Fluo-4 钙离子检测试剂盒

货号: KTA7010　　规格：200 T/1000 T　　批号：见产品标签

	适用样本：细胞
	荧光激发/发射：Fluo-4 AM: Ex/Em=494 nm/516 nm
	保质期：-20℃，避光保存 12 个月

01 背景与原理

Fluo-4 是一种将 Fluo-3 结构中的 Cl 离子替换成 F 离子的钙荧光探针。由于将 Cl 离子替换成了电子吸引力更强的 F 离子，它的最大激发波长会向短波长方向偏离 10 nm 左右。这个波长更接近于氩激光器的波长，所以用氩激光器激发时，Fluo-4 的荧光强度比 Fluo-3 更强。

Fluo-4 钙离子检测试剂盒是一种基于 Fluo-4 AM 钙离子荧光探针检测细胞内钙离子浓度的试剂盒。Fluo-4 AM 穿透细胞膜进入细胞后被细胞内的酯酶剪切形成 Fluo-4，从而被滞留在细胞内。Fluo-4 以游离配体形式存在时几乎是非荧光性的，但是与细胞内钙离子结合后可以产生较强的荧光，可以使用荧光显微镜进行荧光成像检测，也可以使用荧光酶标仪或流式细胞仪进行荧光的定量检测。使用荧光显微镜或荧光酶标仪还可以进行细胞内钙离子浓度的动态变化检测。

02 包装清单

试剂盒组分	规格		储存要求
	200 T	1000 T	
Fluo-4 AM (500×)	20 μL	100 μL	-20℃，避光保存
Staining Enhancer (500×)	20 μL	100 μL	-20℃
Assay Buffer	50 mL	100 mL×2+50 mL	4℃

03 自备仪器与试剂

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	荧光显微镜或流式细胞仪	流式推荐 FITC 通道
耗材	细胞培养孔板	/
试剂	磷酸盐缓冲液（PBS，pH7.4）或 Hank's 平衡盐溶液（PBS，pH7.4）	清洗
其他	离心机、可调节式移液枪及枪头	/

04 注意事项

- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。
- 如果使用含有血清的培养基，血清中的酯酶会分解 Fluo-4 AM，从而降低 Fluo-4 AM 进入细胞的效果。另外，含有酚红的培养基会使本底值略微偏高，加工作液前应尽量去除残留培养基。
- Ionomycin 是一种对钙离子有亲和力的离子载体，细胞经 Ionomycin 处理数秒内就能观察到绿色荧光强度增加，推荐使用激光共聚焦显微镜连续拍摄来检测细胞内钙离子浓度的变化。
- Staining Enhancer 可降低 Fluo-4 AM 的稳定性，因此只建议在配制 Stain Solution 时加入。
- 本试剂盒对 Fluo-4 AM 染色浓度做了优化处理，也可根据自身的细胞类型，培养条件以及应用方向来梯度摸索最佳的工作浓度及染色时间，Fluo-4 AM 工作浓度可在 0.2×-2×调整。
- Fluo-4 AM 遇水极易分解，如果不能一次用完，建议适当分装保存。
- 荧光染料均存在淬灭问题，请尽量注意避光，以减缓淬灭。

05 实验流程

05-1 试剂准备

试剂名称	试剂准备	注意事项
Stain Solution	即用型; 使用前配置，每 1 mL Assay buffer 加入 2 μL Fluo-4 AM (500×)，混匀。	/

可选做：如果 Fluo-4 AM 进入细胞的效果不好，可向 Stain Solution 中加入 Staining Enhancer (500×)至终浓度为 1×，Staining Enhancer 可防止 Fluo-4 AM 在缓冲液中聚集并促进 Fluo-4 AM 进入细胞。

05-2 实验步骤

05-2-1 流式细胞仪检测

1. 对于悬浮细胞，300 g 离心 5 min 收集细胞，用 PBS 清洗 2 次，弃去 PBS。对于贴壁细胞，先用胰蛋白酶（不含 EDTA）消化细胞，然后 300 g 离心 5 min 离心收集细胞，用 PBS 清洗 2 次，弃去 PBS。

注意：需准备悬浮在 Assay Buffer 的细胞样本，用于流式细胞检测时的阴性对照。

2. 用 1 mL Stain Solution 重悬 1×10^6 细胞，37℃避光孵育 10-60 min，不同的细胞最佳孵育时间有所不同。

注意：如果是首次实验不能确定孵育温度和时间，建议先尝试 37℃孵育 30 min，观察荧光效果。如果细胞死亡较多，则适当缩

短时间或降低温度；如果荧光强度太弱，则适当延长时间。

3. 孵育完成后，可直接进行流式细胞仪检测（FL1/BL1 通道），也可 300 g 离心 5 min 离心收集细胞，吸弃 Stain Solution 后每个样本加入 0.5 mL Assay Buffer 重悬细胞后进行流式细胞仪检测。

