

Coelenterazine 400 a 腔肠素 400a

产品编号	产品名称	包装规格
NBS5922-500ug	Coelenterazine 400 a 腔肠素 400a	500ug
NBS5922-1mg	Coelenterazine 400 a 腔肠素 400a	2x500ug
NBS5922-5mg	Coelenterazine 400 a 腔肠素 400a	10x500ug

【温馨提示】：见我司提供的活体成像底物-腔肠素及衍生物产品专题。

产品简介：

腔肠素 (Coelenterazine) 是在水生生物中发现的一种发光基团 (luminophore)，是许多荧光素酶的作用底物，包括海肾荧光素酶 (Renilla reniformis luciferase, Rluc)，分泌型膜锚定荧光素酶 (Gaussia luciferase, Gluc) 和数枝虫荧光素酶 (Obelia luciferase)，和发光蛋白包括水母发光蛋白 (Aequorin) 的构成之一。其作用原理是以腔肠素为底物的荧光素酶，在含分子氧的条件下，氧化腔肠素产生高能量的中间产物，在此过程发射蓝色光，光波长在 450~480nm。而甲虫 (或萤火虫) 荧光素/荧光素酶 (FLuc) 系统不同，其在含分子氧的条件下，还需要 ATP 和 Mg^{2+} 的存在才能同时发光，光波长在 550-570nm。正由于生物发光信号和底物的差异，RLuc 常常与 FLuc 联合用于多重转录报告基因研究，或用作 Fluc 系统内萤火虫荧光素酶转染的内参。

腔肠素应用甚是广泛，包括：1) 活细胞或组织的钙离子检测；2) 细胞或组织的超氧化物和过氧亚硝基阴离子 (活性氧，ROS) 化学发光检测；3) 基因报告基因检测；4) 动物活体检测；5) ELISA 和生物发光共振能量转移 (BRET) 用于蛋白相互作用研究；6) 药物高通量筛选 (HTS)。

天然腔肠素 (Coelenterazine Native, CTZ-Native) 是自然界中存在最丰富的一种腔肠素，也是目前应用最普遍的一种标准底物。不仅是脱辅基水母发光蛋白 (APO) 的底物，也是海肾荧光素酶 (Rluc) 和分泌型膜锚定荧光素酶 (Gluc) 等荧光素酶的作用底物。前者用于检测钙离子浓度，后者用作荧光素酶的报告基因检测系统。还可用于生物共振能量转移 BRET，细胞或组织内的超氧阴离子和过氧化亚硝基阴离子水平 (ROS) 的化学发光检测等。

腔肠素 400a (Coelenterazine 400a, CTZ 400a)，常称为 DeepBlue C，是一种天然腔肠素衍生物，是一款良好的海肾荧光素酶 (Rluc) 底物，但不适合用作分泌型膜锚定荧光素酶 (Gluc) 底物。可用来实时监测钙离子浓度，报告基因分析，以及用作生物发光共振能

量转移 (BRET) 的首选底物。腔肠素 400a 的最大发射波峰值约在 400nm, 从而对 GFP 受体的发射峰干扰最小。腔肠素 400a 用在 BRET2 体系, 该体系通常用来评估蛋白-蛋白相互作用, 包括涉及 G 蛋白偶联受体介导的药物细胞信号通路分析, 是一种有效的药物开发和筛选工具。

产品描述:

- 1) CAS NO: 70217-82-2
- 2) 化学名: 2,8-Dibenzyl-6-phenyl-imidazo[1,2a]pyrazin-3-(7H)-one;
6-phenyl-2,8-bis(phenylmethyl)-imidazo [1,2-a]pyrazin-3(7H)-one;
- 3) 同义名: CTZ 400a; 1-bisdeoxycoelenterazine; di-dehydrocoelenterazine;
DeepBlueCTM; 腔肠素 400a;
- 4) 分子式: C₂₆H₂₁N₃O
- 5) 分子量: 391.5 g/mol
- 6) 纯度: >97%
- 7) 外观: 黄色至橙色固体
- 8) 溶解性: 溶于甲醇或乙醇, 不要溶于 DMSO

保存条件:

-20°C 干燥避光保存, 且保存于惰性气体内。至少一年有效。

产品使用:

一、腔肠素 400a 的溶解事项

- 1) 腔肠素 400a 不溶于水, 接触到空气, 水分或任何氧化剂都不稳定。溶于甲醇或乙醇, 千万不要溶于 DMSO, 因会发生未知反应引起腔肠素 400a 的快速降解并生成未知的代谢产物。
- 2) 毒性最小的溶剂是无水乙醇, 可溶解粉末配制成 0.1-1mg/ml 溶液, 之后加入需要的缓冲液, 尽量保持缓冲液 pH 小于 7.0, 因碱性条件会快速降解腔肠素 400a, 有时沉淀会立即产生。

