

Fluo-8钙流检测试剂盒（免洗型）

Fluo-8 Calcium Flux Assay Kit (No Wash)



产品规格

产品货号	规格	组分		可检测 96 孔板 孔数	可检测 384 孔板 孔数
		Fluo-8 试剂	缓冲液		
CFA001.10	10 ml	100 μ l	10 ml	200 wells	1,000 wells
CFA001.100	100 ml	1 ml	100 ml	2,000 wells	10,000 wells
CFA001.500	500 ml	5 ml (5 $\times$ 1 ml)	500 ml (5 $\times$ 100 ml)	10,000 wells	50,000 wells
CFA001.1000	1000 ml	10 ml (10 $\times$ 1 ml)	1000 ml (10 $\times$ 100 ml)	20,000 wells	100,000 wells

保存条件

Fluo-8试剂分装后于-20℃ 或-80℃避光保存，避免反复冻融。未开封的缓冲液储存于4℃，使用前需要取出在室温平衡30分钟，摇晃混匀后使用。

检测原理

钙离子 (Ca^{2+}) 在多种细胞内关键生物进程中发挥着至关重要的作用。精确监测细胞内瞬时钙离子流的动态变化，对于深入探究细胞内生物反应机制以及推进靶向药物的研发具有极其重要的意义。钙离子特异性荧光染料法作为一种成熟的技术手段，被广泛应用于细胞内钙离子流的检测。

Fluo-8 作为一种新型的钙离子流检测染料，相较于传统的 Fluo-3 和 Fluo-4，展现出了显著的优势。Fluo-8 能够在室温条件下进行装载，且荧光强度是 Fluo-4 AM 的两倍，是 Fluo-3 AM 的四倍。Fluo-8 不仅在细胞装载效率上有所提升，而且在钙离子反应的灵敏度方面表现出色，同时保持了与 Fluo-3 和 Fluo-4 相似的光谱特性 ($\text{Ex/Em} \approx 490/520 \text{ nm}$)。

在传统的钙离子流染料检测过程中，细胞洗涤步骤是必不可少的，但这一过程不仅增加了实验操作的复杂性，还可能导致部分细胞在洗涤过程中脱落。免洗法细胞钙流检测试剂盒操作简便，无需洗板步骤，显著减少人为误差，具有良好的数据重复性和高通量筛选兼容性，是细胞功能分析和药物研发领域的理想选择。

实验步骤

细胞准备

1. 正常培养基培养的细胞经胰酶消化后，加入完全培养基，进行细胞计数，取需要的细胞总数，离心。以下是按96孔板的建议用量，384板需要的细胞数及体积需对应调整：96孔培养板一般建议每孔细胞数目在20,000左右。
2. 用Hank's盐溶液或类似无酚红培养液，加胎牛血清至浓度为1%，用该培养液重新悬浮上述离心后的细胞。然后将细胞铺于培养板，每孔50 μ l，细胞培养3-5小时至贴壁或培养过夜。

染料装载

1. 将缓冲液在室温平衡30分钟，颠倒混匀几次。如果缓冲液注明是10 $\times$ 浓缩液，需要用去离子水稀释成1 $\times$ 的工作缓冲液。

2. 取出Fluo-8试剂，室温平衡5-10分钟，通过离心将管内容物集中于管底。
3. 计算好需要的染料装载液体积，按每孔50 μ l计算。将Fluo-8试剂加入1 $\times$ 的工作缓冲液，充分混匀。Fluo-8试剂用量建议起始按1:100稀释到工作缓冲液中，稀释度可根据不同细胞株及需求调整。
4. 计算需要的丙磺舒（不包含在试剂盒中，需要自行准备，纯度>98%）储存液体积，加入到上述Fluo-8工作缓冲液中，充分混匀，作为装载液。
5. 吸去培养板孔中的培养液，将装载液加入细胞培养板孔，每孔50 μ l。轻轻振摇10秒钟，加盖后于37 $^{\circ}$ C培养1小时。

细胞内钙流检测

1. 准备化合物及激动剂：激动剂建议不少于6个浓度梯度。每反应板设立未加激动剂或化合物的对照孔。激动剂/化合物板每孔100-200 μ l体积。
2. 准备与检测仪配套的专用移液枪头盒。
3. 准备检测缓冲液：检测缓冲液是加了丙磺舒的Hank's盐缓冲液。
4. 吸去培养板孔中的染料装载液，每孔加检测缓冲液100 μ l。
5. 设定好仪器检测程序及各相关参数，检测波长为490/525 nm，每1-3秒读1次，连续读2分钟。
6. 加激动剂/化合物前读取一次基础读数。
7. 设定好化合物/激动剂板孔及枪头与实验细胞的对应位置。
8. 启动加激动剂/化合物的检测程序，收集实验数据。
9. 用 $(F-F_0)/F_0 \times 100\%$ 的方法或其它已验证的方法进行数据处理分析。

注意事项（供参考）

试验中请穿着试验服并带手套做好防护工作。请按实验室安全操作规范进行实验。

本试剂**仅供科研使用**，请勿用于临床诊断或其他治疗用途。

V08/25