



## 活细胞/死细胞双染试剂盒(Calcein-AM/PI)

产品编号	产品名称	包装
DW0027	活细胞/死细胞双染试剂盒(Calcein-AM/PI)	500T

### 产品介绍

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 ( $\text{Ex}=490\text{ nm}$ ,  $\text{Em}=515\text{ nm}$ )。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 ( $\text{Ex}=535\text{ nm}$ ,  $\text{Em}=617\text{ nm}$ )，因此 PI 仅对死细胞染色。由于 Calcein 和 PI-DNA 都可被  $490\text{ nm}$  激发，因此可用荧光显微镜同时观察活细胞和死细胞。而用  $545\text{ nm}$  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。

### 产品组分

试剂名称	500T	1000T
Calcein-AM Solution (2 mM)	50 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$
PI Solution (1.5 mM)	150 $\mu\text{L}$	300 $\mu\text{L}$
10 $\times$ Assay Buffer	50mL	100mL

### 运输和保存方法

冰袋运输；其中 A 组分和 B 组分需  $-20^{\circ}\text{C}$  避光干燥保存，C 组分  $-20^{\circ}\text{C}$  保存，经常使用可放在  $4^{\circ}\text{C}$  保存。一年有效。

### 使用方法

#### 1. 工作液的配制

##### a. 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 ( $\text{dH}_2\text{O}$ ) 做 10 倍稀释以得到 1 $\times$ Assay Buffer。

##### b. 1 $\times$ 染色工作液的配制

1) 先将低温保存的 Calcein-AM 溶液 (2 mM) 和 PI 溶液 (1.5 mM) 回到室温 20-30 min。

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  $\mu\text{L}$  Calcein-AM 溶液 (2 mM) 和 15  $\mu\text{L}$  PI 溶液 (1.5 mM) 加入 5 mL 1 $\times$ Assay Buffer，充分混匀。此时得到 Calcein-AM 的工作液浓度为 2  $\mu\text{M}$ ，PI 的工作液浓度为 4.5  $\mu\text{M}$ 。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。

#### 2. 染色步骤



# 多沃生物

## Dowobio Biotechnology Co., Ltd



- 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（1000 rpm，3 min）。
- 对于悬浮细胞，直接离心（1000 rpm，3 min）收集细胞。
- 去上清，用 1×Assay Buffer 充分清洗细胞 2~3 次，以充分去除残留的酯酶活性。
- 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。
- 取 100  $\mu$ L 染色工作液加入 200  $\mu$ L 细胞悬液内，混匀，37°C 孵育 15 min。

注意：如果需要，可延长孵育时间至 30min。

f. 荧光显微镜下使用  $490 \pm 10$  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 545 nm 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。

### 注意事项

- 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。
- 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。
- EDTA 和酚红对本实验室有影响
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

### 本产品文章中的写法：

英文：Dowobio (Shanghai, China)

中文：上海多沃生物科技有限公司 Dowobio, 上海