

活细胞/死细胞双染色试剂盒 Calcein-AM/PI Live/Dead Cell Double Stain Kit

产品编号	产品名称	包装规格
NBS2015-100T	活细胞/死细胞双染色试剂盒	100T
NBS2015-500T	活细胞/死细胞双染色试剂盒	500T
NBS2015-2500T	活细胞/死细胞双染色试剂盒	2500T

产品简介:

活细胞/死细胞双染色试剂盒 Calcein-AM/PI Live/Dead Cell Double Stain Kit 是一种非常便捷的基于 Calcein-AM (钙黄绿素)和 PI (碘化丙啶)双荧光染色法检测动物细胞死活的试剂盒, 荧光染色和检测仅需约 30 分钟。染色 30 分钟后就可进行后续的荧光显微镜拍照、流式分析或者荧光酶标仪定量等荧光检测和分析。本试剂盒的原理是两种探针可分别检测细胞内酯酶活性和细胞膜完整性, 从而反映细胞活性与细胞毒性。其中 Calcein AM 染色活细胞, 呈现绿色荧光; 而碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)染色死细胞, 呈现红色荧光。

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。

本试剂盒提供的 Calcein AM 和 PI 为 1000X 溶液, 使用非常便捷。并且这两种溶液都经过优化, 对大多数细胞都适用, 但为得到比较理想的结果, 也可根据细胞类型和实验实际情况对 Calcein AM 或 PI 在 500-2000 稀释倍数之间进行适当调整。同时, 本试剂盒提供了检测缓冲液, 该缓冲液可在一段时间内维持细胞的正常状态, 并给细胞提供一定的营养, 效果比 PBS 或 HBSS 更好。对于 96 孔板, 按推荐稀释倍数配制相关检测试剂, 且每孔使用 100 μ l, 此时本试剂盒的小包装、中包装和大包装分别可以检测 100 次、500 次和 2500 次。

保存条件:

-20℃保存, 一年有效。

Calcein AM (1000X)和 PI (1000X)需要避光保存。

产品组成：

序号	组分编号	组分名称
1	NBS2015-1	Calcein AM (1000X)
2	NBS2015-2	PI (1000X)
3	NBS2015-3	检测缓冲液

产品使用：**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，参考下表配制适量的 Calcein AM/PI 检测工作液，并充分混匀。

组分	10 个样品	100 个样品	1000 个样品
Calcein AM (1000X)	1 μ l	10 μ l	100 μ l
PI (1000X)	1 μ l	10 μ l	100 μ l
检测缓冲液	1ml	10ml	100ml
Calcein AM/PI 检测工作液	1ml	10ml	100ml

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。

注 3：也可以用其它合适的溶液，如无血清培养液、HBSS 或 PBS 稀释 Calcein AM (1000X)。本试剂盒 配套提供的检测缓冲液可在一段时间内维持细胞的正常状态，并给细胞提供一定的营养，效果通常比 PBS 或 HBSS 更好。

2. 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，吸除培养液，用 PBS 洗涤细胞 1 遍；对于悬浮细胞，250-1000 $\times$ g 室温离心 5min，吸除上清，用 PBS 洗涤 1 遍。酚红或血清对于本试剂盒的检测有一定的干扰，吸除培养液和 PBS 时最好使用真空泵。在能充分吸净残留液体的情况下，可以不使用 PBS 洗涤。

- c. 染色。加入适当体积的 Calcein AM/PI 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 1ml。37°C 避光孵育 30min。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=494/517nm; PI 为红色荧光, Ex/Em=535/617nm)。如有需要, 也可进一步进行其它荧光的复染, 例如使用 Hoechst 33342 (CAT: NBS8032 和 CAT: NBS8033) 活细胞染色液染色细胞核等。注意整个过程均需注意避光操作。

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 洗涤一次; 悬浮细胞 250-1000 $\times$ g 室温离心 5min, 弃上清, 用 PBS 洗涤一次。每个样品推荐的细胞用量为 10⁶ 个细胞。
- b. 染色。对于上一步骤的 10⁶ 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, 可以直接进行流式细胞仪检测, 也可以 250-1000 $\times$ g 室温离心 5min 沉淀细胞, 吸净液体后每个样品加入 0.5ml 缓冲液重悬细胞后用流式细胞仪检测(Calcein AM 为绿色荧光, Ex/Em=494/517nm; PI 为红色荧光, Ex/Em=535/617nm)。如有需要, 也可进行进一步染色, 例如使用 Hoechst 33342 活细胞染色液染色细胞核等。注意整个过程均需注意避光操作。染色后, 将样品置于冰上, 并尽量在 1 小时内进行流式细胞仪检测和分析。

