

Fluo-4 钙离子检测试剂盒

Fluo-4 Calcium Assay Kit

产品介绍

Fluo-4 是一种将 Fluo-3 结构中的 Cl 替换成 F 的钙荧光探针。由于将 Cl 替换成了电子吸引力更强的 F，它的最大激发波长会向短波长处偏离 10 nm 左右。这个波长更接近于氩激光器的波长，所以用氩激光器激发时，Fluo-4 的荧光强度比 Fluo-3 强一倍。由于 Fluo-4 与钙离子的亲和力和 Fluo-3 近似 (Fluo-3: $K_d=0.4 \mu\text{mol/L}$ 、Fluo-4: $K_d=0.36 \mu\text{mol/L}$)，所以使用上和 Fluo-3 完全相同，可以使用激光共聚焦显微镜或流式细胞仪等仪器检测细胞内钙离子浓度的变化。Fluo-4-AM 是 Fluo-4 的一种乙酰甲酯衍生物，通过培养，能够轻易进入细胞中。Fluo-4-AM 穿透细胞膜进入细胞后被细胞内的酯酶剪切形成 Fluo-4，从而被滞留在细胞内，Fluo-4 若以游离配体形式存在时几乎是非荧光性的，但是当它与细胞内钙离子结合后可以产生较强的荧光，最大激发波长为 494nm，最大发射波长为 516nm。可以使用激光共聚焦显微镜或流式细胞仪检测细胞内钙离子浓度的变化。

Fluo-4 钙离子检测试剂盒(Fluo-4 Calcium Assay Kit)是一种基于 Fluo-4-AM 钙离子荧光探针检测细胞内钙离子浓度的试剂盒。本试剂盒可以使用荧光显微镜进行荧光成像检测，也可以使用荧光酶标仪或流式细胞仪进行荧光的定量检测。使用荧光显微镜或荧光酶标仪还可以进行细胞内钙离子浓度的动态变化检测。

钙(Calcium)通常是哺乳动物机体内最为丰富的矿物质，参与调控众多的细胞生命活动过程，也是最为重要的细胞内调控因子之一。钙能够以自由离子或结合钙离子的复合物两种形式存在，例如磷酸钙和碳酸钙复合物即为骨骼组织的组成成分。包括肌肉收缩、细胞粘附、激素/神经递质释放、糖原代谢、细胞增殖/分化、血凝、神经或突触传递以及骨骼结构支持在内的大量生理过程都受到钙离子信号的调控。细胞特异性钙信号系统完整性的缺陷会导致一些疾病的发生^[1]。

本试剂盒检测细胞内钙离子流通量的原理是：钙离子荧光探针 Fluo-4-AM 本身几乎无荧光，一旦进入细胞内经过胞内酯酶水解后产生的 Fluo-4 和钙离子结合后可以发出绿色荧光。细胞外的钙离子内流，或者细胞内储存的钙离子释放，使得细胞浆内的钙离子浓度增加，细胞内的 Fluo-4 可以结合更多的钙离子，最终引起细胞内绿色荧光强度增加；细胞内的钙离子外流或储存，使得细胞浆内的钙离子浓度降低，细胞浆内的 Fluo-4 可以结合的钙离子减少，最终引起细胞内绿色荧光强度下降。钙离子荧光探针 Fluo-4-AM 可广泛地用于钙离子浓度的动态变化检测，以及高通量筛选影响钙离子浓度变化的 G 蛋白偶联受体激动剂或抑制剂等。

本试剂盒使用便捷，提供了多种配套试剂，并且染色后无需洗涤。本试剂盒提供了用于稀释 Fluo-4-AM 的检测缓冲液(Assay Buffer)，该检测缓冲液可以极大程度地保证细胞活力和接近正常的生长状态；提供了可增强 Fluo-4-AM 溶解性的促溶剂(Solubility Enhancer)可以改善染色效果；提供的染色增强剂(Staining Enhancer)在检测中可有效地维持细胞内荧光并减少背景荧光。同时，本试剂盒染色后可不用洗涤，使用更方便。

