

## Ready-to-use FluoroGold(4%)

即用型低毒稳活，高特异显影，专业逆行示踪，长效动态稳定神经元细胞标记

产品货号：C22413

产品规格：25 µL

储运条件：4 °C避光保存，冰袋运输

### 产品简介：

Ready-to-use FluoroGold(4%)是一款兼具细胞质染色与神经元逆行示踪双重功能的经典荧光染料，核心组分为羟基胍基苜。其核心原理是凭借独特的胍基分子结构，可被神经末梢高效摄取并通过逆行轴浆运输系统，从轴突终末逆向转运至神经元胞体与近端树突，实现完整的神经元形态标记与大量枝晶精细填充。本产品核心优势突出：即用型产品，使用浓度为4%时可以无需稀释直接使用；逆行运输效率远高于传统示踪剂，标记神经元形态完整度佳；荧光亮度高且抗光淬灭性极强，长期保存与多次成像信号无明显衰减；操作简便，可直接用生理盐水配制，适配压力注射、离子电渗法等多种给药方式；兼容性优异，兼容多聚甲醛、戊二醛等常规固定剂，完美支持冷冻切片、石蜡切片等不同组织学处理流程，广泛应用于神经元示踪、神经环路解析、组织化学染色及细胞形态学观察等研究领域。

FluoroGold自1986年由Schmued和Fallon首次作为逆行荧光示踪剂应用以来，已成为神经科学领域公认的经典示踪工具。在神经环路研究中，它能精准解析脊髓-脑干、皮层-丘脑等中枢神经系统及外周神经系统的投射通路，清晰绘制神经连接图谱；在神经损伤修复研究中，可长期追踪神经轴突再生过程，客观评估不同治疗方案的修复效果；在细胞移植与组织工程研究中，能够稳定标记移植细胞，监测其在体内的存活、迁移与整合情况；在药物研发领域，可作为理想的示踪工具评估鼻内给药等中枢神经系统药物递送方式的效率与通路。凭借其高特异性、长效稳定性和广泛的技术兼容性，FluoroGold为神经科学基础研究、神经系统疾病病理机制探索及新型治疗手段开发提供了不可或缺的技术支撑，极大推动了神经退行性疾病、脊髓损伤、脑卒中等重大疾病的研究进程。

注：效能等同于AAT Bioquest Hydroxystilbamidine(17514)、Biotium Hydroxystilbamidine (Fluoro-Gold™)(80014)；

注：本文中 Fluoro-Gold™ 为 Fluorochrome,LLC 的商标和注册商标。

**应用范围：**神经元逆行示踪，组织化学染色，轴突运输，细胞移植与组织工程，病理模型研究等

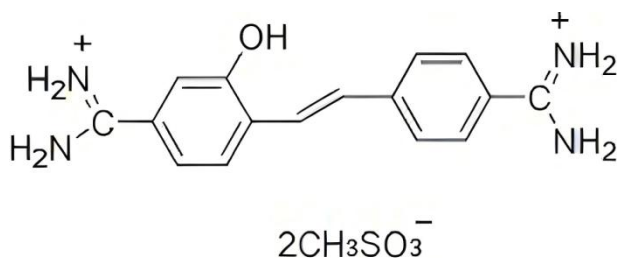
### 产品特点：

- **低细胞毒性：**对细胞损伤小，保障实验过程中细胞活性与生理状态稳定；
- **高灵敏特异性：**低浓度荧光亮度高，无背景干扰，在脑、脊髓等致密组织中信噪比可达40:1以上；
- **专业逆行示踪：**超高逆行示踪效率，标记灵敏度是传统示踪剂的2~3倍；
- **超长稳定长效：**在细胞内分解极慢，动态保证标记强度，完美适配长期追踪实验；
- **多技术多色兼容：**光谱重叠少，可与免疫荧光、免疫组化、透射电镜、双光子成像、石蜡包埋、放射自显影兼容。

### 产品参数：

- **Ex/Em：**361 nm/536 nm；
- **CAS 号：**223769-64-0；
- **分子式：** $C_{18}H_{24}N_4O_7S_2$ ；
- **分子量：**472.5；
- **分子结构图：**