注 1: 使用仅含检测缓冲液的并且未经染色的细胞样品用于流式细胞仪的阴性对照设置。注 2: 细胞圈门(gate)时, 注意不要圈入细胞碎片, 并使用 Calcein AM 或 PI 单染的细胞进行调节补偿。双染细胞流式检测应获得两个相对独立的细胞群: 绿色荧光的活细胞群和红色荧光的死细胞群。

注 3: 由于流式检测比较灵敏, 使用的荧光探针浓度可能要比荧光显微镜检测时要低, 此时可根据细胞类型和实际染色情况对 Calcein AM 或 PI 的稀释倍数进行适当调整。

4. 荧光酶标仪检测细胞死活的变化:

- a. 接种培养。将细胞接种于 96 孔板黑色多孔板中, 如全黑 96 孔细胞培养板, 每孔的细胞数

需要控制在 100-10,000 个，通常宜在 2000-5000 个范围内。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，吸除培养液，用 PBS 洗涤细胞 1 遍；对于悬浮细胞，250-1000×g 室温离心 5min，吸除上清，用 PBS 洗涤 1 遍。酚红或血清对于本试剂盒的检测有一定的干扰，吸除培养液和 PBS 时最好使用真空泵。在能充分吸净残留液体的情况下，可以不使用 PBS 洗涤。

c. 染色。加入适当体积的 Calcein AM/PI 检测工作液，通常 96 孔板每孔加入 100μl。37℃ 避光孵育 30min。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，用荧光酶标仪检测(Calcein AM 为绿色荧光，Ex/Em=494/517nm；PI 为红色荧光，Ex/Em=535/617nm)。通过对比对照组与处理组的 RFU (Relative fluorescence values)，可以得出死细胞与活细胞数量的变化。

5. 荧光酶标仪检测细胞死活的比列：本方法通过设置对照，可计算出死细胞与活细胞的比例。

a. 细胞培养和处理同前。

b. 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。

c. 检测样品组和对照组设置：

对于下面组别的细胞或无细胞组，需要保持细胞数量、检测工作液浓度、孵育时间和孵育温度的完全一致。

编号	组别	检测工作液	激发波长	发射波长	结果命名
1	样品组	Calcein AM/PI	494nm	517nm	F(517)sam
2	样品组	Calcein AM/PI	535nm	617nm	F(617)sam
3	活细胞组	PI	494nm	517nm	F(517)min
4	活细胞组	Calcein AM	494nm	517nm	F(517)max
5	死细胞组	PI	535nm	617nm	F(617)max
6	死细胞组	Calcein AM	535nm	617nm	F(617)min
7	无细胞组	Calcein AM/PI	494nm	517nm	F(517)0
8	无细胞组	Calcein AM/PI	535nm	617nm	F(617)0

活细胞组为没有加入药物处理的细胞；死细胞组可用 0.1-0.5% 洋地黄皂苷或 0.1% 皂素处理细胞 10 分钟，或 70% 乙醇 孵育细胞 30 分钟即可得到死细胞。

d. 染色和检测步骤同前。

e. 根据检测数据计算死细胞与活细胞的比例：

$$\% \text{ Live Cells} = \frac{F(517)_{\text{sam}} - F(517)_{\text{min}}}{F(517)_{\text{max}} - F(517)_{\text{min}}} \times 100\%$$

$$\% \text{ Dead Cells} = \frac{F(617)_{\text{sam}} - F(617)_{\text{min}}}{F(617)_{\text{max}} - F(617)_{\text{min}}} \times 100\%$$

注 1：其中所有的 F(517) 和 F(617) 都减去相应的 F(517)₀ 和 F(617)₀。

注 2：如果需要确定活细胞与死细胞的具体数量，可制作不同数量活细胞与死细胞在 517nm 和 617nm 处的荧光光谱标准曲线。该标准曲线呈线性关系，因此通过标准曲线和样品中两个染料的荧光强度可计算出活细胞与死细胞的数量。

注意事项：

1. 荧光染料均存在淬灭问题，请尽量注意避光，以减缓荧光淬灭。
2. 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。
3. 由于 Calcein AM 在水溶液中不稳定，Calcein AM 检测工作液须现配现用，不能配制后冻存。
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. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

本产品仅用于生命科学研究，不得用于医学诊断及其他用途！