

Product Manual

产品说明书

产品货号: PR01519

产品名称: Ready-to-use Fluo-20 AM 钙离子荧光探针 (2 mM)

储运条件: -20 °C避光保存, 冰袋运输

产品简介:

Fluo-20 AM 是一款优化升级的可见光激发钙荧光探针, 专为活细胞钙成像研究设计, 光谱波长便捷适配(Ex/Em: 495/516 nm), 可直接替换 Fluo-3 AM、Fluo-4 AM 及 Fluo-8 AM 且无需调整仪器参数。Fluo-20 AM 对温度依赖性低, 更适配特殊细胞与高通量实验; 荧光亮度是 Fluo-4 AM 的 4 倍、Fluo-3 AM 的 8 倍、Fluo-8 AM 的 2 倍, 较进口 Fluo-8 AM 高出 40%, 能精准捕捉微弱钙信号; 荧光信号在厚组织深层或低探针浓度下保持高信噪比; 细胞毒性更低, 提升活细胞长期监测存活率。同时 Fluo-20 AM 具备优良的细胞膜渗透性, 被内酯酶剪切后能稳定滞留在胞内, 精准响应 Ca^{2+} 浓度变化。相较于紫外光激发探针, 它能避免紫外光对细胞的损伤, 维持细胞生理状态, 且组织穿透性更强、操作便捷, 与其他荧光标记兼容性好, 适配多色共染实验。

Fluo-20 AM 凭借可见光激发、高亮度、灵活加载、低毒性、强组织穿透性及多色兼容等核心优势, 广泛适用于多元化科研需求, 其应用覆盖细胞生理机制研究、信号通路解析、药物活性筛选、临床前体内成像等多个领域, 是生物医学、药理学等学科钙相关研究的优选探针, 尤其适配原代细胞、低钙响应细胞等信号较弱的特殊实验场景。

应用范围:

钙离子检测

产品特点:

光谱适配便捷: Ex/Em: 495/516 nm, 可直接替换 Fluo-3/4/8 AM, 无需调整仪器参数。

加载条件灵活: 对温度依赖性低, 室温或 37 °C 孵育均能高效染色, 适配高通量实验。

荧光亮度超强: 荧光亮度是 Fluo-4 AM 的 4 倍、Fluo-3 AM 的 8 倍, 较进口 Fluo-8 AM 高 40%。

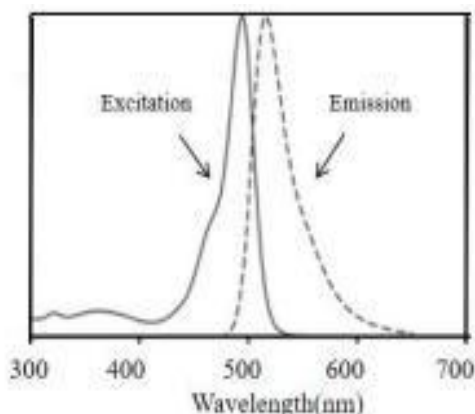
细胞毒性低: 可见光激发, 维持细胞生理状态, 提升活细胞长期监测存活率。

适配性更广: 膜渗透性优、组织穿透性强, 兼容多色共染, 覆盖活细胞、厚组织/体内检测及药物筛选场景。

产品参数:

Ex/Em: 495/516 nm;

光谱图:



产品组分:

组分	250 T
Ready-to-use Fluo-20 AM Calcium Probe (2 mM)	50 μ L

注: 按照 96 孔板每孔 100 μ L 染色液, Fluo-20 AM 工作浓度 4 μ M, 产品使用量每孔 0.2 μ L 的体系计算。

注意事项:

1. Fluo-20 AM 遇水极易分解, 如果不能一次用完, 建议将储液小量分装保存。
2. 荧光染料均存在淬灭问题, 请尽量注意避光。
3. 本产品仅限于科研用途并且不得存放于普通住宅内。
4. 为了您的安全和健康, 请遵循您所在常规实验室安全规定。

