

# 细胞活力(活死细胞染色)检测试剂盒

## (CalceinAM, PI法, 适用于FACS、FM)

产品货号: 26642

产品规格: 500T/1000T

### 产品简介:

细胞活力(活死细胞染色)检测试剂盒(Calcein-AM, PI法, 适用于FACS、FM)通过同时检测细胞内酯酶活性和质膜完整性, 提供一种判断细胞活力的荧光染色方法。

本试剂盒内含有两种染料: 钙黄绿素-AM (Calcein-AM) 和碘化丙啶 (PI), Calcein-AM可透过活细胞膜, 通过活细胞内的酯酶作用由几乎无荧光的Calcein-AM脱去AM基团生成具有强烈荧光信号的绿色荧光物质Calcein (Ex/Em: 495nm/515nm), 因此活细胞可被检测到绿色荧光。另一方面PI不能透过活细胞的细胞膜, 但当细胞膜受损时PI可进入到细胞内并与核酸结合, 产生明亮的红色荧光 (Ex/Em: 535nm/617nm), 因此死细胞会被检测到红色荧光。用490nm激发时可用荧光显微镜同时观察活细胞和死细胞; 而用545nm激发时仅可观察到死细胞。

本试剂盒适用于荧光显微镜、流式细胞仪、荧光酶标仪等荧光检测系统。本试剂盒可以应用于大多数的真核哺乳动物细胞, 但不适用于细菌和真菌。

### 产品组成:

产品名称	500T	1000T	保存条件
Calcein-AM Solution (4mM in DMO)	50 $\mu$ L	100 $\mu$ L	-20 $^{\circ}$ C, 避光
PI Solution (16mM in DMSO)	50 $\mu$ L	100 $\mu$ L	-20 $^{\circ}$ C, 避光
Assay buffer	500mL	500mL	2-8 $^{\circ}$ C

### 操作步骤:

#### (一) 确定染色试剂的最佳浓度(可选)

由于不同细胞种类、细胞浓度的染色条件不同, 建议通过以下的操作自行摸索一下Calcein-AM和PI的最适浓度:

1. 制备死细胞: 细胞在0.1%皂苷或0.1-0.5%毛地黄皂苷中培养10min或在70%乙醇中培养30min。
2. 用0.1-10 $\mu$ M PI工作液染死细胞, 以便找到仅针对细胞核染色而不对细胞质染色的PI浓度。
3. 用0.1-10 $\mu$ M Calcein-AM工作液染死细胞, 以便找到不对细胞质染色的Calcein-AM浓度, 再以此浓度的Calcein-AM对活细胞染色以检验活细胞是否能被染色。

#### (二) 染色工作液的配制(以2 $\mu$ M Calcein-AM, 8 $\mu$ M PI为例)

Calcein-AM和PI推荐浓度范围为0.1~10 $\mu$ M, 可以根据步骤一确定的最佳浓度来配制工作液。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。

1. 取出Calcein-AM Solution和PI Solution, 室温平衡30min。
2. 在10mL的Assay buffer中加入5 $\mu$ L的PI Solution和5 $\mu$ L的Calcein-AM Solution, 涡旋震荡混匀制成工作液, 此时Calcein-AM的浓度为2 $\mu$ M, PI的浓度为8 $\mu$ M。
3. 所得到的的工作液(2 $\mu$ M Calcein-AM和8 $\mu$ M PI)可直接用于染色细胞。

#### (三) 染色步骤:

对于贴壁细胞:

1. 可以将细胞接种至细胞培养板、微孔板或者制作成细胞爬片。悬浮细胞也可制作成细胞爬片。
2. 按照实验要求处理细胞后, 用PBS温和洗涤细胞2-3次, 确保除去培养基中含有的活性酯酶。
3. 加入足量的染色工作液, 保证没过单层细胞。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

QQ: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

4. 在37°C孵育15~30min。

**对于悬浮细胞：**

1. 按照实验要求处理细胞后，1,000rpm，3min离心收集细胞（ $10^4$ - $10^5$ cells）。
2. 去除上清，PBS重悬洗涤2-3次，确保除去培养基中含有的活性酯酶。
3. 用100 $\mu$ L染色工作液重悬细胞，使细胞密度大约为 $10^5$ - $10^6$ cells/mL。
4. 在37°C孵育15~30min。

