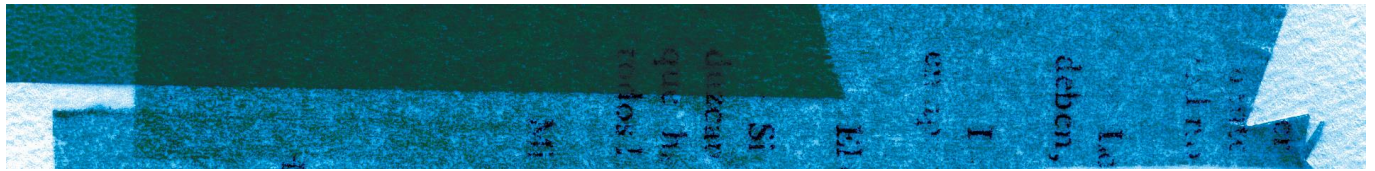


初次检测细胞内 Ca^{2+} 研究者的使用手册

目录

I.	引言	1
II.	选择钙离子探针	1
III.	选择测定设备	5
IV.	探针的溶解方法	5
V.	使用酶标仪测定细胞内 Ca^{2+} 浓度的例子	6
VI.	常见问题的分析和解决	10
VII.	相关产品	15
VIII.	参考文献	16



I. 引言

19 世纪下半叶，Ringer 等报告了 Ca^{2+} 与肌肉的收缩有关。后来通过不断地研究发现，虽然 Ca^{2+} 在发挥生理机能上有着非常重要的作用，但由于细胞内 Ca^{2+} 浓度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 非常低难以检测（数百 nmol/l ），所以更好地观测 Ca^{2+} 成为大批研究人员长期的目标。

1980 年，美国加州大学 Tsien 等发表了用 Quin 2 检测细胞内 Ca^{2+} 的方法¹⁾。他们开发的检测试剂（ Ca^{2+} 探针）具有「无需其他试剂便可进入细胞」「荧光强度随着细胞内 Ca^{2+} 浓度变化而变化」等优点。

随着新的 Ca^{2+} 探针的不断开发及光学仪器技术的进步，可以说细胞内 Ca^{2+} 成像已经变成一种「很容易上手的实验」了。确实，细胞内 Ca^{2+} 成像的实验不需要使用特殊的设备，通过荧光强度的变化就能够进行检测，对从未涉及过该试验的研究者来说也不算很难的实验。

不过，我们公司也经常收到一些来自研究人员对于细胞内 Ca^{2+} 实验技术的询问。从中我们发现，如果没有充分了解 Ca^{2+} 探针的性能和注意事项，很难得到与预期一样的实验结果。

据该情况，我们公司整理了本手册，并想借此向初次检测 Ca^{2+} 的研究人员简单地介绍常见问题的解决方法及实验中的注意事项等。

II. 选择钙离子探针

Ca^{2+} 荧光探针的种类繁多。所以大多数的初次使用者会犹豫需要选择哪种荧光探针。下面说明选择 Ca^{2+} 探针时的要点。

1. 探针名称中是否含有 AM 酯

Ca^{2+} 探针名称中带有“AM”字样（例如；Fluo 4-AM、Fura 2-AM）。AM 指乙酰甲酯，表示螯合 Ca^{2+} 的部分（羧基）被乙酰甲酯（AM 酯）保护。

为什么需要 AM 酯保护？理由是为了有利于探针穿过细胞膜进入到细胞内部。也可以这样说，如果 Ca^{2+} 探针没有被 AM 酯保护将很难进入到细胞内部。所以需要检测细胞内 Ca^{2+} 浓度的话，一定要选择具有 AM 酯的 Ca^{2+} 探针。探针进入细胞内后，AM 酯会通过细胞内酯酶水解变成能够螯合 Ca^{2+} 的结构，同时探针无法再透过细胞膜从而留在细胞内（图 1）。

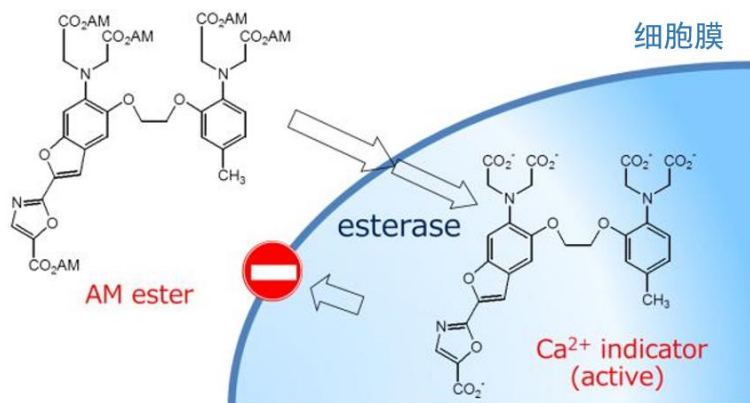


图 1 AM 酯进入细胞内的模式图

2. 实验室是否有合适的检测仪器

每种荧光物质都具有自己的最大激发波长和最大发射波长。如果不是在最大激发波长附近激发，则荧光强度会降低。最理想的设备是具有全波长的仪器。但由于一般的仪器只有限定的滤光片，所以需要判断 Ca^{2+} 探针的激发波长是否适用于自己的仪器、是否能检测荧光。

由于 Fluo 3 和 Fluo 4 适用的滤光片是大多数仪器通用的滤光片（荧光显微镜的 488 nm）所以推荐给第一次检测的客户使用。

Fura 2 需要用 2 个波长（340 nm 和 380 nm）同时激发（发射波长均为 510 nm），所以需要双激发波长的仪器。

3. 荧光探针的解离常数 (K_d 值) 是否适合测定对象

K_d 值指探针在 Ca^{2+} 浓度多少时容易与 Ca^{2+} 螯合的数值。一定要选择具有合适 K_d 值的探针。

例如， K_d 值 0.2 $\mu\text{mol/l}$ 左右的 Fura 2 和 K_d 值 0.3 $\mu\text{mol/l}$ 左右的 Fluo 4 适合检测细胞质。如果使用不合适的探针，得到的信号变化非常小（图 2）。

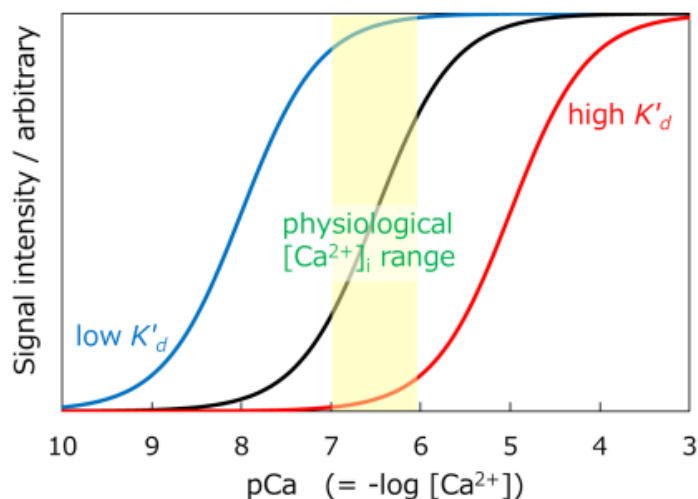
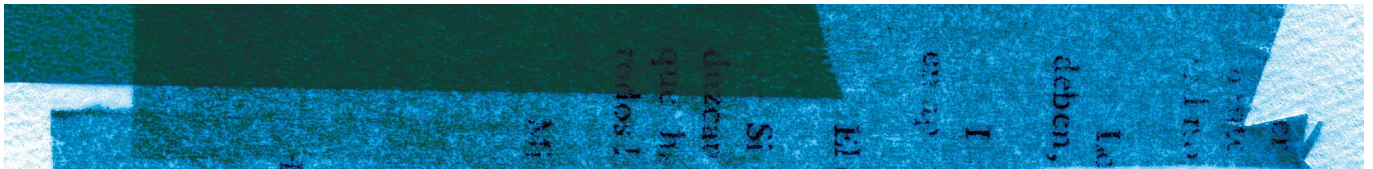


