即用型钙荧光探针 Fluo-20 AM（2 mM）

货号：F1405

规格：50 μL

储存条件：-20℃避光保存，冰袋运输。

产品说明

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，激发/发射波长为 495/516 nm，可直接替换 Fluo-3 AM、Fluo-4 AM 及 Fluo-8 AM，无需调整仪器参数。Fluo-20 AM 对温度依赖性低，室温或 37℃ 孵育均能高效染色，更适配特殊细胞与高通量实验；荧光亮度为 Fluo-4 AM 的 4 倍、Fluo-3 AM 的 8 倍，能精准捕捉微弱钙信号，在厚组织深层或低探针浓度条件下仍可保持较高的信噪比；细胞毒性更低，有助于提升活细胞长期监测的存活率。

本品为即用型 2 mM 储液，无需自行称量配制，可直接用 PBS 或 HBSS 稀释成工作液使用。Fluo-20 AM 具有良好的细胞膜渗透性，进入细胞后被胞内酯酶剪切，生成的游离酸稳定滞留于胞内，可精准响应胞内 Ca^{2+} 浓度变化。与紫外光激发探针相比，本品可避免紫外光对细胞的损伤、维持细胞生理状态，组织穿透性更强，并可与多种荧光标记兼容，适配多色共染实验。

本品适用于细胞生理机制研究、信号通路解析、药物活性筛选、临床前体内成像等多种研究场景，尤其适合原代细胞、低钙响应细胞等信号较弱的实验体系。

应用范围 钙离子检测。

产品特点

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

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

3、荧光亮度高：荧光亮度为 Fluo-4 AM 的 4 倍、Fluo-3 AM 的 8 倍，微弱钙信号亦可清晰呈现。

4、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。

5、适配范围广：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等场景。

产品参数

激发/发射波长：Ex/Em = 495/516 nm；

检测仪器：荧光显微镜、流式细胞仪、荧光酶标仪均可，激发/发射波长或检测通道按 495/516 nm 设置；

储存液浓度：2 mM（即用型）；

推荐工作浓度：2-20 μM（常规 4 μM）。

产品组分

组分	规格
即用型 Fluo-20 AM 钙荧光探针（2 mM）	50 μL

注：按 96 孔板每孔 100 μL 染色工作液、Fluo-20 AM 工作浓度 4 μM（每孔 0.2 μL 储液）计算，50 μL 储液约可完成 250 个孔的检测。

试剂准备

1、储液复温：从 -20℃ 取出 Fluo-20 AM 储液，室温避光放置使其充分融解，瞬时离心后备用。本品遇水极易分解，建议首次使用后小量分装保存，避免反复冻融。

2、染色工作液配制：以 96 孔板为例，每孔 100 μL 体系，用 PBS 或 HBSS 将 2 mM 储液稀释为 2-20 μM 的 Fluo-20 AM 染色工作液（常规终浓度 4 μM）。其他规格孔板加液量为：48 孔板 150 μL/孔，24 孔板 250 μL/孔，12 孔板 500 μL/孔，6 孔板 1 mL/孔。

表 1　Fluo-20 AM 染色工作液用量（以 4 μM、100 μL/孔计）

试剂	1 个孔	10 个孔	100 个孔
Fluo-20 AM 储液（2 mM）	0.2 μL	2 μL	20 μL

注：染色工作液需现用现配、避光配制，不可冻存；表中用量以 Fluo-20 AM 终浓度 4 μM 为例，实际操作中可根据染色效果在 2-20 μM 范围内适当调整。

3、（可选）助溶处理：若 Fluo-20 AM 进入细胞的效果不佳，可在染色工作液中加入适量 20%（w/v）Pluronic F-127 母液，终浓度控制在 0.04%-0.05%，以防止探针在缓冲液中聚集并促进其进入细胞。20% Pluronic F-127 母液配制：100 mg Pluronic F-127 中加入 0.5 mL DMSO，40-50℃ 加热 20-30 min 溶解，室温保存，勿冷藏；如有结晶析出，可重新加热溶解，不影响使用。注意：Pluronic F-127 会降低 Fluo-20 AM 的稳定性，仅建议在配制工作液时加入，不可加入储液中。