05-2-2 荧光显微镜检测

1. 对于贴壁细胞：

(1) 在合适的孔板上培养细胞，在 CO_2 细胞培养箱中 37℃培养至少 24 h，再进行后续实验。

(2) 用 PBS 清洗细胞 2 次。

(3) 加入适当体积的 Stain Solution 到细胞中，通常 96 孔板每孔加入 50 μL，24 孔板每孔加入 200 μL，12 孔板每孔加入 500 μL，6 孔板每孔加入 1 mL，37℃避光孵育 10-60 min，不同的细胞最佳孵育时间有所不同。

注意：如果是首次实验不能确定孵育温度和时间，建议先尝试 37℃孵育 30 min，观察荧光效果。如果细胞死亡较多，则适当缩短时间或降低温度；如果荧光强度太弱，则适当延长时间。

(4) 孵育结束后，可直接进行荧光显微镜检测（Ex/Em=494 nm/516 nm），也可吸弃 Stain Solution，用 PBS 或 HBSS 洗涤细胞 2-3 次后进行荧光显微镜检测。

2. 对于悬浮细胞：

(1) 按照流式细胞分析步骤制样。

(2) 将染色好的细胞悬浮置于玻片上，用盖玻片盖住细胞，在荧光显微镜下观察。

06 结果示例

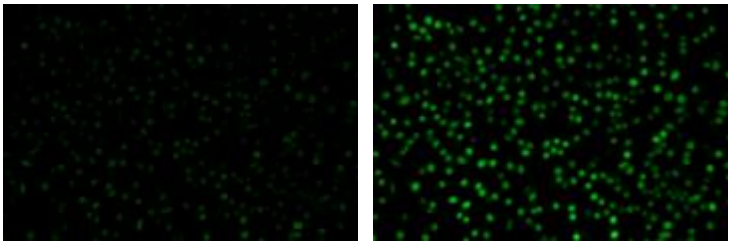


Figure 1.L929 细胞使用 Fluo-4 钙离子检测试剂盒染色效果图，左未处理，右 1 μM Ionomycin 处理。

07 FAQ

1． 该试剂盒可以代替 Fluo-3 钙离子检测试剂盒吗？

可以的，Fluo-4 是钙指示剂 Fluo-3 的升级版本，主要变化为后者分子上的两个氯原子被 Fluo-4 上的氟所取代，该结构上的微小变化使 Fluo-4 AM 加载更快，在相同浓度下检测信号更强。

2． 加载 Fluo-4 染料检测钙后可以固定细胞吗？

不能，因 Fluo-4 不与任何细胞成分共价结合并且固定会损害膜，染料将不会被细胞保留。

3． 可以使用荧光酶标仪进行检测吗？

可以的，建议使用 96 孔板黑色多孔板接种细胞。

4． Fluo-4 AM 应如何保存？

Fluo-4 AM 容易吸潮，遇水易分解，建议分装成单次使用量保存。同时使用前建议将 Fluo-4 AM 置于干燥环境下回温至室温后并离心数秒使溶液聚集到管底。

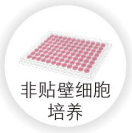
08 相关产品

货号	试剂盒名称
KTA1001	活/死细胞双染色试剂盒
KTA4002	线粒体通透性转换孔(MPTP)检测试剂盒

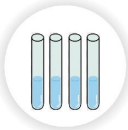
Fluo-4钙离子检测试剂盒

（Abbkine 货号 ： KTA7010）

①



收集细胞，转移到流式管
并准备悬浮在Assay Buffer的细胞样本
作阴性对照

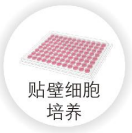


300 g×5 min，PBS
洗涤2次，弃上清
加入染色工作液

37℃避光孵育10-60 min
（不同的细胞最佳孵育时
间有所不同）

流式细胞仪分析
（FITC）

②



PBS洗涤2次
加入染色工作液

37℃避光孵育10-60 min
（不同的细胞最佳孵育时
间有所不同）

荧光显微镜分析

转移到载玻片
(悬浮细胞)

工作液配置：

Assay bufferAnnexin	1 mL
Fluo-4 AM(500×)	2 μL