上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话：021-61312973　传真：021-55068248
网址：www.shyuanye.com
邮箱：shyysw@sina.com

荧光钙探针 Fura 2-AM

简介：

Fura-2 是一种常用的紫外光激发和比率测定型Ca^{2+}荧光探针。一旦与Ca^{2+}结合后，Fura-2 的最大激发波长发生蓝色迁移，由原来的363nm(Ca^{2+}-free)迁移到3 3 5nm(Ca^{2+}-saturated), 而最大发射波长基本未变化，保持在510nm 左右。通常情况，分别用最大激发波长340nm 和 380nm 来激发Fura-2, 且用340/380nm 激发下的荧光比值来检测细胞内Ca^{2+}浓度。使用比值检测，可消除不同细胞样品间荧光探针装载效率的差异，探针的渗漏，细胞厚度差异等因素导致的检测误差。Fura-2 自1985年合成以来，广泛用于各种细胞系统和生化用途，特别是数字显微成像。单波长检测，Fura-2 与Ca^{2+}结合后，推荐用最大激发和发射波长分别为340nm和 510nm; 双波长检测，则推荐用最大激发和发射 波长分别为340nm 和 380nm。

Fura-2,AM是 Fura-2 的一种乙酰甲酯衍生物，具有细胞膜渗透性，只需简单培养，即可轻易进入细胞。一旦进入细胞内，即被其内酯酶剪切生成不具膜渗透性的Fura-2, 从而滞留在胞内以发挥相应生理功能。本品以冻干粉的形式提供，使用时只需经无水DMSO 充分溶解，配置成1~5mM 的储存液，并稀释到合适的工作浓度即可。进行细胞内Ca^{2+}检测，Fura-2,AM 的常用浓度为0 .5~5 μM。

保存与运输方法

保存： -20℃干燥避光保存，有效期至少1年。

运输：冰袋运输。

注意事项

1) 荧光染料均存在淬灭问题，请尽量注意避光，以减缓荧光淬灭。

2) 乙酰氧基甲基酯 (AM) 易吸潮，冰箱取出后请在干燥的环境放至室温后再开封。由于试剂微量，开封前请将其短暂离心，以保证粉末落入管底。

3) Fura-2,AM　在4℃、冰浴等较低温度情况下会凝固而粘在离心管管底、管壁或管盖内，可在20-25℃温育片刻至全部融解后使用。

4) Fura-2,AM　第一次使用，建议储存液现配现用，分装成单次用量，严格做到≤-20℃密封干燥冻存，以防止受潮。为了保证良好的实验效 果，尽量在短时间内使用。

5) Fura-2,AM　具有相对较强的抗光淬灭能力，细胞孵育后1h 内观察，都不会因荧光泄露和光漂白作用导致测定结果发生明显变化。

6) Fura-2　不适合用激光共聚焦显微镜和流式细胞仪检测，因很难用它们完成激发光谱的快速转换。

7) 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用方法

A 试剂准备

1) 配制Pluronic F-127母液 ： 称取100mg Pluronic F-127粉末中加入500ul DMSO, 配制成 2 0 %(W/M)DMSO母液 。溶解过程需要在 4 0 - 5 0 ℃ 加热 20 - 30min。 溶液室温 存 ， 不用冷藏。如有结晶析出，可以重新加热后溶解 ， 不影响使用 。

2) HHBS Buffer(1XHank's Balanced Salt Solution with 20mM HEPES buffer,pH7.3) 或者其他生理缓冲液。

B操作步骤

1) 用无水DMSO 溶 解Fura-2,AM 配制成1 - 5mM 的储存液 ， 或将已配好的Fura-2,AM 储存液取出于室温回温 。 (如 ： 若配制成 4mM 的母液， 需向50ug Fura-2,AM中加入12 . 5 μl无水DMSO) 。准备Fura-2,AM 工作液之前，有时需要 往Fura-2,AM储存液中加入适量的 20 % Pluro nic F-127溶液 ， 以增强AM 探针 的水溶性 。

【 注 ① 】 : Fura-2,AM 染色工作液制备前 ， 添加等体积 20 % Pluronic F-127溶液 到Fura-2,AM+DMSO 储存液 ， 从而使Pluronic F-127的最终工作浓度约为 0.02 % 。

【注②】: Pluronic F-127可以防止AM 探针在溶液中聚合并促使探针更好进入细胞。但Pluronic F-127可降低AM 探针的稳定性，因此只建议在配制工作液时加入，不建议加入储存液长期保存。

2) 用HHBS或其他生理缓冲液将Fura-2, AM+ DMSO储存液稀释到0.1- 5μM的工作液。

[注①] : Fura-2, AM应用在大部分细胞的推荐加载浓度为4-5μM,具体的使用浓度需根据实验要求进行优化。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尽量使用最低探针浓度。

[注②] : Fura-2, AM工作液需现配现用，避免反复冻存。

3) [可选]如果细胞内含有机阴离子转运体，丙磺舒(Probenecid, 1-2.5mM)或磺吡酮(Sulfinpyrazone, 0.1-0.25mM) 可能需要加入细胞培养基内，以降低去酯化探针的泄露水平。

[注①] :丙磺舒或磺吡酮储存液相当偏碱，因此加入培养基后需要重新调整pH。

4) 将准备好的Fura-2, AM染色工作液加入细胞,加入量以夏盖细胞为准。37°C孵育20-60min.

[注①] :若使用含血清的培养基，血清内酯酶会降解AM,从而降低Fura-2, AM加载效果。而含酚红培养基会使本底值略偏高，建议加入染色工作液前，对细胞清洗2 ~3次。

[注②] :关于孵育的时间，如果首次做实验不能确定，建议先孵育30min,看荧光效果;如果细胞死亡较多，适当缩短时间;如果荧光强

度太弱，适当延长时间。

[注③] :降低探针加载温度可能会降低探针的区室化现象。

5) 吸掉染色工作液，并用HHBS或其他生理缓冲液(如有必要，使用含转运体抑制剂如2.5mM丙磺酸的缓冲液)清洗细胞1~2次，以去除残留探针。

6) 37℃ 再孵育30min以保证细胞内AM的完全去酯化。

7) 用荧光显微镜、荧光分光光度计或其他荧光检测设备，根据实验要求选择合适的波长进行检测。