

はじめに

Calcium Kit II - iCelluxは、細胞内 Ca^{2+} 測定蛍光試薬と、その測定に必要な Buffer 等を組み込んだキットです。薬剤低濃度領域のシグナル応答を大幅に向上し、96 ウェル、384 ウェルのマイクロプレートでの測定に最適化しています。

これまでの Calcium Kit II シリーズと同様に、溶液中のバックグラウンド蛍光を消去するクエンチャー試薬を用いることで、 Ca^{2+} 測定蛍光試薬を細胞へ負荷した後の洗浄操作を行うことなく、細胞内カルシウム濃度変化を測定できます。洗浄操作が不要となるため、HEK293 細胞などの剥離しやすい細胞を使用する場合や、薬剤スクリーニングを行う場合に適しています。また、細胞種や添加する薬剤などに応じて、製品に付属した Probenecid (陰イオントランスポーター阻害剤) 溶液を添加することが可能です。

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。本キットでは、96 ウェルプレート 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ください。

キット内容

- Calcium Probe.....	×10
- Dimethylsulfoxide.....	2 ml ×1
- 250 mmol/l Probenecid	1.3 ml ×1
- Quenching Buffer	100 ml ×1

保存条件

冷凍にて保存してください。

使用上の注意

- Calcium Probe の Dimethylsulfoxide 溶液および Loading Buffer は用時調製してください。
 - * Calcium Probe を Dimethylsulfoxide に溶かした状態で長期保存すると、Calcium Probe 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。

* 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。

* 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 10 μl を分取し、Calcium Probe 1 本に加えよく溶解する。

2) 別途、用意した容器に添付の 250 mmol/l Probenecid を任意の量* 添加し、これに全量が 10 ml となるように Quenching Buffer を加え、良く混合する (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) Calcium Probe の Dimethylsulfoxide 溶液 10 μl を 2) の溶液に添加してよく混合溶解し、Loading Buffer とする。

* Probenecid 推奨濃度を 1.25 mmol/l 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 のアッセイ時の最終濃度と、添加量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 (μl)	40	60	80	100	120
最終濃度 (mmol/l)	0.50	0.75	1.00	1.25	1.50

3. 細胞への Calcium Probe 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 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。
($\lambda_{ex} = 480 \sim 500 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 520 \text{ nm}$ 付近；細胞洗浄の必要はありません。)