

动物活/死细胞检测试剂盒 (Calcein AM, PI)

(本试剂盒仅供科研使用)

产品包装

-20°C 避光保存。注意 Calcein AM 容易水解, 需密封干燥保存, 稀释工作液需当天配制。

产品编号	组分名称	30T	150T
YFXCA09	4mM Calcein AM (无水 DMSO)	10 μ L	50 μ L
	1.5mM Propidium (PI in H ₂ O)	50 μ L	250 μ L

注: 本试剂盒次数是按照流式细胞仪一个样品使用 0.5 mL 工作液规定的。

一、产品说明

动物细胞活力/毒性检测试剂盒 (Calcein AM, PI) 是一种检测动物细胞死活的双荧光染色试剂盒。试剂盒内的两种探针可分别通过测定细胞内酯酶活性和质膜完整性从而反映细胞活力。

本试剂盒可用于荧光显微镜、流式细胞仪、酶标仪以及其他荧光检测系统。本试剂盒可应用于大多数的真核哺乳动物细胞, 包括贴壁细胞核的某些组织, 但不适用于真菌和酵母。本试剂盒与相同用处的台盼蓝相比, 更快捷安全且灵敏度更高。

二、荧光显微镜检测

1、准备工作液

准备 2 μ M Calcein AM 和 4.5 μ M PI 的染色工液: 取出 Calcein AM 和 PI 原液, 恢复至室温。将 30 μ L 1.5mM PI 和 5 μ L 4 mM Calcein AM 与 10mL PBS 或其他无血清缓冲液或培养基混合, 涡旋混匀。上述工作液可直接用于细胞染色。

注: Calcein AM 的水溶液易水解, 应当天用完。Calcein AM 和 PI 的浓度选择依据所用细胞类型不同而有所区别, 推荐浓度范围为 0.1~10 μ M。

2、准备细胞

2.1 对于贴壁细胞, 可用 1 \times PBS 清洗 2~3 次后进行染色。对于悬浮细胞, 250-1000 \times g 室温离心 5 min, 收集细胞染色。

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

2.3 对于贴壁细胞, 加入足够量的 Calcein AM/PI 染色工作液。对于悬浮细胞, 加入适量的染色工作液, 使细胞密度控制在 1-5 \times 10⁵ /mL。

2.4 室温避光孵育 15 min~20 min (如果工作液浓度较高或者孵育温度较高, 应适当的减少孵育时间)。

2.5 荧光显微镜下观察标记的细胞。

三、流式细胞仪检测

1、取出试剂, 恢复至室温。

2、准备 2 μ M Calcein AM 和 4.5 μ M PI 的染色工作液: 取出 Calcein AM 和 PI 原液, 恢复至室温。将 30 μ L 1.5 mM PI 和 5 μ L 4 mM Calcein AM 与 10 mL PBS 或其他无血清缓冲液或培养基混合, 涡旋混匀。上述工作液可直接于细胞染色。

3、用 1 \times PBS 充分清洗细胞 2~3 次。

4、用 0.5 mL 染色工作液悬浮细胞, 控制细胞密度为 1-5 \times 10⁵ /mL。

注: 推荐准备两管额外的细胞样品, 每管只加入一种染料 (Calcein AM 和 PI), 用于流式

单染的补偿调节; 另准备一管仅含 缓冲液 (该缓冲液与配制 Calcein AM 及 PI 检测工作液的缓冲液宜保持一致) 的细胞样品用作流式检测时的阴性对照。

5、 室温避光孵育 15-20 min。

6、 在 1-2 h 内, 通过流式细胞仪检测细胞活性。Calcein AM 可以由 488 nm 激光激发, 检测荧光发射光谱约在 530 nm 处, PI 发射光约在 617 nm 处。

