

Fluo-8 AM Calcium Probe

最快 10 min 速染, 室温/37 °C 灵活加载, 荧光亮度是 Fluo-4 AM 两倍, Fluo-3 AM 四倍

产品货号: C22609

产品规格: 1 mg

储运条件: -20 °C 避光保存; 冰袋运输。

产品简介:

Fluo-8 AM Calcium Probe 是精准检测细胞内钙离子浓度变化的专业工具, 本产品以 Fluo-8 AM 钙离子荧光探针为核心检测成分, 其检测原理如下: Fluo-8 AM 是 Fluo-8 的一种乙酰甲酯衍生物, 具有细胞膜渗透性, 只需简单培养, 即可轻易进入细胞, 一旦进入细胞内即被其内酯酶剪切生成不具膜渗透性的 Fluo-8, 从而滞留在胞内以发挥相应生理功能。本产品荧光显微镜、荧光酶标仪、流式细胞仪等多种检测平台检测钙离子浓度变化, 为细胞生物学研究、疾病机制探索及药物研发提供关键技术支持。

Fluo-8 AM 作为经典钙指示剂 Fluo-4 AM、Fluo-3 AM 的升级产品, 在性能上实现全面优化。Fluo-3 AM 和 Fluo-4 AM 是在活细胞钙成像研究里最为常用的可见光可激发钙指示剂, 其在活细胞中仅能呈现出中等强度的荧光, 而且为使细胞钙反应达到最佳效果, 需要较为苛刻的细胞加载条件。Fluo-8 AM 可在室温条件下进行细胞染色, Fluo-3 AM 和 Fluo-4 AM 则必须在 37 °C 的环境中才能进行细胞上样操作。Fluo-8 AM 显著改善了细胞负载情况以及钙反应效果。Fluo-8 AM 在荧光亮度上是 Fluo-4 AM 的 2 倍, 是 Fluo-3 AM 的 4 倍, 完美替代 Fluo-3 AM 和 Fluo-4 AM。

注: 效能等同 AAT Fluo-8[®], AM;

注: 本文中 Fluo-8[®] 为 AAT Bioquest 的商标及注册商标。

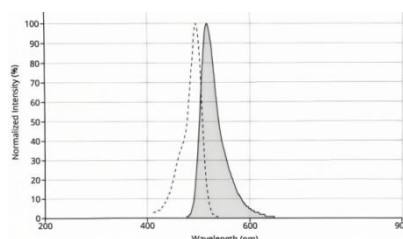
应用范围: 钙离子检测;

产品特点:

- **10 min 快速染色:** 试剂混匀后直接加样, 孵育后最快 10 min 染色, 大幅缩短实验时间与操作步骤;
- **加载条件灵活:** 室温或 37 °C 孵育均可实现良好染色效果, 无需较为苛刻的细胞加载条件;
- **荧光强度更高:** 荧光亮度为 Fluo-4 AM 的 2 倍、Fluo-3 AM 的 4 倍, 显著提升检测信号辨识度;
- **超高灵敏度:** 低背景信号干扰, 检测灵敏度高, 轻松捕捉低幅度的钙信号波动。

产品参数:

- **外观:** 可溶于 DMSO 的固体粉末;
- **CAS 号:** 1345980-40-6;
- **Ex/Em:** 494/516 nm
- **分子式:** C₅₀H₅₀N₂O₂₃;
- **分子量:** 1046.93;
- **光谱图:**



产品组分:

组分	2300 T
Fluo-8 AM Calcium Probe	1 mg

注：以每次使用 100 μ L 染色工作液，染色工作液浓度 4 μ M 计算。

注意事项:

- AM酯基易吸潮，故请确保从冰箱拿出后恢复至室温再开封，Fluo-8 AM微量不易观察，恢复室温后瞬时离心确保粉末离心至管底。
- Fluo-8 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。
- 荧光染料均存在淬灭问题，请尽量注意避光。
- 本产品仅限于科研用途并且不得存放于普通住宅内。
- 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. 储液准备:

- (1) 将Fluo-8 AM从冰箱取出，恢复至室温后，瞬时离心至管底。用无水DMSO制备2-5 mM的Fluo-8 AM储备液。举例：制备5 mM储液需要往1 mg管子中加入191 μ L无水DMSO。

注：配置好的储液建议分装保存放置-20 $^{\circ}$ C，且最好用封口膜缠紧管盖。

2. 工作液准备:

- (1) 用PBS或HBSS稀释Fluo-8 AM储液制备4 μ M的Fluo-8 AM工作液。对于大多数细胞系，建议使用终浓度为4-5 μ M的Fluo-8 AM工作液。

