

Fluo 4-AM special packaging

－ 細胞内カルシウムイオン測定用試薬 －

Technical Manual

はじめに

Fluo 4 は Fluo 3 のクロロ基 (Cl) がフルオロ基 (F) に置換した構造を持つカルシウム蛍光プローブです。フルオロ基に替わったことで、励起スペクトルの極大波長は Fluo 3 よりも 10 nm 程度短波長にシフトしており、アルゴンレーザーの波長により近くなり、488 nm 励起での蛍光強度は Fluo 3 の二倍程度になります。Fluo 4 のカルシウムイオンの解離定数 (K_{dCa}) は 360 nmol/l で、数 $\mu\text{mol/l}$ までのカルシウムイオン濃度変化を蛍光変化として迅速かつ高感度に測定できるので、細胞内の遊離カルシウムイオン変動のモニターに使用されます。Fluo 4 は生理的条件下では分子内のカルボキシル基がマイナスイオンを持つため、細胞膜を透過できませんが、アセトキシメチルエステル化 (AM 化) した中性分子の Fluo 4-AM は細胞膜を透過できます。細胞膜を透過した Fluo 4-AM は、細胞内のエステラーゼにより加水分解を受け Fluo 4 となり、分子周辺のカルシウムイオン濃度により蛍光強度が変化します。

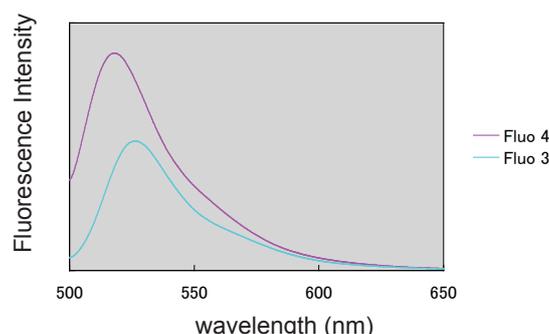
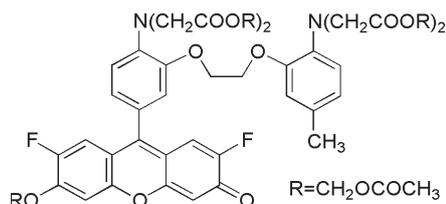


Fig. 1 Fluo 4 および Fluo 3 蛍光スペクトル (Ex.490 nm)
1 $\mu\text{mol/l}$ Fluo 4 (or Fluo 3), 20 mmol/l HEPES, 0.1 mmol/l CaCl_2

内容

- － Fluo 4-AM 50 μg \times 8
- － 添付品 Dimethylsulfoxide(DMSO) 1 ml \times 1

溶液調製法

Fluo 4-AM 50 μg に適量の DMSO を加え、均一に溶解するとご希望の濃度の溶液に調製できます。目的濃度に調製するための DMSO 使用量については、下記の式で算出してください。

* 45 μl の DMSO を加えた場合、約 1 mmol/l の溶液になります。

$$\text{濃度 A (mmol/l) の Fluo 4-AM 溶液を調製したい場合の DMSO の使用量 B (\mu\text{l})}$$
$$\mathbf{B = 45.6/A}$$

使用例

下記の試薬濃度やインキュベーション時間は、必要に応じて最適化する必要があります。

- 1) 1 ~ 5 mmol/l Fluo 4-AM 溶液となるように DMSO を加え溶解する^{a)}。
- 2) 調製した Fluo 4-AM/DMSO 溶液を細胞に使用される中性バッファーを用いて 1000 倍程度に希釈する^{b)}。
(Fluo 4-AM バッファー溶液)
- 3) Fluo 4 を導入したい細胞 (細胞数: 10^6 cells/ml 程度) に対して、終濃度が 1 ~ 5 $\mu\text{mol/l}$ になるように、希釈した Fluo 4-AM バッファー溶液を加える^{c)}。
- 4) 細胞を 10 ~ 60 分間インキュベートする。
- 5) 細胞を培地で洗浄する。

注意事項

- 残った Fluo 4-AM/DMSO 溶液は -20°C で保存してください。保存した溶液の使用に際しては、調製時と比べて着色あるいは蛍光が強く見られる場合は使用しないでください。Fluo 4 の導入効果が低くなります。
 - バッファーで希釈した溶液は保存できません。用時調製してください。また、Fluo 4-AM の細胞への取り込みが悪い場合は、Pluronic[®] F-127 などのデタージェントを使うと、導入効率が高くなる場合があります。(Pluronic[®] F-127 の濃度は 0.04 % 程度でご使用ください。)
 - Fluo 4-AM の希釈バッファー溶液を加える際の細胞培地は、血清を含まない培地あるいは、バッファーを用いてください。血清を含む培地では、AM 基が血清由来のエステラーゼにより加水分解を受け、導入効率が大幅に低下することがあります。
- * 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、お取扱に際してはご注意ください。

ご質問・ご要望は下記までお問い合わせください。

< 製造元 >

DOJINDO 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
熊本テクノリサーチパーク 〒861-2202
Tel: 096-286-1515 (代表) Fax: 096-286-1525
E-mail: info@dojindo.co.jp
URL: www.dojindo.co.jp/

ドージン・イースト (東京)
東京都港区芝大門 2-1-17 朝川ビル 7F 〒105-0012
Tel: 03-3578-9651 (代表) Fax: 03-3578-9650
フリーダイヤル: 0120-489548
フリーファックス: 0120-021557

Fluo 4-AM special packaging
Revised December 22, 2010