

Calcein-AM/PI Double Stain Kit

Calcein-AM/PI 活死细胞双染试剂盒

产品简介

Calcein-AM/PI Double Stain Kit 活死细胞双染试剂盒主要通过两种染料 Calcein-AM 和 PI 对细胞进行活死鉴别。

Calcein-AM 是一种对活细胞进行荧光标记的细胞染色试剂，发绿色荧光（Ex=490 nm, Em=515 nm）。它穿透细胞膜进入细胞后能够被细胞内的酯酶剪切形成 Calcein，从而被滞留在细胞内，发出强绿色荧光。因其在传统的 Calcein（钙黄绿素）基础上引入乙酰甲氧基甲酯（AM）基团，增加了疏水性，它能够更轻易穿透活细胞膜。与其它同类试剂（如 BCECF-AM 和 CFDA）相比，由于 Calcein-AM 细胞毒性极低，是最适用于活细胞染色的荧光探针，且不会抑制任何细胞功能，如细胞增殖和淋巴球的趋化性。死细胞缺乏酯酶活性，因此，Calcein-AM 常与死细胞荧光探针如碘化丙啶（PI）等联合使用，同时进行活细胞和死细胞的荧光双重染色。碘化丙啶（Propidium iodide, PI）不能穿过活细胞的细胞膜，仅能穿过死细胞膜的无序区域而到达细胞核，并嵌入细胞的 DNA 双螺旋从而产生红色荧光（Ex=535 nm, Em=617 nm）。Calcein 和 PI-DNA 都可被 490 nm 激发，因此可用荧光显微镜同时观察活细胞和死细胞。而用 545 nm 激发，仅可观察到死细胞。

根据我司优化的实验体系，单次就 200 μ L 细胞悬液进行染色，C331308E 和 C331308S 分别可以做 500 次和 1000 次检测。

产品规格

货号	C331308E/C331308S
规格	500 T/1000 T

组分信息

组分编号	组分名称	C331308E	C331308S
C331308-A	Calcein-AM Solution (2 mM)	50 μ L	50 μ L $\times$ 2
C331308-B	PI Solution (1.5 mM)	150 μ L	150 μ L $\times$ 2
C331308-C	10 $\times$ Assay Buffer	50 mL	100 mL

储存条件

冰袋运输；其中 A 组分和 B 组分需-20 $^{\circ}$ C 避光干燥保存，C 组分-20 $^{\circ}$ C 保存，经常使用可放在 4 $^{\circ}$ C 保存。一年有效。

注意事项

1. 由于 Calcein-AM 对湿度非常敏感，Calcein-AM 溶液每次取完需要量后，必须紧紧密封盖子。建议根

据单次用量，分装密封保存。Calcein-AM 工作液必须现配现用。

2. 碘化丙啶 (PI) 有一定的致癌性，操作时一定要注意防护。若接触到皮肤，需要立即用自来水清洗。
3. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
4. 本产品仅用于科研。

使用说明

1. 工作液的配制

1.1 1×Assay Buffer（反应缓冲液）的配制

从冰箱内取出 10×Assay Buffer，根据单次用量于无菌条件取出适量，用去离子水 (dH₂O) 做 10 倍稀释以得到 1×Assay Buffer。

1.2 1×染色工作液的配制

- 1) 先将低温保存的 Calcein-AM 溶液 (2 mM) 和 PI 溶液 (1.5 mM) 回到室温 20-30 min。

注意：第一次使用可对母液进行分装，以减少反复冻融次数。

- 2) 取 5 μL Calcein-AM 溶液 (2 mM) 和 15 μL PI 溶液 (1.5 mM) 加入 5 mL 1×Assay Buffer，充分混匀。此时得到 Calcein-AM 的工作液浓度为 2 μM，PI 的工作液浓度为 4.5 μM。由于不同细胞系的最佳染色条件不同，初次实验建议做梯度实验，以确定 Calcein-AM 和 PI 的最适浓度。梯度筛选的原则为使用最低的探针浓度得到最好的荧光结果。加入 500 μL CFDA-SE 溶剂到 1 管 CFDA-SE 荧光探针中进行溶解，充分混匀即得到 1000× 的储存液。

【注意】该储存液最好在 1 个月内使用完毕，最长不超过 2 个月。剩余储存液请务必分装后于 ≤ -20℃ 避光干燥保存，避免反复冻融，-70℃ 避光保存可适当延长保存周期。

2. 染色步骤

- 1) 对于贴壁细胞，先用细胞刮刀或者胰酶-EDTA 消化细胞，之后离心收集细胞 (1000 rpm, 3 min)。对于悬浮细胞，直接离心 (1000 rpm, 3 min) 收集细胞。
- 2) 去上清，用 1×Assay Buffer 充分清洗细胞 2~3 次，以充分去除残留的酯酶活性。
- 3) 用 1×Assay Buffer 制备细胞悬液，使其密度为 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 细胞/mL。
- 4) 取 100 μL 染色工作液加入 200 μL 细胞悬液内，混匀，37℃ 孵育 15 min。注意：如果需要，可延长孵育时间至 30 min。
- 5) 荧光显微镜下使用 490±10 nm 激发滤片同时检测活细胞（黄绿色荧光）以及死细胞（红色荧光）。另外，使用 545 nm 的发射滤片仅能观察到死细胞。也可以直接在荧光酶标仪下进行检测。

【注意】可以使用以下方法来优化得到两种荧光染料的最佳工作浓度。

- a) 用 0.1% 皂素或者 0.1-0.5% 地高辛孵育细胞 10 min，或者用 70% 乙醇孵育细胞 30 min，制备死细胞。
- b) 用 0.1-10 μM 的 PI 溶液进行死细胞染色，以得到仅对细胞核染色而不会对细胞质染色的最佳工作浓度。
- c) 用 0.1-10 μM 的 Calcein-AM 进行死细胞染色，以得到不会对细胞质染色的最佳工作浓度。然后用此浓度进行活细胞染色，去观察是否活细胞能被染色。