使用说明:

一、实验前准备

1. 工作液制备:

(1) 将试剂取出, 恢复室温备用。

(2) 以 96 孔板为例, 每孔 100 μ L Fluo-20 AM 染色工作液的体系, 用 PBS 或 HBSS 稀释 Fluo-20 AM 储液制备 2-20 μ M 的 Fluo-20 AM 工作液。(其它规格孔板加染色工作液量如下, 48 孔板加 150 μ L/孔, 24 孔板加 250 μ L/孔, 12 孔板加 500 μ L/孔, 6 孔板加 1 mL/孔。)

试剂	1 个孔	10 个孔	100 个孔
Fluo-20 AM	0.2 μ L	2 μ L	20 μ L

表 1.Fluo-20 AM 染色液使用量

注: 配制好的 Fluo-20 染色工作液现用现配、避光配置, 不能冻存。Fluo-20 AM 染色工作液中 Fluo-20 AM 的浓度可以根据染色效果在 0.2-2 μ M 之间适当调整, 表 1 中使用量以 Fluo-20 AM 的终浓度 4 μ M 为例。

(3) (可选) 如果 Fluo-20 AM 进入细胞的效果不好, 可向 Fluo-20 AM 溶液中加入适量 20% Pluronic F- 127 溶液, 防止 Fluo-20 AM 在缓冲液中聚集并促进 Fluo-20 AM 进入细胞, Pluronic F- 127 终浓度控制在 0.04~0.05%。

注: 20% (w/v) 的 Pluronic F- 127 DMSO 母液配制: 100 mg Pluronic F- 127 中加入 0.5 mL DMSO, 配制成 20%(w/v) 的 DMSO 母液。溶解需要在 40~50 $^{\circ}$ C 加热 20~30 min。溶解后室温保存, 勿冷藏。如果有结晶析出, 可以重新加热后溶解, 不影响使用。

注: Pluronic F- 127 可降低 Fluo-20 AM 的稳定性, 因此只建议在配制工作液时加入, 不建议将其加入储液中。

注: 如果您的细胞含有有机阴离子转运蛋白, 则可以将丙磺舒(1-2 mM)添加到染料工作溶液中 (最终浓度为 0.5- 1 mM), 以减少脱酯指示剂的泄漏。

2. 仪器准备:

荧光显微镜: 激发/发射波长 Ex/Em: 495/516 nm;

流式细胞仪: 检测通道激发/发射波长 Ex/Em: 495/516 nm;

荧光酶标仪: 激发/发射波长 Ex/Em: 495/516 nm。

3. 对照组设置:

组别	Fluo-20 AM Calcium Probe	样品细胞
阴性对照	+	不做任何处理
实验组	+	经实验处理细胞

阴性对照组: 对细胞不进行任何处理, 为实验组处理后钙信号变化提供参考。

实验组: 验证探针活性与细胞加载效率。

二、操作步骤-以 96 孔板为例

方案一：荧光显微镜检测（适用于悬浮细胞）

1. 细胞收集与洗涤：

- (1) 收集待测悬浮细胞悬液至离心管中。
- (2) 1000 rpm ， 室温离心 5 min ， 小心吸弃上清液。

注：通常洗涤能更好地降低背景荧光，吸除培养液、PBS 和 HBSS 等常规缓冲液时，最好使用真空泵，酚红或血清对于本试剂盒的检测有一定的干扰。

2. 细胞重悬与计数：

- (1) 使用 PBS 重悬并细胞计数。
- (2) 取 5×10^4 - 10^5 个细胞，1000 rpm 低速离心 5 min ， 去除 PBS。
- (3) 使用 100 μ L 的 PBS 或 HBSS 等常规缓冲液重悬。1000 rpm 低速离心 5 min ， 去除上清。

