

一般研究用

CaTM-2™ 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
GC505	CaTM-2™ AM Assay Kit	<ul style="list-style-type: none"> • CaTM-2 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

■ CaTM-2™ AM について

新しい赤色蛍光色素 TokyoMagenta を用いた CaTM-2™ AM は、細胞質におけるカルシウムイオン挙動解析に最適な赤色蛍光カルシウムプローブです。カルシウムイオン濃度に応じて感度良く蛍光を発します。

CaTM-2™ AM は 609 nm に蛍光極大波長をもつ赤色蛍光カルシウムプローブです。長波長領域は、組織透過性に優れ、光細胞毒性が低いという利点があります。またカルシウムイオンとの解離定数 (K_d) が 0.20 μM であり、カルシウムイオン濃度に応じて感度良く赤い蛍光を発します。

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. CaTM-2 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

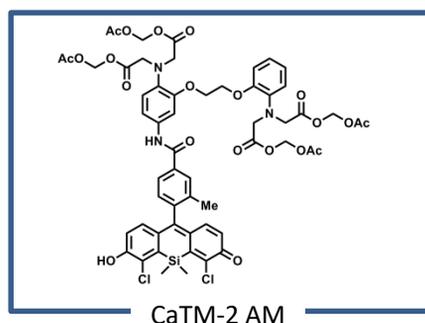
- 本キットは、96 well plate 5 枚分のアッセイキットです。
- Probenecid は強塩基性溶液で溶解しています。お取り扱いには保護手袋を着用し、十分にご注意ください。
- 一旦 CaTM-2 AM を DMSO に溶かして保存すると、分解する可能性があります。溶解後は一回使い切りを推奨します。
- 96 well plate へ細胞を培養する際、Poly-L-Lysine など細胞接着を強くし、subconfluent まで細胞を培養することをお勧めします。

■ 試薬の調製

1. 細胞染色液の調製

- ① CaTM-2™ 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) 20 μL * を加え、ピペティングでよく混合する。

* 最終濃度 0.04 % 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500 mM 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 1 mLを取り、9 mL の滅菌水を加える。これに500 mM 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。

CaTM-2 AM の励起極大波長は597 nm、蛍光極大波長は 609 nmです。

モノクロメーターを用いた測定の際、励起波長は550～590 nm、蛍光波長は600～640nm 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. CaTM-2 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 ± 半値幅	蛍光フィルター 【型番】中心波長 ± 半値幅	相当品
TECAN社	【30000489】 560 ± 20 nm	【30005011】 612 ± 10 nm	Texas Red Cy3.5 Alexa Fluor 594
Perkin Elmer社	【2100-5670】 555 ± 38 nm	【2100-5680】 632 ± 45 nm	
BERTHOLD社	560 ± 20 nm	640 ± 20 nm	

3. 参考文献

Egawa T., Hirabayashi K., Koide Y., Kobayashi C., Takahashi N., Mineno T., Terai T., Ueno T., Komatsu T., Ikegaya Y., Matsuki N., Nagano T., Hanaoka K. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2013, 52, 3874–3877.

Pluronic 及び Cremophor はBASF 社の登録商標です。