

Fura-2 QBT™ 钙流试剂盒: 新型均相 Fura-2 钙流检测实验

Fura-2 染料一直以来被认为是在细胞成像、GPCR 介导的细胞内钙流、以及离子通道激活等实验中检测钙动员的重要工具。这种比值法检测染料通过计算结合和未结合两种状态之间的荧光强度比值，有助于纠正由于染料添加或细胞铺板造成的误差。然而，传统的 Fura-2 染料必须要进行缓冲液清洗，从而对于每一个实验来说都提高孔间差异性并需要耗费更多时间且增加操作复杂性。

Molecular Devices® 推出的 Fura-2 QBT™ 钙流试剂盒是基于专利的信号湮灭技术，含有比值法检测的 Fura-2 钙离子指示剂，提供均相实验体系并减小细胞基础的差异性，从而通过在检测前去除细胞清洗步骤间接增加通量。另外，Fura-2 QBT™ 钙流试剂盒是在紫外光谱处激发，最大程度使得研究者可以减少 488nm 激发的化合物荧光信号的干扰。

实验原理

Fura-2 AM 是一种钙离子敏感染料，在 340 nm 和 380 nm 被激发，发射波长是 510 nm。染料结合了钙离子后其吸收波长从 380nm 转移到 340nm。图 1 显示了钙离子结合 Fura-2 后 340/510nm 发射的信号 (绿) 的增加，而 380/510 nm 发射的信号 (橙) 下降。计算两种发射的信号比值 (插图) 来检测用于拟合量效曲线的最大值减去最小值后的信号效应。

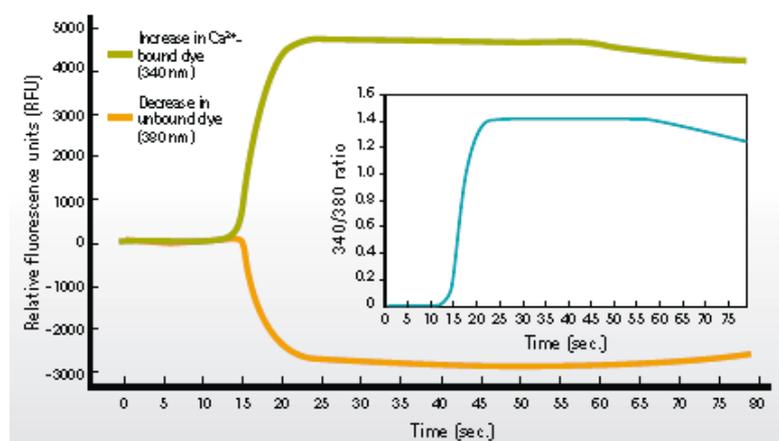
Fura-2 QBT™ 钙流实验准备

本次实验中使用的是小规格的 Fura-2 QBT™ 钙流试剂盒 (PN #R8197)。染料重悬在含有 20 mM HEPES 的 Hank's 平衡盐溶液 (HBSS)。丙磺舒 (PBX) 在需要时加入，用以抑制染料被转移到细胞内。贴别的 CHO M1 细胞或 HeLa 细胞实验前过夜种在黑壁底透的 384 孔板中，在试验时从培养箱中取出。含有 Fura-2 QBT 染料或者其它染料的 25μL 缓冲液加入到每个孔中，同时孔中需含有 25μL 缓冲液或培养基。加载了 Fura-2 QBT™ 钙流试剂 (PN #R8197) 或 BD 比值法钙流试剂 (#644243) 的细胞记录板在 37 °C、5% CO₂ 孵育一小时。为便于对比，采用了传统的 Fura-2 清洗方法。

特点

- 基于信号湮灭技术，获得更大信号窗口
- 免洗和比值法信号检测使得实验差异性降至最低
- 免洗步骤节省了时间和实验成本

FURA-2 QBT 钙流实验的比值法分析 (图 1)



原始信号的变化——对应于细胞内钙离子浓度的变化，分别用橙色和绿色曲线表示。两种之间的比值见插图。

按照此传统的 Fura-2 清洗方法，在加入 50 μ L 的 1X 染料缓冲液之前去除每个孔中的培养基，然后去其它试剂盒一样细胞记录版在同样的条件和时间内进行孵育。在 FlexStation[®]3 微孔读板机或 FLIPR[®] Tetra 系统上开始记录前，所有记录板从培养箱中取出并降温至室温 10 分钟。采用了传统 Fura-2 清洗方法的记录板需要在开始记录前用 HBSS 实验缓冲液清洗 3 次以去除多余的染料。

FlexStation 3 和 FLIPR Tetra 系统上的比值法钙流检测实验

在 384 孔的聚丙烯化合物板中将 5 倍浓度的相应配体溶于含 20mMHEPES 的 HBSS 缓冲液中。

在 FlexStation3 (图 2) 或 FLIPR^{Tetra} 系统 (图 3) 检测过程中加入激动剂，仪器参数进行了优化以适应于比值法检测实验。染料的激发波长是 340nm 和 380nm。在 510 nm 检测到发射信号，每个孔中两个激发波长下的相对荧光单位 (RFU) 的记录持续大约 90 秒，包括加样前和加样后。实验中每个采样时间点的计算后的输出结果是 340nm 与 380nm 波长信号的比值。最大值减去最小值的计算来自比值信号曲线。量效曲线和 EC₅₀/IC₅₀ 浓度统计计算所需的数据从 ScreenWorks[®]或 SoftMax[®] Pro