注：显微镜法对细胞密度要求不严格，只要实验组与对照组密度一致即可。具体可根据样本种类与实验条件灵活调整，以显微镜下视野中细胞分布约 70%-85%为宜。

3. 细胞染色：

- (1) 参照表 1 配置 Fluo-20 AM 染色工作液。
- (2) 向 96 孔板中加入 100 μ L 的 Fluo-20 AM 染色工作液，37 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min。孵育时间可在 10-60 min 进行调整，最快 10 min 快速染色，最大程度保持细胞活性，简化实验流程。

注：如果首次实验不能确定孵育温度和时间，建议先 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min ， 观察荧光效果。如果细胞死亡较多，适当缩短时间；如果荧光强度太弱，适当延长时间。

4. 洗涤：

- (1) 孵育结束后，1000 rpm ， 室温离心 5 min ， 收集细胞。
- (2) 小心吸弃含染料的上清液（此为废液，需妥善处理）。
- (3) 加入 PBS 或 HBS 等常规缓冲液，洗涤 1 次，以充分去除残留 Fluo-20 AM 探针，降低背景。

5. 显微镜观察与拍照：

- (1) 将细胞悬液加入 96 孔板中，静置片刻，待细胞自然沉降贴底后，置于荧光显微镜下观察。

注：细胞悬液使用量可根据细胞计数的数量自行调整，显微镜视野中细胞分布 70%-85%为最佳。

方案二：荧光显微镜检测（适用于贴壁细胞）

1. 细胞处理：

- (1) 提前一天在孔板中接种细胞，使得细胞汇合度达到 70%-85% ， 待细胞贴壁后按照实验设计处理细胞。

2. 细胞清洗：

- (1) 小心吸弃细胞培养液。
- (2) 根据培养板规格，加入对应体积的 PBS 或 HBS 等常规缓冲液轻柔洗涤细胞 1 次（例如：96 孔板加 100 μ L/孔，48 孔板加 150 μ L/孔，24 孔板加 250 μ L/孔，12 孔板加 500 μ L/孔，6 孔板加 1mL/孔），洗涤后吸净 PBS 或 HBS 等常规缓冲液。

3. 细胞染色：

- (1) 参照表 1 配置 Fluo-20 AM 染色工作液。
- (2) 将 100 μ L Fluo-20 AM 染色工作液加入细胞中，37 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min。孵育时间可在 10-60 min 进行调整，最快 10 min 快速染色，最大程度保持细胞活性，简化实验流程。

注：如果首次实验不能确定孵育温度和时间，建议先 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min ， 观察荧光效果。如果细胞死亡较多，适当缩短时间；如果荧光强度太弱，适当延长时间。

4. 洗涤：

- (1) 孵育结束后，吸弃各孔中的染色工作液。
- (2) 加入 PBS 或 HBS 等常规缓冲液，洗涤 1 次，以充分去除残留 Fluo-20 AM 探针，降低背景。

5. 显微镜观察与拍照：

- (1) 洗涤后，每孔加入对应体积的 PBS 或 HBS 等常规缓冲液，以保持细胞湿润。
- (2) 直接将培养板置于荧光显微镜下观察和拍照。滤光片设置同方案一。

方案三：流式细胞仪检测（适用于悬浮细胞与贴壁细胞）

1. 细胞准备：

悬浮细胞：同方案一，取 5×10^4 - 10^5 个细胞。

贴壁细胞：

a.吸弃培养液，用 PBS 或 HBS 等常规缓冲液轻柔清洗 1 次。

b.加入适量胰酶消化液（覆盖细胞即可），室温下置于显微镜下观察，待细胞变圆、间隙增大时，用移液器轻轻吹打，使细胞完全脱落。

c.关键：立即加入含血清的完全培养基以终止消化。

d.将细胞悬液转移至离心管，1000 rpm，室温离心 5 min，吸弃上清。

e.用 PBS 或 HBS 等常规缓冲液重悬细胞并进行细胞计数。

f.取 5×10^4 - 10^5 个细胞，室温 1000 rpm 低速离心 5 min，吸弃上清。

2. 细胞染色：

(1) 参照表 1 配置 Fluo-20 AM 染色工作液。

(2) 将 1 mL 的 Fluo-20 AM 染色工作液加入细胞中，37 °C 避光孵育 30 min。孵育时间可在 10-60 min 进行调整，最快 10 min 快速染色，最大程度保持细胞活性，简化实验流程。

