

Fluo-8 AM No Wash Calcium Assay Kit

Fluo-8 AM 免洗细胞钙流检测试剂盒

(C1001, C1002, C1003)

一. 产品描述

许多细胞内重要生物反应涉及到钙流。检测细胞内瞬间钙流变化对细胞内生物反应的研究及靶向药物研发至关重要。钙特异性结合荧光染料法是检测细胞内钙流的最常用的手段。

Fluo-8 作为新一代钙流检测染料提高了细胞装载和钙反应，同时保持了 Fluo-3 和 Fluo-4 光谱波长 $Ex/Em \approx 490/520$ nm。Fluo-8 AM 可以在室温下装载到细胞中，而 Fluo-3 AM 和 Fluo-4 AM 需要 37°C 进行细胞装载。此外，Fluo-8 AM 比 Fluo-4 AM 亮两倍，比 Fluo-3AM 亮四倍。

钙流染料在细胞装载及钙流分析中常需要进行细胞洗涤，这显著增加了检测中的工作流程，由于一些细胞可以在洗涤过程中脱落，这也增加了分析中数据变量。因此，免洗染料及方法是现在的发展趋势。

为了减少染料被细胞转运到细胞外，阴离子转移蛋白抑制剂丙磺舒需要加到染料加载溶液及后续的分析溶液中。

二. 产品组成

试剂盒内容包括 Fluo-8 试剂及缓冲液，分别灌装于 1 ml 螺旋管，及 10 ml 或 100 ml 的棕色瓶中，规格如下：

目录号	规格	Fluo-8 试剂	缓冲液	可检测的 96-孔板孔数	可检测的 384-孔板孔数
C1001	10ml	100 μ l	10ml	200 wells	1,000 wells
C1002	100ml	1ml	100ml	2,000 wells	10,000 wells
C1003	10x100ml	10x1ml	10x100ml	20,000 wells	100,000 wells

三. 实验步骤

1. 细胞准备

- 正常培养基培养的细胞胰酶消化后，加完全培养基，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，对应调整。96 孔培养板一般建议每孔细胞 20,000 左右。

- b) 用 Hank' s 盐溶液或类似无酚红培养液，加胎牛血清至 1% 浓度，用该培养液重新悬浮上述离心后的细胞。然后铺细胞于培养板，每孔 50 μ l。细胞培养 3-5 小时至贴壁或过夜。

2. 染料装载

- a) 取出缓冲液在室温平衡 30 分钟，颠倒混匀几次。如果缓冲液注明是 10x 浓缩液，需要用去离子水稀释成 1x 的工作缓冲液。
- b) 取出 Fluo-8 试剂，室温平衡 5-10 分钟，离心将管内内容物集中于管底。如果试剂不是一次性用完，可以对试剂进行分装，分装后的 Fluo-8 试剂继续 -20℃ 保存，减少冻融次数。注意避光。
- c) 计算好需要的染料装载液体积，按每孔 50 μ l 计算。将 Fluo-8 试剂加于 1x 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。
- d) 计算需要的丙磺舒储存液体积，加入到上述 Fluo-8 工作缓冲液中，充分混匀，此为装载液。
- e) 吸去培养板孔中的培养液，将装载液加到细胞培养板孔，每孔 50 μ l。轻轻振摇 10 秒钟，加盖，37℃ 培养 1 小时。

3. 细胞内钙流检测

- a) 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。
- b) 准备与检测仪配套的专用移液枪头盒。
- c) 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。
- d) 吸去培养板孔中的染料装载液，每孔加检测缓冲液 100 μ l。
- e) 设定好仪器检测程序及各相关参数，检测波长为 490/525nm，每 1-3 秒读 1 次，连续读 2 分钟。
- f) 在加激动剂/化合物前读取一次基础读数。
- g) 设定好化合物/激动剂板孔及枪头与实验细胞的对应位置。
- h) 启动加激动剂/化合物的检测程序，收集实验数据。
- i) 用 $(F-F_0)/F_0 \times 100\%$ 的方法或其它被验证的方法进行数据处理分析。

四、 储存条件

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，颠倒混匀几次。分装的缓冲液或 1 x 工作液可储存于室温（22℃）1 周。Fluo-8 试剂储存在 -20℃ 或 -80℃ 性能稳定 1 年。