图 2 Ca^{2+} 浓度与信号强度的关系

表 1 Ca^{2+} 荧光探针的种类与荧光特性

产品名	激发波长	发射波长	Ca^{2+} 解离常数 (K_d)	文献
Quin 2	339 nm	492 nm	110 nmol/l	1)
Fura 2	340 nm / 380 nm	510 nm	224 nmol/l	2)
Fluo 3	508 nm	527 nm	400 nmol/l	3)
Fluo 4	495 nm	518 nm	360 nmol/l	4)
Rhod 2	553 nm	576 nm	1,000 nmol/l	3)



【关于探针浓度】

为了使探针和 Ca^{2+} 的充分结合，除了 K_d 值和 Ca^{2+} 浓度（一般无法改变）之外，探针浓度也会对探针和 Ca^{2+} 的结合造成影响。

$$K_d = [\text{Ca}^{2+}][\text{探针}] / [\text{Ca}^{2+}\cdot\text{探针}]$$

以上为解离常数 K_d 的计算公式。探针浓度会影响探针和 Ca^{2+} 的充分结合。如果探针浓度太高，探针不但会和细胞内的 Ca^{2+} 结合，同时还会与在细胞内和已结合蛋白质的 Ca^{2+} 反应（探针与 Ca^{2+} 的 K_d 会对蛋白质与 Ca^{2+} 的 K_d 造成影响）。细胞内 Ca^{2+} 实验的一般实验条件是探针浓度在 1-5 $\mu\text{mol/l}$ 左右，孵育时间 15-60 分钟左右。

4. 是否需要算出细胞内 Ca^{2+} 浓度

有些客户原以为探针是为了算出 Ca^{2+} 浓度而使用。其实通过检测可以得到的结果不是 Ca^{2+} 浓度，而是荧光强度。如想算出 Ca^{2+} 浓度，需要将荧光强度用标准曲线转换成 Ca^{2+} 浓度。标准曲线笼统地说有 2 种作法。

1) 生物体内的标准曲线

在模仿细胞内离子环境的盐溶液中，边改变 Ca^{2+} 浓度边检测荧光，作成荧光强度和 Ca^{2+} 浓度的标准曲线。

2) 生物体外的标准曲线

将已载入探针的细胞用 Ca^{2+} 离子载体（ionomycin、Br-A23187 等）处理提高细胞膜对 Ca^{2+} 的通透性后，检测细胞外溶液中的荧光。根据探针对 Ca^{2+} 的 K_d 值、最大荧光值、最小荧光值等，使用公式算出细胞内 Ca^{2+} 浓度。计算细胞内 Ca^{2+} 浓度时，一般来说选择具有双激发波长的 Fura 2-AM 的情况比较多（具有双激发波长不太会受细胞厚度和探针漏出等影响）。

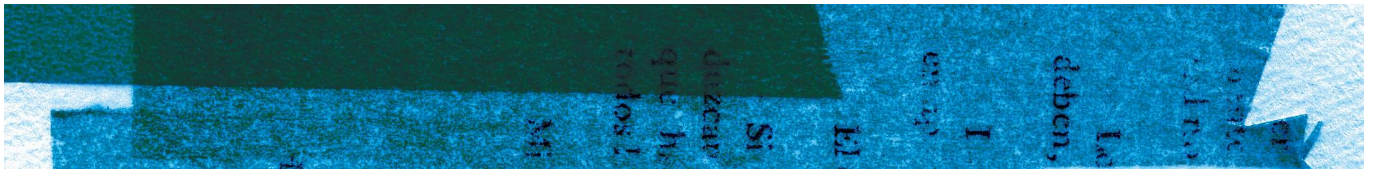
【关于标准曲线的注意点】

通过标准曲线得到的不是完全正确的 Ca^{2+} 浓度的绝对值。关于 Fura 2-AM 的解离常数，一般用的是 Tsien 等人报告²⁾的 135 nmol/l 或 224 nmol/l，但实际上会随着细胞内的条件变化。例如，一般所知的如果细胞内蛋白质与 Fura 2 结合，Fura 2 的 K_d 值会增加⁵⁾。事实上，因为无法清楚有多少细胞内的蛋白质与 Fura 2 结合，所以很可惜正确的解离常数并不为人知。因此，很难精确算出细胞内绝对的 Ca^{2+} 浓度。综上所述结合文献中报导，使用 Fura 2-AM 等双波长激发探针的话，可以得到双波长测定的荧光强度的比率。使用 Fluo 4-AM 等单波长激发探针的话，可以得出荧光变化率。

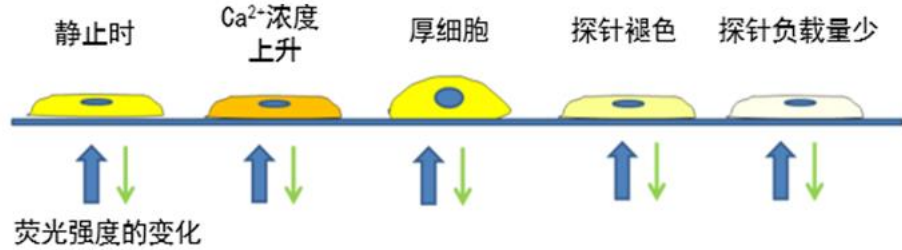
5. 选择单激发波长还是双激发波长

如果是根据荧光强度变化的比率来讨论的话，推荐 Fluo 3-AM、Fluo 4-AM 等单激发波长的探针。这种探针的特点是荧光强度会随着细胞内 Ca^{2+} 浓度变化而变化，而激发波长和荧光波长固定不变，所以这类探针易于初次实验。

可以得到「假设加入待测药物前的荧光强度（相对值）等于 5,000，添加药物之后的荧光强度（相对值）变成 20,000」等的的数据。但是，使用具有单激发波长探针需要注意的是荧光强度会根据进入细胞内的探针量、细胞厚度与探针的淬灭而变化（图 3）。就是说，单激发波长的探针容易因为检测条件出现



差错。具有双激发波长的荧光探针 Fura 2 可以解决这类问题。Fura 2 是随着 Ca^{2+} 浓度的上升，340 nm 激发的荧光强度会增强，而 380 nm 激发的荧光强度会减弱的探针（图 4）。用比率讨论的话，无论进入细胞内的 Fura 2 的量有多少，比率都会一样，可以得到比较符合实际结果的数据。特别是要计算 Ca^{2+} 浓度的时候，用这种双激发波长的探针比较多。



	静止时	Ca^{2+} 浓度上升	厚细胞	探针褪色	探针负载量少
Fluo3, Fluo4	标准	上升	强	弱	弱
Fura2					
F340	标准	上升	强	弱	弱
F380	标准	下降	强	弱	弱
比率	R:固定	R:增加	R:固定	R:固定	R:固定