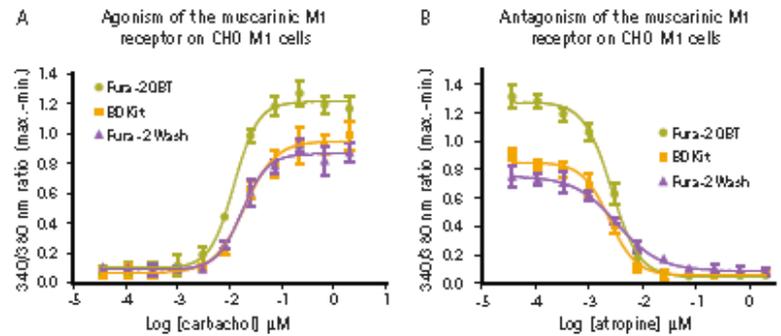
软件中输出，然后用 GraphPad Prism 进一步拟合和计算。根据 Zhang, *et. al* 发表的方法进行 Z 值的计算。

Conclusions 结论

相对于传统 Fura-2 实验，Fura-2 QBT[™]钙流试剂盒提供了均相的实验体系，通过使用 Molecular Devices 公司基于信号湮灭的专利技术无需再对细胞进行冲洗。因此将提高通量、减小细胞铺板或冲洗时细胞丢失等造成的实验差异性，并节省了实验成本（因为差异性而需要重复实验带来的缓冲液和耗材）。相比于 BD 比值法钙流试剂盒 (#644243) 传统的 Fura-2 细胞冲洗实验，Fura-2 QBT[™]钙流试剂盒可得到最大的信号窗口以及在 EC₈₀ 或 IC₈₀ 下最好的 Z 值。因为 Fura-2 燃料在紫外范围激发，从而避免了化合物 488nm 激发的自发荧光的干扰。Fura-2 QBT[™]钙流试剂盒在 FLIPR^{Tetra} 系统和 FlexStation 3 微孔板检测平台上进行了充分的验证，提供了可重复、可量化操作的解决方案，适合于高通量的筛选工作。

Results 结果

Fura-2 QBT[™]钙流试剂盒——更大的信号窗口 (图 2)

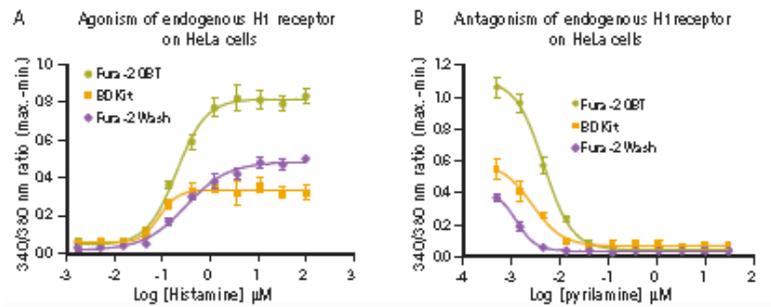


Carbachol	Fura-2 QBT	BD Kit	Fura-2 Wash
EC ₅₀ (nM)	13	17	19
Z @ EC ₅₀	0.7	0.5	0.38
Window	1.1	0.85	0.7

Atropine	Fura-2 QBT	BD Kit	Fura-2 Wash
IC ₅₀ (nM)	2.4	2.2	3.3
Z @ IC ₅₀	0.81	0.53	0.66
Window	1.2	0.75	0.72

Fura-2 QBT[™]钙流试剂盒得到最大的信号窗口以及在 EC₈₀ 或 IC₈₀ 下最好的 Z 值。

Fura-2 QBT[™]钙流试剂盒——最大程度减小实验差异性 (图 3)



Histamine	Fura-2 QBT	BD Kit	Fura-2 Wash
EC ₅₀ (nM)	200	900	300
Z @ EC ₅₀	0.72	0.54	0.69
Window	0.77	0.29	0.44

Pyrilamine	Fura-2 QBT	BD Kit	Fura-2 Wash
IC ₅₀ (nM)	4.7	2.7	1.3
Z @ IC ₅₀	0.8	0.49	0.33
Window	1.1	0.52	0.37

Fura-2 QBT[™]钙流试剂盒得到最大的信号窗口以及在 EC₈₀ 或 IC₈₀ 下最好的 Z 值从而提升实验质量，并且免洗步骤消除了实验差异性。本实验通过 FLIPR^{Tetra} 系统的紫外 LED 检测。

Contact Us

Phone: +1-800-635-5577
Web: www.moleculardevices.com
Email: info@moldev.com

Check our website for a current listing of worldwide distributors.

Regional Offices

USA and Canada +1-800-635-5577
Brazil +55-11-3616-6607
China (Beijing) +86-10-6410-8669
China (Shanghai) +86-21-3372-1088
Germany 00800-665-32860

Japan (Osaka) +81-6-7174-8831
Japan (Tokyo) +81-3-6362-5260
South Korea +82-2-3471-9531
United Kingdom +44-118-944-8000

