

## Product Manual

## 产品说明书

**产品货号:** PR01518

**产品名称:** Ready-to-use CalBright™免洗 Fluo-4 钙离子实时检测试剂盒

**储运条件:** -20 °C避光保存, 冰袋运输

### 产品简介:

Ready-to-use CalBright™免洗 Fluo-4 钙离子实时检测试剂盒, 是精准检测细胞内钙离子浓度及动态变化的专业工具, 为细胞生物学研究、疾病机制探索及药物研发提供关键技术支持。钙是哺乳动物体内含量最丰富的矿物质, 同时也是调控众多细胞生命活动的关键内源性因子。它主要以两种形式存在: 自由离子形式与结合钙离子复合物形式(如构成骨骼组织的磷酸钙、碳酸钙复合物)。从肌肉收缩、细胞粘附、激素/神经递质释放, 到糖原代谢、细胞增殖/分化、血凝及神经突触传递, 再到骨骼结构支持, 大量生理过程均依赖钙信号的精准调控。一旦细胞特异性钙信号系统的完整性受损, 便可能诱发多种疾病, 因此精准检测细胞内钙离子浓度及动态变化具有重要科研与应用价值。本试剂盒以 Fluo-4 AM 钙离子荧光探针为核心检测成分(Fluo-4 AM 是在 Fluo-3 AM 基础上升级的钙离子浓度指示剂), 其检测原理如下: Fluo-4 AM 本身无荧光特性, 进入细胞后会被胞内酯酶水解为 Fluo-4; Fluo-4 可与细胞内钙离子特异性结合, 结合后会发出绿色荧光。当细胞外钙离子内流、细胞内储存钙离子释放, 或细胞内钙离子外流/储存时, 会导致细胞质内钙离子浓度升高或降低, 进而引起绿色荧光强度相应增强或减弱, 通过监测荧光强度变化, 即可实现对细胞内钙离子浓度动态变化的实时检测。此外, 该试剂盒适配荧光显微镜、荧光酶标仪、流式细胞仪等多种检测平台, 具有荧光信号更强、检测灵敏度更高的优势, 可同时满足细胞内钙离子浓度定量检测与动态变化监测的需求。

### 应用范围:

钙离子检测

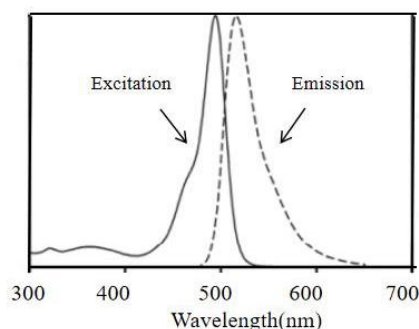
### 产品特点:

10 min 快速染色: 试剂混匀后直接加样, 孵育后无需洗涤细胞, 大幅缩短实验时间与操作步骤;  
仪器友好: 无需切换双激发光及计算信号比值, 单波长检测, 降低操作门槛, 仪器适配性强;  
荧光强度更高: Fluo-4 AM 与钙离子结合后荧光会增加 60 至 80 倍, 荧光强度较 Fluo-3 AM 提升 100%;  
超高灵敏度: 低背景信号干扰, 提升检测灵敏度, 轻松捕捉低幅度的钙信号波动;  
细胞毒性低: 细胞毒性显著低于 Fluo-3 AM, 染色后细胞活率 > 90%, 适合长期动态追踪;  
亲和力适配性好: 轻松捕捉低幅度的钙信号波动, 低背景信号干扰, 信号清晰无干扰, 实验结果稳定可靠;

### 产品参数:

Ex/Em: 494/516 nm;

光谱图:



产品组分:

组分	200 T	5×200 T
A. 500× Fluo-4 AM	40 μL	5×40 μL
B. 500× Solubility Enhancer	40 μL	5×40 μL
C. Assay Buffer	50 mL	5×50 mL
D. 100× Staining Enhancer	200 μL	5×200 μL

注: 按照 96 孔板每孔 0.2 μL Fluo-4 AM 的体系计算。

注: 本试剂盒配套组分 C (Assay Buffer) 为我司自主创新的染色缓冲液, 配方经多重优化, 可在检测期间持续维持细胞生理状态并提供基础营养, 并显著提升染料稳定性。若样本类型差异导致用量不足, 可直接用 PBS、HBSS 等常规缓冲液补足体积重悬, 不影响检测结果。

