

Calcein-AM/PI Double Stain Kit

Calcein-AM/PI 活细胞/死细胞双染试剂盒

产品信息

| 产品名称 | 产品编号 | 规格 |
|--------------------------------|-----------|--------|
| Calcein-AM/PI Double Stain Kit | 40747ES76 | 500 T |
| Calcein-AM/PI 活细胞/死细胞双染试剂盒 | 40747ES80 | 1000 T |

产品描述

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）。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，使其能够轻易穿透活细胞膜。一旦进入细胞后，Calcein-AM（本身不发荧光）被细胞内的酯酶剪切形成膜非渗透性的极性分子 Calcein，从而被滞留在细胞内并发出强绿色荧光。与其它同类试剂（如 BCECF-AM 和 CFDA）相比，由于 Calcein, AM 细胞毒性极低，是最适合用于活细胞染色的荧光探针，而且不会抑制任何的细胞功能，如增殖和淋巴球的趋化性。

由于死细胞缺乏酯酶，Calcein-AM 仅用于对活细胞的细胞生存能力测试和短期标记。因此，Calcein-AM 常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），因此 PI 仅对死细胞染色。由于 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。

本试剂盒的工作原理就在于 Calcein-AM 和 PI 的双重染料，来进行活细胞和死细胞的双重染色标记，从而进行活细胞和死细胞水平的分析。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，分别可以做 500 次（CAS: 40747ES76）和 1000 次（CAS: 40747ES80）检测。

产品组分

| 编号 | 组分 | 产品编号/规格 | |
|---------|----------------------------|-------------------|------------------------|
| | | 40747ES76 (500 T) | 40747ES80 (1000 T) |
| 40747-A | Calcein-AM Solution (2 mM) | 50 μ L | 50 μ L \times 2 |
| 40747-B | PI Solution (1.5 mM) | 150 μ L | 150 μ L \times 2 |
| 40747-C | 10 \times Assay Buffer | 50 mL | 100 mL |

运输和保存方法

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。

使用方法

1. 工作液的配制

1.1 1 \times Assay Buffer（反应缓冲液）的配制

从低温冰箱内取出 10 \times Assay Buffer，根据单次用量无菌条件取出适量，用去离子水（dH₂O）做 10 倍稀释以得到 1 \times Assay Buffer。

1.2 1 \times 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 \times 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。

【注意】: 由于 Calcein-AM 的稳定性比较差, 此染色工作液必须现配现用, 并且在当天用完。

2. 染色步骤

2.1 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。

2.2 去上清, 用 1 \times Assay Buffer 充分清洗细胞 2~3 次, 以充分去除残留的酯酶活性。

2.3 用 1 \times 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。

2.4 取 100 μL 染色工作液加入 200 μL 细胞悬液内, 混匀, 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 15 min。

【注意】: 如果需要, 可延长孵育时间至 30min。

2.5 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使用合适的滤片进行检测。

【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。

- 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, 从而制备死细胞;
- 用 0.1-10 μM 的 PI 溶液进行死细胞染色, 以得到仅仅对细胞核染色, 而不会对细胞质染色的最佳工作浓度。
- 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。

注意事项

- 由于 Calcein-AM 对湿度非常敏感, 若是 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。
- 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。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。