对于 96 孔板中的样品，按照每孔使用 100uL Fluo-4 染色液计算，本试剂盒的小包装和中包装分别可以进行 200 次和 1000 次检测；如果用于流式细胞仪检测，按照每个样品的检测体系体积为 0.5ml 时，本试剂盒的小包装和中包装分别可以进行 40 次和 200 次检测；对于 6 孔板中的贴壁培养细胞样品，按照每孔使用 1ml Fluo-4 染色液计算，本试剂盒的小包装和中包装分别可以进行 20 次和 100 次检测。

注意事项:

- 1) Fluo-4-AM 遇水极易分解，建议第一次使用时，适当酌情分装
- 2) Fluo-4-AM 在 4℃、冰浴等较低温度情况下会凝固而粘在离心管管底、管壁或管盖内，可以 20-25℃水浴温育片刻至全部融解并适当离心至管底后使用。
- 3) Fluo-4-AM 的工作浓度、细胞量、孵育温度和时间等可根据所使用的细胞和给予的特定刺激预先进行适当摸索和优化，例如荧光探针的浓度可在 0.2X-2X 之间适当调整。
- 4) Fluo-4-AM (500X)和 Solubility Enhancer (500X)使用时请确保已完全溶解。

- 5) 荧光染料均存在淬灭问题，请尽量注意避光，以减缓荧光淬灭。
- 6) 本公司所有产品仅限于专业人员用于生命科学研究，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅。
- 7) 本公司所有产品必须由合格专业技术人员操作同时佩戴口罩/手套/实验服并遵守生物实验室安全操作规程！

试剂盒组份：

货号	产品名称	规格	
ADS013U4	Fluo-4 钙离子检测试剂盒	200T	
产品组分	组分名称	包装	保存条件
1	Fluo-4 AM (500X)	40uL	-20°C Protect from light 1 year
2	Solubility Enhancer (500X)	40uL	-20°C Protect from light 1 year
3	Assay Buffer	50mL	-20°C Protect from light 1 year
4	Staining Enhancer (100X)	200uL	-20°C Protect from light 1 year

保存条件：密封避光-20°C保存，一年有效。Fluo-4 AM 须-20°C避光保存。

使用方法：

1. Fluo-4 染色液的配制：

按照 96 孔板每孔 100uL Fluo-4 染色液(Fluo-4 Staining Solution)的体系，参考下表配制适量的 Fluo-4 染色液，并充分混匀。

Reagent	1 Sample	10 Samples	100 Samples
Fluo-4 AM	0.2uL	2uL	20uL
Solubility Enhancer (500X)	0.2uL	2uL	20uL
Assay Buffer	99.6uL	996uL	9.96mL
Fluo-4 Staining Solution	100uL	1mL	10mL

注 1：配制好的 Fluo-4 染色液必须一次使用完，不能冻存。Fluo-4 染色液中 Fluo-4 AM 的浓度可以根据染色效果在 0.2X-2X 之间适当调整。

注 2：也可以使用其它合适的溶液，如无血清培养液、HBSS 或 PBS 稀释 Fluo-4 AM (500X)。本试剂盒配套提供的检测缓冲液(Assay Buffer)可在一段时间内有效维持细胞的正常状态，并给细胞提供一定的营养，使用效果通常比 PBS 或 HBSS 更好。

注 3：Staining Enhancer 即染色增强剂，对细胞功能可能有一定的影响，对于大多数细胞无需添加。如果遇到细胞(例如 CHO)出现去酯化的荧光探针 Fluo-4 明显的外排现象时，则建议添加。使用时将 Staining Enhancer (100X)按照 1:100 稀释到 Fluo-4 Staining Solution 中，配制含 1X Staining Enhancer 的 Fluo-4 Staining Solution。细胞在含 1X Staining Enhancer 的溶液中孵育的时间不能超过 2 小时。

2. 荧光显微镜检测：

2.1) 接种培养。将细胞接种于 96 孔板等多孔板、细胞培养皿中或者细胞爬片上。如有必要，按实验设计对细胞进行一定处理。

2.2) 洗涤(选做)。对于贴壁细胞，吸除培养液，用 PBS 洗涤细胞 1 遍；对于悬浮细胞，250-1000×g 室温离心 5min，吸除上清，用 PBS 洗涤 1 遍。酚红或血清对于本试剂盒的检测有一定的干扰，吸除培养液和 PBS 时