### 注意事项:

1. Fluo-4 AM 遇水极易分解, 如果不能一次用完, 建议将储液小量分装保存。
2. AM 酯基易吸潮, 故请确保从冰箱拿出后恢复至室温再开封。
3. 荧光染料均存在淬灭问题, 请尽量注意避光。
4. 本产品仅限于科研用途并且不得存放于普通住宅内。
5. 为了您的安全和健康, 请遵循您所在常规实验室安全规定。

### 使用说明:

#### 一、实验前准备

##### 1. 工作液制备:

- (1) 将试剂盒取出, 恢复室温备用。
- (2) 以 96 孔板为例, 每孔 100 μL Fluo-4 染色工作液的体系, 先加入 Fluo-4 AM 和 Solubility Enhancer, 充分混匀后加入组分 C (Assay Buffer)。Fluo-4 染色工作液配制见表 1。(其它规格孔板加染色工作液量如下, 48 孔板加 150 μL/孔, 24 孔板加 250 μL/孔, 12 孔板加 500 μL/孔, 6 孔板加 1 mL/孔。)

表 1. Fluo-4 染色工作液配制

试剂	1 个孔	10 个孔	100 个孔
A. 500× Fluo-4 AM	0.2 μL	2 μL	20 μL
B. 500× Solubility Enhancer	0.2 μL	2 μL	20 μL
C. Assay Buffer	99.6 μL	996 μL	9.96 mL
Fluo-4 Staining Solution	100 μL	1 mL	10 mL

注: 配制好的 Fluo-4 染色工作液现用现配、避光配制, 不能冻存。Fluo-4 染色工作液中 Fluo-4 AM 的浓度可以根据染色效果在 0.2-2 μL 之间适当调整。

(3) (可选) 如果遇到细胞, 如 CHO, 出现去酯化的荧光探针 Fluo-4 明显的外排现象时, 建议添加染色增强剂组分 D (100× Staining Enhancer)。使用时将组分 D (100× Staining Enhancer) 按照 1:100 稀释到染色工作液中, 配制成分含 1× Staining Enhancer 的染色工作液。

注: 细胞在含 1× Staining Enhancer 的溶液中孵育的时间不能超过 2 h。

##### 2. 仪器准备:

荧光显微镜: 激发/发射波长 Ex/Em: 494/516 nm;

流式细胞仪: 检测通道激发/发射波长 Ex/Em: 494/516 nm;

荧光酶标仪：激发/发射波长 Ex/Em：494/516 nm。

### 3. 对照组设置：

组别	Fluo-4 AM Calcium Probe	样品细胞
阴性对照	+	不做任何处理
实验组	+	经实验处理细胞

阴性对照组：对细胞不进行任何处理，为实验组处理后钙信号变化提供参考。

实验组：验证探针活性与细胞加载效率。

## 二、操作步骤-以 96 孔板为例

方案一：荧光显微镜检测（适用于悬浮细胞）

### 1. 细胞收集与洗涤：

(1) 收集待测悬浮细胞于离心管中，1000 rpm 室温离心 5 min，小心吸弃上清。

(2) 用组分 C (Assay Buffer)或 PBS、HBSS 等常规缓冲液洗涤细胞 1 次。

**注：通常洗涤能更好地降低背景荧光，吸除培养液、Assay Buffer 和 PBS、HBSS 等常规缓冲液时，最好使用真空泵，酚红或血清对于本试剂盒的检测有一定的干扰。**

### 2. 细胞重悬与计数：

(1) 使用组分 C (Assay Buffer)或 PBS、HBSS 等常规缓冲液重悬细胞沉淀，进行细胞计数。

(2) 取  $5 \times 10^4 - 10^5$  个细胞，1000 rpm 低速离心 5 min，去除组分 C (Assay Buffer)或 PBS、HBSS 等常规缓冲液。

