

一般研究用

CaSiR-1™ AM Assay Kit

表1. 製品情報

品番	品名	キット内容	保存条件	安定性
GC404	CaSiR-1™ AM Assay Kit	・CaSiR-1 AM × 5 ・Dimethylsulfoxide (DMSO) 1 mL × 1 ・20% Pluronic® F-127 1 mL × 1 ・20% Cremophor® EL 1 mL × 1 ・500 mM Probenecid 1 mL × 1 ・10 × Assay Buffer 15 mL × 1	遮光-20℃保存。 DMSO溶解後は 1回使い切り。	未開封 1年

1. はじめに

■ CaSiR-1™ AM について

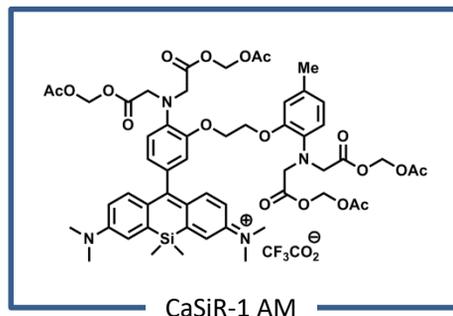
カルシウムは細胞内において極めて重要なセカンドメッセンジャーとして、多くの生命現象に関与します。その挙動の解析には蛍光イメージングが大きく貢献していますが、汎用されているカルシウムプローブの蛍光波長領域は、500-580 nm 程度に限られています。対してCaSiR-1™ AM は664 nmの蛍光極大波長をもつ新しい近赤外蛍光カルシウムプローブです。CaSiR-1™ はカルシウムを認識すると蛍光強度が大きく変化します。具体的にはカルシウム濃度を 0 μM から 39 μM に変化させると、1000 倍以上の蛍光強度上昇を示します。カルシウム濃度 0 μM では蛍光がほとんど検出されず、高い S/N 比が得られます。

本キットは、96 well plate での細胞アッセイに最適化したスクリーニング用セットです。また、界面活性剤(Pluronic® F-127、Cremophor® EL)と、陰イオントランスポーター阻害剤(Probenecid)がキットに含まれており、細胞にあわせ、各濃度を任意に設定できます。

2. CaSiR-1 AM Assay Kit を用いたカルシウム蛍光アッセイ

■ ご用意頂くもの (キットに含まれないもの)

- ・滅菌水
- ・細胞洗浄用 HBSS
- ・96 well black plate
- ・マイクロピペッター
- ・15~50mL チューブ



■ 注意事項

- ・本キットは、96 well plate 5 枚分のアッセイキットです。
- ・Probenecid は強塩基性溶液で溶解しています。お取り扱いには保護手袋を着用し、十分にご注意ください。
- ・一旦 CaSiR-1 AM を DMSO に溶かして保存すると、分解する可能性があります。溶解後は一回使い切りを推奨します。
- ・96 well plate へ細胞を培養する際、Poly-L-Lysine など細胞接着を強くし、subconfluent まで細胞を培養することをお勧めします。

■ 試薬の調製

1. 細胞染色液の調製

- ① CaSiR-1™ AM が入ったチューブに 40 μL の DMSO を加えて、色素を溶解させる。
- ② ①に 20% Pluronic® F-127(もしくは 20% Cremophor® EL) 15 μL* を加え、ピペティングでよく混合する。

* 最終濃度 0.03 % となります。細胞にあわせて 0.01 - 0.05 % の範囲で使用可能です。

- ③ 10 × Assay buffer 1 mLを取り、9 mLの滅菌水を添加します。この溶液に②の色素溶液と500mM Probenecid 25 μ L*を添加してよく混合する。

* 最終濃度 1.25 mMとなります。細胞にあわせて 0.5 - 1.5 mM の範囲で使用可能です。

2. 測定溶液の調製

- ① 10 × Assay buffer 1mLを取り、9mL の滅菌水を加える。これに500mM Probenecid 25 μ L* を添加してよく混合する。

* 最終濃度 1.25 mMとなります。細胞にあわせて0.5 - 1.5 mM の範囲で使用可能です。

表2. 20% Pluronic® F-127 (Cremophor® EL) 溶液の添加量と最終濃度

添加量(μ L)	5	10	15	20	25
最終濃度(%)	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05

表3. 500mM Probenecid 溶液の添加量と最終濃度

添加量(μ L)	10	15	20	25	30
最終濃度(mM)	0.50	0.75	1.00	1.25	1.50

■細胞染色

- ① プレートから培地を除去し、HBSSで2回洗浄を行う。
- ② 洗浄後、細胞染色液を 100 μ L 加え、37 °C、5 % CO₂ 雰囲気下で 30 分間インキュベーションする。
- ③ 容器から染色液を除去し、HBSSで2回洗浄を行った後、測定溶液 100 μ L 加えて測定を行う。

■蛍光測定

プレートに薬剤等を添加し、カルシウムの流出入をプレートリーダーで測定する。

CaSiR-1 AM の励起極大波長は650 nm、蛍光極大波長は 664 nmです。

モノクロメーターを用いた測定の際、励起波長は620~640 nm、蛍光波長は660~680nm を推奨します。

フィルタータイプのプレートリーダーの場合の推奨フィルターセットを表 4 に示します。

表 4. CaSiR-1 AM 推奨フィルターセット

メーカー	励起フィルター 【型番】中心波長 \pm 半値幅	蛍光フィルター 【型番】中心波長 \pm 半値幅	相当品
TECAN社	【30002292】 620 \pm 10 nm	【30000527】 670 \pm 25 nm	Cy5 Alexa Fluor 647
Perkin Elmer社	【2100-5240】 620 \pm 10 nm	【2100-5770】 685 \pm 35 nm	
BERTHOLD社	620 \pm 20 nm	700 \pm 20 nm	

3. 参考文献

Egawa, T.; Hanaoka, K.; Koide, Y.; Ujita, S.; Takahashi, N.; Ikegaya, Y.; Matsuki, N.; Terai, T.; Ueno, T.; Komatsu, T.; Nagano, T. *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133, 14157-14159

Pluronic 及び Cremophor はBASF 社の登録商標です。