4、（可选）减少泄漏：若待测细胞表达有机阴离子转运蛋白，可在染色工作液中加入丙磺舒（终浓度 0.5-1 mM），以减少脱酯探针的泄漏。

5、仪器准备：荧光显微镜、流式细胞仪、荧光酶标仪均按 Ex/Em = 495/516 nm 设置激发/发射波长或检测通道。

对照设置

组别	Fluo-20 AM 染色工作液	样品细胞
阴性对照	+	不做任何处理
实验组	+	经实验处理细胞

注：阴性对照组对细胞不进行任何处理，为实验组处理后的钙信号变化提供参考；实验组用于验证探针活性与细胞加载效率。

操作步骤

以 96 孔板为例，可根据细胞类型与检测仪器选择相应方案。

一、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：收集待测悬浮细胞悬液至离心管中，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、HBSS 等缓冲液时最好使用真空泵。酚红或血清对检测有一定干扰，应尽量去除。

2、细胞重悬与计数：用 PBS 重悬细胞并计数；取 5×10^4-10^5 个细胞，1000 rpm 室温离心 5 min，弃去 PBS；用 100 μL PBS 或 HBSS 重悬，再次 1000 rpm 离心 5 min，弃上清。

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，以显微镜视野中细胞分布约 70%-85% 为宜。

3、细胞染色：向 96 孔板中加入 100 μL Fluo-20 AM 染色工作液，37℃ 避光孵育 30 min。孵育时间可在 10-60 min 内调整，最快 10 min 即可完成染色，有助于最大程度保持细胞活性、简化实验流程。

注：首次实验若不能确定孵育温度和时间，建议先 37℃ 孵育 30 min 观察荧光效果；细胞死亡较多时适当缩短时间，荧光强度太弱时适当延长时间。

4、洗涤：孵育结束后 1000 rpm 室温离心 5 min 收集细胞，小心吸弃含染料的上清液（此为废液，需妥善处理）；加入 PBS 或 HBSS 洗涤 1 次，以充分去除残留探针、降低背景。

5、显微镜观察与拍照：将细胞悬液加入 96 孔板，静置片刻待细胞自然沉降贴底后，置于荧光显微镜下观察并拍照。

二、方案二：荧光显微镜检测（适用于贴壁细胞）

1、细胞处理：提前一天在孔板中接种细胞，使细胞汇合度达到 70%-85%，待细胞贴壁后按实验设计处理细胞。

2、细胞清洗：小心吸弃细胞培养液，按培养板规格加入对应体积的 PBS 或 HBSS 轻柔洗涤 1 次（96 孔板 100 μL/孔，48 孔板 150 μL/孔，24 孔板 250 μL/孔，12 孔板 500 μL/孔，6 孔板 1 mL/孔），洗涤后吸净。

3、细胞染色：将 100 μL Fluo-20 AM 染色工作液加入细胞中，37℃ 避光孵育 30 min，孵育时间可在 10-60 min 内调整，条件摸索方法同方案一。

4、洗涤：孵育结束后吸弃各孔中的染色工作液，加入 PBS 或 HBSS 洗涤 1 次，以充分去除残留探针、降低背景。

5、显微镜观察与拍照：洗涤后每孔加入对应体积的 PBS 或 HBSS 以保持细胞湿润，直接将培养板置于荧光显微镜下观察拍照，滤光片设置同方案一。

三、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：

（1）悬浮细胞：同方案一，取 5×10^4-10^5 个细胞。

（2）贴壁细胞：吸弃培养液，用 PBS 或 HBSS 轻柔清洗 1 次；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；立即加入含血清的完全培养基终止消化；将细胞悬液转移至离心管，1000 rpm 室温离心 5 min，吸弃上清；用 PBS 或 HBSS 重悬并计数；取 5×10^4-10^5 个细胞，1000 rpm 室温离心 5 min，吸弃上清。

