

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号：GBQ057

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)(500Assays)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	盐溶液 (Saline Solution)	60 mL×1 瓶	60 mL × 5 瓶	-20℃ 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	增强剂 (Solubility Enhancer)	16 mL×1 瓶	40 mL × 2 瓶	-20℃ 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	探针 (Probe)	液体×2 支	液体 × 10 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
	96 孔黑色酶标板	1 板		无要求
	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℃ 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：试剂三的面积比= 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°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）。
- 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。