注: 细胞圈门时, 注意排除细胞碎片, 使用单染管调节补偿, 双染管流式检测应获得两个相对独立的细胞群: 显示绿色荧光的活细胞群和红色荧光的死细胞群。

四、酶标仪检测

1、 在 96 孔黑色酶标板中培养适量的贴壁或悬浮细胞。

注: 用 1%的皂苷或 0.1-0.5%洋地黄皂苷处理细胞 10 min, 即可得到死细胞。

2、 准备 2 μ M Calcein AM 和 4.5 μ M PI 的染色工作液: 取出 Calcein AM 和 PI 原液, 使其恢复室温。将 30 μ L 1.5 mM PI 和 5 μ L 4 mM Calcein AM 与 10 mL PBS 或其他无血清 缓冲液或培养基混合, 涡旋混匀。

注: (1)10 mL 的染色液足够染色一个 96 孔板, 可根据实验需要调整染色液的体积。Calcein AM 和 PI 的浓度可在 0.1~10 μ M 之间摸索。(2) Calcein AM 的水溶液易水解, 应当天用完。

3、 用 1 \times PBS 充分清洗细胞, 以充分去除残留的酯酶活性。对于贴壁细胞, 每孔加 100 μ L PBS 清洗细胞。对于悬浮细胞, 加 100 μ L PBS 重悬细胞, 离心去上清。重复上述操作。

4、 每孔中加入 100 μ L PBS。

5、 每孔中加入 100 μ L 染色工作液, 使每孔总体积为 200 μ L, Calcein AM 的终浓度为 1 μ M, PI 的终浓度为 2.25 μ M。轻轻 摇晃培养板, 使液体均匀覆盖细胞。

6、 室温避光孵育 30~45 min。 注: 不同的细胞最佳孵育时间有所不同, 以 30min 作为初始孵育时间, 后续可以根据实际染色效果对染色时间进行适当调整 和优化, 以得到更加理想的染色效果。

7、 酶标仪检测。当酶标仪设置为 fluorescein 时, 可以检测 Calcein AM; 当酶标仪设置为 rhodamine 或 Texas Red 时, 可以检测 PI。根据光谱特性选择最佳的发射及激发波长。

注: 通过对比样品组与对照组测量的 Relative fluorescence values (RFU), 可以得出死细胞与活细胞数量的变化。下面也提供了另一种数据分析的方法。

五、计算某个区域活细胞与死细胞的比例

下面方法可计算出死细胞与活细胞的比例。需要的样品有死细胞对照组、活细胞对照组及待测样品组。1%的皂苷或 0.1- 0.5%洋地黄皂苷处理细胞 10 min, 即可得到死细胞。

1、 准备染色工作液及按上述步骤染色细胞。另外, 分别准备 1 mL 2 μ M Calcein AM 和 4 μ M PI 溶液, 按照下列指示来染色 对照组。对于下面组别的细胞或无细胞组, 需要保持细胞数量、检测工作液浓度、孵育时间和孵育温度的完全一致。

2、 样品组及对照组测量:

A. 样品组在 517 nm 的测量值, 记为 Calcein AM 和 PI=F(517)sam。

B. 样品组在 617 nm 的测量值, 记为 Calcein AM 和 PI=F(617)sam。

C. 死细胞 PI 单染对照组在 617 nm 的测量值, 记为 PI=F(617)max。

D. 死细胞 Calcein AM 单染对照组在 617 nm 的测量值, 记为 Calcein AM=F(617)min。

E. 活细胞 PI 单染对照组在 517 nm 的测量值, 记为 PI=F(517)min。

F. 活细胞 Calcein AM 单染对照组在 517 nm 的测量值, 记为 Calcein AM=F(517)max。

G. 没有细胞的空白对照孔（加染料或不加染料均可），517 nm 处的检测值记为 F(517)0。

H. 没有细胞的空白对照孔（加染料或不加染料均可），617 nm 处的检测值记为 F(617)0。

3、根据测量数据计算死细胞与活细胞的比例：

$$\% \text{ Live Cells} = (A - E) \div (F - E)$$

$$\% \text{ Dead Cells} = (B - D) \div (C - D)$$

注：所有的 F(517)和 F(617)都减去相应的 F(517)0 和 F(617)0。

六、确定某个区域活细胞与死细胞的比例

通过制作 517 nm 和 617 nm 处的荧光光谱标准曲线，可以确定死细胞与活细胞的数量，每个染料的荧光强度分别与样品中死细胞或活细胞的数量成直线型关系。

七、注意事项

- 1、使用前请将产品瞬时离心至管底，再进行后续实验。
- 2、酚红或血清对于本试剂盒的检测有一定的干扰。
- 3、荧光染料均存在淬灭问题，实验操作时请尽量注意避光，以减缓荧光淬灭。
- 4、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