注：如果首次实验不能确定孵育温度和时间，建议先 37 °C 孵育 30 min，观察荧光效果。如果细胞死亡较多，适当缩短时间；如果荧光强度太弱，适当延长时间。

3. 洗涤：

(1) 孵育结束后，1000 rpm，室温离心 5 min，收集细胞。

(2) 小心吸弃含染料的上清液（此为废液，需妥善处理）。

(3) 加入 PBS 或 HBS 等常规缓冲液轻柔重悬细胞，洗涤 1 次，以充分去除残留 Fluo-20 AM 探针，降低背景。

(4) 末次洗涤后，彻底吸净上清液，加入 500 μ L PBS 或 HBSS 等常规缓冲液重悬细胞，制成流式上机样品。

4. 上机检测：

(1) 重要：染色完成后 1h 内进行流式检测，以保证荧光信号稳定。

(2) 用流式细胞仪在预设的检测通道下进行分析。

(3) 首先通过空白对照（未染色细胞）调节电压，使细胞群位于坐标系左下角。

(4) 其次检测对照组和实验组，确认实验体系成立。

(5) 最后检测实验样品，记录并分析细胞的平均荧光强度。

注：所有样本染色后需避光、置冰上并立即检测；定量实验（如流式）尤须严格在 1h 内完成，以确保数据准确、可重复。

方案四：荧光酶标仪检测（适用于悬浮与贴壁细胞）

1. 接种培养：

(1) 将细胞接种于 96 孔板黑色多孔板中，每孔的细胞数需要控制在 100- 10000 个，通常宜在 2000-5000 个范围内。

2. 洗涤：

收集待测悬浮细胞悬液至离心管中。

l 悬浮细胞：250- 1000 \times g 室温离心 5 min，吸除上清，用 PBS 或 HBSS 等常规缓冲液洗涤 1 次。

l 贴壁细胞：吸除培养液，用 PBS 或 HBSS 等常规缓冲液洗涤细胞 1 次。

注：通常洗涤能更好地降低背景荧光，吸除培养液、PBS 或 HBSS 等常规缓冲液时最好使用真空泵，酚红或血清对于本试剂盒的检测有一定的干扰。

3. 细胞染色：

(1) 参照表 1 配置 Fluo-20 AM 染色工作液。

(2) 加入 100 μ L 的 Fluo-20 AM 染色工作液，37 °C 避光孵育 30 min。孵育时间可在 10-60 min 进行调整，最快 10 min 快速染色，最大程度保持细胞活性，简化实验流程。

注：如果首次实验不能确定孵育温度和时间，建议先 37 °C 孵育 30 min，观察荧光效果。如果细胞死亡较多，适当缩短时间；如果荧光强度太弱，适当延长时间。

4. 洗涤：

(1) 孵育结束后，1000 rpm，室温离心 5 min，收集细胞。

(2) 小心吸弃含染料的上清液（此为废液，需妥善处理）。

(3) 加入 PBS 或 HBSS 等常规缓冲液，洗涤 1 次，以降低背景。

(4) 末次洗涤后，彻底吸净上清液，加入 100 μ L PBS 或 HBSS 等常规缓冲液重悬细胞，制成待测样品。

5. 荧光酶标仪检测:

在荧光酶标仪预设的条件检测，通过对比对照组与处理组的 RFU(Relative Fluorescence Units)，可得出药物刺激的效果。

三、 结果判读:

定性分析 (显微镜) :