最好使用真空泵。在能充分吸净残留液体的情况下，可以不使用 PBS 洗涤。通常洗涤一次能更好地降低背景荧光，但本试剂盒不进行洗涤也能获得良好染色效果。

2.3)染色。加入适当体积的 Fluo-4 染色液。通常 96 孔板每孔加入 100uL，24 孔板每孔加入 250uL，12 孔板每孔加入 500uL，6 孔板每孔加入 1ml。37°C 避光孵育 30min。孵育时间可在 10-60min 之间进行调整。

注 1：如果是首次实验不能确定孵育温度和时间，建议先尝试 37°C 孵育 30min，观察荧光效果。如果细胞死亡较多，则适当缩短时间或降低温度；如果荧光强度太弱，则适当延长时间。

注 2：孵育后也可用 PBS 或 HBSS 洗涤 1-3 次。

2.4)检测。孵育结束后，在荧光显微镜下观察染色效果(Fluo-4 AM 为绿色荧光，Ex/Em = 490/525nm)。

3.流式细胞仪检测：

3.1)细胞准备。贴壁细胞胰酶消化后用培养液重悬，并用 PBS 洗涤一次；悬浮细胞 250-1000×g 室温离心 5min，弃上清，用 PBS 洗涤一次。每个样品推荐的细胞用量为 10^6 个细胞。

3.2)染色。对于上一步骤的 10^6 个细胞的沉淀，加入 1ml Fluo-4 染色液，重悬为单细胞悬液。37°C 避光孵育 30min。孵育时间可在 10-60min 之间进行调整。

注 1：如果是首次实验不能确定孵育温度和时间，建议先尝试 37°C 孵育 30min，观察荧光效果。如果细胞死亡较多，则适当缩短时间或降低温度；如果荧光强度太弱，则适当延长时间。

注 2：孵育后也可用 PBS 或 HBSS 洗涤 1-3 次。

3.3)检测。孵育完成后，可以直接进行流式细胞仪检测，也可以 250-1000×g 室温离心 5min 沉淀细胞，吸净液体后每个样品加入 0.5ml 检测缓冲液重悬细胞后用流式细胞仪检测(Fluo-4 AM 为绿色荧光，Ex/Em = 490/525nm)。

注 1：使用仅含检测缓冲液的并且未经染色的细胞样品用于流式细胞仪的阴性对照设置。

注 2：由于流式检测比较灵敏，使用的荧光探针浓度可能要比荧光显微镜检测时要低，此时可根据细胞类型和实际染色情况对 Fluo-4 AM 稀释倍数进行适当调整。

4.荧光酶标仪检测：

4.1)接种培养。将细胞接种于 96 孔板黑色多孔板中，每孔的细胞数需要控制在 100-10,000 个，通常宜在 2000-5000 个范围内。按实验设计对细胞进行一定处理。

4.2)洗涤(选做)。对于贴壁细胞，吸除培养液，用 PBS 洗涤细胞 1 遍；对于悬浮细胞，250-1000×g 室温离心 5min，吸除上清，用 PBS 洗涤 1 遍。酚红或血清对于本试剂盒的检测有一定的干扰，吸除培养液和 PBS 时最好使用真空泵。在能充分吸净残留液体的情况下，可以不使用 PBS 洗涤。通常洗涤一次能更好地降低背景荧光，但本试剂盒不进行洗涤也能获得良好染色效果。

4.3)染色。加入适当体积的 Fluo-4 染色液，通常 96 孔板每孔加入 100uL。37°C 避光孵育 30min。孵育时间可在 10-60min 之间进行调整。

注 1：如果是首次实验不能确定孵育温度和时间，建议先尝试 37°C 孵育 30min，观察荧光效果。如果细胞死亡较多，则适当缩短时间或降低温度；如果荧光强度太弱，则适当延长时间。

注 2：孵育后也可用 PBS 或 HBSS 洗涤 1-3 次。

4.4)检测。孵育结束后，用荧光酶标仪检测(Fluo-4 AM 为绿色荧光，Ex/Em = 490/525nm)。

e.通过对比对照组与处理组的 RFU (Relative fluorescence values)，可以得出药物刺激的效果。