附录

附表 1. EdU 培养基及染色反应液的参考使用量

	96 孔板	48 孔板	24 孔板	12 孔板	6 孔板	5.5 cm 小皿
EdU 培养基	100 μ L	150 μ L	200 μ L	500 μ L	1 mL	2 mL
染色反应液	100 μ L	150 μ L	200 μ L	500 μ L	1 mL	2 mL

附表 2. EdU 的参考孵育时间

细胞系	人胚胎细胞	酵母细胞	鼠成纤维细胞	人宫颈癌细胞	人胚肾细胞系	人神经细胞
细胞周期	-30 min	-3 h	-18 h	-21 h	-25 h	-5 d
孵育时间	5 min	20 min	2 h	2 h	2 h	1 d

注: (1) EdU 孵育时间取决于细胞周期, 一般为细胞周期的 1/10 至 1/5, 但大多数细胞系均可采用 2 h 孵育时间;
(2) 考虑到细胞培养基、温度、湿度、光线等其他因素的影响, 细胞周期会有所变化。

附表 3. 文献中 EdU 孵育浓度及时间

PubMed ID	Reference	Cell Line	Concentration	Time
18272492	Salic A, <i>et al.</i> PNAS.2008	NIH3T3, HeLa	10 nM-10 μ M	1 h
18521918	Cappella P, <i>et al.</i> Cytometry A.2008	HL-60, A2780, U2OS	1-10 μ M	0.5 h
18996411	Chehehasa F, <i>et al.</i> Neurosci Methods.2009	Neurospheres	1-20 μ M	24 h
19179371	Limsirichaikul S, <i>et al.</i> Nucleic Acids Res.2009	Primary fibroblasts	10 μ M	1, 2, 4 h
19253396	Warren M, <i>et al.</i> Dev Dyn.2009	Chick embryos	10 μ M-2 mM	4 h
19647746	Yu Y, <i>et al.</i> J Immunol Methods.2009	Spleen cells	50 μ M	24 h
19544417	Momcilovic O, <i>et al.</i> Stem Cells.2009	Human ES cells	10 μ M	0.5 h
20080700	Cinquin O, <i>et al.</i> PNAS.2010	emb-30	1 μ M	12 h
20025889	Han W, <i>et al.</i> Life Sci.2009	VSMC	50 μ M	2 h
20659708	Huang C, <i>et al.</i> J Genet Genomics.2010	ESC	50 μ M	2 h
21310713	Hua H, <i>et al.</i> Nucleic Acids Res.2011	Fission yeast strains	10 μ M	3 h
20824490	Lv L, <i>et al.</i> Mol Cell Biochem.2011	EJ cells	50 μ M	4 h
21248284	Yang S, <i>et al.</i> Biol Reprod.2011	GC cells	50 μ M	2 h
21227924	Zhang YW, <i>et al.</i> Nucleic Acids Res.2011	U2OS, HT29	30 μ M	1.5 h
21829621	Guo T, <i>et al.</i> PloS One. 2011	HIT-T15	50 μ M	4 h
21980430	Zeng T, <i>et al.</i> PloS One. 2011	MCF-10A	25 μ M	2 h
22012572	Ding D, <i>et al.</i> Int Orthop.2011	C3H10T1/2	10 μ M	24 h
22000787	Zeng W, <i>et al.</i> Biomaterials.2011	EPC	50 μ M	4 h
21913215	Xue Z, <i>et al.</i> J Cell Biochem.2011	SGC7901	25 μ M	24 h
22016038	Peng F, <i>et al.</i> Lasera Med Sci.2011	MSC	50 μ M	2 h
21878637	Li D, <i>et al.</i> J Biol Chem.2011	HCC	50 μ M	2 h