

本产品仅用于科研, 不可用于诊断

Calcein-AM/PI Double Staining Kit

活细胞/死细胞双染色试剂盒

RG100-116-500 规格: 500T

一、概述

Calcein-AM/PI细胞双染试剂盒内含两种染料: Calcein-AM和 Propidium Iodide (PI)。该试剂盒可在荧光显微镜下同时观察到在同一个细胞培养皿中的活细胞和死细胞。Calcein-AM可透过细胞膜, 通过活细胞内的酯酶作用脱去AM基团, 产生的Calcein发出强绿色荧光, 因此活细胞在荧光显微镜下可被检测到绿色荧光。另一方面PI可以通过受损的细胞膜进入到死细胞内并嵌入细胞的DNA双螺旋从而产生红色荧光, 因此死细胞会被检测到红色荧光。Calcein-AM水解产物Calcein的最大激发光波长为494 nm, 最大发射光波长为517 nm; PI-DNA复合物的最大激发光波长为535 nm, 最大发射光波长为617 nm。

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。

二、试剂盒组分

试剂盒组份	500 T
Calcein-AM Reagent (1000×)	50 ul
PI Stock Solution (1000×)	50 ul
Staining Buffer	50 ml

三、储存条件

-20°C避光保存, 有效期一年。

四、操作步骤

1. Calcein-AM/PI检测工作液的配制:

- 按照96孔板每孔100 μ l Calcein-AM/PI检测工作液的体系, 取出Calcein-AM Reagent和 PI Stock Solution, 室温平衡30 min。
- 在1 ml的检测缓冲液中加入1 μ l PI Stock Solution和1 μ l Calcein-AM Reagent, 涡旋震荡混匀制成工作液 (可检测10个样品)。所得到的工作液可直接用于染色细胞。

注1: 为得到比较理想的结果, 可根据细胞类型和实际染色效果对Calcein-AM (1000X)和 PI (1000X)在500-2000稀释倍数之间进行适当调整。

注2: 配制好的Calcein-AM/PI检测工作液必须一次使用完毕, 不能冻存。

2. 检测

2.1. 荧光显微镜检测:

- 接种培养。将细胞接种于96孔板等多孔板、细胞培养皿中或者细胞爬片上, 按实验设计对细胞进行一定处理。
- 洗涤 (选做)。对于贴壁细胞, 去除培养液, 用PBS洗涤细胞2遍; 对于悬浮细胞, 250-1000 \times g室温离心5 min, 吸除上清, 用PBS洗涤2遍。酚红或血清对于本试剂盒的检测有一定的干扰, 尽可能洗干净。
- 染色。加入适当体积的检测工作液。通常96孔板每孔加入100 μ l, 24孔板每孔加入250 μ l, 12孔板每孔加入500 μ l, 6孔板每孔加入1 ml。37°C避光孵育30 min。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。

d. 检测。孵育结束后, 在荧光显微镜下观察染色效果 (Calcein-AM为绿色荧光, Ex/Em=494/517 nm; PI为红色荧光, Ex/Em=535/617 nm)。

2.2. 流式细胞仪检测:

a. 细胞准备。贴壁细胞胰酶消化后用培养液重悬, 并用PBS洗涤2次; 悬浮细胞250-1000×g室温离心5 min, 弃上清, 用PBS洗涤2次。每个样品推荐的细胞用量为 1×10^6 个细胞。

b. 染色。对于上一步骤的 1×10^6 个细胞的沉淀, 加入1 ml Calcein-AM/PI检测工作液, 重悬为单细胞悬液。37°C避光孵育30 min。注: 需要准备好仅含缓冲液的细胞样品用作流式细胞仪检测时的阴性对照, 该缓冲液与配制Calcein-AM/PI检测工作液的缓冲液宜保持一致。同时准备两管额外的细胞样品, 每管只加入一种染料 (Calcein-AM或PI), 用于流式单染的补偿调节。

c. 检测。孵育完成后, 直接进行流式细胞仪检测, (Calcein-AM为绿色荧光, Ex/Em=494/517 nm; PI为红色荧光, Ex/Em=535/617 nm)。

2.3. 荧光酶标仪检测:

a. 按照实验要求准备对照样本, 无细胞对照组 (G、H), 活细胞对照组 (E、F) 和死细胞对照组 (C、D)。如果测量活死细胞的相对增量, 那么对照可以不用设置。除配制Calcein-AM/PI检测工作液外, 还需要配制单独的Calcein-AM检测工作液和PI检测工作液用于对照的检测。配制方法和稀释倍数与Calcein-AM/PI检测工作液的配制一致。

样品编号	组别	染色液	激发波长	发射波长	结果命名
A	样品组	Calcein-AM/PI	494nm	517nm	F(517)sam
B	样品组	Calcein-AM/PI	535nm	617nm	F(617)sam
C	死细胞组	PI	535nm	617nm	F(617)max
D	死细胞组	Calcein-AM	535nm	617nm	F(617)min
E	活细胞组	PI	494nm	517nm	F(517)min
F	活细胞组	Calcein-AM	494nm	517nm	F(517)max
G	无细胞组	Calcein-AM/PI	494nm	517nm	F(517)0
H	无细胞组	Calcein-AM/PI	535nm	617nm	F(617)0

b. 贴壁细胞可直接检测。对于悬浮细胞, 将染色好的细胞悬液以每孔100 μ 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, 每孔最大细胞检测值约为 1×10^6 个。

c. 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。

d. 结果分析与计算:

死细胞的特点是在617 nm下有强荧光信号, 而在517 nm处有弱荧光信号。在计算结果之前, 可以分别从F(517)和F(617)的所有值中减去背景荧光读数F(517)0和F(617)0。活死细胞的百分比可以定义为荧光读数的计算:

$$\text{Live Cells\%} = (F(517)\text{sam} - F(517)\text{min}) / (F(517)\text{max} - F(517)\text{min})$$

$$\text{Dead Cells\%} = (F(617)\text{sam} - F(617)\text{min}) / (F(617)\text{max} - F(617)\text{min})$$

绝对活死细胞数量的计算: 制作细胞数与荧光读数 (517 nm和617 nm) 的标准曲线, 荧光强度与样本中的细胞数成线性正相关。

五、注意事项

1. 由于本试剂盒中的Calcein-AM Reagent和PI Stock Solution量很少, 有可能会粘在盖子或管壁上, 开封前请先离心。

2. 由于Calcein-AM (1000×)在潮湿环境中容易分解, 首次使用时建议适当分装并-20°C密封保存。例如分装成10 ul/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, 在≤-20°C密封避光保存。
3. 配制好的染色工作液请在当天使用。
4. 培养液中的血清和酚红对Calcein-AM的染色可能有一定的影响, 使荧光背景增强, 建议在加入Calcein-AM检测工作液前适当洗涤细胞。
5. PI有疑似致癌性, 使用前应注意, 使用时请带好手套、口罩、防护眼镜等, 不要接触到或呼吸到。当PI不慎接触到皮肤时, 请立刻用大量水冲洗。