荧光强度也会因为 Ca^{2+} 浓度增减以外的因素发生变化，而比率不太会因为这些因素产生变化

图 3 探针信号的增减

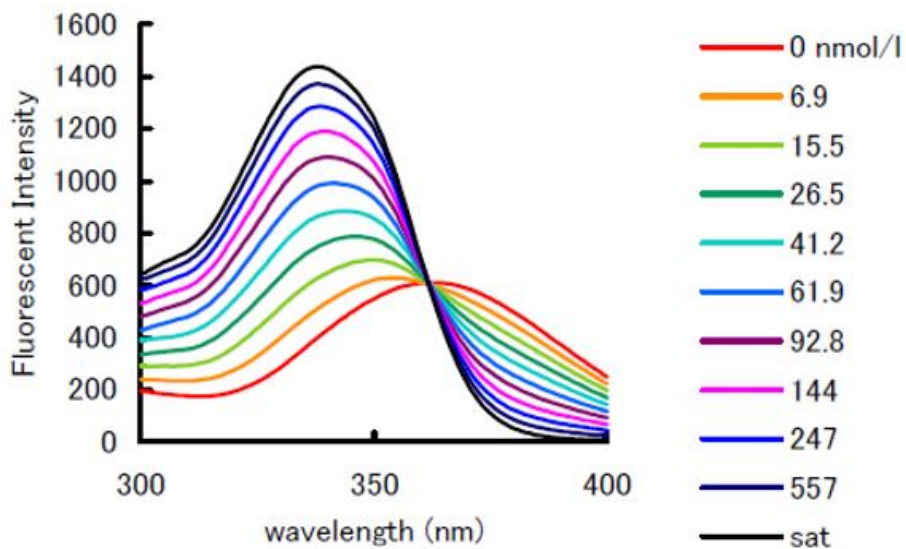
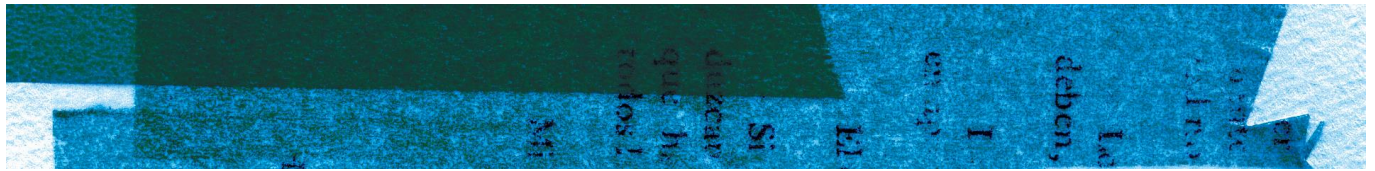


图 4 Fura 2 激发光谱的变化



III. 选择测定设备

对于细胞内 Ca^{2+} 的研究者，最常见的荧光测定设备是荧光酶标仪和荧光显微镜。经常有客户反应，例如「使用荧光酶标仪检测 96 孔板内 Ca^{2+} 浓度，但是检测不了」等问题。下面将向您介绍，使用这两种设备检测时的注意事项。

① 荧光酶标仪

由于药物应答引起的细胞 Ca^{2+} 浓度的变化一般都是从添加药物时就会开始。所以使用带有注射器的荧光酶标仪检测比较理想。不过，也有添加药物之后，细胞内 Ca^{2+} 浓度逐渐上升，然后保持固定状态的情况。这种情况的话，加入药物之后立刻检测，就可以看到荧光强度变化。但是，如果 Ca^{2+} 浓度变化比较迅速（例如短时间内增加后迅速减少），那么，检测时 Ca^{2+} 浓度很有可能已经减少。此外，需要了解的是使用荧光酶标仪检测的时候，检测的结果是很多细胞荧光强度的平均值。而一边使用荧光显微镜观察一边加入药物（ionomycin 等），得到的结果是每个细胞的荧光变化都会是不同的。其中有些细胞是加入药物前已经发射荧光，也有些细胞加入药物后荧光强度也不会发生变化的。荧光酶标仪是把酶标仪激发光线上存在的细胞荧光强度平均之后算出数值。因此，需要留意细胞状态影响的荧光强度变化，以及当激发光位置不存在细胞，可能导致的平均荧光强度没有上升的情况。

② 荧光显微镜

一般的荧光显微镜是倒置型，可以利用落射荧光。通常将汞灯作为光源，但是使用具有双激发波长探针（Fura 2-AM 等）的话，建议使用对能量的波长依存性比较均等的氙气灯更合适。Fura 2-AM 实验中，需要可以交互转换的双波长设备。Fluo 3-AM 和 Fluo 4-AM 只需要含 B 激发滤光片就可以检测。

带有 CCD 照相机的图像处理系统可以量化细胞的荧光强度。关于设备的原理和详细情况，请咨询设备厂商。也有可以看单个细胞荧光强度变化的图像处理系统。

IV. 探针的溶解方法

具有 AM 的探针由于其高疏水性，不会轻易地在水中溶解，同时帮助探针进入细胞。因此，探针需要使用 DMSO 溶解，然后再与缓冲液混合。不过，AM 酯在溶液中会形成颗粒，且漂浮在溶液中。使用这种悬液，探针进入细胞能力会大幅下降。所以需要使用少量的表面活性剂（Pluronic F-127、Cremophor ET 等）或超声波处理提高探针进入细胞能力。

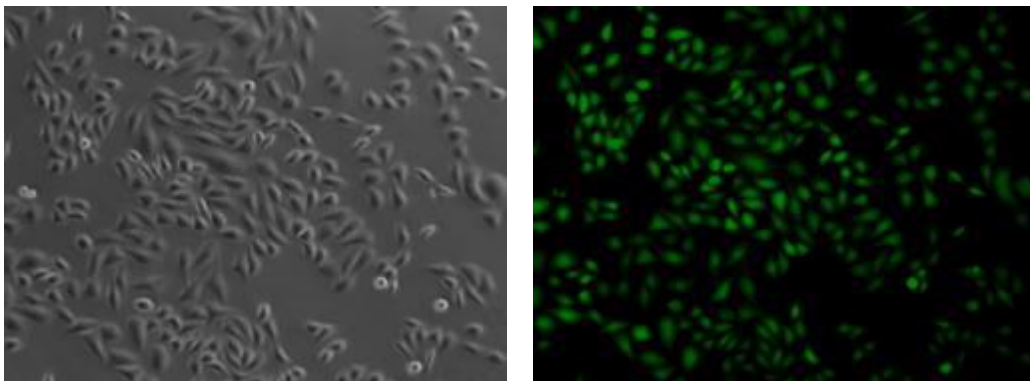
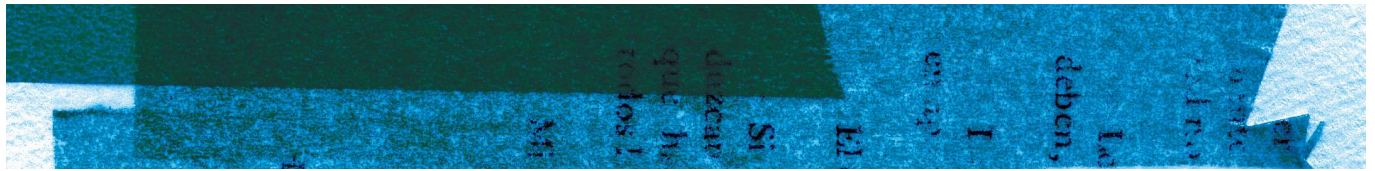


图 5 Fluo 4-AM 进入到细胞后（左图：明视野，右图：荧光）



V. 使用酶标仪测定细胞内 Ca^{2+} 浓度的例子

敝公司销售测定细胞内 Ca^{2+} 浓度的试剂盒(Calcium Kit)，试剂盒内包含所有该实验所需试剂。除 Ca^{2+} 探针以外，还包括二甲基亚砜 (DMSO，溶解 Ca^{2+} 探针时使用)、Pluronic F-127 (表面活性剂)、Probenecid (阴离子转运抑制剂)，所以推荐给初次检测细胞内 Ca^{2+} 的客户。以下为使用试剂 Fluo 4-AM 的实验例。

【实验例 1】使用 Calcium Kit 和装有注入器的荧光酶标仪(Infinite M200)

1. 试剂

- ✚ Calcium Kit-Fluo 4 (货号: CS22)
- ✚ 药物: ATP
- ✚ 细胞: CHO 细胞 (中国仓鼠卵巢细胞)
- ✚ PBS (磷酸盐缓冲液: 8 g/l NaCl, 0.2 g/l KCl, 0.2 g/l KH_2PO_4 , 1.15 g/l Na_2HPO_4)
- ✚ 培养板: 透明底板(Nunc)

