はじめに

Calcium Kit - Fluo 3 は、細胞内 Ca<sup>2+</sup> 測定試薬である Fluo 3-AM と、その測定に必要な Buffer 等を組み込んだ大量スクリーニングに最適なキットです。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 3-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各種蛍光プレートリーダーで測定可能です。

キット内容

/
\

- N(CH<sub>2</sub>COOR)<sub>2</sub> N(CH<sub>2</sub>COOR)<sub>2</sub>
  O O CI CH<sub>3</sub>
  RO O R=CH<sub>2</sub>OCOCH<sub>3</sub>
- Fluo 3-AM
- \*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。
- \* 2,000 回分(96 穴プレート 20 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 3-AM Dimethylsulfoxide 溶液、Loading Buffer 及び Recording Medium は、用時調製してください。
- Fluo 3-AM を Dimethylsulfoxide に溶かした状態で長期保存しますと、Fluo 3-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薦めします。
- \* 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。

## 1. 細胞の培養

プロトコール

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 cells/well、384 穴プレートでは 5,000 cells/well 程度の 細胞を一晩培養して使用することをお薦めします。
- ・培養に用いる培地の は、96 穴プレートで 100 μl/well、384 穴プレートで 25 μl/well をお薦めします。
- 2. Loading Buffer の調製 (96 穴マイクロプレート 20 枚分)
- 1) 添付の Dimethylsulfoxide から 1 ml を分取し、Fluo 3-AM 1 本(1 mg)に加え、よく溶解する。
- 2) 200 ml スケールの容器を準備する。Recording Medium (2X) 100 ml に、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 200 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 3-AM の Dimethylsulfoxide 溶液 (1 ml) 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 % としてあるが、濃度の変更は可能です。

Loading Buffer 200 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 (ml)	0.4	0.6	0.8	1.0	0.2	
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 (ml)	0.4	0.8	1.2	1.6	2.0		
最終濃度 (%)	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05		

## 3. Recording Medium の調製 (96 穴マイクロプレート 20 枚分)

- 1) 別途、200 ml スケールの容器を準備する。Recording Medium (2X) 100 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 200 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。

Recording Medium (1X) 200 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 (ml)	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2	
最終濃度 (mmol/l)	0.50	0.75	1.00	1.25	1.50	

## 4. 細胞への Fluo 3-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℃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、ハイスループットスクリーニング用の各種蛍光プレートリーダーで測定する。  $(\lambda_{\rm ex}$  = 480  $\sim$  500 nm,  $\lambda_{\rm em}$  = 530 nm)

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

<sup>\*</sup> 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。