

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