

Enhanced NaTrium Green-2(ENG-2) AM 钠离子指示探针

产品简介

Enhanced NaTrium Green-2 AM (ENG-2 AM)是 Asante NaTrium Green-2 AM (ANG-2 AM)的替代物,是一种具细胞膜渗透性的新型钠离子(Na⁺)荧光探针。一旦进入细胞后,经非特异性酯酶水解生成水溶性形式的探针。不同于传统 Na⁺探针 SBF1, ENG-2 是一种可见光光谱范围的探针,激发波长范围是 488-525nm,发射波长是 545nm。ENG-2 AM 具有容易加载、缓慢泄露、良好光稳定性和宽动力学范围等理想特征,也正好弥补传统 Na⁺荧光探针 SBF1 AM (#CAT:FS1226)的缺陷。

产品组成

名称 / 编号	FS1345	FS1345	Storage
Enhanced NaTrium Green-2(ENG-2) AM 钠离子指示探针	100ug(2*50ug)	(250ug)5*50ug	-20℃干燥保存
使用说明书	1 份		

基本特性

同义名: ENG-2 AM

分子式: C₅₃H₆₀Cl₂N₂O₁₈

分子量: 1084 g/mol

纯度: ≥90% (HPLC)

最大激发波长: 525 ± 3 nm (Methanol)

最大发射波长: 545 ± 3 nm (Methanol)

解离常数 (K_d): 20mM (in the absence of K⁺)

动力学范围 (F_{max}/F_{min}): 29

溶解性: DMSO

储存条件: -20℃干燥避光保存,至少 1 年有效。

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。)

1.1 使用无水 DMSO 溶解 ENG-2 AM (Mw: 1084 g/mol) 配制成 1-5mM 储存液,比如往 50μg ENG-2 AM 冻干粉内加入 23μl DMSO,充分溶解后配制成 2mM 储存液。-20℃分装干燥冻存,避免反复冻融。

1.2 通常在含适当浓度 AM 探针的无血清培养基中实现探针加载。建议正式实验前向加载培养基内加入 Pluronic F-127 (#CAT:FS0432) 以促进 AM 探针的分散。可用 DMSO 配置 20% Pluronic F-127 储存液或其他浓度,只需在正式实验前将其与 ENG-2 AM 储存液混合,然后加入加载培养基,保证其终浓度 < 0.1% (w/v)。

1.3 室温或 37℃ 孵育细胞(可能在室温的探针加载质量会高些),孵育浓度通常为 1-10μM,孵育时间通常为 30-60min,具体的请根据实际情况或参考文献资料。

1.4 【可选】对于大分子量 AM 探针(分子量 ≥ 1000g/mol),孵育结束,加入不含 AM 探针的细胞加载培养基额外孵育 20-60min,以确保细胞将 AM 基团完全去酯化。

1.5 用不含血清和探针的培养基清洗细胞至少一次,以降低细胞外背景荧光。

1.6 最后用合适的仪器来检测荧光信号。最大激发波长 525nm,最大发射波长 545nm。

【操作注意事项】:

2.1 如果细胞加载培养基是以碳酸氢钠为缓冲体系,那么加载需要含 5% CO₂ 的环境内进行,以防止因 CO₂ 损失引起的培养基碱化。

2.2 如果细胞加载培养基含血清,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。

2.3 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。

2.4 探针的加载时间和浓度因具体的细胞类型而有差异,请根据具体的细胞类型来优化。

2.5 对每一种探针有必要通过校准(calibration)来得到实际解离常数(K_d)。物理条件如温度, pH, 离子强度或溶液粘度,以及探针与细胞组成成分如蛋白质的相互作用,都会影响 K_d 值。实际情况细胞内的 K_d 比体外溶液通常要高。因此,细胞水平研究有必要进行校准确认实际 K_d 值。

2.6 对于 ENG-2,虽然最大激发波长在 525nm,但其极强的荧光亮度使其能够用标准的 488nm 滤片来激发,与 Fluo 系列的可见光钙离子指示探针检测手段一致。值得注意的是,488nm 激发下得到的荧光强度约为最大激发波长下的 40%。

流式检测参考方法:

试剂准备

储备液配制: 将 EPG-2 AM 用无水 DMSO 配制成合适浓度的储备液,由于 AM 酯形式的探针水溶性较差,溶解时可使用必要的 Pluronic F-127,比如在加载探针到细胞之前,将探针的 DMSO 溶液与等体积 25%(w/v) 的 Pluronic F-127 混合。

工作液配制: 根据实验需求,用合适的缓冲液将储备液稀释成工作液,如用不含钾离子的 PBS 缓冲液。

细胞准备

- 1) 细胞培养: 将待检测的细胞培养至对数生长期,确保细胞状态良好。
- 2) 细胞收集: 用胰酶消化细胞或其他合适的方法收集细胞,然后用 PBS 等缓冲液洗涤细胞 2-3 次,去除培养基中的血清等成分,以 500-1000g 离心 5-10 分钟收集细胞沉淀。
- 3) 细胞重悬: 用无钾离子的缓冲液将细胞重悬,调整细胞浓度至合适范围,如 1×10^6 至 1×10^7 个/mL。

探针加载

- 1) 加载探针: 将适量的 EPG-2 AM 工作液加入到细胞悬液中,使探针终浓度达到 $5 \mu\text{M}$ - $10 \mu\text{M}$,轻轻混匀。
- 2) 孵育细胞: 将细胞与探针的混合液在合适的温度下孵育,一般在 37°C 孵育 40 分钟-4 小时,期间可适当轻柔振荡或翻转细胞悬液,以确保探针充分进入细胞。
- 3) 洗涤细胞: 孵育结束后,用无钾离子的缓冲液洗涤细胞 2-3 次,去除未进入细胞的探针,离心条件与收集细胞时相同。

流式检测

- 1) 仪器校准: 开启流式细胞仪,用标准微球等对仪器进行校准,确保仪器的光路、流速等参数处于正常状态。
- 2) 设置参数: 根据 EPG-2 AM 的荧光特性,设置激发波长为 488nm 或 517nm,发射波长为 546nm 左右。
- 3) 检测样本: 将加载好探针的细胞悬液加入到流式细胞仪的样品管中,进行检测,记录细胞的荧光信号。
- 4) 数据分析: 使用流式细胞仪配套的数据分析软件,对检测到的数据进行分析,如绘制荧光强度直方图、散点图等,计算细胞内钾离子的相对浓度或浓度变化等。

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) ENG-2 AM 易受潮,粉末需干燥保存;
- (3) ENG-2 AM 储存液可用 DMSO 溶解,不推荐长期保存,甚至是 -20°C。建议条件允许,最好现配现用。
- (4) 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。