

Calcein-AM/PI活细胞/死细胞双染试剂盒

产品货号: R23246

产品规格: 500T

产品简介:

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 ($Ex=490nm$, $Em=515nm$)。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490nm激发, 因此可用荧光显微镜同时观察活 细胞和死细胞。而用545nm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, 可以做500次检测。

产品组成:

试剂名称	500T	保存条件
Calcein-AM Solution(2mM)	50 μ L	-20 $^{\circ}$ C, 避光
PI Solution (1.5 mM)	150 μ L	-20 $^{\circ}$ C, 避光
10 \times Assay Buffer	50mL	-20 $^{\circ}$ C, 经常使用可4 $^{\circ}$ C保存。

操作步骤(仅供参考):

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 (2mM)和PI溶液 (1.5mM) 回到室温20-30min。

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 μ l Calcein-AM溶液 (2mM)和15 μ l PI溶液 (1.5mM)加入5ml 1 \times Assay Buffer, 充分混匀。此时得到Calcein-AM的工作液浓度为2 μ M, PI的工作液浓度为4.5 μ M。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。

1. 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 (1000rpm, 3min)。对于悬浮细胞, 直接离心 (1000rpm, 3min) 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。



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

2.3 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。

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

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545nm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。

a) 用0.1%皂素或者0.1-0.5%地高辛孵育细胞10min，或者用70%乙醇孵育细胞30min，从而制备死细胞；

b) 用0.1-10 μ M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。

c) 用0.1-10 μ M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：

1. 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。
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。

保存条件：

-20 $^{\circ}$ C避光保存，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

QQ：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com