

FURA-2AM

1. 产品描述

FURA-2AM 是一种可渗透细胞的高亲和力钙离子荧光探针，是比率测量中使用最广泛的钙指示剂之一。FURA-2AM 是 FURA-2 的酯形式，FURA-2 是极性大的酸性化合物，无法进入活细胞内，在其负性基团上加上乙酰氧甲酯（AM）后，显著增加了细胞渗透性。

FURA-2AM 穿透细胞膜进入活细胞后，被细胞内的酯酶去酯化变成 FURA-2 游离酸，后者可与胞浆内的游离 Ca^{2+} 特异性地结合（结合比例为 1:1）。当 FURA-2 结合胞质内的游离 Ca^{2+} 后，表现出吸收位移，激发波长峰值从 380 nm 变为 340 nm，而 510 nm 附近的发射峰值保持不变。荧光强度与结合 Ca^{2+} 的浓度存在定量关系。一般用 340nm 和 380nm 波长激发 Fura-2，通过使用与两种激发对应的荧光强度比率来计算细胞内的钙离子浓度。比率测量可最大程度地减少混合物中的光漂白，荧光探针的泄漏，探针的不均匀装载和细胞厚度差异的影响，从而提供更可靠和可再现的结果。

Indo-1 也是目前使用最广泛的比率测量的钙荧光指示剂。通常来讲，Fura-2 是显微镜成像的首选染料，改变激发波长比发射波长更实用。而 Indo-1 是流式细胞仪的首选染料，使用单个激光激发（通常是氩离子激光的 351-364 nm 光谱线）并检测两个发射光更为实用，当染料被 Ca^{2+} 饱和时，Indo-1 的最大发射值从~475 nm 转变为~400 nm。Fura-2 比 indo-1 更耐光漂白。

2. 产品信息

货号	产品名称	规格
B6984	FURA-2AM	1 mg

3. 使用方法

（1）工作液配制

1) 储存液配制：产品以粉末形式提供，开盖前需要经过瞬时离心。如果产品是从冰箱中取出则需要先置于室温进行回温。取适量 FURA-2AM 用无水 DMSO 充分溶解，配制浓度为 1-5 mM 的储存液。储存液配置的浓度可以根据实验需求进行调整。使用者可根据需要进行分装，储存于 -20℃，注意保持干燥，避光，避免反复冻融。【注意】：溶剂 DMSO 一定要保证高质量无水，否则将会导致乙酰氧甲酯（AM）水解，使荧光染料无法进入细胞，影响实验效果。

2) 工作液配制：用合适的缓冲液直接稀释储存液到需要的工作液浓度，充分混匀。推荐的工作液浓度为 0.1-5 μM 。使用者可根据实验需求进行调整和配制。为了避免过度加载造成细胞毒性，建议在有效范围内尽量使用最低浓度。工作液需现配现用

3)（可选）如果 FURA-2AM 进入细胞的效果不好，在配制工作液时可加入 20% Pluronic F127 溶液（终浓度为 0.02%），将 FURA-2AM 分散在溶液中防止其聚合并能帮助进入细胞。【注意】：在配制储存液的时候不要加入 Pluronic F127，因为 Pluronic F127 会降低 FURA-2AM 的稳定性。

(2) 染色步骤

1) 取出培养到合适密度的细胞，除去旧培养液，使用缓冲液洗涤细胞 3 次。细胞黏附在培养板上或制成细胞悬液均可。

注意：如果使用含血清的培养液，血清中的酯酶会分解 AM，影响 FURA-2AM 进入细胞。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液残留。

2) 将适量的 FURA-2AM 工作液加入细胞中，在 37°C 培养 15-60 min，然后除去 FURA-2AM 工作液。

3) 用缓冲液洗涤细胞 3 次，以充分去除残留的 FURA-2AM 工作液。然后加入缓冲液覆盖细胞。

4) 37°C 培养箱孵育约 20-30 min，以确保细胞内的 AM 完全去酯化。

5) 荧光显微镜观察染色情况。

注意，一些细胞尤其是含有有机阴离子转运蛋白的细胞，会发生荧光探针泄漏，此时需加入一些抑制剂防止这种情况的发生，可以将丙磺舒（probenecid, 2-5 mM）或亚砷吡嗪（sulfipyrazone, 0.2-0.5 mM）添加到染料工作溶液中，以减少去酯化探针的泄漏。抑制剂的加入量需要经过优化，过量会对细胞造成不利影响。

注意事项

为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。