## 产品组分:

| 组分                          | 250 T |
|-----------------------------|-------|
| Ready-to-use FluoroGold(4%) | 25 μL |

注: 以压力注射法, 每次使用 0.1 μL 染料, 染色工作液浓度 4% 计算。

## 注意事项:

- 对于大多数应用, FluoroGold染料浓度为2%~4%, 在进行无菌实验时, 注意对染料进行无菌过滤操作。
- FluoroGold几乎可以兼容任何固定剂, 也可以不使用固定剂。常用的固定剂为4%多聚甲醛, 含有高浓度重金属(例如: 钨, 汞)的固定剂会淬灭荧光, 而高浓度(超过1%)的戊二醛可能会增加背景荧光, 故最好在实验前进行预实验避免以上因素的影响。
- 含FluoroGold的组织可以根据任何常见的组织学技术进行处理。这些组织包括未固定组织的冷冻切片(10 μm), 固定组织的冷冻切片(20 μm), 或者石蜡切片(3~10 μm)。
- 对于通过微量注射器或微量移液器进行压力注射, 应将FluoroGold溶于蒸馏水或0.9%的生理盐水中。FluoroGold也可用作悬浮液于0.2 M中性磷酸盐缓冲液中。但是悬浮的颗粒可能会堵塞微量移液器吸头。对于离子电渗法, 在0.1 M醋酸盐缓冲液(pH3.3)中配制1%的FluoroGold溶液。
- 对于注射部位的描述: 几乎任何中枢或外周神经系统结构均可注射FluoroGold来分析逆行转运。在外周神经系统中, 可以对神经节和外周目标进行研究。为了研究外周神经, 应切断或损伤神经, 然后浸入或注射5%的FluoroGold水溶液。由于完整通道的纤维不会显著吸收FluoroGold, 因此必须切断或严重破坏纤维才能吸收染料。
- 溶解FluoroGold的水或者溶剂需要使用超纯水, 在使用前经0.2 μm无菌滤膜过滤。
- FluoroGold溶解度具有温度依赖性, 4 °C下其饱和溶解度仅为2%~2.5%, 产品4%的浓度高于该温度下的饱和溶解度, 冷藏放置后可能析出黄色结晶或产生轻微沉淀, 此为正常物理现象, 不影响产品活性与使用效果。若出现结晶, 可将试剂置于30~37 °C温水浴中加热数分钟, 可配合短暂超声辅助溶解, 待溶液完全澄清后即可正常使用。
- 严格避光: 从试剂配制到实验观察的所有步骤均需铝箔包裹试剂瓶、注射器和电极, 避免强光直射, 防止FluoroGold荧光淬灭。
- 使用前请将产品瞬时离心, 再进行后续操作。
- 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. 试剂准备:

- 将试剂从储存条件(如4 °C)取出, 平衡至室温(15~25 °C)。

#### 二、操作步骤

对于大多数实验, FluoroGold 染料浓度为 2%~4%, 初次实验建议 FluoroGold 浓度为 4%, 如果在注射部位发生坏死, 或者标记过于强烈, 可适当降低浓度。

注: 不同实验所需 FluoroGold 染液浓度需参考文献或通过预实验确定。

### 方案一: 纳米注射器压力注射法

#### 1. 仪器耗材:

- 耗材: 硼硅酸盐玻璃毛细管(外径1.5 mm)、手术器械包、吸收性明胶海绵、无菌纱布、碘伏、75%酒精
- 仪器: 小动物立体定向仪、数字式纳米注射器、玻璃微电极拉制仪、牙科钻、恒温手术台

#### 2. 玻璃微电极制备



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 Probabilities Technology CO., LTD.

