

活/死细胞染色试剂盒 (Calcein AM • PI) 说明书

产品编号: BTN140632

规格: 1000T

产品及特点:

钙黄素 AM (Calcein AM) 是一种可对活细胞进行荧光标记的优良染色试剂, 其能够轻易穿透活细胞膜。在钙黄素 AM 存在活细胞内时, 其特点就是由于胞内无所不在的脂酶活性作用, 由几乎无荧光、具有细胞膜透性的钙黄素 AM 生成具有强烈荧光信号的绿色荧光物质 (Ex/Em: 495 nm/520 nm)。

而对于受损的细胞膜来说, 碘化丙啶 (PI) 可以进入细胞, 与核酸结合, 荧光信号从而放大 40 倍, 产生一个明亮的红色荧光信号的死细胞 (Ex/Em: 530nm/620 nm)。本产品是基于 Calcein AM 和 PI 的活死细胞染色试剂盒, 通过检测细胞内酯酶活性和质膜完整性两个方面反映细胞活力, 可用于动物细胞样品的活力和毒性检测。本产品具有下列特点:

1. 即开即用, 不需要专门花时间准备各种成分, 操作简便、快捷、安全, 灵敏度高。
2. Calcein AM 是最理想的活细胞的荧光探针, 其细胞毒性很低。
3. 本试剂盒适用于荧光显微镜、荧光多孔板、扫描仪、流式细胞仪以及其他荧光检测系统。
4. 本试剂盒可以应用于大多数的真核哺乳动物细胞, 包括贴壁细胞核某些组织, 但不适用于细菌、酵母。

规格及成分:

成分	规格
溶液 A, 4 mM in DMSO	100 μ l
溶液 B, 16 mM in DMSO	100 μ l
说明书	1 份

保存条件:

低温运输, -20°C 避光保存, 有效期半年。

自备试剂:

PBS 溶液、0.1%皂角苷或 0.1-0.5%的毛地黄皂苷。

使用方法:

一、荧光显微镜操作

1. 制备混合工作液 (2 μ M 溶液 A, 8 μ M 溶液 B)

注: 溶液 A 和溶液 B 的浓度选择依据所用的细胞类型不同而有区别, 应当根据具体细胞调节染料浓度以得到最佳效果。一般来说, 满足信号足够的前提下, 尽可能选择最低浓度的染料剂量。溶液 A 和溶液 B 的推荐浓度范围为 0.1~10 μ M。

- 1) 取出溶液 A 和溶液 B 原液, 室温平衡 30 分钟。
- 2) 取 5 μ L 16 mM 的溶液 B 原液加入至 10 mL 的自备的 PBS 溶液中, 涡旋震荡混匀, 得到 8 μ M 的

溶液 B 工作液。

- 3) 将 5 μL 4 mM 的溶液 A 原液加入到上一步的 10 mL 的溶液 B 工作液中，涡旋，确保充分混匀。
- 4) 所得到的混合工作液（2 μM 溶液 A，8 μM 溶液 B）可直接用于染色细胞。

注意：溶液 A 的水溶液容易发生水解，应当当天用完。

2. 准备细胞，开展实验

- 1) 贴壁细胞可以用培养瓶或者小室爬片。非贴壁细胞同样可以。
- 2) 正式开始实验前，洗涤细胞，确保除去培养基中含有的活性酯酶。
用 PBS 温和洗涤贴壁细胞，去除上清。非贴壁细胞用离心管收集离心，PBS 洗涤去除上清。
- 3) 加入足量的上述混合工作液，保证没过单层细胞。
- 4) 室温孵育 30–45 分钟。
- 5) 对于贴壁细胞，吸出染色工作液终止孵育。加入 10 μL 的 PBS 至干净的载玻片，覆以盖玻片，以指甲油密封，防止水份蒸发。
- 6) 荧光显微镜下观察标记细胞。