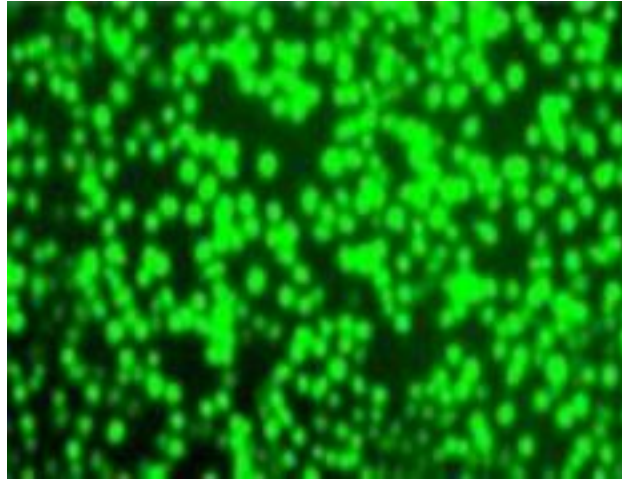


图 1.离子霉素处理 HeLa 细胞 15 s 后，细胞内钙浓度 $[Ca^{2+}]$ 荧光检测

在荧光显微镜下:

图 1 为离子霉素处理后的 HeLa 细胞，在荧光显微镜下观察细胞内绿色荧光的分布以及强度情况。当药物处理细胞而让钙离子浓度出现上升，那么 Fluo-20 AM 标记细胞的荧光强度会明显变强。

定量分析 (流式细胞仪) :

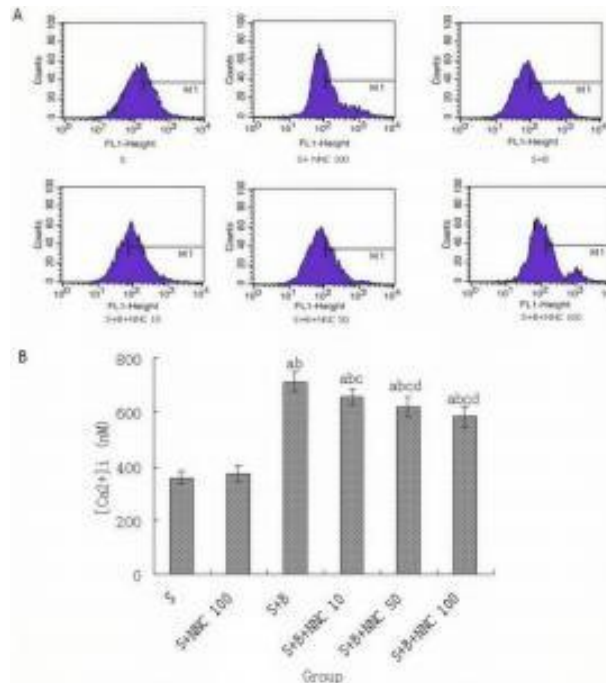


图 2.布比卡因诱导 SH-SY5Y 细胞损伤时, 流式细胞仪检测胞质钙离子浓度 ($[Ca^{2+}]_i$) 的变化规律

注: 图片引自文献《Neurotoxicity Induced by Bupivacaine via T-Type Calcium Channels in SH-SY5Y Cells》(doi: 10.1371/journal.pone.0062942)

流式细胞仪检测结果

图 2 对照组 (S 组) 和仅用 NNC 100 mM 预处理组 (S+NNC 100 组): $[Ca^{2+}]_i$ 分别为 358 ± 25 nM、 372 ± 32 nM, 两组无显著差异; 布比卡因处理组 (S+B 组, 1 mM 布比卡因): $[Ca^{2+}]_i$ 显著升高至 715 ± 35 nM, 远高于对照组; NNC 预处理+布比卡因组: $[Ca^{2+}]_i$ 随 NNC 浓度升高逐渐降低, 10 mM、50 mM、100 mM NNC 组分别为 657 ± 29 nM、 619 ± 37 nM、 585 ± 39 nM; 50 mM 与 100 mM NNC 组无显著差异, 提示保护作用达平台期。