

## Fluo-20 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 的 4 倍、Fluo-3 AM 的 8 倍、Fluo-8 AM 的 2 倍, 相较 AAT Fluo-8 AM 高出 40%**

**产品货号:** C22618

**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-20 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-20 AM 钙离子荧光探针为核心检测成分, 其检测原理如下: Fluo-20 AM 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-20, 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-20 AM 作为经典钙指示剂 Fluo-8 AM、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-20 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-20 AM 显著改善了细胞负载情况以及钙反应效果。Fluo-20 AM 在荧光亮度上是 Fluo-8 AM 的 2 倍, Fluo-4 AM 的 4 倍, 是 Fluo-3 AM 的 8 倍, 荧光亮度远超 Fluo-8 AM、Fluo-4 AM 和 Fluo-3 AM。

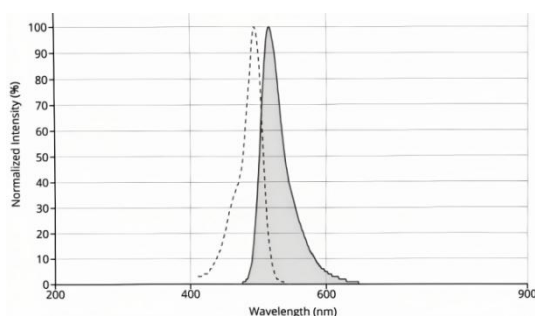
**应用范围:** 钙离子检测;

### 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 4 倍、Fluo-3 AM 的 8 倍、Fluo-8 AM 的 2 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;
- **Ex/Em:** 494/516 nm;
- **光谱图:**



**产品组分:**

| 组分                       | 2300 T |
|--------------------------|--------|
| Fluo-20 AM Calcium Probe | 1 mg   |

注：以每次使用 100  $\mu$ L 染色工作液，染色工作液浓度 4  $\mu$ 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-20 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-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-20 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-20 AM储备液。举例：制备5 mM储液需要往1 mg管子中加入191  $\mu$ 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-20 AM储液制备4  $\mu$ M的Fluo-20 AM工作液。对于大多数细胞系，建议使用终浓度为4~5  $\mu$ M的Fluo-20 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  $\mu$ M开始摸索。

- (2) (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：

(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-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；

(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-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**


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

中文网址 [www.probelives.cn](http://www.probelives.cn)  
 英文网址 [www.probelives.com](http://www.probelives.com)  
 Suzhou Probelives Technology CO., LTD.

**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  $5 \times 10^4$ ~ $10^5$  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  $\mu$ L 的 Fluo-20 染色工作液，37  $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min。孵育时长可根据实际观察到的染色效果进行灵活调整，调整区间为 10~60 min，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  $\mu$ 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  $\mu$ L 的 Fluo-20 染色工作液，37  $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min。孵育时长可根据实际观察到的染色效果进行灵活调整，调整区间为 10~60 min，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，取  $5 \times 10^5$ ~ $10^6$  个细胞。
- 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-20 染色工作液加入细胞中, 37 °C 避光孵育 30 min。孵育时长可根据实际观察到的染色效果进行灵活调整, 调整区间为 10~60 min, 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 洗涤 1 次。

● 贴壁细胞: 吸除培养液, 用 PBS 或 HBSS 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, 用 PBS 或 HBSS 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-20 染色工作液, 37 °C 避光孵育 30 min。孵育时长可根据实际观察到的染色效果进行灵活调整, 调整区间为 10~60 min, 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):

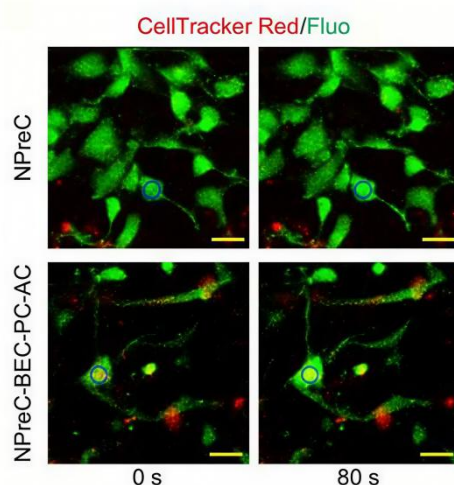


图 1. 神经元细胞钙离子浓度动态变化图

在荧光显微镜下:

● 图 1 为在荧光显微镜下, 观察不同时间点细胞内绿色荧光的分布以及强度情况, 分析神经元在刺激下的钙信号动态响应过程, 研究钙信号在神经元功能中的作用机制。

注: 图片引自《Bioengineered perfused human brain microvascular networks enhance neural progenitor cell survival, neurogenesis,



### 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。

