

Ready-to-use Fluo-20 AM Calcium Probe (2 mM)

Fluo-20 AM 亮度超 Fluo-4 四倍、Fluo-3 八倍，较进口 Fluo-8 更优且低毒

产品货号：C22623

产品规格：50 μ L

储运条件：-20 $^{\circ}$ 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良好，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。

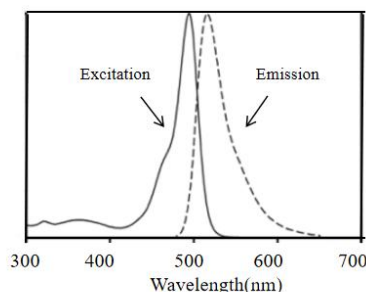
应用范围：钙离子检测；

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 $^{\circ}$ 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。



仅限体外科研用途 不得用于临床诊断或治疗
技术咨询 Contact@probelives.com
订购咨询 Sales@probelives.com

中文网址 www.probelives.cn
英文网址 www.probelives.com
Suzhou Probelives Technology CO., LTD.

注意事项:

- 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。
- 荧光染料均存在淬灭问题, 请尽量注意避免。
- 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. 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 μL 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 μM 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 μL /孔, 24 孔板加 250 μL /孔, 12 孔板加 500 μL /孔, 6 孔板加 1 mL/孔。)

表 1.Fluo-20 AM 染色液使用量

试剂	1 个孔	10 个孔	100 个孔
Fluo-20 AM	0.2 μL	2 μL	20 μL

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 μL 之间适当调整, 表 1 中使用量以 Fluo-20 AM 的终浓度 4 μM 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 $^{\circ}\text{C}$ 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1 mL/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：



仅限体外科研用途 不得用于临床诊断或治疗
技术咨询 Contact@probelives.com
订购咨询 Sales@probelives.com

中文网址 www.probelives.cn
英文网址 www.probelives.com
Suzhou Probelives Technology CO., LTD.

(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 μL 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等常规缓冲液洗涤1次。

● 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 μL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 μL 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）：

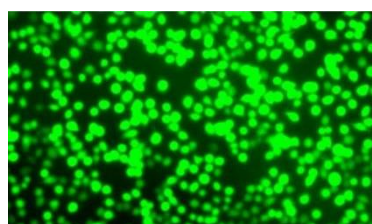


图 1. 离子霉素处理 HeLa 细胞 15 s 后，细胞内钙浓度 $[Ca^{2+}]$ 荧光检测



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）：

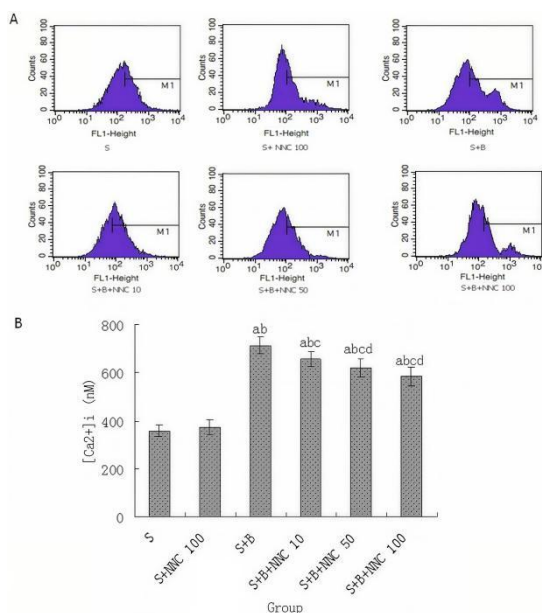


图 2.布比卡因诱导 SH-SY5Y 细胞损伤时，流式细胞仪检测胞质钙离子浓度 $[Ca^{2+}]_i$ 的变化规律

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。

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-20 AM 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-20 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。

