo 4-AM

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 の Dimethylsulfoxide 溶液および Loading Buffer 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すると、Fluo 4-AM が分解する可能性があります。
- * 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。
- Quenching Buffer の容器への着色が見られる場合がありますが、ご使用には問題ありませんのでそのままお使いください。
- Quenching Buffer 中に沈殿が生じる場合がありますが、品質には影響ありません。40°C の水浴で加温溶解後お使いください。
- * 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、お取扱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晚培養する。

- * 附着細胞を使用する際は、96 穴プレートでは 15,000 cells/well、384 穴プレートでは 5,000 cells/well 程度の細胞を一晚培養して使用することをお勧めします。
- * 浮遊細胞を使用する際は、96 穴プレートでは 100,000 cells/well、384 穴プレートでは 25,000 cells/well 程度で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 μl /well、384 穴プレートで 25 μl /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 μl を分取し、Fluo 4-AM 1 本 (50 μg) に加え、よく溶解する。
- 2) Quenching Buffer 5 ml に、Hanks' HEPES Buffer (10X) 500 μl 、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が、必要に応じて HCl や NaOH 溶液で pH を調整してください)。
- 3) Fluo 4-AM の Dimethylsulfoxide 溶液 (50 μl) を添加して、よく混合溶解し、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、添加量の関係は下記ようになります。

250 mmol/l Probenecid 溶液の添加量と最終濃度					
添加量 (μl)	40	60	80	100	120
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 (μl)	40	80	120	160	200
最終濃度 (%)	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05

3. 細胞への Fluo 4-AM のロード

- 1) 細胞を培養したままの状態で培地は取り除かない。直接、培地と当量 (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。
- 2) 37°C で 1 時間、インキュベートする。
- 3) そのまま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。
($\lambda_{ex} = 480 \sim 500 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 518 \text{ nm}$; 細胞洗浄の必要はありません。)

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