* 如果使用能够从上方激发荧光的仪器，使用透明底板以外的培养板也可以测定。

不过，使用透明底板同时也可以使用光学显微镜观察细胞的状态，所以透明底板更适用于该实验。

2. 配制试剂 (1 块 96 孔板用量)

1. 配制 Fluo 4-AM DMSO 溶液

在 50 μg Fluo 4-AM (1 支) 中加入 50 μl DMSO 后，吹打溶解。

2. 配制 Loading Buffer

在 5 ml Recording Medium(2x)中加入 50 μl Fluo 4-AM DMSO 溶液。按照需要加入终浓度为 0.04 % (w/v) 的 Pluronic F-127 (表面活性剂、能够更容易把 Ca^{2+} 探针进入到细胞内)、终浓度为 1.25 mmol/l 的 Probenecid (抑制 Ca^{2+} 探针从细胞内漏出) 后，加入纯水使总体积达到 10 ml。使用 Vortex 或超声波充分混匀。

3. 配制 Recording Medium(1x)

在 5 ml Recording Medium(2x)中加入 50 μl Probenecid(1.25 mmol/l)。加入纯水使总体积达到 10 ml、充分混匀后，37 $^{\circ}\text{C}$ 加温。

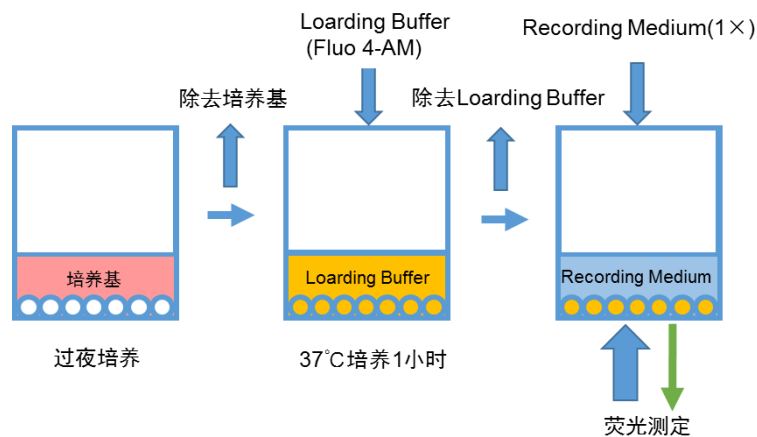
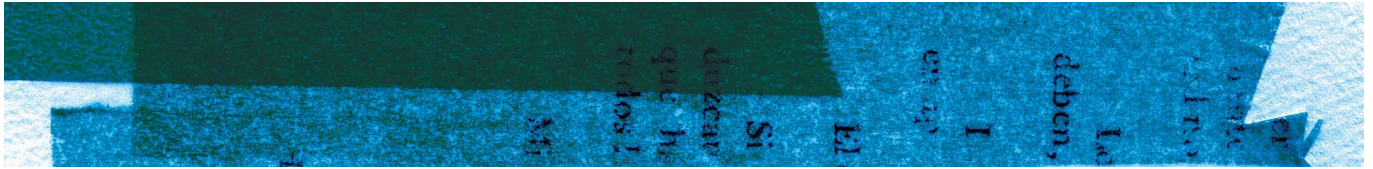


图 6 使用 Calcium Kit 测定细胞内 Ca^{2+} 的方法



3. 试验步骤（1块 96 孔板用）

- 1) 配制细胞悬液后，每孔加入 40,000 cells/100 μ l 的细胞悬液。使用 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱过夜培养。
* 如果细胞数量偏少，细胞偶尔会处在偏孔边缘位置。为了孔中央的光路处充满细胞，最合适的细胞接种密度为 80-90 %、即相对饱满的状态。
- 2) 去除培养基（注意不要损伤细胞）。如有血清成分的残留，Fluo 4-AM 会分解，使用加温到 37 $^{\circ}$ C 的 PBS 洗涤细胞数次（如果细胞容易会拖落，请不要洗涤）。
- 3) 在每孔中加入 100 μ l Loading Buffer。
- 4) 在 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱培养 1 小时。
* 不推荐培养 1 小时以上，可能会引起探针的局部漏出。
- 5) 去除 Loading Buffer（注意不要损伤细胞）。被水解的探针会引起背景的上升，使用加温到 37 $^{\circ}$ C 的 PBS 洗涤细胞数次（如果细胞容易脱落，不要洗涤）。
- 6) 在每孔中加入已经加温到 37 $^{\circ}$ C 的 Recording Medium(1 \times)。
- 7) 使用荧光酶标仪测定通过加入药物(ATP)的荧光强度变化。

例) Infinite M200（荧光酶标仪）的设定条件

Plate Definition	: 96 well Flat Black microplate
Part of Plate	: Select rows
Kinetic Cycle	: 100 cycles
Kinetic Condition	: Handling for cycle 10
Injection	: Injector A injects 20 μ l with speed 100 μ l/sec.
Fluorescence Intensity	: Ex.485 nm / Em.535 nm, gain 100

4. 结果

检测用终浓度 ATP(25 μ mol/l)刺激的 CHO 细胞内 Ca^{2+} 浓度变化。开始检测 10 秒后加入 ATP，发现荧光强度上升明显，说明 Ca^{2+} 浓度上升。

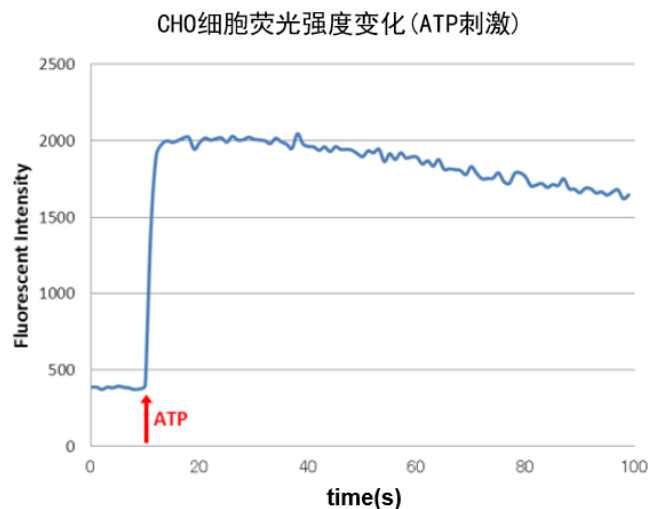
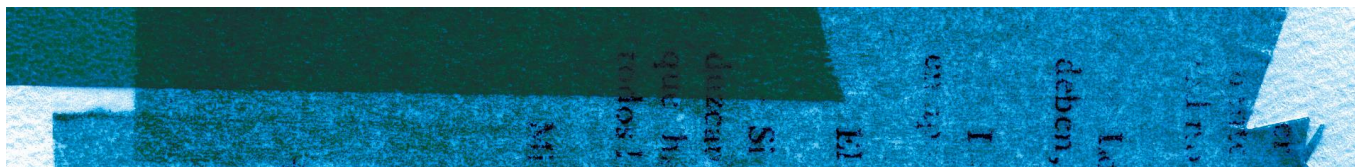


图 7 使用 ATP 刺激 CHO 细胞时的荧光强度变化



【实验例 2】使用 Fluo 4-AM special packaging 和没有装注入器的荧光酶标仪(TECAN GENios)

1. 试剂

- ✚ Fluo 4-AM special packaging (货号: F312)
- ✚ 药物: ionomycin free acid(ALS)
- ✚ PBS (磷酸盐缓冲液: 8 g/l NaCl, 0.2 g/l KCl, 0.2 g/l KH₂PO₄, 1.15 g/l Na₂HPO₄)
- ✚ Pluronic F-127(Sigma)
- ✚ Probenecid (和光纯药工业)
- ✚ 细胞: CHO 细胞 (中国仓鼠卵巢细胞)
- ✚ 培养板: 透明底板(Nunc)
- ✚ Recording Medium(1×)
 - 1) 在 1 l 烧杯中加入如下表 2 的试剂后, 加入大约 800 ml 超纯水溶解。
 - 2) 使用 4 mol/l KOH 调制 pH 7.4(25 °C)后, 加入超纯水, 使总体积达到 1 l。
 - 3) 使用孔径为 0.2 μm 的无菌过滤膜灭菌后, 在 4 °C 保存。
 - * 不可使用高压蒸气灭菌锅灭菌。