**注：显微镜法对细胞密度要求不严格，只要实验组与对照组密度一致即可。具体可根据样本种类与实验条件灵活调整，以显微镜下视野中细胞分布约 70%-85%为宜。**

### 3. 细胞染色：

(1) 参照表 1 配置 Fluo-4 染色工作液。

(2) 向 96 孔板中加入 100  $\mu$ L 的 Fluo-4 染色工作液，37  $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min。孵育时间可在 10-60 min 进行调整，最快 10 min 快速染色，最大程度保持细胞活性，简化实验流程。

**注：如果首次实验不能确定孵育温度和时间，建议先 37  $^{\circ}$ C 孵育 30 min，观察荧光效果。如果细胞死亡较多，适当缩短时间；如果荧光强度太弱，适当延长时间。**

**注：本试剂盒为免洗涤型检测体系，无需洗涤即可进行荧光检测，孵育后也可加入组分 C 或 PBS、HBSS 等常规缓冲液洗涤 1-3 次。**

### 4. 显微镜观察与拍照：

(1) 将细胞悬液加入 96 孔板中，静置片刻，待细胞自然沉降贴底后，置于荧光显微镜下观察。

**注：细胞悬液使用量可根据细胞计数的数量自行调整，显微镜视野中细胞分布 70%-85%为最佳。**

方案二：荧光显微镜检测（适用于贴壁细胞）

### 1. 细胞处理：

(1) 提前一天在 96 孔板中接种细胞，使得细胞汇合度达到 70%-85%，待细胞贴壁后按照实验设计处理细胞。

### 2. 细胞清洗：

(1) 小心吸弃细胞培养液。

(2) 加入 100  $\mu$ L 的组分 C 或 PBS、HBSS 等常规缓冲液轻柔洗涤细胞 1 次，洗涤后吸净组分 C 或 PBS、HBSS 等常规缓冲液。

### 3. 细胞染色：

(1) 参照表 1 配置 Fluo-4 染色工作液。

(2) 将 100  $\mu$ L Fluo-4 染色工作液加入细胞中，37  $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min。孵育时间可在 10-60 min 进行调整，最快 10 min 快速染色，最大程度保持细胞活性，简化实验流程。

**注：如果首次实验不能确定孵育温度和时间，建议先 37  $^{\circ}$ C 孵育 30 min，观察荧光效果。如果细胞死亡较多，适当缩短时间；如果荧光强度太弱，适当延长时间。**

**注：本试剂盒为免洗涤型检测体系，无需洗涤即可进行荧光检测，孵育后也可加入组分 C (Assay Buffer)或 PBS、HBSS 等常规缓冲液洗涤 1-3 次。**

#### 4. 显微镜观察与拍照:

(1) 洗涤后, 每孔加入对应体积的组分 C (Assay Buffer)或 PBS 、 HBSS 等常规缓冲液, 以保持细胞湿润。

(2) 直接将培养板置于荧光显微镜下观察和拍照。滤光片设置同方案一。

方案三: 流式细胞仪检测 (适用于悬浮细胞与贴壁细胞)

##### 1. 细胞准备:

悬浮细胞: 同方案一, 取  $5 \times 10^4$ -  $10^5$  个细胞。

贴壁细胞:

a.吸弃培养液, 用组分 C 或 PBS 、 HBSS 等常规缓冲液轻柔清洗 1 次。

b.加入适量胰酶消化液 (覆盖细胞即可), 室温下置于显微镜下观察, 待细胞变圆、间隙增大时, 用移液器轻轻吹打, 使细胞完全脱落。

c.关键: 立即加入含血清的完全培养基以终止消化。

d.将细胞悬液转移至离心管, 1000 rpm , 室温离心 5 min , 吸弃上清。

e.用组分 C 或 PBS 、 HBSS 等常规缓冲液重悬细胞并进行细胞计数。

f.取  $5 \times 10^4$ -  $10^5$  个细胞, 室温 1000 rpm 低速离心 5 min , 吸弃上清。

##### 2. 细胞染色:

(1) 参照表 1.配置 Fluo-4 染色工作液。

(2) 将 1mL 的 Fluo-4 染色工作液加入细胞中, 37 °C避光孵育 30 min 。孵育时间可在 10-60 min 进行调整, 最快 10 min 快速染色, 最大程度保持细胞活性, 简化实验流程。

