

# Calcein-AM/PI Double Staining Kit

## Calcein-AM/PI 活细胞/死细胞双染试剂盒

货号: Cat.No: C6803 Size: 500T

### 产品介绍

Calcein-AM/PI Double Staining Kit 可用于区分含有酯酶活性的哺乳动物的死细胞和活细胞。Calcein-AM 是在传统的钙黄绿素 (Calcein) 上引入乙酰甲氧基甲酯即 (AM) 基团修饰而成, 疏水性显著增加, 能够高效穿透细胞膜进入胞内。Calcein-AM 本身无荧光, 进入细胞后可被内源性酯酶水解, 生成带强负电荷、难以跨膜透出的极性产物 Calcein, 并滞留在细胞内, 发出强烈绿色荧光 (激发/发射波长 Ex/Em = 494 nm/517 nm)。由于死细胞缺乏酯酶活性, 无法或极少生成 Calcein, 因此仅活细胞呈现强绿色荧光, 死细胞则染色极弱或不染色。死细胞的细胞膜选择透过性丧失, 碘化丙啶 (Propidium Iodide, PI) 可进入胞内并与双链 DNA 特异性结合, 产生强烈红色荧光 (激发/发射波长 Ex/Em=535 nm/617 nm), 从而特异性标记死细胞。将 Calcein-AM 与 PI 联合使用, 可实现活细胞与死细胞的同步双重荧光染色, 广泛适用于细胞活性检测及细胞毒性评价。

### 自备试剂

PBS 缓冲液 (pH7.2~7.4)

### 保存条件

-20°C 避光可保存 1 年。Calcein-AM Solution (500  $\mu$ l, 100  $\mu$ M) ; Propidium Iodide(PI)(500  $\mu$ l, 750  $\mu$ M) ; Calcein-AM Solution (100  $\mu$ M)首次使用时建议适当分装并密封避光保存, 防止潮湿环境中发生自发性酯水解。

### 操作步骤

#### 1.流式细胞仪检测

##### 1.1 工作液的配制:

1.1.1 试剂准备: 取出保存的 Calcein-AM/PI Double Staining Kit, 室温解冻后, 涡旋混匀试剂。

1.1.2 配制 Calcein-AM/PI 染色工作液:室温解冻后,将涡旋混匀的 Calcein-AM Solution 和 PI Solution 按照  $1\sim 5\times 10^5$  个细胞/200  $\mu$ L 配制染色工作液。根据实验用量参考下表配制染色工作液。

注: 染色工作液中的 Calcein-AM 易潮解, 建议现配现用。

提示: 为节约试剂及保证实验的准确性, 可先将 Calcein-AM Solution 进行梯度稀释, 如用 PBS(1X)将 Calcein-AM Solution(100 $\mu$ M) 稀释 100 倍到 1 $\mu$ M。染色前再使用 PBS(1X)将 1 $\mu$ M 的 Calcein-AM Solution 稀释 100 倍到染色浓度 (0.01 $\mu$ M), 即 200 $\mu$ L PBS(1X)

组分	Calcein AM/PI 染色工作液体积		
	1 mL	5 mL	10 mL
Calcein AM Solution (100 $\mu$ M)	0.1 $\mu$ L	0.5 $\mu$ L	1 $\mu$ L
PI Solution (750 $\mu$ M)	1 $\mu$ L	5 $\mu$ L	10 $\mu$ L
PBS(1X)	1 mL	5 mL	10 mL

中加入 2 $\mu$ L 1 $\mu$ M 的 Calcein-AM Solution。

##### 1.1.3 用于阴性对照与补偿调节的单染管工作液配制参考下表配制:

组分	Calcein AM单染工作液 (1 mL)	PI单染工作液 (1mL)	阴性对照 (1mL)
Calcein AM Solution (100 $\mu$ M)	0.1 $\mu$ L	0 $\mu$ L	0 $\mu$ L
PI Solution (750 $\mu$ M)	0 $\mu$ L	1 $\mu$ L	0 $\mu$ L
PBS(1X)	1 mL	1 mL	1 mL

注: 染色工作液中的 Calcein-AM 易潮解, 建议现配现用; 阴性对照管与单染管的细胞选择阳性药物组细胞。

## 1.2 染色步骤:

1.2.1 收集细胞, 300×g 离心 5 min, 弃去上清, 加入 1 ml PBS 重悬细胞沉淀, 300×g 离心 5 min, 去上清, 重复清洗 1 次, 去上清。