表 2 Recording Medium(1×)的配方

浓度	试剂	需要量	分子量
20 mmol/l	HEPES	4.77 g	238.31
115 mmol/l	NaCl	6.72 g	58.44
5.4 mmol/l	KCl	0.40 g	74.55
0.8 mmol/l	MgCl ₂	0.076 g	95.21
1.8 mmol/l	CaCl ₂	0.20 g	110.98
13.8 mmol/l	glucose	2.49 g	180.16

2. 配制试剂 (1 块 96 孔板用量)

- 1) 配制 Fluo 4-AM DMSO 溶液
在 50 μg Fluo 4-AM (1 支) 中加入 15.2 μl DMSO 后, 吹打溶解 (母液终浓度为 3 mmol/l)。
- 2) 配制 Loading Buffer
在 10 ml Recording Medium(1×)中加入 10 μl Fluo 4-AM DMSO 溶液 (终浓度 3 μmol/l)。按照需要加入浓度为 0.04 % (0.4 mg/ml) 的 Pluronic F-127、浓度为 1.25 mmol/l (0.36 mg/ml) 的 Probenecid。
 - * 对于 CHO 细胞, 不加入 Pluronic F-127、Probenecid 的话, 探针进入细胞的效率特别低。
 - * 如果 Pluronic F-127、Probenecid 难溶解, 建议使用超声波溶解。
- 3) 配制测定用 Recording Medium
在 10 ml Recording Medium(1×)中加入 Probenecid (最终浓度 1.25 mmol/l, 0.36 mg/ml)。
- 4) 配制刺激用 ionomycin 溶液
在 ionomycin free acid 中加入 DMSO, 调制 1 mmol/l DMSO Stock 溶液。使用 Recording Medium(1×) 或 PBS 稀释、调制 10 μmol/l ionomycin 溶液。

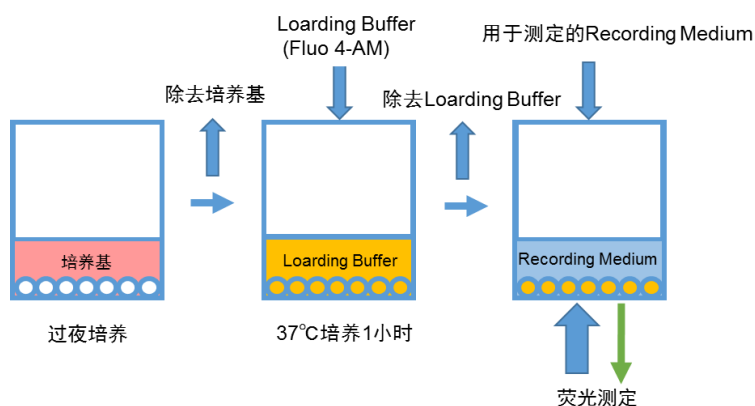
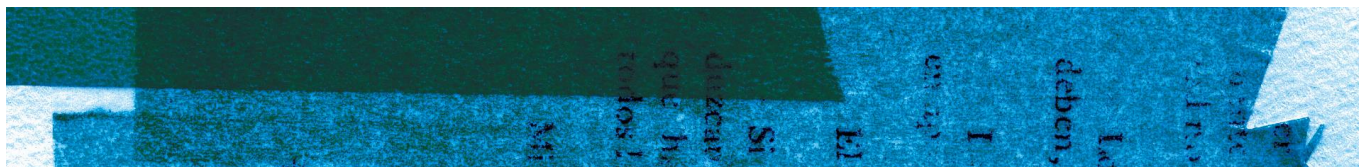


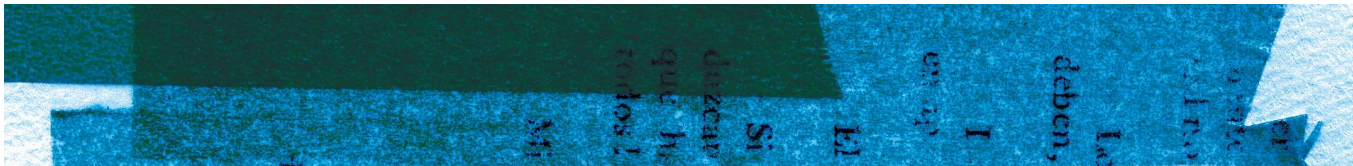
图 8 使用 Fluo 4-AM special packaging 测定细胞内 Ca²⁺的方法

3. 试验步骤（使用 1 块 96 孔板时）

- 1) 配制细胞悬液后，每孔中加入 40,000 cells/100 μl 的细胞悬液。37 °C 细胞培养箱过夜培养。
* 如果细胞数量偏少，细胞偶尔会处在偏孔边缘位置。为了孔中央的光路处充满细胞，最合适的细胞接种密度为 80-90 %、即相对饱满的状态。
- 2) 去除培养基（注意不要损伤细胞）。如有血清成分的残留，Fluo 4-AM 会分解，使用加温到 37 °C 的 PBS 洗涤细胞数次（如果细胞容易脱落，请不要洗涤）。
- 3) 在每孔中加入 100 μl Loading Buffer（按照需要，加入 Loading Buffer 前使用加温到 37 °C 的 PBS 洗涤细胞数次）。
- 4) 在 37 °C 细胞培养箱培养 1 小时。
* 由于培养 1 小时以上会引起探针的局部漏出，所以不推荐。
- 5) 除去 Loading Buffer（注意不要损伤细胞）。被水解的探针会引起背景的上升，使用加温到 37 °C 的 PBS 洗涤细胞数次（如果细胞容易会剥落，不要洗涤）。
- 6) 在每孔中加入已经加温到 37 °C 的 100 μl 检测用 Recording Medium(1x)。
- 7) 使用动力学模式检测数次加入药物前的荧光强度。以动力学检测间隔时间最短的孔为指定孔检测。
- 8) 取出培养板后，使用单枪加入 10 μl 药物（10 μmol/l ionomycin，最终浓度 0.9 μmol/l）。使用动力学模式检测数次加入药物后的荧光强度。以动力学检测间隔时间最短的孔为指定孔检测。
* 由于 Ca²⁺浓度的变化特别快，加入药物后，一定要马上检测。
* 由于荧光强度是相对值，酶标仪的灵敏度设定一定要与加入药物前的条件一致。

例) TECAN GENios（荧光酶标仪）的设定条件

Measurement mode : Fluorescent Bottom
 Kinetic interval : 7 sec.
 Fluorescence Intensity : Ex.485 nm / Em.535 nm, gain 80(manual)
 Measurement mode : Fluorescent Bottom
 Part of Plate : 1 well 指定
 Kinetic Cycle : 20 cycles（加入前 4 cycles）