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

**注: 本试剂盒为免洗涤型检测体系, 无需洗涤即可进行荧光检测, 孵育后也可加入组分 C 或 PBS 、 HBSS 等常规缓冲液洗涤 1-3 次。**

##### 3. 上机检测:

(1) 重要: 染色完成后 1h 内进行流式检测, 以保证荧光信号稳定。

(2) 用流式细胞仪在预设的检测通道下进行分析。

(3) 首先通过空白对照 (未染色细胞) 调节电压, 使细胞群位于坐标系左下角。

(4) 其次检测对照组和实验组, 确认实验体系成立。

(5) 最后检测实验样品, 记录并分析细胞的平均荧光强度。

**注: 所有样本染色后需避光、置冰上并立即检测; 定量实验 (如流式) 尤须严格在 1h 内完成, 以确保数据准确、可重复。**

方案四: 荧光酶标仪检测 (适用于悬浮与贴壁细胞)

##### 1. 接种培养:

(1) 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- 10000 个, 通常宜在 2000-5000 个范围内。

##### 2. 洗涤:

收集待测悬浮细胞悬液至离心管中。

悬浮细胞: 250- 1000× g 室温离心 5 min , 吸除上清, 用组分 C 或 PBS 、 HBSS 等常规缓冲液洗涤 1 次。

贴壁细胞: 吸除培养液, 用组分 C 或 PBS 、 HBSS 等常规缓冲液洗涤细胞 1 次。

**注: 通常洗涤能更好地降低背景荧光, 吸除培养液和组分 C 或 PBS 、 HBSS 等常规缓冲液时最好使用真空泵, 酚红或血清对于本试剂盒的检测有一定的干扰。**

##### 3. 细胞染色:

(1) 参照表 1.配置 Fluo-4 染色工作液。

(2) 加入 100 μL 的 Fluo-4 染色工作液, 37 °C避光孵育 30 min 。孵育时间可在 10-60 min 进行调整, 最快 10 min 快速染色, 最大程度保持细胞活性, 简化实验流程。

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

**注: 本试剂盒为免洗涤型检测体系, 无需洗涤即可进行荧光检测, 孵育后也可加入组分 C (Assay Buffer)或 PBS 、 HBSS 等常规缓冲液洗涤 1-3 次。**

##### 4. 荧光酶标仪检测:

在荧光酶标仪预设的条件检测, 通过对比对照组与处理组的 RFU(Relative Fluorescence Units), 可得出药物刺激的效果。

结果判读:

定性分析 (显微镜):

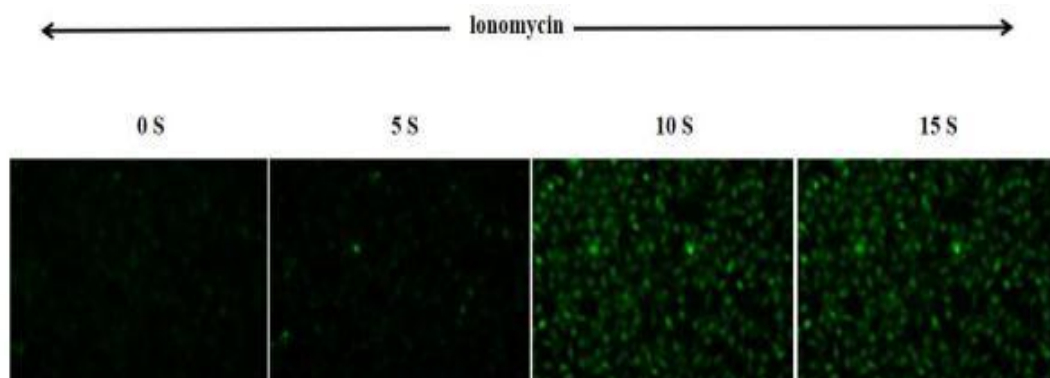


图 1.Hela 细胞钙离子浓度动态变化图

在荧光显微镜下:

图 1 为加入离子霉素的 HeLa 细胞在同一视野下的动态变化, 在荧光显微镜下观察细胞内绿色荧光的分布以及强度情况。当细胞受刺激而让钙离子浓度出现上升, 那么 Fluo-4 标记细胞的荧光强度会明显变强, 可实现对细胞内钙离子浓度的动态变化的实时监测。