2、细胞染色：将 1 mL Fluo-20 AM 染色工作液加入细胞中，37℃ 避光孵育 30 min，孵育时间可在 10-60 min 内调整。

3、洗涤：孵育结束后 1000 rpm 室温离心 5 min 收集细胞，小心吸弃含染料的上清液；用 PBS 或 HBSS 轻柔重悬细胞洗涤 1 次；末次洗涤后彻底吸净上清，加入 500 μL PBS 或 HBSS 重悬，制成流式上机样品。

4、上机检测：染色完成后 1 h 内进行检测，以保证荧光信号稳定；用流式细胞仪在预设检测通道下进行分析；先用未染色空白对照调节电压，使细胞群位于坐标系左下角；再检测对照组与实验组，确认实验体系成立；最后检测实验样品，记录并分析细胞平均荧光强度。

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。

四、方案四：荧光酶标仪检测（适用于悬浮细胞与贴壁细胞）

1、接种培养：将细胞接种于 96 孔黑色多孔板中，每孔细胞数控制在 100-10000 个，通常以 2000-5000 个为宜。

2、洗涤：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后，用 PBS 或 HBSS 洗涤 1 次。

3、细胞染色：加入 100 μL Fluo-20 AM 染色工作液，37℃ 避光孵育 30 min，孵育时间可在 10-60 min 内调整。

4、洗涤：孵育结束后 1000 rpm 室温离心 5 min 收集细胞，小心吸弃含染料的上清液；加入 PBS 或 HBSS 洗涤 1 次以降低背景；末次洗涤后彻底吸净上清，加入 100 μL PBS 或 HBSS 重悬，制成待测样品。

5、荧光酶标仪检测：在荧光酶标仪预设条件下检测，通过比较对照组与处理组的相对荧光单位（RFU），评价药物刺激效果。

结果判读

1、定性分析（荧光显微镜）：当药物或其他处理使胞内 Ca^{2+} 浓度升高时，Fluo-20 AM 标记细胞的绿色荧光强度明显增强，可据此判断钙信号的变化趋势。观察时应保持实验组与对照组的细胞密度、曝光参数一致，以便对比。

2、定量分析（流式细胞仪）：以细胞平均荧光强度反映胞内 Ca^{2+} 水平，比较对照组与处理组的荧光强度差异，即可评价处理因素对胞内钙浓度的影响；条件允许时可用离子霉素等钙离子载体设置阳性对照。

常见问题与解答

1、问：检测不到荧光或荧光值偏低？答：可能为细胞密度不足或探针加载不充分，可适当增加细胞密度、延长孵育时间（最长 60 min），并确认染色工作液是否现用现配、操作过程是否避光。

2、问：染色后发现细胞死亡较多？答：首先应评估染料浓度与处理时间是否合适。Fluo-20 AM 相对安全，但过高的浓度或过长的染色时间仍可能造成细胞损伤，建议降低工作液浓度或缩短孵育时间，并在实验过程中密切观察细胞状态。

3、问：背景荧光偏高？答：染色后须充分洗涤以去除残留探针；吸除培养液及缓冲液时尽量使用真空泵，并注意去除含酚红或血清的培养基。

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，避免反复冻融。

2、荧光染料均存在淬灭问题，整个操作过程请尽量注意避光。

3、染色工作液须现用现配、避光配制，不可冻存；Pluronic F-127 会降低探针稳定性，仅可在配制工作液时加入，不可加入储液。

4、本产品仅限于科研用途，不得用于临床诊断或治疗，不得存放于普通住宅内。

5、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作，并遵循所在实验室的常规安全规定。