

细胞/组织线粒体内钙离子荧光染色试剂盒产品说明书

主要用途

细胞/组织线粒体内钙离子荧光染色试剂是一种旨在通过线粒体钙离子特异性荧光探针 Rhod-2-AM，进入线粒体后，与钙离子结合，其荧光强度显著增强，在荧光显微镜下观察红色荧光现象，来分析细胞/组织线粒体中总钙离子的权威而经典的技术方法。该技术经过精心研制、成功实验证明的。其适用于各种活体细胞或组织（动物、人体等）内线粒体钙离子的染色检测。产品严格无菌，即到即用，操作简捷，性能稳定，检测敏感。

技术背景

钙是人体中的一种重要电介质和矿物质，占1150克。其中99%的钙以氟磷灰石钙（calcium fluorophosphate apatite）形式存在于骨组织中。非骨组织钙成分主要存在于细胞内。钙具有两种主要形式：一种是非弥散型蛋白结合钙，其构成约40%至50%的血清中的总钙含量；另一种为弥散型游离钙，其进一步分成具有活性的复合钙（complexed calcium）和离子钙（ionized calcium）。钙对神经肌肉兴奋性（neuromuscular excitability）、血液凝固、酶的激活、离子跨膜运输、释放神经传导介质、信使传导等方面起着重要作用。在细胞内，钙离子主要储存在线粒体和内质网等细胞器中。其中线粒体钙离子在调节线粒体代谢、保持线粒体的ATP产量达到细胞需求，维持细胞内环境钙离子平衡方面起着重要作用。Rhod-2-AM，罗丹明123（rhodamine 123）的衍生产物，进入细胞受到酯酶解离，同时其正电荷特性，特异性地聚集在线粒体里，与钙离子结合产生荧光，由此用于测定线粒体内钙离子水平。在荧光显微镜下，激发波长550nm，散发波长590nm，观察红色荧光现象。

产品内容

清理液（Reagent A）	40 毫升
染色液（Reagent B）	30 微升
介导液（Reagent C）	600 微升
产品说明书	1 份

保存方式

保存染色液（Reagent B）和介导液（Reagent C）在-20℃冰箱里，避免光照；其余的保存在4℃冰箱里；有效保证6月

用户自备

1.5 毫升离心管：用于工作液配制的容器

细胞培养箱：用于染色孵育

（共聚焦）荧光显微镜：用于荧光染色观察

实验步骤

一、测定准备

1. 设定好（共聚焦）荧光显微镜（22℃）：激发波长 550nm，散发波长 590nm
2. 测定开始前，将-20℃冰箱里的试剂盒中的**染色液（Reagent B）**室温下融化，然后分别移出 30 微升**介导液（Reagent C）**和 1.5 微升**染色液（Reagent B）**到新的 1.5 毫升离心管，标记为**染色工作液**，并放在暗室里备用。然后进行下列操作。

二、（共聚焦）或荧光显微镜检测

1) 细胞样品染色

1. 准备 1 个待测的细胞爬片样品
2. 小心加上 500 微升**清理液（Reagent A）**，覆盖样品表面
3. 小心移去样品上的**清理液（Reagent A）**
4. 移取 300 微升**清理液（Reagent A）**到新的 1.5 毫升离心管
5. 加入 30 微升**染色工作液**，混匀
6. 小心加上上述**染色工作液**到样品上，覆盖样品表面
7. 室温下（22℃），孵育 30 分钟，避免光照
8. 放进 37℃细胞培养箱里孵育 30 分钟，避免光照
9. 小心移去样品上的**染色工作液**
10. 小心加上 500 微升新鲜的**清理液（Reagent A）**
11. 小心移去**清理液（Reagent A）**
12. 小心加上 500 微升新鲜的**清理液（Reagent A）**
13. 放进 37℃细胞培养箱里孵育 30 分钟
14. 小心移去**清理液（Reagent A）**
15. 盖上盖玻片
16. 即刻在（共聚焦）荧光显微镜下进行观察：激发波长 550nm，散发波长 590nm（线粒体钙离子呈现红色）

2) 组织样品染色

1. 取出待测的 5 至 10 微米厚的冰冻切片（注意：使用快速冷冻处理—snap frozen 的冰冻切片，不宜使用包埋处理）
2. 小心加上 500 微升**清理液（Reagent A）**，覆盖切片样品表面
3. 小心移去切片样品上的**清理液（Reagent A）**
4. 移取 300 微升**清理液（Reagent A）**到新的 1.5 毫升离心管
5. 加入 30 微升**染色工作液**，混匀
6. 小心加上上述**染色工作液**到切片样品上，覆盖切片样品表面
7. 室温下孵育 60 分钟，避免光照
8. 小心移去染色液
9. 小心移去**清理液（Reagent A）**
10. 小心加上 100 微升新鲜的**清理液（Reagent A）**
11. 盖上盖玻片
12. 即刻在（共聚焦）荧光显微镜下进行观察：激发波长 550nm，散发波长 590nm（线粒体钙离子呈现红

色)

注意事项

1. 本产品为 20 次操作
2. 操作时，须戴手套
3. 避免使用 EDTA 等处理样品
4. 孵育反应完成后即刻进行荧光分析
5. 如果背景染色过高，可以调整**染色工作液**使用剂量（1：100 至 1：1000 容量比）
6. 本公司提供系列钙生化检测试剂产品

质量标准

1. 本产品经鉴定性能稳定
2. 本产品经鉴定检测敏感