拉制玻璃毛细管并折断尖端至内径 25~40  $\mu\text{m}$ ，充入矿物油后安装到纳米注射器上。

### 3. 动物麻醉与固定：

实验动物经腹腔注射或吸入麻醉后，俯卧位固定于立体定向仪，调整颅骨至水平状态（前囟与后囟高度差 $<0.1\text{ mm}$ ）。

### 4. 手术暴露：

剃除头部毛发，碘伏-酒精交替消毒 3 遍，沿正中线切开头皮，分离皮下组织，暴露颅骨前囟、后囟等标志点。

### 5. 颅骨钻孔：

根据目标核团立体定向坐标，用牙科钻在对应位置钻直径约 1 mm 的骨窗，注意避免损伤硬脑膜。

### 6. 吸样与注射：

（1）将玻璃微电极尖端浸入 FluoroGold 工作液，通过负压吸入约 0.5  $\mu\text{L}$  溶液；

（2）按坐标将电极缓慢刺入目标核团深度；

（3）采用分层注射法：每次推注 23~64 nL，推注时间 $\geq 30\text{ s}$ ，间隔 1 min 后进行下一次注射，总注射体积 69~192 nL（大鼠）、32~64 nL（小鼠）；

**注：**不同实验中 FluoroGold 压力注射工作液使用量需根据动物类型、大小结合参考文献或通过预实验确定。

（4）注射完成后留针 5 min，防止溶液沿针道反流，然后以 0.5 mm/min 的速度缓慢拔出电极。

### 7. 术后护理：

用吸收性明胶海绵覆盖骨窗，逐层缝合肌肉和皮肤，碘伏消毒伤口。皮下注射抗生素（20 mg/kg 头孢唑林钠）和止痛药（5 mg/kg 布洛芬），连续给药 3 天。

### 8. 存活时间：

短通路（如丘脑-皮质）3~5 天，长通路（如脊髓-大脑皮层）7~14 天，最长可至 2 个月。

表 1. 不同物种关键参数参考表

| 物种      | 推荐 FluoroGold 浓度 | 总注射体积                  | 单次注射量     | 留针时间  | 标准存活时间 |
|---------|------------------|------------------------|-----------|-------|--------|
| 大鼠(SD)  | 2%~4%            | 0.1~0.2 $\mu\text{L}$  | 23~64 nL  | 5 min | 7 天    |
| 小鼠(C57) | 2%~4%            | 0.05~0.1 $\mu\text{L}$ | 16~32 nL  | 3 min | 5 天    |
| 家猫      | 2%~4%            | 0.2~0.5 $\mu\text{L}$  | 50~100 nL | 5 min | 10 天   |

**注：**不同物种关键参数参考表中 FluoroGold 压力注射条件均是结合考文献总结得出，仅供参考，具体参数请通过预实验确定。

## 方案二：离子电渗注射法（极小核团专用）

### 1. 仪器耗材：

- 耗材：带内芯的硼硅酸盐玻璃毛细管、手术器械包、吸收性明胶海绵、无菌生理盐水
- 仪器：小动物立体定向仪、恒流电流源、玻璃微电极控制仪、牙科钻、银-氯化银电极

### 2. 微电极制备

拉制带内芯的玻璃毛细管，折断尖端至内径 8~15  $\mu\text{m}$ 。

**注：**玻璃毛细管尖端过粗会导致电流过大，过细则易堵塞。

### 3. 充液与连接：

用微量注射器从电极后端注入 2% FluoroGold 工作液，排除气泡后插入银电极（正极），连接至电流源；将参考电极（负极）植入动物皮下。

### 4. 动物麻醉与固定：

实验动物经腹腔注射或吸入麻醉后，俯卧位固定于立体定向仪，调整颅骨至水平状态（前囟与后囟高度差 $<0.1\text{ mm}$ ）。

### 5. 手术暴露：

剃除头部毛发，碘伏-酒精交替消毒 3 遍，沿正中线切开头皮，分离皮下组织，暴露颅骨前囟、后囟等标志点。

### 6. 离子电渗注射：

（1）将微电极缓慢刺入目标核团深度；

（2）开启电流源，采用脉冲电流模式：+ 0.8~+ 5  $\mu\text{A}$ （推荐 2  $\mu\text{A}$ ），7 s 开/7 s 关，持续注射 15 min；

