

# CaTM-3 AM

表 1. 製品情報

品番	品名	容量	保存	安定性
GC507	CaTM-3 AM	40 nmol (50 µg) ×5	遮光冷凍保存	未開封で約 1 年

## 1. CaTM-3 AM について

CaTM-3 AM は、細胞内カルシウムイオンを検出できる蛍光プローブです。最大蛍光波長は約 609 nm で、カルシウム濃度に応じて可逆的に赤色蛍光を発します。アセトキシメチルエステル基が付加されており、細胞内に取り込まれた後、細胞内のエステラーゼで分解され細胞質に均質に分布します。そのため細胞内でのカルシウムの挙動を解析することが可能です。

### CaTM-3 の物性

Abs <sub>max</sub>	595 nm
Em <sub>max</sub>	609 nm
K <sub>d</sub> (Ca <sup>2+</sup> )	0.19 µM
Φ	0.37

### ■ 保存

色素は窒素封入、乾燥状態で出荷しています。入荷後は遮光し -20°C以下で冷凍保存してください。DMSO 溶解後はすみやかにご使用ください。溶液を凍結保存した場合の性能は保証対象外です。

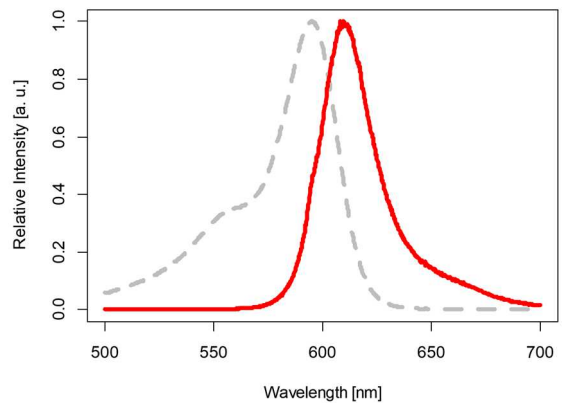


図 1 CaTM-3 の吸収、蛍光スペクトル

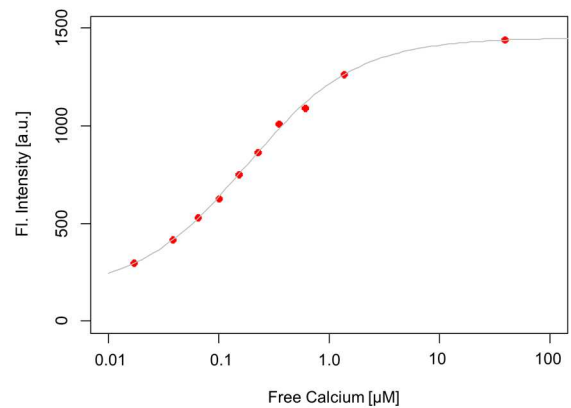


図 2 蛍光強度の Ca<sup>2+</sup> 依存性



## 2. プロトコル

### ■ ご用意いただくもの

- ・ Dimethylsulfoxide (DMSO)
- ・ 適切な洗浄および観察用バッファー (例: HBSS など)

### ■ 試薬の調製

1. CaTM-3 AM は淡黄褐色の粉末です。輸送中に粉末がキャップ等に付着していることがありますので、開封前にチューブをマイクロ遠心機等で遠心し、粉末をチューブの底に集めてください。
2. 室温に戻した 40 nmol の CaTM-3 AM (1 バイアル) を DMSO 40  $\mu$ L に溶解し、1 mM ストック溶液を作成します。均質な溶液になるよう、ピペティングで完全に溶解してください。

### ■ HeLa 細胞の染色・観察例

1. ポリリジンコートしたガラスボトムディッシュに HeLa 細胞を播種し、37°C 5% CO<sub>2</sub> の条件下で DMEM + 10% FBS で1晩以上培養します。次に、培地を取り除き、HBSS で優しく3回洗浄します。
2. CaTM-3 AM の1 mM ストック溶液を HBSS で希釈し、終濃度 3  $\mu$ M の染色液を作成し、培養容器に加え、37°C で30分染色します。
3. 染色液を取り除き、細胞を HBSS で3回優しく洗浄します。
4. HBSS 中の細胞を蛍光顕微鏡で観察します。
5. 観察しながら、終濃度 1  $\mu$ M のヒスタミンを加えると、細胞内のカルシウム濃度の振動が観察されます。
6. 同様に終濃度 5  $\mu$ M のイオノマイシンを加えると、細胞内のカルシウム濃度の増加が観察されます。

### ■ 脳スライス染色・観察例

1. 生後7日 (P7) のマウス脳から、300  $\mu$ m 厚の脳海馬スライスを作成します。
2. 脳スライスをメンブレンフィルターにマウントし、培養液を加えて 37°C 5% CO<sub>2</sub> 条件下で7日間培養します。
3. 8  $\mu$ M の CaTM-3 AM を加えた人工脳脊髄液 (ACSF) (0.01% Pluronic F-127, 0.005% クレモフォール EL, 0.08% DMSO 含有) に置換して、37°C で40分間染色します。

4. 脳スライスを ACSF で3回洗浄し、ACSF 中で 37°C 45分間インキュベートします。

5. 脳スライスをレコーディングチェンバーに移して、35°C の ACSF で連続的に灌流し、共焦点顕微鏡などで連続観察します。

※ 培養細胞では CaTM-3 AM を細胞に透過させる補助剤は不要ですが、脳スライスの場合は 0.01% Pluronic F-127, 0.005% クレモフォール EL を添加したほうが良いようです。

### ■ 蛍光観察

観察のためには、共焦点レーザー顕微鏡では 568 nm または 590 nm のレーザーで励起し、610–680 nm の波長の蛍光を観察します。もしくはニコン蛍光顕微鏡用の mCherry, TexasRed、オリンパス蛍光顕微鏡用の U-FYW, U-FMCHC などの Y 励起用または mCherry 用蛍光フィルターキューブが適合します。

### 参考文献

K. Hirabayashi, K. Hanaoka, T. Egawa, C. Kobayashi, S. Takahashi, T. Komatsu, T. Ueno, T. Terai, Y. Ikegaya, T. Nagano, Y. Urano (2016) *Cell Calcium* **60**:256-265

※ CaTM-3 AM は東京大学大学院薬学系研究科 薬品代謝化学教室の花岡健二郎先生のご指導・ご協力のもとで製品化しました。

表 2. 関連製品

型番	品名	主な用途
GC401 GC402	CaSiR-1	近赤外蛍光による $\text{Ca}^{2+}$ の検出に
GC403 GC4031	CaSiR-1 AM	近赤外蛍光による細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ の検出に
GC404	CaSiR-1 Assay Kit	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キット
GC503 GC504 GC5041	CaTM-2 AM	赤色蛍光による細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ の検出に
GC505	CaTM-2 Assay Kit	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キット
SK1003-01	DAF-FM	緑色蛍光による一酸化窒素の検出に
SK1004-01	DAF-FM DA	緑色蛍光による細胞内一酸化窒素の検出に
SK1005-01	DAR-4M	赤色蛍光による一酸化窒素の検出に。広い pH 領域で使えます。
SK1006-01	DAR-4M AM	赤色蛍光による細胞内一酸化窒素の検出に。広い pH 領域で使えます。