3. 光学滤光片选择

Calcein AM 和 PI 可以在传统的荧光长通道滤光器中被观察到，两者可以被分开观察到。各种滤光器的列表如下：

- 1) 长波和双发射滤波器有助于 Calcein AM 和 PI 同时观看：

Omega Filters: XF25, XF26, XF115

Chroma Filters: 11001, 41012, 71010

- 2) 单独观察 Calcein AM 的滤波器

Omega Filters: XF22, XF23

Chroma Filters: 31001, 41001

- 3) 单独观察 PI 的滤波器

Omega Filters: XF32, XF43, XF102, XF108

Chroma Filters: 31002, 31004, 41002, 41004

二、荧光微孔板操作

1. 制备混合工作液（2 μM 溶液 A，8 μM 溶液 B）

- 1) 取出溶液 A 和溶液 B 原液，室温平衡 30 分钟。
- 2) 取 5 μL 16 mM 的溶液 B 原液加入至 10 mL 的自备的 PBS 溶液中，涡旋震荡混匀，得到 8 μM 的溶液 B 工作液。
- 3) 将 5 μL 4 mM 的溶液 A 原液加入到上一步的 10 mL 的溶液 B 工作液中，涡旋，确保充分混匀。
- 4) 所得到的混合工作液（2 μM 溶液 A，8 μM 溶液 B）可直接用于染色细胞。
- 5) 如需单独计算活、死细胞比例请单独配置 1mL 2 μM 的溶液 A 工作液和 1mL 8 μM 的溶液 B 工作液。

2. 准备细胞，开展实验（每孔细胞的最低监测值大约为 200–500 个，每孔最大常用细胞检测值约为

106。)

1) 培养贴壁或者悬浮细胞。按照您的实验要求处理细胞。准备活细胞与死细胞的对照样品。死细胞可以用自备的 0.1%皂角苷或 0.1-0.5%的毛地黄皂苷处理 10 分钟得到。

2) PBS 洗涤细胞。对于贴壁细胞，加入 100 μ L PBS 覆盖孔底；对于悬浮细胞，可以直接在离心管中操作，再以 PBS 重悬。将含有细胞的缓冲液，每孔 100 μ L 加入到微孔板各孔。细胞样品的洗涤注意要确保除去培养基中的活性酯酶，否则会引起背景。

3. 使用荧光酶标仪测量荧光（为了获得最佳的灵敏度，所使用的酶标仪，建议采用带光学过滤器的信号激发器，可保证不互相干扰。Calcein AM 可以用（485 \pm 10 nm）的荧光光学滤光器激发，而 PI 可以用（530 \pm 12.5 nm）的典型罗丹明光学滤光器来兼容。而发射光信号可以通过滤光器得到很好的分开采集，Calcein AM 530 \pm 12.5 nm，PI 645 \pm 20 nm。）

1) 如有需要，准备对照实验样本的死活细胞百分比。如是测量死活细胞的相对增量，那么对照可以不用设置。对照样品可以有：无细胞对照（G、H），活细胞对照（E、F）和死细胞对照（C、D）。

2) 每孔分别加入 100 μ L 的溶液 A 和溶液 B 工作液，终体积为 200 μ L，每孔含 1 μ M 的溶液 A 和 2 μ M 的溶液 B 的终浓度。室温孵育 30-45 分钟。

3) 用合适的激发和发射滤光片收集样本数据。

A. 645 nm，实验组细胞样本，同时标有 Calcein AM 和 PI=F(645) sam

B. 530 nm，实验组细胞样本，同时标有 Calcein AM 和 PI=F(530) sam

C. 645 nm，死细胞样本，只标有 PI=F(645) max

D. 645 nm，死细胞样本，只标有 Calcein AM=F(645) min

E. 530 nm，活细胞样本，只标有 PI=F(530) min

F. 530 nm，活细胞样本，只标有 Calcein AM=F(530) max

G. 530 nm，无细胞样本或不加染料=F(530) 0

H. 645 nm，无细胞样本或者不加染料=F(645) 0

4. 结果分析

活细胞和死细胞的相对数量可以表示为在 530 nm 下（在更长波长下荧光信号有限）的百分比或细胞绝对数，死细胞的特点是在 600nm 下有强荧光信号，而 530 nm 处有弱荧光信号。在计算结果之前，可以将背景的荧光读数 F（530）0 和 F（645）0 分别从 F 值 530 和 645 中减去。

活细胞的百分比可以定义为荧光读数的计算：

$$\% \text{Live Cells} = \frac{B - E}{F - E}$$

死细胞的百分比可定义为荧光读数的计算：

$$\% \text{Dead Cells} = \frac{A - D}{C - D}$$

5. 计算绝对活死细胞数量

设置细胞数与荧光读数（530 nm）和（645 nm）的标准曲线，荧光强度与样本中的细胞数成线性正相关。

三、流式细胞仪

本试剂盒可以方便地应用于流式细胞仪。悬浮细胞或经胰酶消化的贴壁细胞，可以参见荧光显微镜染色操作步骤。对于流式的检测分析，通过 PBS 离心洗涤细胞再以 PBS 重悬，反复操作 2 次之后，以溶液 A 和溶液 B 的工作液孵育悬浮细胞 30-45 分钟，即可上机检测。