

Rhod-2 AM

1. 产品描述

Rhod-2 AM 是一种可渗透细胞的、可用可见光激发的高亲和力 Ca^{2+} 指示剂。Rhod-2 AM 本身不结合 Ca^{2+} ，一旦进入细胞，就会被细胞内的内源性酯酶水解成 Rhod-2。Rhod-2 与 Ca^{2+} 具有很高的亲和力，结合 Ca^{2+} 后荧光增加近 100 倍，其激发和发射最大值分别为 557 nm 和 581 nm，激发和发射光谱不会随着 Ca^{2+} 浓度变化发生明显迁移，适合与氩和氩激光光源一起使用。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，更适用于检测自发荧光水平高的细胞和组织中的 Ca^{2+} 水平，还用于检测由光感受器和可光活化钙离子螯合剂产生的 Ca^{2+} 释放。

Rhod-2 适用于通过共聚焦激光扫描显微镜和流式细胞术监测细胞内的钙离子。Rhod-2 与钙的解离常数 ($K_d = 1.0 \text{ mM}$) 是所有荧光钙探针中最高的，为监测钙浓度提供了更大的范围。Rhod-2 可准确测量线粒体内 Ca^{2+} 的流入和流出。

2. 产品信息

货号	产品名称	规格
C3276	Rhod-2 AM	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 Rhod-2 AM 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°C ，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（如 HBSS）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 1-10 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 Rhod-2 AM 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% - 0.05%），将 Rhod-2 AM 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 Rhod-2 AM 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 Rhod-2 AM 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 Rhod-2 AM 工作液加入细胞中，在 37°C 培养 15-60 min，然后除去 Rhod-2 AM 工作液。
- 3) 用缓冲液洗涤细胞 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。
- 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（sulfapyrazone, 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。