



## PBFI AM ( K<sup>+</sup> Indicator) 钾离子指示探针

### 产品简介

PBFI, 英文全名 Potassium-binding Benzofuran Isophthalate, 一种 K<sup>+</sup>敏感的荧光探针, 用来测定细胞和细胞内区隔 (Intracellular compartments) 的 K<sup>+</sup>水平变化。虽然 PBFI 对 K<sup>+</sup>的选择能力弱于 Ca<sup>2+</sup>指示剂比如 Fura-2, 但在其他一价阳离子存在体系中, PBFI 足以检测 K<sup>+</sup>的生理浓度。结合离子后的 PBFI 光谱变化可通过激发光比率测定来分析, 其能与使用相同光滤片和仪器检测的探针 Fura-2 共同使用。

PBFI 对 K<sup>+</sup>的解离常数 (K<sub>d</sub>) 非常依赖于 Na<sup>+</sup>的存在与否。在不含 Na<sup>+</sup>的体系, PBFI 对 K<sup>+</sup>的 K<sub>d</sub> 值为 5.1mM; 而在含 135mM K<sup>+</sup>/ Na<sup>+</sup>总浓度 (约为生理离子强度) 的溶液体系, PBFI 对 K<sup>+</sup>的 K<sub>d</sub> 值为 44mM; 若缓冲液中的 Na<sup>+</sup>用四甲基氯化铵所替代, PBFI 对 K<sup>+</sup>的 K<sub>d</sub> 值变为 11mM。氯化胆碱和 N-甲基葡萄糖胺是培养基中另两种可能替代 Na<sup>+</sup>的化合物。虽然 PBFI 对 K<sup>+</sup>的选择性比 Na<sup>+</sup>仅强 1.5 倍, 这一选择能力已足以满足检测需求, 因为正常情况细胞内 K<sup>+</sup>浓度比 Na<sup>+</sup>高 10 倍左右。

本品为乙酰氧基甲基酯 (Acetoxymethyl ester, AM ester) 形式的 PBFI, CAS NO: 124549-23-1, 具有细胞膜渗透性, 只需简单孵育即可进入细胞, 常用加载浓度范围 5-10μM, 加载时间 40min-4h, 根据具体的实验要求和细胞类型来调整。

### 产品组成

名称 / 编号	FS1316	FS1316	FS1316	Storage
PBFI AM ( K <sup>+</sup> Indicator) 钾离子指示探针	2*50ug	10*50ug	20*50ug	-20℃干燥保存
使用说明书	1 份			

### 基本特性

CAS: 124549-23-1

同义名: Potassium-binding Benzofuran Isophthalate Acetoxymethyl ester

化学名: 4,4'-[1,4,10,13-tetraoxa-7,16-diazacyclooctadecane-7,16-diylbis(5-methoxy-6,2-benzofurandiyl)]bis-1,3-benzenedicarboxylic acid, tetrakis[(acetyloxy)methyl] ester

分子式: C<sub>58</sub>H<sub>62</sub>N<sub>2</sub>O<sub>24</sub>

分子量: 1171.1

纯度: ≥95% (HPLC)