二、腔肠素 400a 的保存事项

最好在使用前, 才用无水乙醇溶解腔肠素 400a 粉末, 然后用所选的缓冲液稀释并混匀。此时配好的工作缓冲液需静置 20-30min 使其稳定 (因部分底物会发生自氧化) 后才进行体外实验。该工作液能稳定保存几个小时 (室温 3-4h), 仅微弱的信号衰减可能发生。不建议将腔肠素 400a 的乙醇溶液置于 -20°C 或 -70°C 保存, 因天然腔肠素及任何衍生物含有

一个高能量的二氧杂环丁酮环形结构，即使在低温条件下都会自发降解。

三、腔肠素工作液的配制

称取 1mg 腔肠素 400a 粉末溶解于 1ml 乙醇（或甲醇）中配置成浓度为 1mg/ml 的母液。在使用时 需将母液用合适的缓冲液（比如 PBS）稀释成需要浓度的工作液。比如常用的工作液浓度是 100μM，可使用 391.5ul 的 1mg/ml 的母液用 PBS 稀释到 10ml，得到一个 100uM 的溶液。

BRET 生物发光共振能量转移（可根据具体实验发生变动） 详细步骤可参考文献：
Gersting SW, et al. Bioluminescence resonance energy transfer:an emerging tool for the detection of protein-protein interaction in living cells. Methods Mol Biol. 815:253-63 (2012)。

本步骤以 Rluc 的融合蛋白作为能量供体，YFP 的融合蛋白作为能量受体，两者同时电转化进入细胞，并通过加载腔肠素 400a 底物来启动氧化反应，通过分析两者 BRET 信号来研究两个蛋白之间的相互作用。

1. 按照正常流程将能表达两个融合蛋白的质粒，按照 3:1 的比例（YFP:Rluc）共电转染进入细胞。
2. 转染后 24h 进行 BRET 信号的检测。吸去培养液（留约 30μl）后，将 96 孔板放到荧光酶标仪上。
3. 至少在测定前 15min 准备腔肠素 400a 工作液。
4. 用超纯水清洗注射泵后，让泵开始自动吸取配制好的 400a 工作液，按照每孔 70μl 工作液的量顺序加入，使得每孔中底物的终浓度为 30μM。进样结束后，孵育 2min。之后立即进行双波长荧光信号读数，即 Rluc 信号（485nm）和 BRET 信号（535nm）。

BRET 信号值计算

为了能够进行数据评估，转染细胞的 Rluc 信号（485nm）应当超过非转染对照细胞的（平均值+9×标准误差）的区间。

1. BRET-ratio（BRET 信号比）基于以下等式进行计算，

$$R = (I_A/I_D) - cf$$

R 代表 BRET 比值，ID 表示受体 YFP 荧光信号的强度（535nm），IA 表示供体 Rluc 荧光信号的强度（485nm），cf 表示校准因子（BRETcontrol/RluccontrolID），对照样本是指共转染 YFP 融合蛋白质粒和不含供体第二个研究蛋白的 Rluc 载体的细胞荧光信号。

2. 阳性对照，使用 YFP-Rluc 融合蛋白的 BRET 比值为 1.0。
3. 若蛋白之间有阳性反应，必须检测到：8 组蛋白样本中至少有一组能够产生超过设定阈值 0.1 以上的 BRET 信号比值。

附录 1 天然腔肠素及其衍生物的光谱特性：

产品名称	产品编号	Em (nm)	RLC[1]	Relative Intensity[2]	Half-rise time (ms) [3]
<u>Coelenterazine native</u>	<u>NBS5918</u>	466	1.00	1	6-30
<u>Coelenterazine h</u>	<u>NBS5920</u>	466	0.75	16	6-30
<u>Coelenterazine 400 a</u>	<u>NBS5922</u>	400	/	/	/
<u>Coelenterazine e</u>	<u>NBS5923</u>	405&465	0.5	4	0.15-0.3
<u>Coelenterazine f</u>	<u>NBS5924</u>	472	0.80	20	6-30
<u>Coelenterazine cp</u>	<u>NBS5925</u>	442	0.63	28	2-5
<u>Coelenterazine hcp</u>	<u>NBS5926</u>	445	0.65	500	2-5
<u>Coelenterazine n</u>	<u>NBS5928</u>	468	0.25	0.15	6-30

[1] RLC = relative luminescence capacity: Total time-integrated emission of aequorin in saturating Ca^{2+} relative to native aequorin = 1.0.

[2] Ratio of the luminescence of aequorin reconstituted with coelenterazine analog relative to native aequorin at 100 nM Ca^{2+} .

[3] Half-Rise Time: The half-rise time is the time for the luminescence signal to reach 50% of the maximum after addition of 1 mM Ca^{2+} to a standard of aequorin reconstituted with the coelenterazine analog of interest.

