

3) Fura 2-AM の Dimethylsulfoxide 溶液 (50 μ l) 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、添加の関係は下記のようになります。

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

3. 細胞への Fura 2-AM のロード

- 1) 細胞を培養したままの状態ですぐに培地は取り除かない。直接、培地と当量 (96 穴プレートで 100 μ l/well、384 穴プレートで 25 μ l/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。
($\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm} / 380 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 510 \text{ nm}$; 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。

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