4. 结果

检测用终浓度 0.9 $\mu\text{mol/l}$ ionomycin 刺激的 CHO 细胞内 Ca^{2+} 浓度变化。

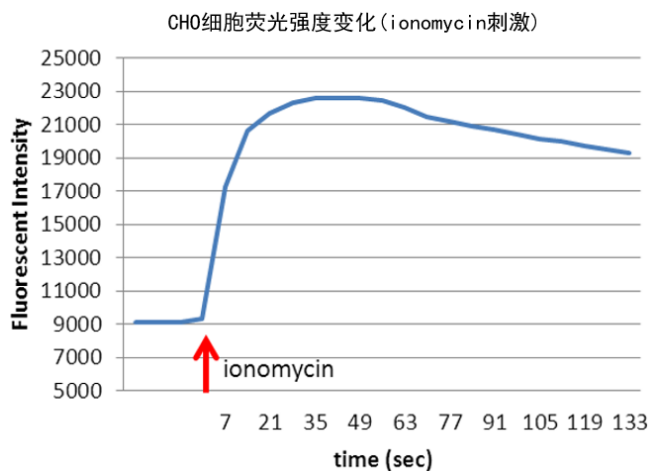


图 9 使用 ionomycin 刺激 CHO 细胞时的荧光强度变化

5. 测定时的注意点

- Fluo 4-AM 需要冷冻保存。
- 使用 DMSO 溶解后的 Fluo 4-AM 长期保存或反复冻融的话， Ca^{2+} 探针可能会分解。如果一次用不完，建议按照一次使用量分装后再冷冻保存。
- Loading Buffer 需要现配现用。使用保存后的 Loading Buffer 会使 Fluo 4-AM 水解，进入细胞的效率也会大幅降低。

VI. 常见问题的分析和解决

问题 1: 加入目的药物后，能够观察荧光强度的变化（细胞内 Ca^{2+} 浓度的上升），但与预期不符。在此介绍解决问题的基本方法。影响荧光强度变化的三个主要因素，如下；

1. 设备参数、设置问题（滤光片、激发光、发射光等）
2. Ca^{2+} 探针没有进入细胞内
3. 药物不适合（浓度、种类等）

虽然解决问题的方法麻烦，但仍然建议从 1. 开始一个个解决如上 3 个要点。如下介绍各种问题的确认方法。

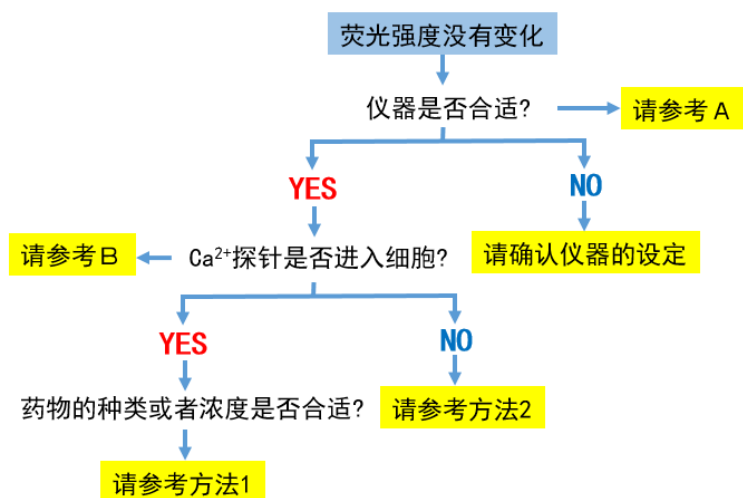
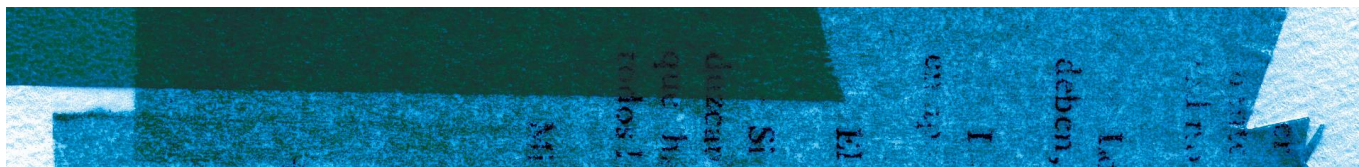


图 10 解决问题的流程图

A. 设备参数、设置（滤光片、激发光、发射光等）是否适用 Ca^{2+} 探针的确认方法

将 Fluo 4-AM 强制水解后，确认荧光强度的上升。

<操作步骤>

- 1) 在 96 孔板（无细胞）不同孔中分别加入 100 μl PBS、100 μl 含有 10 % 血清的培养基、100 μl 0.1 mol/l NaOH（图 11 上面）。
- 2) 在步骤 1 溶液孔中分别加入 100 μl Loading Buffer 后，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 1 小时。Fluo 4-AM 会被碱和血清水解。
- 3) 使用荧光酶标仪测定。

如与 PBS+Loading Buffer 孔的荧光强度比较，加入 NaOH 和血清孔的荧光强度没有区别，则设备设定条件及滤光器可能有问题，需要再次确认设备设定条件。因为细胞内的荧光强度变化非常小，如果使用降低荧光检测灵敏度的酶标仪，荧光强度的上升可能无法被测出。

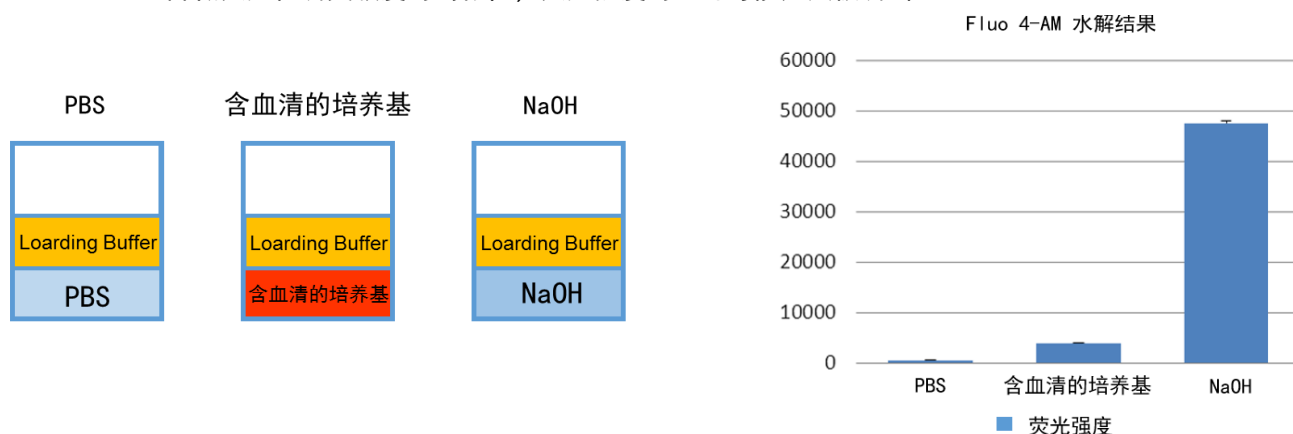
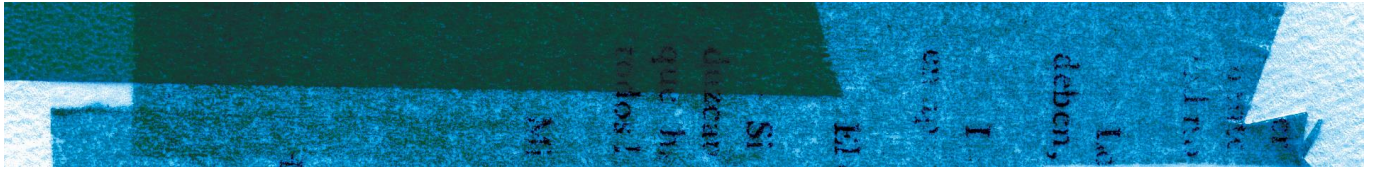


