

产品说明书

产品介绍

Fluo-4 是一种将 Fluo-3 结构中的氯离子替换成氟离子的钙荧光探针。由于将氯离子替换成电子吸引力更强的氟离子，它的最大激发波长会向短波长方向偏离 10 nm 左右，这个波长更接近于氩激光器的波长，所以用氩激光器激发时，Fluo-4 的荧光强度比 Fluo-3 更强。Fluo-4, AM ester 穿透细胞膜进入细胞后被细胞内的酯酶剪切形成 Fluo-4，从而被滞留在细胞内。Fluo-4 以游离配体形式存在时几乎是非荧光性的，但是与细胞内钙离子结合后可以产生较强的荧光。可以使用激光共聚焦显微镜或流式细胞仪检测细胞内钙离子浓度的变化。

应用范围

细胞内钙离子浓度检测

产品货号

PL13148

储运条件

-20 °C 避光保存，有效期见外包装；冰袋运输。

产品特点

荧光亮度强：发光时间久，不易淬灭；

选择方便：可搭配我司其它试剂使用，方便灵活。

产品组分

组分	PL13148
Fluo-4, AM ester (钙离子荧光探针)	50 µg

产品参数

外观：可溶于 DMSO 的橙红色粉末

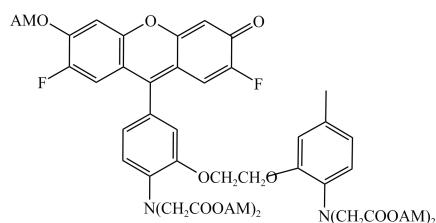
Ex/Em: 494/516 nm (结合Ca²⁺ 后)

CAS 号: 273221-67-3

分子式: C₅₁H₅₀F₂N₂O₂₃

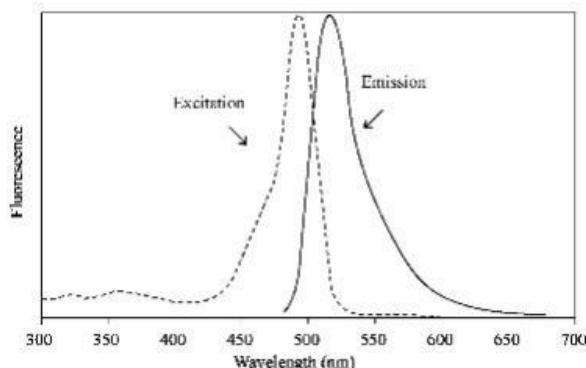
分子量: 1097.0

分子结构图:



AM=CH₂OCOCH₃

光谱图:



注意事项

- 如果使用含有血清的培养基，血清中的酯酶会分解 AM ester 体，从而降低 Fluo-4, AM ester 进入细胞的效果。另外，含有酚红的培养基会使本底值略微偏高，加工作液前应尽量去除残留培养基。荧光染料均存在淬灭问题，请尽量注意避光。
- Fluo-4, AM ester 容易吸潮，从冰箱取出后，请确认在干燥的环境放至室温后开封。由于试剂极微量，开封前请将其短暂离心，以保证粉末落入管底。
- Fluo-4, AM ester 遇水极易分解，如果不能一次用完，建议将储液小量分装保存。
- 本产品仅限于科研用途并且不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请遵循您所在常规实验室安全规定。

操作方法

1. 用无水 DMSO 溶解 Fluo-4, AM ester, 配制成 2 mM 的储液（将 1 mg Fluo-4, AM ester 溶于 456 μL 无水 DMSO 中）。

2. 用 PBS 或 HBSS 稀释 Fluo-4, AM ester 储液，制备 4 μM 的 Fluo-4, AM ester 工作液。

注：推荐工作液浓度为 4~20 μM。为了避免过度加载造成细胞毒性，建议在取得有效结果的基础上使用最低探针浓度，可从 4 μM 开始摸索。

3. (可选) 如果 Fluo-4, AM ester 进入细胞的效果不好，可向 Fluo-4, AM ester 溶液中加入适量 20% Pluronic F-127 溶液，防止 Fluo-4, AM ester 在缓冲液中聚集并促进 Fluo-4, AM ester 进入细胞，Pluronic F-127 终浓度控制在 0.04~0.05%。

注：(1) 20% (w/v) 的 Pluronic F-127 DMSO 母液配制：100 mg Pluronic F-127 中加入 0.5 mL DMSO，配制成 20% (w/v) 的 DMSO 母液。溶解需要在 40~50 °C 加热 20~30 min。溶解后室温保存，勿冷藏。如果有结晶析出，可以重新加热后溶解，不影响使用。
(2) Pluronic F-127 可降低 Fluo-4, AM ester 的稳定性，因此只建议在配制工作液时加入，不建议将其加入储液中。

4. 取出预培养的细胞，除去培养基，使用 PBS 或 HBSS 溶液洗涤细胞 3 次。

5. 去除缓冲液，将 Fluo-4, AM ester 工作液加入细胞中，在 37 °C 培养 10~60 min。

注：如果首次实验不能确定孵育温度和时间，建议尝试 37 °C 孵育 20 min，观察荧光效果。

若细胞死亡较多，则适当缩短时间或降低温度；如果荧光强度太弱，则适当延长时间。

6. 去除 Fluo-4, AM ester 工作液，用 PBS 或 HBSS 等缓冲液洗涤细胞 3 次，然后用 PBS 或 HBSS 等缓冲液重悬细胞，制成 1 × 10⁵ cells/mL 细胞悬液。

7. 37 °C 培养 10 min，确保 AM 体在细胞内的完全去酯化作用。

8. 进行荧光钙离子检测。

注：钙浓度与荧光的关系式为：[Ca²⁺] = Kd [(F - F_{min}) / (F_{max} - F)]

其中，F 是实验钙浓度下指示剂的荧光，F_{min} 是无钙时的荧光。F_{max} 为饱和钙浓度下指示剂的荧光。

据报道，Fluo-4 在无细胞介质中的 Kd 为 345 nM，然而，Kd 通常会受到细胞中多种因素的影响，包括 pH 值、蛋白质浓度、离子强度、温度和粘度。因此，要准确测量细胞内的钙浓度，必须校准 Kd。详细信息，请参阅参考文献。