**（四） 荧光检测和分析：**

**荧光显微镜检测：**

1. 对于贴壁细胞：对于培养板孔中的细胞：吸出染色工作液终止孵育，用PBS温和洗涤细胞2-3次，加入足量的Assay buffer，保证没过单层细胞，随后置于荧光显微镜下观察。对于细胞爬片：在干净的载玻片上滴加10 $\mu$ L的Assay buffer，覆以细胞爬片。可以以指甲油密封，防止水分蒸发。
2. 对于悬浮细胞：在干净的载玻片上滴加 10 $\mu$ L 的已染色的细胞溶液，覆以盖玻片。可以以指甲油密封，防止水分蒸发。
3. 使用荧光显微镜在490 $\pm$ 10nm激发波长下同时观察活细胞（黄绿色荧光）和死细胞（红色荧光）。另外使用545nm激发波长单独观察死细胞。

**荧光酶标仪检测：**

1. 按照实验要求准备对照样本，与实验组样本一起按照步骤二、三操作。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）。死细胞对照可以按照步骤一方法制备。如果测量死活细胞的相对增量，那么对照可以不用设置。

编号	组别	检测发射波长	染色液	测得结果
A	实验组细胞样品	645nm	Calcein AM/PI	F(645) <sub>sam</sub>
B	实验组细胞样品	530nm	Calcein AM/PI	F(530) <sub>sam</sub>
C	死细胞对照样品	645nm	PI	F(645) <sub>max</sub>
D	死细胞对照样品	645nm	Calcein AM	F(645) <sub>min</sub>
E	活细胞对照样品	530nm	PI	F(530) <sub>min</sub>
F	活细胞对照样品	530nm	Calcein AM	F(530) <sub>max</sub>
G	无细胞样品	530nm	Calcein AM/PI	F(530) <sub>0</sub>
H	无细胞样品	645nm	Calcein AM/PI	F(645) <sub>0</sub>

2. 贴壁细胞可直接检测。悬浮细胞：将染色好的细胞悬液以每孔100 $\mu$ L加入至微孔板各孔。【注：每孔细胞最低检测值大约为200-500个，每孔最大常用细胞检测值约为 $10^6$ 个。】
3. 使用荧光酶标仪以合适的激发和发射滤光片收集样本数据。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可以用（490 $\pm$ 10nm）的荧光光学滤光器激发，而PI可以用（530 $\pm$ 12.5nm）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是530 $\pm$ 12.5nm，PI是645 $\pm$ 20nm。
4. 结果分析与计算：

死细胞的特点是在645nm下有强荧光信号，而530nm处有弱荧光信号。在计算结果之前，可以分别从F(530)和F(645)的所有值中减去背景荧光读数F(530)<sub>0</sub>和F(645)<sub>0</sub>。活死细胞的百分比可以定义为荧光读数的计算：

$$\text{Live Cells}\% = \frac{F(530)_{\text{sam}} - F(530)_{\text{min}}}{F(530)_{\text{max}} - F(530)_{\text{min}}}$$

$$\text{Dead Cells}\% = \frac{F(645)_{\text{sam}} - F(645)_{\text{min}}}{F(645)_{\text{max}} - F(645)_{\text{min}}}$$

绝对活死细胞数量的计算：制作细胞数与荧光读数（530nm和645nm）的标准曲线，荧光强度与样本中的细胞数成线性正相关。

**流式细胞仪分析：**

悬浮细胞或经胰酶消化的贴壁细胞，可以类同步骤二、三的悬浮细胞染色操作。染色后的细胞悬液可直接上机检测。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

#### 注意事项:

1. 本试剂盒中的Calcein-AM Solution和PI Solution量很少,有可能会粘在盖子或管壁上,开封前请先适当离心至管底。
2. 由于Calcein-AM储存液对湿度非常敏感,请在每次使用后紧紧密封Calcein-AM储存液的盖子。如果不能一次用完,建议根据单次用量分装密封保存。例如分装成10 $\mu$ L/管,用封口膜封口,并用铝箔纸包裹,放在一个密闭性能好的塑料袋中,并放入一包干燥剂,在-20 $^{\circ}$ C密封避光保存。
3. Assay buffer应在无菌环境中取用,否则可能会被微生物污染而影响使用效果,甚至无法继续使用。染色工作液必须现配现用,配制好的工作液请在当天使用。
4. 荧光染料均存在淬灭问题,保存和使用本试剂盒的过程中请尽量注意避光,以减缓荧光淬灭。建议染色后尽量当天完成检测。
5. 碘化丙啶对人体有刺激性,操作时请小心,并注意适当防护以避免直接接触人体或吸入体内。
6. 为了您的安全和健康,操作时请穿着实验服并佩戴一次性手套。

#### 有效期:

Assay buffer 2-8 $^{\circ}$ C保存,其余组分-20 $^{\circ}$ C避光密闭保存,本试剂盒自生产之日起12个月有效。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址:郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com