图 11 每孔溶液加入示意图（上）
及各孔 Fluo 4-AM 荧光强度结果（下）



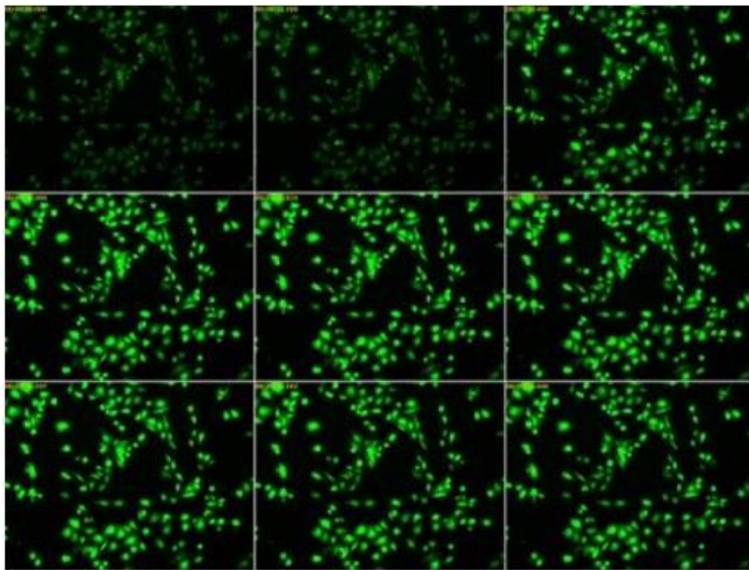
B. Ca²⁺探针是否进入细胞内的确认方法

使用荧光显微镜直接观察或使用 Ca²⁺载体 (ionomycin、Br-A23187 等) 处理、提高细胞膜的 Ca²⁺通透性后, 确认荧光强度的上升。

<操作步骤>

1) 使用荧光显微镜, 直接观察细胞。

使用 Fluo 4-AM 时, 如果 Ca²⁺探针进入细胞, 能够观察到微小的荧光。由于 Fura 2-AM 和 Fluo 3-AM 的荧光强度没有 Fluo 4-AM 高, 偶尔无法观察到荧光。



刺激前	刺激后 0s	刺激后 15s
刺激后 30s	刺激后 45s	刺激后 60s
刺激后 75s	刺激后 90s	刺激后 105s

图 12 负载 Fluo 4-AM 的 CHO 细胞使用药物(ionomycin)刺激后每 15 秒观察

2) 如无法使用荧光显微镜, 可以选择以下两种方法中的一种确认。

【方法 1】使用 Ca²⁺载体和 GEDTA(EGTA)的方法

<操作步骤>

- 在 10 μl ionomycin solution(1 mmol/l)中加入 990 μl PBS 制成 10 μmol/l ionomycin 溶液。
* 建议使用 DMSO 溶解 ionomycin free acid 配制 1 mmol/l 母液。按照细胞种类, 可以使用 Br-A23187 等的离子载体。
- 加入 10 μl 大约终浓度为 1 μmol/l 的 ionomycin 溶液代替药物后, 立刻测定荧光强度的变化。如果 Ca²⁺探针进入细胞, 荧光强度会变化。
- 加入 12 μl 100 mmol/l GEDTA solution (终浓度 10 mmol/l)、在 37 °C 培养大约 5 分钟后, 测定荧光强度的变化。如果 Ca²⁺探针进入细胞, 会观察到荧光强度的减弱。

* 100 mmol/l GEDTA solution 的配制方法

使用 10 ml PBS 或 10 ml Recording Medium(1×)溶解 380 mg GEDTA (货号: G002)。

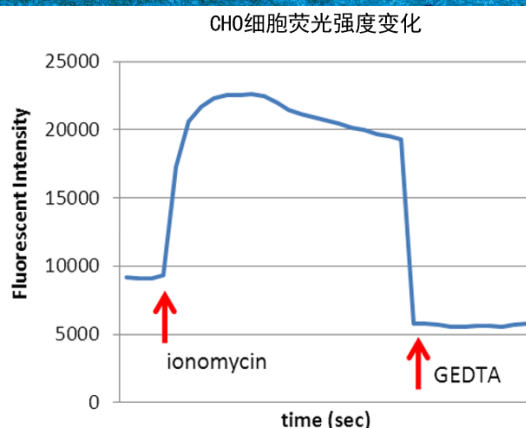
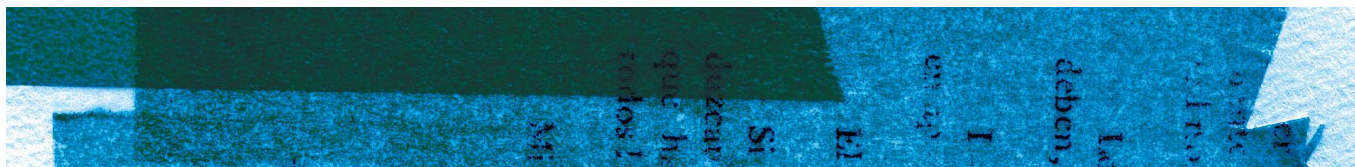


图 13 在 CHO 细胞加入 ionomycin 和 GEDTA 时的荧光强度变化

* ionomycin 等的 Ca^{2+} 载体是会强制提高细胞膜对 Ca^{2+} 通透性的药物，如果 Ca^{2+} 探针进入细胞内，能够观察荧光强度的上升。且说，GEDTA(EGTA)是 Ca^{2+} 螯合剂，在加入 ionomycin 的状态，在细胞外加入 GEDTA，由于细胞内 Ca^{2+} 浓度下降，荧光强度会下降。

* 如果通过加入 ionomycin 溶液及 GEDTA 没有观察到荧光强度的变化， Ca^{2+} 探针有可能没有进入细胞。参照如下解决问题【问题 1】来解决。

【方法 2】裂解细胞膜后，确认在细胞中是否有探针的方法

<操作步骤>

- 1) 用 PBS 制成 10 % Triton X-100 (溶解细胞膜的表面活性剂)。
- 2) 加入 10 μl 终浓度为 1 % 左右的 Triton X-100 溶液代替药物，几分钟后检测荧光强度的变化。如果探针进入到细胞内，通过溶解细胞膜从细胞中释放的 Ca^{2+} 探针与 Recording Medium 中的 Ca^{2+} 结合，可以观察荧光强度的变化。

* 加入 Triton X-100 溶液前需要洗涤、去除细胞外的 Ca^{2+} 探针。

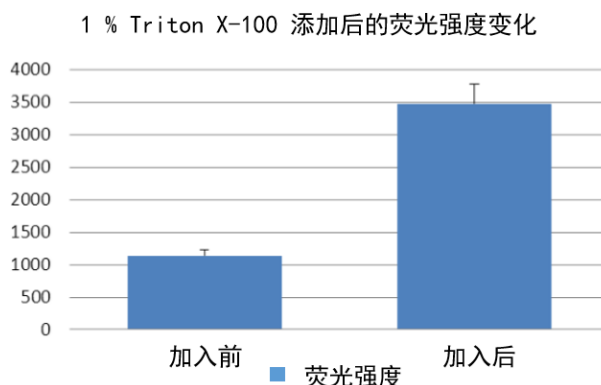
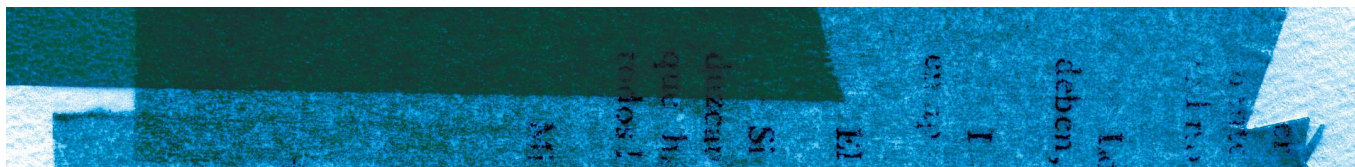


图 14 溶解含有探针细胞的细胞膜时的荧光强度变化

* 如果加入终浓度为 1 % Triton X-100 时没有荧光强度的变化，说明探针可能没有进入到细胞内 (仪器确认无误的情况下)。参照如下故障探测 [故障 1] 试试能否解决。



