

Calcein-AM/PI Double Staining Kit

死活细胞染色试剂盒

货号：100-116 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)。这个试剂盒可在 荧光显微镜下同时观察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 (Ex/Em: 495nm/515nm) 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 (Ex/Em: 535nm/617nm), 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 494nm, 最大发射光波长为 517nm; PI-DNA 复合物的最大激发光波长为 535nm, 最大发射光波长为 617nm。

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	500T	货号
Calcein-AM Reagent (1000X)	50ul	100-116A
PI Stock Solution (1000X)	50ul	100-116B
Staining Buffer	50ml	100-116C

三、储存条件：

-20°C 避光密闭保存, 有效期 1 年。冰袋运输。

四、操作步骤：

- 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 Solution 和 PI Solution, 室温平衡 30 分钟。
 - 在 1ml 的检测缓冲液中加入 1 μ l 的 PI Solution 和 1 μ l 的 CalceinAM Solution, 涡旋震荡混匀制成工作液。所得到的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。
- 荧光显微镜检测:

- a. 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。
- b. 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×g 室温离心 5min，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。
- c. 染色。加入适当体积的检测工作液。通常 96 孔板每孔加入 100μl，24 孔板每孔加入 250μl，12 孔板每孔加入 500μl，6 孔板每孔加入 1ml。37°C 避光孵育 30min。
- 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=494/517nm；PI 为红色荧光，Ex/Em=535/617nm)。

3. 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 5min，弃上清，用 PBS 洗涤 2 次。每个样品推荐的细胞用量为 10^6 个细胞。
- b. 染色。对于上一步骤的 10^6 个细胞的沉淀，加入 1ml Calcein AM/PI 检测工作液，重悬为单细胞悬液。37°C 避光孵育 30min。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=494/517nm；PI 为红色荧光，Ex/Em=535/617nm)。

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

- b. 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 100μl 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】
- 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 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)0 和 F(645)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（517nm 和 617nm）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 (1000X) 在潮湿环境中容易分解，首次使用时建议适当分装并 -20℃ 密封保存。例如分装成 10 μl/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℃ 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，请立刻用大量的水冲洗。