1.2.2 每组 1~5×10<sup>5</sup> 个细胞加入 200 μL 染色工作液重悬, 室温避光孵育 5~15 min。

1.2.3 孵育完成后, 可以直接进行流式细胞仪检测, 若不能及时检测, 建议避光置于 4°C 冰箱, 2 小时内进行流式细胞仪检测。

**注: 流式细胞仪检测时, Calcein 可用 FITC 通道, PI 可用 Percp/Cy5.5 通道或 PE 通道。**

## 2. 荧光显微镜检测

### 2.1 工作液的配制:

2.1.1 试剂准备: 取出保存的 Calcein-AM/PI Double Staining Kit, 室温解冻后, 涡旋混匀各试剂。

2.1.2 配制 Calcein-AM/PI 染色工作液: 解冻后, 将涡旋混匀的 Calcein-AM Solution 和 PI Solution 按照 96 孔板每孔 100μL 或 24 孔板每孔 200μL 配制染色工作液。根据实验用量参考下表配制染色工作液。

**注: 染色工作液中的 Calcein-AM 易潮解, 建议现配现用。**

组分	Calcein AM/PI染色工作液体积		
	1 mL	5 mL	10 mL
Calcein AM Solution (100μM)	10 μL	50 μL	100 μL
PI Solution (750μM)	10 μL	50 μL	100 μL
PBS(1X)	1 mL	5 mL	10 mL

### 2.2 染色步骤:

2.2.1 小心吸取贴壁细胞的培养基, 每孔加入适量 PBS 洗涤细胞, 去除 PBS, 重复清洗 1 次, 除去 PBS。

2.2.2 按照 96 孔板每孔 100 μL 或 24 孔板每孔 200 μL 的比例加入染色工作液, 37°C 孵育 10~30 min。(基础培养基配制染色工作液需延长染色时间至 30~60 min, 在反应结束前 10 min 加入 PI Solution。)

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

**注: 若是悬浮细胞, 则收集细胞沉淀后, 按照 1~5×10<sup>5</sup> 个细胞加入 200μL 染色工作液重悬, 室温避光孵育 15~20 min, 吸取细胞悬液滴加在载玻片上, 轻轻盖上盖玻片即可在显微镜下观察拍照。**

## 注意⚠ 事项

1. 本产品仅限专业人员用于科学研究, 不得用于临床诊断、治疗及其他非科研用途。
2. 操作时请注意安全, 严格遵守实验室试剂操作规范。为保障安全与健康, 实验过程中请穿着实验服并佩戴一次性手套。
3. 请按产品要求在适宜温度下保存, 避免试剂失效。
4. 染色前使用无血清培养基 (血清中可能含有酯酶) 或 PBS 洗涤细胞; 缓冲液中不得含有伯胺、仲胺, 此类物质可水解 AM 酯并影响探针负载。
5. 37°C 条件下可缩短染色时间; 室温染色可减少荧光探针进入细胞器带来的副反应。
6. Mn<sup>2+</sup> 会加速荧光淬灭, 洗涤缓冲液中应避免含 Mn<sup>2+</sup> 等金属离子。
7. 探针渗漏: AM 酯类探针可能被细胞表面 P 糖蛋白等多药耐药外排泵排出。
8. 本试剂盒适用于所有具有酯酶活性的动物细胞; 植物与细菌具有细胞壁, Calcein-AM 无法进入胞内, 因此不适用于植物及细菌样本。
9. 可采用 5%~20% DMSO 处理细胞 2~4 h, 或 70%乙醇处理细胞 30 min, 制备死细胞阳性质控样本。
10. 离心机升降速过快易造成细胞损失, 建议设置升速 (Acc) ≤3, 降速 (Dec) ≤2。
11. 荧光显微镜检测时, 贴壁能力较弱的细胞建议先进行防脱处理, 再接种与染色; PI 染色时间不宜超过 30 min, 否则易出现假阳性。如需延长 Calcein-AM 染色时间, 可在染色结束前 10~30 min 加入 PI 染液, 染色完成后 1~2 h 内及时观察并拍照。