[故障 1] Ca²⁺探针没有进入到细胞内。

考虑到的因素	解决方法
Ca ²⁺ 探针被水解，没有进入到细胞内。	用新的 Ca ²⁺ 探针配置 Loading Buffer。 Ca ²⁺ 探针会被 DMSO 中的水分水解。 避免使用开封过长时间的 DMSO。
细胞内 Ca ²⁺ 探针外漏。	① 调制 Loading Buffer 时加入 Probenecid 的浓度从 1.25 mmol/l 变成 2 mmol/l 左右。 ② 为了避免细胞内 Ca ²⁺ 探针的漏出，在 Recording Medium 加入 Probenecid 溶液。
Ca ²⁺ 探针/DMSO 溶液和 Recording Medium 没有充分混合。	① 如果没有使用 Pluronic F-127，就加入。 ② 在 Ca ²⁺ 探针/DMSO 溶液和 Recording Medium 混合时用超声波混合几秒钟。
细胞内酯酶活性极低	提高浓度，孵育时间，另外孵育工作液之后，在培养箱里放 30-60 分钟给酯酶点时间。

药物是否合适（浓度及种类等）的确认方法

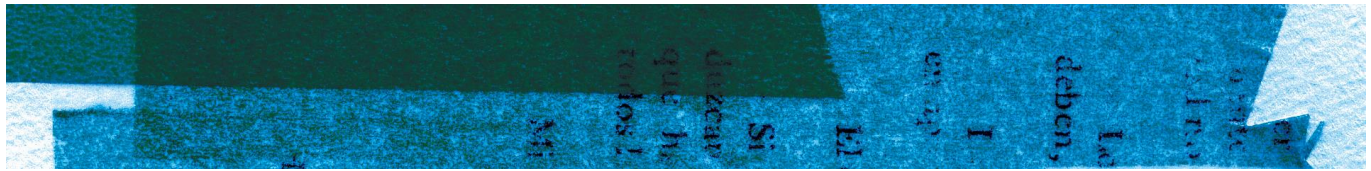
虽然在 ionomycin 溶液中能够观察荧光强度变化，但在使用目的药物时观察不到荧光强度的变化或无法得到理想的荧光强度变化时，参照如下 [故障 2]、[故障 3] 解决药物刺激的问题。

[故障 2] 使用目的药物观察不到荧光强度变化（在确定使用 ionomycin 能够观察荧光强度变化的情况下）

考虑到的因素	解决方法
药物浓度太高或太低。 * 没有发生 Ca ²⁺ 应答的性质。	变化药物浓度后验证。 在荧光强度没有变化时，有的研究者考虑加大药物浓度，但如果药物浓度太高，会导致细胞死亡，从而可能无法得到信号。 也需要验证药物浓度低时的结果。

[故障 3] 细胞的 Ca²⁺应答信号弱、细胞的 Ca²⁺应答缓慢

考虑到的因素	解决方法
药物浓度太高或太低。	变化药物浓度后验证。在荧光强度没有变化时，有的研究者考虑加大药物浓度，但如果药物浓度太高，会导致细胞死亡，从而可能无法得到信号。也需要验证药物浓度低时的结果。
由于被水解 Ca ²⁺ 探针在 Recording Medium 中会导致背景上升。去除 Loading Buffer 时的洗涤不足。	去除 Loading Buffer 后 37 °C PBS 洗涤几次。如果由于细胞容易剥落，不能洗涤时，使用 Non-Wash 型的 Calcium Kit（货号：CS32）可能会解决。
细胞状态不好。由于加入药物会发生荧光强度变化的细胞与不会发生荧光强度变化的细胞混在一起，观察到的荧光强度可能会缓慢上升。	① 延长预培养时间，恢复细胞状态后检测。 ② 缩短培养时间（1 小时 => 30 分钟）。培养时间太长会引起细胞损伤。 ③ 降低 DMSO 含量及 Fluo 4-AM 的浓度（减低 DMSO 及 Fluo 4-AM 的毒性）。 ④ 在含有血清的培养基中加入 Loading Buffer。由于含血清，有可能会减低对细胞的影响。



VII. 相关产品

<试剂盒>

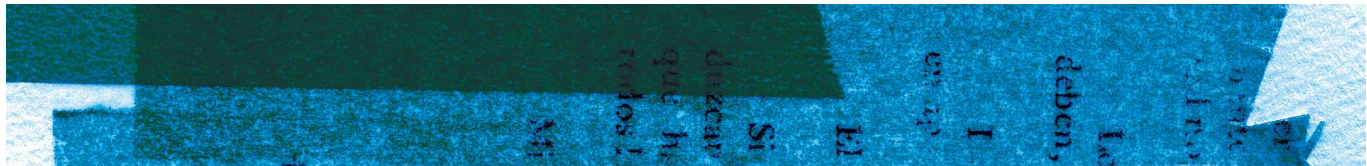
产品名	规格	货号	备考
Calcium Kit II - iCellux	10 plates	CS34	Non-Wash 型。比 Fluo 4 的灵敏度高。
Calcium Kit - Fluo 3	2,000 assays	CS21	Wash 型。适用于高通量筛选。
Calcium Kit - Fluo 4	10 plates	CS22	Wash 型。适用于初次研究者。
Calcium Kit II - Fluo 4	10 plates	CS32	Non-Wash 型。使用容易剥落细胞时方便。
Calcium Kit - Fura 2	10 plates	CS23	Wash 型。可以 Ratiometry 检测。
Calcium Kit II - Fura 2	10 plates	CS33	Non-Wash 型。可以 Ratiometry 检测。

<Ca²⁺荧光探针>

产品名	规格	货号	备考
Fluo 3-AM special packaging	50 µg 50 µg×8	F026	50 µg 分装品。 适用于使用量少的研究者。
Fluo 3-AM	1 mg	F023	适用于检测频率高的研究者。
Fluo 3	1 mg	F019	无法使用于细胞内 Ca ²⁺ 浓度的检测。
Fluo 4-AM special packaging	50 µg 50 µg×8	F312	50 µg 分装品。 适用于使用量少的研究者。
Fluo 4-AM	1 mg	F311	比 Fluo 3 的灵敏度高。
Fura 2-AM special packaging	50 µg 50 µg×8	F025	50 µg 分装品。 适用于使用量少的研究者。
Rhod 2-AM	1 mg	R002	适用于高浓度领域的 Ca ²⁺ 浓度检测。
Rhod 2	1 mg	R001	无法使用于细胞内 Ca ²⁺ 浓度的检测。
Quin 2	100 mg	Q001	无法使用于细胞内 Ca ²⁺ 浓度的检测。

<其他有关产品>

产品名	规格	货号	备考
GEDTA(EGTA)	5 g	G002	Ca ²⁺ 螯合剂，适用于标准。
HEPES	25 g	GB10	使用于 Recording Medium。



VIII. 参考文献

- 1) R. Y. Tsien, *J. Biol. Chem.*, **1980**, 19, 2396.
- 2) G. Gryniewicz, M. Poenie and R. Y. Tsien, *J. Biol. Chem.*, **1985**, 260, 3440.
- 3) A. Minta, J. P. Y. Kao and R.Y. Tsien, *J. Biol. Chem.*, **1989**, 264, 8171.
- 4) K. R. Gee, K. A. Brown, W-N. U. Chem, J. Bishop-Stewart, D. Dray, I. Johnson, *Cell Calcium*, **2000**, 27, 97.
- 5) M. Konishi, A. Olson, S. Hollingworth, S. M. Baylor, *Biophys. J.*, **1988**, 54, 1089.

东仁化学科技（上海）有限公司

如果您需要更好的信息或者有任何问题可以通过以下方式联系我们：

电子邮件：info@dojindo.cn

网址：<http://www.dojindo.cn>

上海

上海市零陵路 899 号飞洲国际广场 27 楼 J 座

邮编：200030

电话：021-6427-2302

北京

北京市朝阳区德外马甸裕民路 12 号元辰鑫大厦 E1-210 室

邮编：100029

电话：010-8225-1765