

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号：E-BC-F100

产品规格：96T/500Assays

检测仪器：荧光酶标仪(激发波长 490 nm，发射波长 525 nm)

Elabscience® Fluo-4 钙离子荧光法测试盒

Fluo-4 Calcium Fluorometric Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100

邮箱：biochemical@elabscience.cn

网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测细胞样本中的钙离子水平。

检测原理

钙离子 (Calcium) 作为生物机体的重要金属离子, 不仅参与细胞内信号传导, 还在细胞的许多生命活动中担当着重要角色, 因此检测钙离子浓度在实验研究中具有重要意义。

本测试盒检测钙离子浓度用到的探针在细胞外并无荧光, 当进入细胞后, 被细胞内酯水解会发射绿色荧光, 其荧光在激发波长 490 nm 和发射波长 525 nm 附近有最大波峰, 强度与细胞内钙离子水平成正比。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(96 T)	规格 2 (Size 2)(500 Assays)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	盐溶液 (Saline Solution)	60 mL×1 瓶	60 mL × 5 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	增强剂 (Solubility Enhancer)	16 mL×1 瓶	40 mL × 2 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	探针 (Probe)	液体×2 支	液体 ×10 支	-20°C 避光 保存 6 个月
	96 孔黑色酶标板	1 板		
	96 孔覆膜	2 张		
	样本位置标记表	1 张		

说明: 试剂严格按上表中的保存条件保存, 不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂, 使用前请先离心, 以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器: 荧光酶标仪 (Ex/Em=490 nm/525 nm) /流式细胞仪/荧光显微镜、37 °C 恒温箱

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温。

② 工作液的配制：

根据实验实际需求量，按照试剂二：试剂三的总体积比=99:1的比例，配制适量工作液，并充分混匀，配制后的工作液现配现用。荧光酶标仪检测工作液的需求量可参考下表(实际实验可根据实验结果进行调整工作液浓度，适当提高试剂三加入体积)。

	1个孔	10个孔	50个孔	100个孔
试剂二(μL)	99	990	4950	9900
试剂三(μL)	1	10	50	100
工作液体积 (μL)	100	1000	5000	10000

实验关键点

① 必须使用活细胞。

② 避免试剂三反复冻融，可根据实验情况分装保存。

③ 试剂三遇水容易淬灭，配制成工作液后应尽快使用，且孵育完成后应2小时之内进行测定，防止荧光减弱。

操作步骤

荧光酶标仪/流式细胞仪检测

检测仪器部分参数设置	
荧光酶标仪	Ex/Em = 490 nm/525 nm
流式细胞仪	Ex/Em = 490 nm/525 nm, 可以用 FITC 的参数设置检测。

样本准备:

悬浮细胞: 根据实验设计进行细胞培养, 确保细胞健康且不会过度生长。收集细胞, 4°C, 500 × g 离心 5 min, 弃去上清液。

贴壁细胞: 根据实验设计进行细胞培养, 确保细胞健康且不会过度生长。去除细胞培养液, 用胰酶消化细胞 2 min, 加入含血清培养基终止消化, 清洗并收集细胞, 4°C, 500 × g 离心 5 min, 弃去上清液。

- ① 荧光酶标仪: 用试剂一重悬细胞, 建议细胞密度为 1×10^4 个/ μL , 如 1×10^6 个细胞, 用 100 μL 试剂一重悬(细胞密度根据细胞类型及细胞活性调整)。流式细胞仪: 用工作液重悬细胞, 建议细胞密度为 0.2×10^4 - 0.5×10^4 个/ μL , 如 1×10^6 个细胞, 用 200-500 μL 工作液重悬(细胞密度可根据细胞类型及细胞活性调整)。
- ② 荧光酶标仪: 吸取 50 μL 细胞悬液加入黑色酶标板孔中, 加入 100 μL 工作液。建议同时设置对照孔: 吸取 50 μL 细胞悬液加入黑色酶标板孔中, 加入 100 μL 试剂一。
流式细胞仪: 吸取 150 μL 细胞悬液加入黑色酶标板孔中。
- ③ 37°C 避光孵育 30 min (此孵育时长与细胞类型、探针浓度有关, 孵育时间可在 10-60 min 之间进行调整)。
- ④ 使用荧光酶标仪测定各孔激发波长 490 nm, 发射波长 525 nm 处的荧光值。或使用流式细胞仪于激发波长 490 nm, 发射波长 525 nm 检测各孔荧光值。

荧光显微镜检测（仅适用于贴壁细胞）

- ① 细胞接种：细胞培养板中铺入细胞爬片，再加入细胞，在最适合细胞的培养基中按照所需方案培养细胞，确保细胞健康且不会过度生长。
- ② 设置对照孔（试剂一代替工作液）。
- ③ 去除细胞培养液，细胞用试剂一洗涤一次（注意：不要直接对着细胞吹打，否则细胞会脱落）。
- ④ 加入适当体积工作液，加入体积以能充分覆盖住细胞为宜，通常对于六孔板的一个孔加入工作液不少于 1 mL。
- ⑤ 37℃ 避光孵育 30 min（此孵育时长与细胞类型、探针浓度有关，孵育时间可在 10-60 min 之间进行调整）。
- ⑥ 去除工作液，用试剂一洗涤细胞 2-3 次，充分去除未进入细胞的探针。
- ⑦ 取出细胞爬片，放到载玻片上直接在荧光显微镜下进行检测。
- ⑧ 检测波长设置：选择激发波长 490 nm，根据所观察的荧光强度设置曝光时间，在同一参数下测定所有样本。

附录1 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
没有检测到荧光值 或荧光值低	细胞密度不够	增加细胞密度
	探针浓度不够	增加试剂三的体积,调节工作液浓度
	孵育时间不够	延长孵育时间

声明

1. 试剂盒仅供研究使用,如将其用于临床诊断或任何其他用途,我公司将不对因此产生的问题负责,亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器,严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低,请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中,建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责,不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责,使用前请充分考虑样本可能的使用量,预留充足的样本。

