

## Meilun Calcein-AM/PI Double Staining Kit

### 细胞活力(活死细胞染色)检测试剂盒

### (Calcein AM,PI 法, 适用于 FACS、FM)

产品编号: MA0361 规格: 500T 1000T

#### 产品内容

产品组成	MA0361-500T	MA0361-1000T
Calcein AM Solution (4mM in DMSO)	0.05 ml	0.1 ml
PI Solution (16mM in DMSO)	0.05 ml	0.1 ml
说明书	1 份	1 份

#### 产品简介

美仑细胞活力(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。

#### 操作步骤

##### 一、(可选) 确定染色试剂的最佳浓度:

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 10 min 或在 70%乙醇中培养 30 min。
2. 用 0.1-10  $\mu\text{M}$  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  $\mu\text{M}$  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 $\mu\text{M}$ calcein AM, 8 $\mu\text{M}$ PI 为例):

Calcein-AM 和 PI 推荐浓度范围为 0.1~10 $\mu\text{M}$ ，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 30 分钟。
2. 在 10ml 的 PBS 中加入 5 $\mu\text{l}$  的 PI Solution 和 5 $\mu\text{l}$  的 Calcein AM Solution，涡旋震荡混匀制成工作液，此时 Calcein AM 的浓度为 2  $\mu\text{M}$ ，PI 的浓度为 8  $\mu\text{M}$ 。
3. 所得到的的工作液（2 $\mu\text{M}$  钙黄素 AM 和 8 $\mu\text{M}$  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。
4. 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15~30 分钟。

### 对于悬浮细胞:

1. 按照实验要求处理细胞后，1,000 rpm，3 min 离心收集细胞 (10<sup>4</sup>-10<sup>5</sup> 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  $\mu\text{l}$  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 15~30 分钟。

#### 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，加入 10 $\mu\text{l}$  PBS，覆以干净的盖玻片。对于细胞爬片：在干净的载玻片上滴加 10 $\mu\text{l}$  的 PBS，覆以细胞爬片。可以以指甲油密封，防止水份蒸发。对于悬浮细胞：在干净的载玻片上滴加适量的染色的细胞溶液，覆以盖玻片。可以以指甲油密封，防止水份蒸发。
2. 在荧光显微镜下使用  $490\pm 10$  nm 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 545 nm 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。

样品编号	样品名称（细胞种类）	检测发射波长	染色液	测得结果
A	实验组细胞样品	645 nm	Calcein AM/PI	$F(645)_{\text{sam}}$
B	实验组细胞样品	530 nm	Calcein AM/PI	$F(530)_{\text{sam}}$
C	死细胞对照样品	645 nm	PI	$F(645)_{\text{max}}$
D	死细胞对照样品	645 nm	Calcein AM	$F(645)_{\text{min}}$
E	活细胞对照样品	530 nm	PI	$F(530)_{\text{min}}$
F	活细胞对照样品	530 nm	Calcein AM	$F(530)_{\text{max}}$
G	无细胞样品	530 nm	Calcein AM/PI	$F(530)_0$
H	无细胞样品	645 nm	Calcein AM/PI	$F(645)_0$

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 $\mu\text{l}$  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±10nm）的荧光光学滤光器激发，而 PI 可以用（530±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±12.5nm，PI 是 645±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：

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

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

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。

## 保存条件

-20℃避光密闭保存，有效期1年。

## 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 10μl/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℃密封避光保存。

3. 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。