附录 2 天然腔肠素及其衍生物的应用差异：

产品编号	产品名称	应用特征
<u>NBS5918</u>	<u>Coelenterazine native</u>	应用非常广泛的标准底物。腔肠素是天然水母发光蛋白复合物的发光基团，也是海肾荧光素酶 (Rluc) 的底物。底物的快速再生 (fast regeneration) 比较重要的实验推荐使用天然腔肠素。 1) 生物发光检测钙离子的灵敏度非常高，检测范围从 0.1 μM 到 >100 μM ；2) 使用腔肠素监测报告基因表达是其主要应用；3) 其他应用包括生物共振能量转移 BRET，化学发光检测细胞或组织内的超氧阴离子和过氧化亚硝基阴离子水平 (ROS)；
<u>NBS5920</u>	<u>Coelenterazine h</u>	1) 腔肠素 h 形成的水母发光蛋白复合物比天然腔肠素复合物的光强度高 10 倍以上；2) 比天然腔肠素对钙离子敏感度更高；3) 也适用报告基因分析。
<u>NBS5922</u>	<u>Coelenterazine 400 a</u>	也称为 DeepBlue C，是一种腔肠素衍生物，用作海肾荧光素酶 Rluc 的底物，发射峰约 400nm。含 GFP 受体的 BRET 研究是 Rluc 的首选底物，因其对 GFP 受体的发射波干扰非常小。不可用作 Gluc 底物。
<u>NBS5923</u>	<u>Coelenterazine</u>	体外水母发光蛋白再生中腔肠素 e 的速度最高，具有双发射

	<u>e</u>	峰，分别为 405nm 和 465nm，使其能在 pCa 5-7 范围内通过双发射峰荧光强度比率的方式测定 Ca^{2+} 浓度，提高检测准确度。但由于渗透性差，不适合胞内应用。在溶液中稳定性差。
<u>NBS5924</u>	<u>Coelenterazine f</u>	腔肠素 f 形成的水母发光蛋白复合物的光强度是天然腔肠素复合物的 20 倍，最大发射波长约长 8nm。具有最好的细胞渗透性。当需要具极高钙离子 Ca^{2+} 灵敏度的水母发光蛋白复合物，建议用腔肠素 f。
<u>NBS5925</u>	<u>Coelenterazine cp</u>	Coelenterazine cp 产生水母发光蛋白复合物的光强度是天然腔肠素复合物的 15 倍，且具有更快的 Ca^{2+} 反应性。
<u>NBS5926</u>	<u>Coelenterazine hcp</u>	其生物发光强度最高（腔肠素 hcp 形成水母发光蛋白复合物的荧光强度比天然腔肠素复合物高 190 倍），对 Ca^{2+} 反应速度快。
<u>NBS5927</u>	<u>Coelenterazine fcp</u>	腔肠素 fcp 形成的水母发光蛋白复合物的光强度是天然腔肠素复合物的 135 倍。
<u>NBS5928</u>	<u>Coelenterazine n</u>	所有的腔肠素衍生物中荧光强度最弱，对 Ca^{2+} 反应时间明显慢于天然腔肠素。一种非常有用的低灵敏腔肠素。
<u>NBS5929</u>	<u>Coelenterazine i</u>	体外腔肠素 i 水母发光蛋白复合物的荧光强度仅为天然腔肠素复合物的 3%，在所有腔肠素衍生物种对钙离子的反应时间最慢。
<u>NBS5930</u>	<u>Coelenterazine ip</u>	体外腔肠素 ip 水母发光蛋白复合物的荧光强度几乎比天然腔肠素复合物高 50 倍，但对钙离子的反应时间比天然腔肠素慢。
<u>NBS5932</u>	<u>Methyl Coelenterazine</u>	非常优越的抗氧化剂，靶向细胞内来源于单态氧和超氧化物阴离子产生的活性氧物质（ROS）。

注意事项：

1. 腔肠素 (Coelenterazine, CTZ) 及衍生物最好以完全冻干粉的状态保存在惰性气体内，密封后置于 -20°C 或 -70°C 长期避光保存。管内即使有微量空气，也会随着时间慢慢氧化腔肠素使其活性丧失。
2. 腔肠素 (Coelenterazine, CTZ) 及衍生物不建议以储存液的形式保存，最好于实验前配制新鲜的溶液。不建议将配好的腔肠素溶液储存在 -20°C 或 -70°C，因其具有一个高能量的二氧杂环丁酮环形结构，即使在低温条件下都会自发降解。
3. 商业化腔肠素的种类繁多，有天然腔肠素，以及各种腔肠素衍生物（比如，腔肠素 h，腔肠素 400a，腔肠素 e，腔肠素 f，腔肠素 hcp）。它们对钙离子的亲和力，光谱特性，以及应用倾向上会有差异，详见附录 1—天然腔肠素及其衍生物的光谱特性，附录 2—天然腔肠素及其衍生物的应用差异选择适当的产品。
4. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

本产品仅用于生命科学研究，不得用于医学诊断及其它用途！