Ex/Em: ~340,380/500 nm

外观: 黄色至橙色粉末

溶解性: 溶于 DMSO (10mM) 和甲醇

储存条件: -20℃干燥避光保存, 2 年有效。小量分装避免反复冻融, 至少 3 个月稳定

### 使用方法 (以下步骤仅做参考, 具体请根据实际情况或参考文献资料来调整。)



- 1) 配置 1-10mM PBFI AM 储存液: 比如, 实验前取一管 50  $\mu$ g PBFI AM 置于室温回温至少 20min, 低速离心后, 往管内加入 8.5397 $\mu$ l 无水 DMSO 使其充分溶解后, 制备成 5mM 储存液。若单次用不完, 需分装冻存。
- 2) 准备 25% (w/v) Pluronic F-127: 100mg Pluronic F-127 粉末中加入 400  $\mu$ l DMSO, 配制成 25%(w/v) DMSO 母液。溶解过程需要在 40-50 $^{\circ}$ 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。【也可配置成其他浓度 Pluronic F-127, 只需保证最终工作体系内 Pluronic F-127 < 0.1% (w/v)】。
- 3) 于正式实验前, 将 PBFI AM 储存液于等体积 25% (w/v) Pluronic F-127 混匀。【注意: PBFI AM 水溶性差, 必须借助 Pluronic F-127 来促进其分散进入水溶性加载缓冲液。两者只能在实验前混匀, 不能保存待用】。
- 4) 将上述混合液加入适量细胞加载缓冲液 (如生理缓冲液 PBS, 无血清细胞培养基等) 达到所需的工作浓度, 加入细胞内进行探针标记。孵育温度可以是室温或 37 $^{\circ}$ C, 孵育浓度通常为 5-10  $\mu$ M, 时间 40min-4h, 具体的孵育浓度和时间请参考相关的文献资料。
- 5) 孵育结束, 再加入不含探针的细胞加载缓冲液额外孵育 20-60min, 以保证细胞将 PBFIAM 完全酯酶化。
- 6) 最后用生理缓冲液或无血清培养基清洗细胞至少一次, 以降低胞外背景荧光。
- 7) 用合适的仪器检测荧光信号, 分别收集激发波长 340nm, 380nm, 发射波长 500nm (发射波长范围 450-550nm, 根据你的实际荧光信号看看最大波长吸收峰大概在哪个位置)。根据双激发波长收集荧光信号的比值来确定离子浓度。

## 注意事项

- 1) 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。
- 2) 如果细胞加载缓冲液是以碳酸氢钠为缓冲体系, 那么加载需要含 5% CO<sub>2</sub> 的环境内进行, 以防止因 CO<sub>2</sub> 损失引起的缓冲液碱化。
- 3) 如果细胞加载缓冲液含血清, 那需适当提高 AM 探针工作浓度, 以补偿因 AM 探针与血清蛋白结合引起的损失。
- 4) PBFI AM 由于水溶性较差, 建议使用 Pluronic F-127 以优化探针的细胞加载效率。通常情况, 将 PBFI AM 的 DMSO 储存液与等体积 Pluronic F-127 (25% w/v) 混合均匀, 之后即刻加入适量的细胞加载缓冲液 (cell loading buffer) 中达到所需浓度。
- 5) 某些情况下, 对分子量接近或超过 1000 的 AM 探针, 需用不含 AM 探针的细胞加载缓冲液进一步孵育 20-60min, 以保证细胞内酯酶能充分降解 AM 基因。
- 6) 探针的加载时间和浓度因具体的细胞类型而有差异, 请使用前参考相应的文献资料来设计和摸索最佳条件。
- 7) 探针的细胞 K<sub>d</sub> 值与溶液 K<sub>d</sub> 值有差异, PBFI 的胞内 K<sub>d</sub> 值可用 K<sup>+</sup>载体如缬氨霉素 (valinomycin) 来校正 (calibration)。具体可参考文献来操。
- 8) 微量包装的产品定量精准, 粉剂再进行分装会因为静电/产品性状等原因造成较大损失, 再分装或重新称量前请斟酌! 建议请直接原包装瓶/管内按照所需加入适量的溶液配成浓储分装。

可查阅文献: a) Clementi EA et al. Monitoring Changes in Membrane Polarity, Membrane Integrity, and Intracellular Ion Concentrations in *Streptococcus pneumoniae* Using Fluorescent Dyes. *J Vis Exp.* 2014 Feb 17;(84):e51008. doi: 10.3791/51008. b) Harootunian et al. Fluorescent ratio imaging of cytosolic free Na<sup>+</sup> in fibroblasts and lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry* 1989..