（3）注射结束后留针 5 min，然后缓慢拔出电极；

**注：**等离子电渗模式与条件需根据参考文献与预实验确认。

### 7. 术后护理：



用吸收性明胶海绵覆盖骨窗，逐层缝合肌肉和皮肤，碘伏消毒伤口。皮下注射抗生素（20 mg/kg 头孢唑林钠）和止痛药（5 mg/kg 布洛芬），连续给药 3 天。

#### 8. 存活时间：

短通路（如丘脑-皮质）3~5 天，长通路（如脊髓-大脑皮层）7~14 天，最长可至 2 个月。

表 2. 离子电渗关键参数参考表

| 参数项    | 推荐值范围           | 最佳值         | 注意事项        |
|--------|-----------------|-------------|-------------|
| 电流强度   | +0.8~+5 $\mu$ A | +2 $\mu$ A  | 电流过大易导致组织坏死 |
| 电流模式   | 脉冲电流            | 7 s 开/7 s 关 | 禁止使用连续直流电   |
| 注射时间   | 10~20 min       | 15 min      | 时间过长会增加扩散范围 |
| 电极尖端内径 | 8~15 $\mu$ m    | 10 $\mu$ m  | 尖端需光滑无毛刺    |
| 留针时间   | 3~5 min         | 5 min       | 防止示踪剂沿针道反流  |

注：离子电渗关键参数参考表中参数条件均是结合考文献总结得出，仅供参考，具体参数请通过预实验确定。

### 三、检测方法

#### 1. 组织灌注固定：（所有实验方案均可选）

- 麻醉与开胸：存活时间结束后，对动物进行深度麻醉（过量戊巴比妥或异氟烷），迅速开胸暴露心脏和主动脉。
- 心脏插管：将灌注针插入左心室，并用止血钳固定，立即剪开右心耳放血。
- 冲洗血液：以 10 mL/min 的速度灌注预冷的 0.01 M PBS（pH7.4，含 10 U/mL 肝素），直至肝脏和四肢完全变白（大鼠约 100~150 mL，小鼠约 30~50 mL）。
- 组织固定：换用 4% 多聚甲醛（0.1 M 磷酸缓冲液配制，pH7.4），以 5 mL/min 的速度灌注固定（大鼠约 200~250 mL，小鼠约 50~100 mL）。
- 后固定：取出目标组织（脑、脊髓等），置于 4% 多聚甲醛中 4 °C 后固定过夜。
- 脱水：将组织依次转入 20%、30% 蔗糖-PBS 溶液中 4 °C 脱水，直至组织完全沉底（约 24~48 h）。

#### 2. 冰冻切片准备：

- 将脱水后的组织用 OCT 包埋剂包埋，置于冰冻切片机中预冷至 -20 °C。
- 切取 30~50  $\mu$ m 厚的冠状/横向切片，收集于 0.01 M PBS 中（全程避光）。

#### 3. 直接荧光观察法（快速检测可选）

- 临时封片：取切片置于载玻片上，滴加少量 PBS，盖上盖玻片（无需封片剂）。
- 荧光显微镜观察：使用落射荧光显微镜，配备紫外激发滤光片组（激发波长 361 nm，发射波长 536 nm）。

#### 4. FluoroGold 与免疫荧光双标检测（可选）

- 切片处理：取切片置于 0.3% Triton X-100-PBS 中漂洗 3 次每次 5 min。
- 封闭：5% 正常山羊血清 + 0.3% Triton X-100-PBS 室温封闭 1 h。
- 一抗孵育：加入兔抗目标蛋白一抗（1：500~1：2000 稀释），4 °C 孵育 72 h。
- 漂洗：0.3% Triton X-100-PBS 漂洗 4 次每次 10 min。
- 二抗孵育：加入 FITC/Cy3/BF 系列荧光标记二抗（1：500~1：1000 稀释），室温避光孵育 40 min。
- 漂洗：0.3% Triton X-100-PBS 漂洗 4 次每次 10 min，最后用 0.01 M PBS 漂洗 5 min。
- 抗淬灭封片：切片 37 °C 烘干 10~15 min，滴加抗荧光淬灭固封剂（货号 C23002）封片。