注：不同细胞所需上样浓度不一致，建议正式实验前做最佳浓度摸索。为了避免过度加载造成细胞毒性，建议在取得有效结果的基础上使用最低探针浓度，可从4 μ M开始摸索。

- (2) (可选) 如果Fluo-8 AM进入细胞的效果不好，可向Fluo-8 AM溶液中加入适量20% Pluronic F-127溶液，防止Fluo-8 AM在缓冲液中聚集并促进Fluo-8 AM进入细胞，Pluronic F-127终浓度控制在0.04~0.05%。

注：

(1) 配制 20%(w/v)的Pluronic F-127 DMSO母液：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；

(2) 使用Pluronic F-127 可降低Fluo-8 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；

(3) 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。

3. 仪器准备:

- 荧光显微镜，Ex/Em: 494/516 nm；
- 流式细胞仪，Ex/Em: 494/516 nm；
- 荧光酶标仪，Ex/Em: 494/516 nm。

4. 对照组设置:

组别	Fluo-8 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) 收集待测悬浮细胞于离心管中，1000 rpm 室温离心 5 min，小心吸弃上清。
- (2) 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、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 或 HBSS 重悬细胞沉淀，进行细胞计数。
- (2) 取 5×10^4 - 10^5 个细胞，1000 rpm 低速离心 5 min，去除 PBS 或 HBSS。

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) 96 孔板中加入 100 μ L 的 Fluo-8 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。

- (2) 孵育后可加入 PBS 或 HBSS 洗涤 1-3 次。

4. 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 96 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) 加入 100 μ L 的 PBS 或 HBSS 轻柔洗涤细胞 1 次，洗涤后吸净 PBS 或 HBSS。

3. 细胞染色：

- (1) 96 孔板中加入 100 μ L 的 Fluo-8 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。

- (2) 孵育后可加入 PBS 或 HBSS 洗涤 1-3 次。

4. 显微镜观察与拍照：

- (1) 洗涤后，每孔加入对应体积的 PBS 或 HBSS，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。

● 贴壁细胞：

- a. 吸弃培养液，用 PBS 或 HBSS 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 HBSS 重悬细胞并进行细胞计数。
- f. 取 10^6 个细胞，室温 1000 rpm 低速离心 5 min，吸弃上清。

2. 细胞染色：



(1) 将 1 mL 的 Fluo-8 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。

(2) 孵育后可加入 PBS 或 HBSS 洗涤 1-3 次。

3. 上机检测:

(1) 重要: 染色完成后 1 h 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 1 h 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。

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

● 贴壁细胞: 吸除培养液, 用 PBS 或 HBSS 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, 吸除培养液和 PBS 或 HBSS 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) 96 孔板中加入 100 μL 的 Fluo-8 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。

(2) 孵育后可加入 PBS 或 HBSS 洗涤 1-3 次。

4. 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):

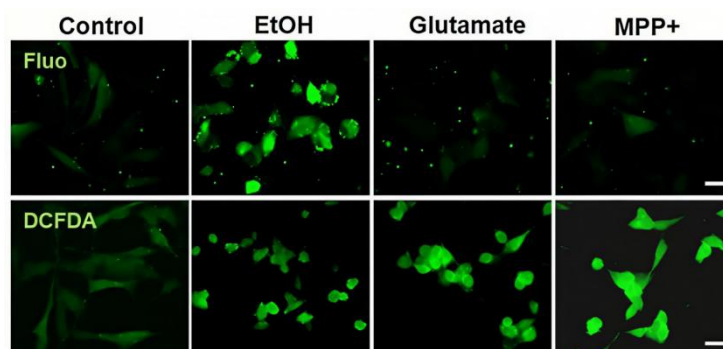


图 1. SH-SY5Y 细胞钙离子浓度动态变化图

在荧光显微镜下:

● 图 1 为对比不同处理组在 Fluo (钙信号) 和 DCFDA (ROS 信号) 在荧光显微镜下观察下的荧光强度情况, 可系统分析不同刺激因素对细胞钙信号通路和氧化应激的协同或独立影响。

注: 图片引自《Stressed neuronal cells can recover from profound membrane blebbing, nuclear condensation and mitochondrial fragmentation, but not from cytochrome c release》(doi:10.1038/s41598-023-38210-w.)



常见疑问与解答：

- 问：为什么没有检测到荧光值或荧光值低？

答：可能是因为细胞密度不够，可增加细胞密度；同时也可以考虑延长孵育时间。

- 问：Fluo-8孵育后发现细胞死亡太多怎么办？

答：首先应评估染料的浓度和处理时间是否合适。Fluo-8 AM 虽然相对较为安全，但过高的浓度或过长的染色时间仍可能导致细胞损伤。建议降低染料浓度或缩短染色时间，并在实验过程中密切观察细胞状态。

