

Fluo-4钙离子检测试剂盒

产品编号	产品名称	包装
S1061S	Fluo-4钙离子检测试剂盒	200次
S1061M	Fluo-4钙离子检测试剂盒	1000次

产品简介:

- 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[2]。
- Fluo-4 AM在Fluo-3 AM的基础上改进而成,其特点是加载更快并且在相同条件下荧光更加明亮。Fluo-4 AM将Fluo-3 AM结构中的氯原子替换成了氟原子,导致它的最大激发波长会向短波长处偏离12nm左右。这个波长更接近于氩激光器的波长488nm,所以用氩激光器激发时,Fluo-4的荧光强度会比Fluo-3强一倍。由于Fluo-4与钙离子的亲和力和Fluo-3相近,所以使用方法方面Fluo-4 AM在Fluo-3 AM也基本相同,可以使用荧光显微镜、荧光酶标仪或流式细胞仪等荧光检测仪器来测定细胞内钙离子浓度的变化。Fluo-4与钙离子结合后的激发光谱和发射光谱参考图1[3]。

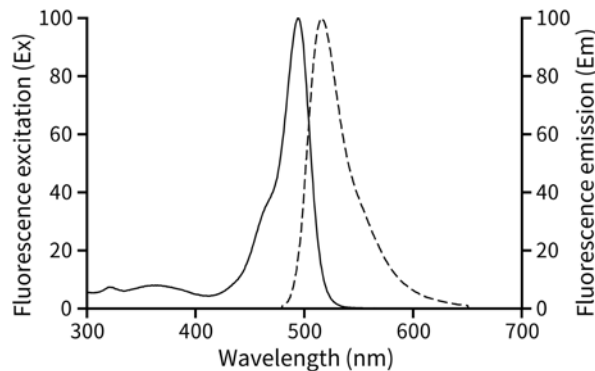


图1. Fluo-4与钙离子结合后的激发光谱和发射光谱。

- 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。本试剂盒检测细胞内钙离子浓度动态变化的效果参考图2。

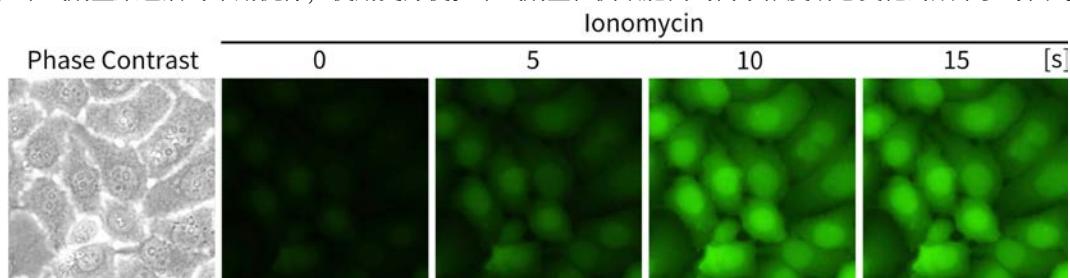


图2. Fluo-4钙离子检测试剂盒检测HeLa细胞内钙离子浓度动态变化的效果图。上图均为同一视野中相同细胞在不同时间点拍摄的照片。Ionomycin (S1672)引起的钙离子内流是一个十分短暂的过程,在5秒内就能引起明显的细胞内绿色荧光强度增加,10

秒时绿色荧光几乎达到一个最大水平，之后的时间内荧光强度几乎没有变化。实际检测效果会因实验条件、检测仪器的不同而存在差异，本图仅供参考。

- 对于96孔板中的样品，按照每孔使用100 μ l 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。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
S1061S-1	Fluo-4 AM (500X)	40 μ l
S1061S-2	Solubility Enhancer (500X)	40 μ l
S1061S-3	Assay Buffer	50ml
S1061S-4	Staining Enhancer (100X)	200 μ l
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
S1061M-1	Fluo-4 AM (500X)	200 μ l
S1061M-2	Solubility Enhancer (500X)	200 μ l
S1061M-3	Assay Buffer	250ml
S1061M-4	Staining Enhancer (100X)	1ml
—	说明书	1份

保存条件：

-20 $^{\circ}$ C避光保存，至少一年有效。Fluo-4 AM (500X)须避光保存。

注意事项：

- Fluo-4 AM遇水极易分解，建议第一次使用时，适当酌情分装。
- Fluo-4 AM在4 $^{\circ}$ C、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 $^{\circ}$ C水浴温育片刻至全部融解并适当离心至管底后使用。
- 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。
- Fluo-4 AM (500X)和Solubility Enhancer (500X)使用时请确保已完全溶解。
- 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。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，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内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

1. Fluo-4染色液的配制：

按照96孔板每孔100 μ l 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 (500X)	0.2 μ l	2 μ l	20 μ l
Solubility Enhancer (500X)	0.2 μ l	2 μ l	20 μ l
Assay Buffer	99.6 μ l	996 μ l	9.96ml
Fluo-4 Staining Solution	100μl	1ml	10ml

注1：配制好的Fluo-4染色液必须一次使用完毕，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 (C0218)或PBS (C0221A/C0221D)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，配制成含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：

- 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。
- 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 \times 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。

c. **染色。**加入适当体积的Fluo-4染色液。通常96孔板每孔加入100 μ l，24孔板每孔加入250 μ l，12孔板每孔加入500 μ l，6孔板每孔加入1ml。37 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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。

d. **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：

a. **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 \times 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。

b. **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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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。

c. **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 \times 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：

a. **接种培养。**将细胞接种于96孔板黑色多孔板中，如BeyoGold™全黑96孔细胞培养板(FCP966)，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。

b. **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 \times 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。

c. **染色。**加入适当体积的Fluo-4染色液，通常96孔板每孔加入100 μ l。37 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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。

d. **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。

参考文献：

1. Clapham DE. Cell. 2007. 131(6):1047-58.
2. Wu N, Nishioka WK, Derecki NC, Maher MP. Sci Rep. 2019. 9(1):12692.
3. Hagen BM, Boyman L, Kao JP, Lederer WJ. Cell Calcium. 2012. 52(2):170-81.

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
S1052	Fura-2 AM (钙离子荧光探针, 2mM)	50 μ l
S1056	Fura-3 AM (钙离子荧光探针, 2mM)	20 μ l
S1060	Fura-4 AM (钙离子荧光探针, 2mM)	25 μ l
S1061S	Fluo-4钙离子检测试剂盒	200次
S1061M	Fluo-4钙离子检测试剂盒	1000次
S1063S	钙含量显色检测试剂盒	200次
S1672-1 μ mol	Ionomycin (钙离子载体)	5mM \times 0.2ml

Version 2023.07.21