

产品组成:

规格	50-500 T	100-1000 T
F04 Ca ²⁺ 钙离子染料	50 ul	50 ul*2

储存条件:

-20℃避光保存。

有效期:

六个月。

注意事项:

避免反复冻融。

【注】:

- 染料短期 2 周内可以 2-8℃ 保存。染料长期不用可以 -20℃ 保存。避免反复冻融。
- 染色液 A 为 DMSO 溶液，冬季气温较低时为凝固状态，极易粘附在管壁、吸头壁。注意需要加热融解，变成液体状态后离心至管底部再开盖。
- 可以用手捂住使其融解或 37℃ 短时间水浴。吸头也需要放在培养箱预热，否者容易再次凝固在吸头内壁产生损耗。
- 试剂拆封后请尽快使用完！

产品简介:

F04 细胞内钙离子染色试剂盒是利用 F 系列 Ca²⁺钙离子荧光探针进行钙离子特异性染色的试剂盒。本试剂盒中的 F04 细胞内钙离子染色探针为绿色荧光标记的钙离子探针，具有 505 / 525nm 的最大激发/发射波长。

F04 具有极高的细胞渗透性，经过简单孵育即可实现细胞加载。穿透细胞膜进入细胞后被细胞内的酯酶剪切形成不易透过细胞膜的 F04 新产物，从而被滞留在细胞内。F04 游离配体几乎是非荧光性的，其荧光不会随钙离子浓度升高而增强。但是，当它与细胞内钙离子结合后可以产生较强的荧光，荧光会增加 60 至 100 倍，被激发后可以发出绿色的荧光，具有很高的淬灭常数和激发态寿命。最大激发波长为 505nm，最大发射波长为 525nm。实际检测时推荐使用的激发波长为 488nm 左右，发射波长为 515~530nm。可以使用荧光显微镜、酶标仪、激光共聚焦显微镜或流式细胞仪检测细胞内钙离子浓度的变化。

F04 荧光探针采用可见光激发，与传统的紫外光激发的荧光探针相比，仪器的适用范围更广泛，具有更强的探针吸收性能，使得更低浓度的探针即可成功检测 Ca²⁺变化，从而降低了对活细胞的光毒性，检测敏感度更高。

检测方法:

- 流式细胞仪
- 荧光显微镜
- 激光共聚焦

样本类型:

- 悬浮细胞
- 贴壁细胞

使用方法:

使用注意事项:

- 螺旋盖微量试剂管装的试剂在开盖前请短暂离心，将盖内壁上的液体收集至管底，避免开盖时液体洒落。
- F04 染色液为 DMSO 溶液，冬季气温较低时在室温时为凝固状态，极易粘附在管壁、吸头壁。注意需要加热溶解，吸头也需要放在培养箱预热，否者容易再次凝固在吸头内壁产生损耗。
- 使用前，先将本品取出回温至室温，并对其进行简短离心使 DMSO 溶液集中于管底。
- 细胞处理需要小心操作, 尽量避免人为的损伤细胞。
- 染色后立即进行分析。
- 本染色液可用于细胞涂片、细胞的检测。
- 可以在染色溶液中加入等体积的 20% Pluronic F127 溶液, Pluronic F127 可以帮助 F04 探针更快进入细胞, 不建议在 Pluronic F127 中长期保存 F04 探针。
- 由于 F04 探针在水中的稳定性比较差, 染色工作液必须现配现用, 并且在当天用完。
- F04 探针对湿度比较敏感, 每次取完需要量后, 必须紧紧密封盖子。建议根据单次用量, 分装密封保存。**不可使用含水的吸头。**
- 试剂 A 母液请拧紧螺旋盖, 避免受潮失效。

1. 染色工作液的配制:

根据样本数量, 用 37°C 培养箱预热的 HBSS 将 BBcellProbe® F04 荧光染料 200-1000 倍稀释, 配制成染色工作液。

【注】:

- 也可以用相应的**无血清**培养基稀释 F04 染料至所需浓度。
- 开始实验前, 使用 HBSS 缓冲液或无血清培养基稀释染料储存液到需要的工作浓度。工作浓度应根据不同细胞的预实验结果确定的最佳工作浓度, 建议至少在超过 10 倍范围的浓度下进行测试。一般染色终浓度 500-1000 倍稀释, 500-1000 倍适合大多数细胞样本。
- 工作液现配现用。
- 为了降低探针加载过度可能引起的假阳性, 建议在不影响染色效果的情况下尽量使用低浓度。
- 若细胞在染色后于不含染料的培养基中孵育, 荧光信号会衰减。

2. 细胞染色

悬浮细胞染色

- 1) 用 PBS 洗涤细胞 2 次。

【注】:

500g 离心 5 分钟。根据实验室平时离心细胞的离心力离心。

- 2) 加入适量体积的染色工作液重悬细胞, 使其密度大约为 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 。
- 3) 在 37°C 孵育细胞 20 分钟, 不同的细胞最佳培养时间不同。可以用 20 分钟作为起始孵育时间, 之后优化体系以得到均一的标记结果。

【注】:

若染色不够充分, 建议增加染料浓度或延长染色时间。

- 4) 加入 5 倍体积的含有 1% 胎牛血清的 HBSS, 再继续孵育 40 分钟。
- 5) 孵育结束, 500 g 离心 5 分钟。

【注】:

以下步骤均为洗涤细胞。根据实验室平时离心细胞的离心力和时间进行离心。

- 6) 弃上清液, 再次缓慢加入 37°C 预热的 HBSS 重悬细胞。
- 7) 重复 (5), (6) 步骤两次。
- 8) 加入 HBSS 重悬细胞, 在 37°C 下再继续孵育 20 分钟。
- 9) 然后用该细胞进行荧光钙离子检测。

贴壁细胞染色

- 1) 用 PBS 洗涤细胞 2 次。
- 2) 细胞培养板中或细胞爬片上加入适量体积的染色工作液。

【注】:

96 孔细胞培养板每孔加入 100ul 染色液即可。

- 3) 37 °C 孵育细胞 20 分钟，不同的细胞最佳培养时间不同。可以用 20 分钟作为起始孵育时间，之后优化体系以得到均一的标记结果。

【注】:

若染色不够充分，建议增加染料浓度或延长染色时间。

- 4) 吸干染色工作液，用 HBSS 洗培养板或盖玻片 2~3 次，每次用预热的 HBSS 覆盖所有细胞，然后吸干培养基。
- 5) 加入 HBSS，在 37°C 下再继续孵育 20 分钟。
- 6) 然后用该细胞进行荧光钙离子检测。

3.用荧光显微镜或流式细胞仪检测

激发波长为 488nm，最大发射波长为 525nm。