#### 5. 检测与成像：

FluoroGold 可直接用荧光显微镜或激光共聚焦进行观察，使用滤光片 Ex: 361 nm, Em: 536 nm。

### 四、结果判读

#### ● 定性分析（显微镜）：



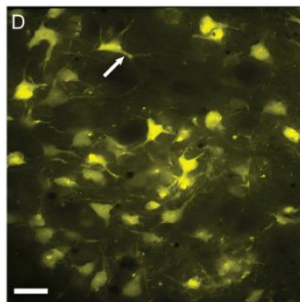


图 1.脑干面神经核胞体 FluoroGold 染色图

- 正常示踪结果：FluoroGold被面神经主干近端神经吸收，逆行运输至脑干面神经核胞体，清晰分辨单个神经元胞体和近端树突。

注：图片引自参考文献《Two-photon excitation fluorescent spectral and decay properties of retrograde neuronal tracer Fluoro-Gold》(doi:10.1038/s41598-021-97562-3)

### 常见疑问与解答：

- 问：用5%浓度的FluoroGold发现注射部位有坏死，是什么原因？  
答：FluoroGold 标记浓度过高导致，可通过设置不同浓度梯度染液注射，确定最佳染料浓度。
- 问：用文献中建议的FluoroGold染液浓度标记，发现背景荧光很高？  
答：排除一下样本是否用了高浓度的戊二醛固定剂，若是，更改为 4%多聚甲醛溶液固定测试。
- 问：实验中出现标记信号弱或无标记的常见原因有哪些？  
答：主要原因可能有：注射针堵塞导致染料未成功注入；注射位点不准确；示踪时间过短；固定剂浓度过高或固定时间过长；使用了过期或反复冻融的工作液；观察时滤光片选择错误。
- 问：FluoroGold可以用于顺行示踪吗？  
答：FluoroGold 主要以逆行示踪为主，顺行运输能力极弱且不稳定，不推荐用于顺行示踪实验。如需顺行示踪，建议选择 BDA（生物素化葡聚糖胺）、PHA-L 等专用顺行示踪剂。
- 问：FluoroGold会发生跨突触标记吗？如何避免？  
答：正常示踪时间内（≤2 周）几乎不发生跨突触标记。若示踪时间超过 4 周，或注射剂量过大，可能出现极少量跨突触标记。严格控制注射剂量和示踪时间，可完全避免跨突触干扰。
- 问：如何提高FluoroGold的标记效率和特异性？  
答：采用压力微量注射或离子电渗法给药，避免注射体积过大导致染料扩散；注射后缓慢拔针并留针 1~2 min，防止染料反流；严格控制示踪时间，过短会导致标记不充分，过长可能出现跨突触标记。
- 问：FluoroGold可以用于活细胞实时成像吗？  
答：可以。其低细胞毒性特性支持活细胞短期实时成像，标记后的活细胞可在共聚焦显微镜下动态观察细胞迁移、形态变化等过程。但长时间（>2 小时）强光照射会导致荧光淬灭，建议采用低激发功率和快速扫描模式。
- 问：产品在4℃冷藏存放后出现黄色结晶/沉淀，是产品变质了吗？该如何处理？  
答：该现象不属于产品变质，为正常的温度依赖性物理析出现象，不会影响产品活性与实验性能。FluoroGold 的溶解度随温度降低显著下降：37℃环境下其饱和溶解度约为 5%~6%，可稳定配制 4%的澄清溶液，配合加热与超声可短时配制最高 5.5%的无沉淀溶液；但 4℃冷藏条件下，其饱和溶解度仅为 2%~2.5%。本产品为 4%浓度规格，在 4℃储存时浓度高于该温度下的饱和溶解度，因此静置存放后会析出黄色结晶。处理方案：将试剂密封后置于 30~37℃温水浴中加热数分钟，结晶量较多时可配合短暂超声加速溶解，待结晶完全溶解、溶液恢复澄清后即可正常使用，溶解操作不会改变产品浓度与生物活性。

