

## Rhod-4, AM, Cell Permeant 钙离子荧光探针, 超级纯

### 产品简介

Rhod-4,AM 是 Rhod-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。Rhod-2 虽然是最受欢迎的红色荧光  $Ca^{2+}$  荧光探针, 但 Rhod-2 的线粒体定位和细胞中高基底  $Ca^{2+}$  信号使其在某些细胞应用中严重受限制。另外, Rhod-2 在 488nm 处很不理想的激发波长使其在某些只有 488nm 激发光源的仪器比如 FLIPR™ 上信号很弱。Rhod-4 正是根据这些缺陷而改进的。

#### Rhod-4 具有以下特征:

①Rhod-4 的最大激发和发射波长是 530nm 和 555nm。虽 Rhod-4 最大激发波长是 530nm, 但在 488nm 处激发下的信号也相当强。除了能在 514nm, 532nm 和 546nm 的长波长激发之外, Rhod-4 用氩离子激发器在 488nm 激发下也能得到理想的荧光信号。Rhod-4 随着增加的  $Ca^{2+}$  浓度荧光信号而增强(555nm 发射波长), 一旦与  $Ca^{2+}$  结合荧光约增强 >200 倍。由于许多细胞受刺激后的  $Ca^{2+}$  浓度提高通常是 5~10 倍, 因此, Rhod-4 是一款优秀的检测此范围内  $Ca^{2+}$  浓度变化的高灵敏探针。

#### Rhod-4 钠盐在含氯化钙体系内的激发光谱特征。

②一旦受激动剂刺激后, Rhod-4 在细胞内的荧光明显强于 Rhod-2(信噪比)。更重要的是, Rhod-4 主要定位在细胞胞浆内, 不像 Rhod-2 主要定位在线粒体。另外, Rhod-4 具更低的温度依赖性的细胞加载特性, 不管室温还是 37°C 产生相似的结果。这一特征使 Rhod-4 比 Rhod-2 在 HTS 应用中更有优势。

③一旦进入细胞内, 即被其内酯酶剪切生成不具膜渗透性的 Rhod-4, 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 2~5mM 的储存液, 并依据具体实验和相关文献资料调整到需要的工作浓度即可。

### 产品组成

名称	FS1225	FS1225	Storage
编号			
Rhod-4, AM, Cell Permeant 钙离子荧光探针	50ug	250ug	-20°C 干燥保存
使用说明书	1 份		

### 基本特性

同义名: Rhod-4, Acetoxymethyl Ester

分子量: 1015.96

外观: 红色固体

最大激发/发射波长: 530/555 nm

Kd ( $Ca^{2+}$ 结合): 525nM

溶解性: 溶于 DMSO (2~5mM)

储存条件: -20°C 避光干燥保存, 1 年有效。

### 使用方法 (仅供参考)

#### 一、试剂准备

1) 配制 Pluronic F-127 母液: 称取 100mg Pluronic F-127 粉末 (货号: Cat No. FS0432) 中加入 500  $\mu$ l DMSO, 配制成 20%(w/v) DMSO 母液。溶解过程需要在 40-50°C 加热 20-30min。溶液室温保存, 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 (1X Hank' s Balanced Salt Solution with 20mM HEPES buffer, pH 7.3) (货号: Cat No. FSH043) 或者其他生理缓冲液

## 二、操作步骤

1) 用无水 DMSO 溶解 Rhod-4, AM 配制成 2-5mM 的储存液, 或将已配好的 Rhod-4, AM 储存液取出于室温回温。(如: 若配制成 4mM 的母液, 需向 50 $\mu$ g Rhod-2, AM 中加入 12.3 $\mu$ l 无水 DMSO (货号: Cat No. FS0306)。准备 Rhod-4, AM 工作液之前, 有时需要往 Rhod-4, AM 储存液中加入适量的 20% Pluronic F-127 溶液, 以增强 AM 探针的水溶性。

**【注①】:** Rhod-4, AM 染色工作液制备前, 添加等体积 20% Pluronic F-127 溶液到 Rhod-4, 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 Rhod-4, AM+DMSO 储存液稀释到 1-10 $\mu$ M 的工作液。

**【注①】:** Rhod-4, AM 应用在大部分细胞的推荐加载浓度为 4-5 $\mu$ M, 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】:** Rhod-4, 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 Rhod-4, AM 工作液加入细胞, 加入量以覆盖细胞为准。37 $^{\circ}$ C 孵育 20min-2h。

**【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 Rhod-4, 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 丙磺舒的缓冲液) 清洗细胞 1~2 次, 以去除残留探针。

6) 室温再孵育 30min 以保证细胞内 AM 的完全去酯化。

7) 用适当的仪器如激光共聚焦、流式细胞仪、荧光酶标仪, 以及波长 Ex/Em=530/555 nm 来进行检测。

## 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) Rhod-4, AM 在 4 $^{\circ}$ C、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 $^{\circ}$ C 温育片刻至全部融解后使用。

4) Rhod-4, 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 $\leq$ -20 $^{\circ}$ C 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) 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

### 相关产品

产品货号	产品名称	规格
FS1219	Fura-2, AM, Cell Permeant 钙离子荧光探针, 超级纯	50µg
FS1220	Fluo-3, AM, Cell Permeant 钙离子荧光探针, 超级纯	50µg
FS1221	Fluo-4, AM, Cell Permeant 钙离子荧光探针, 超级纯	50µg
FS1222	Fluo-8 AM, Cell Permeant 钙离子荧光探针, 超级纯	50µg
FS1223	Indo-1, AM, Cell Permeant 钙离子荧光探针, 超级纯	50µg
FS1225	Rhod-4, AM, Cell Permeant 钙离子荧光探针, 超级纯	50µg
FS0432	Pluronic® F-127, Cell Culture Tested 细胞培养级	1g
FS0306	二甲基亚砜 DMSO (细胞培养级)	100ml
FSH043	1× HHBS , pH 7.2-7.4	500ml

