

# Rhod-2, AM, Cell Permeant 钙离子荧光探针, 超级纯

(长波长的可见光钙离子探针)

## 产品信息

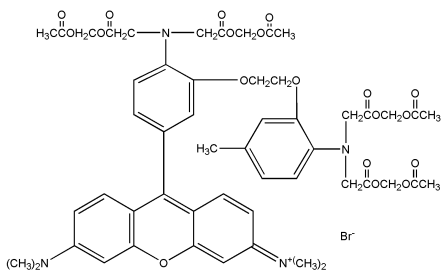
产品名称	产品编号	规格
Rhod-2, AM, Cell Permeant 钙离子荧光探针, 超级纯	NBS7640	50 µg

## 产品描述

Rhod-2 是一种可见光激发的高亲和力  $\text{Ca}^{2+}$  指示剂, 与其他可见光激发荧光探针如 Fluo-3/4 相比, Rhod-2 具有长波长, 更适用于检测具有较高自荧光现象的细胞和组织内钙离子水平以及检测由光感受器和笼锁钙离子螯合剂光激活导致的钙离子释放。

与紫外光激发的荧光探针相比, 如 Fura-2 和 Indo-1, 可见光激发  $\text{Ca}^{2+}$  探针具有以下特点: 1) 可被大多数设备的激发器有效激发, 包括共聚焦激发扫描显微镜以及流式细胞仪等。2) 具有更强的染料吸收性能, 使得更低浓度的探针即可成功检测  $\text{Ca}^{2+}$  变化, 从而降低了对活细胞的光毒性。3)  $\text{Ca}^{2+}$  依赖性荧光强度增强, 对  $\text{Ca}^{2+}$  变化水平检测敏感度更高。4) 降低样品自荧光以及光散射的干扰。5) 兼容光激活探针以及 UV-激发试剂, 因此更方便于多参数检测。6) 无光谱偏移。7) 长波长钙离子探针, 能够与 GFP 和绿色荧光探针兼容。7) 特别定位在线粒体, 以罗丹明结构为基础的 Rhod-2, AM 带正电荷, 以电位驱动的方式吸收聚集在线粒体, 荧光显微镜下观察进入细胞呈现点状染色模式。

## 产品性质

CAS 号 (CAS NO.)	129787-64-0
分子式 (Formula)	$\text{C}_{52}\text{H}_{59}\text{N}_4\text{O}_{19}\text{Br}$
分子量 (Molecular Weight)	1123.9575
Ex/Em	549/ 578nm
溶解性 (Solubility)	溶于 DMSO
纯度 (Purity)	$\geq 98\%$
结构式 (Structure)	

## 运输和保存方法

室温运输。-20℃ 避光干燥保存, 有效期 1 年。

## 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 (Acetoxymethyl ester, AM) 容易吸潮, 从冰箱取出后, 请确认在干燥的环境放至室温后再开封。由于试剂极其微量, 开封前请将其短暂离心, 以保证粉末落入管底。

- 3) 第一次使用时, 建议母液现配现用。且溶解后的试剂尽可能在短时间内使用, 以保证实验效果。
- 4) 母液遇水极易分解, 若单次不能用完, 建议分装保存, 例如 5  $\mu\text{L}$ /管, 用封口膜封口, 并严格做到 $\leq -20^{\circ}\text{C}$ 密封干燥保存。
- 5) 建议您在正式实验前先摸索一下细胞量、钙离子荧光探针的终浓度、培养时间等, 找到最佳实验条件。
- 6) 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。
- 7) 本产品仅作科研用途!

## 试剂准备

- 1) (可选) 配制 **Pluronic F-127 母液**: 100mg Pluronic F-127 粉末中加入 0.5 mL DMSO, 配制成 20%(w/v)的 DMSO 母液。溶解过程需要在 40-50 $^{\circ}\text{C}$ 加热 20-30 min。溶液室温保存, 不要冷藏。如果有结晶析出, 可以重新加热后溶解, 不影响使用。
- 2) **Hanks•balanced salt solution (HBSS, 不含  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ )** (Cat No. 60148ES76)

**使用方法** (本实验方案仅供参考, 为得到最理想实验结果, 需根据具体的实验情况优化实验条件。)

### 1) Rhod-2/AM 储存液的配制

利用高质量无水 DMSO 溶解 Rhod-2/AM 配制成 2-5 mM 的储存液, 该储存液可分装于 $-20^{\circ}\text{C}$ 避光干燥密封保存。每次使用前需回温至室温。

**【注】:** ① 因为 Rhod-2/AM 在水中的溶解性和稳定性较差, 不可用水溶性缓冲液配制 Rhod-2/AM 储存液。

② 溶解用的 DMSO 需要保证新鲜无水, 否则将会导致 AM 体水解, 使荧光染料无法进入细胞, 影响实验效果。

### 2) Rhod-2/AM 工作液的配制

利用合适缓冲液(如 Hanks & Hepes)将 Rhod-2/AM 稀释成 1-10  $\mu\text{M}$  的工作液, 具体稀释方法如 1 mM 母液配制 1 mL 浓度为 4  $\mu\text{M}$  工作液, 用 1 mL 缓冲液稀释 4  $\mu\text{L}$  1 mM 母液即可, 混匀。

**【注】:** ① 典型工作液浓度为 0.1-5  $\mu\text{M}$ , 对于大多数细胞, 我们推荐加载浓度 4-5  $\mu\text{M}$ , 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。

② Rhod-2/AM 工作液需现配现用, 避免反复冻存。

3) (可选) 如果 Rhod-2/AM 进入细胞的效果不好, 可向 Rhod-2/AM/DMSO 储存液中加入适量 20% Pluronic F127 溶液, 最终稀释至其终浓度为 0.02-0.05%, Pluronic F127 可以防止 Rhod-2/AM 在缓冲液中聚合并能帮助其进入细胞。

**【注】:** Pluronic F127 可降低 Rhod-2/AM 的稳定性, 因此只建议在配制工作液时加入, 不建议将其加入储存液长期保存。

4) 取出预培养的细胞, 除去培养基, 使用缓冲液洗涤细胞 3 次。

**【注】:** 如果使用含血清的培养基, 血清中的酯酶会分解 AM 体, 从而降低 Rhod-2/AM 进入细胞的效果。另外含有酚红的培养基会使本底值略微偏高, 所以加工作液之前需尽量去除培养基残留。

5) 将 Rhod-2/AM 工作液加入细胞, 加入量以覆盖细胞为准。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 15-60 min, 然后除去 Rhod-2/AM 工作液。

**【注】:** ① 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。

② 降低加载温度可能会减少探针 AM 酯运载技术造成的探针区室化。

6) 用不含探针缓冲液洗涤细胞 3 次, 以充分去除残留的 Rhod-2/AM 工作液。然后加入缓冲液覆盖细胞。

7) 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱孵育约 20-30 min, 以确保 AM 体在细胞内的完全去酯化作用。

**【注】:** (可选) 对于含有阴离子通道蛋白的细胞, 5-7 步骤中可加入有机阴离子转运抑制剂 probenecid (1-2.5 mM) 或 sulfapyrazone(0.1-0.25 mM)到细胞外液以减少指示剂去酯后的渗漏。

8) 共聚焦激发扫描显微镜以及流式细胞仪等检测细胞。

**【注】:** 某些细胞具有自体荧光会影响结果分析, 需使用未加载探针细胞做对照, 在结果分析时在同一波长下扣除自荧光。