



Calcein-AM/PI 细胞活性与细胞毒性检测试剂盒

产品内容:

产品组成	R32167-500T	R32167-1000T
Calcein-AM Solution (4mM in DMSO)	0.05mL	0.1mL
PI Solution (16mM in DMSO)	0.05mL	0.1mL
Assay buffer	500mL	500mL
说明书	1 份	1 份

产品简介:

细胞活力（活死细胞染色）检测试剂盒（Calcein-AM，PI 法，适用于 FACS、FM）通过同时检测细胞内酯酶活性和质膜完整性，提供一种判断细胞活力的荧光染色方法。

本试剂盒内含有两种染料：钙黄绿素-AM（Calcein-AM）和碘化丙啶（PI），Calcein-AM 可透过活细胞膜，通过活细胞内的酯酶作用由几乎无荧光的 Calcein-AM 脱去 AM 基团生成具有强烈荧光信号的绿色荧光物质 Calcein（Ex/Em：495nm/515nm），因此活细胞可被检测到绿色荧光。另一方面 PI 不能透过活细胞的细胞膜，但当细胞膜受损时 PI 可进入到细胞内并与核酸结合，产生明亮的红色荧光（Ex/Em：535nm/617nm），因此死细胞会被检测到红色荧光。用 490nm 激发时可用荧光显微镜同时观察活细胞和死细胞；而用 545nm 激发时仅可观察到死细胞。

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。

使用方法:

（一）确定染色试剂的最佳浓度（可选）：

由于不同细胞种类、细胞浓度的染色条件不同，建议通过以下的操作自行摸索一下 Calcein-AM 和 PI 的最适浓度：



1、制备死细胞：细胞在 0.1%皂苷或 0.1-0.5%毛地黄皂苷中培养 10min 或在 70%乙醇中培养 30min。

2、用 0.1-10 μ M PI 工作液染死细胞，以便找到仅针对细胞核染色而不对细胞质染色的 PI 浓度。

3、用 0.1-10 μ M Calcein-AM 工作液染死细胞，以便找到不对细胞质染色的 Calcein-AM 浓度，再以此浓度的 Calcein-AM 对活细胞染色以检验活细胞是否能被染色。

（二）染色工作液的配制（以 2 μ M Calcein-AM，8 μ M PI 为例）：

Calcein-AM 和 PI 推荐浓度范围为 0.1~10 μ M，可以根据步骤一确定的最佳浓度来配制工作液。一般来说，满足信号足够的前提下，尽可能选择最低浓度的染料剂量。

1、取出 Calcein-AM Solution 和 PI Solution，室温平衡 30min。

2、在 10mL 的 Assay buffer 中加入 5 μ L 的 PI Solution 和 5 μ L 的 Calcein-AM Solution，涡旋震荡混匀制成工作液，此时 Calcein-AM 的浓度为 2 μ M，PI 的浓度为 8 μ M。

3、所得到的的工作液（2 μ M Calcein-AM 和 8 μ M PI）可直接用于染色细胞。

（三）染色步骤：

对于贴壁细胞：

1、可以将细胞接种至细胞培养板、微孔板或者制作成细胞爬片。悬浮细胞也可制作成细胞爬片。

2、按照实验要求处理细胞后，用 PBS 温和洗涤细胞 2-3 次，确保除去培养基中含有的活性酯酶。

3、加入足量的染色工作液，保证没过单层细胞。

4、在 37 $^{\circ}$ C 孵育 15~30min。

对于悬浮细胞：

1、按照实验要求处理细胞后，1,000rpm，3min 离心收集细胞（104-105cells）。



- 2、去除上清，PBS 重悬洗涤 2-3 次，确保除去培养基中含有的活性酯酶。
- 3、用 100 μ L 染色工作液重悬细胞，使细胞密度大约为 105-106cells/mL。
- 4、在 37 $^{\circ}$ C 孵育 15~30min。

（四）荧光检测和分析：

荧光显微镜检测：

- 1、对于贴壁细胞：对于培养板孔中的细胞：吸出染色工作液终止孵育，用 PBS 温和洗涤细胞 2-3 次，加入足量的 Assay buffer，保证没过单层细胞，随后置于荧光显微镜下观察。对于细胞爬片：在干净的载玻片上滴加 10 μ L 的 Assay buffer，覆以细胞爬片。可以以指甲油密封，防止水分蒸发。
- 2、对于悬浮细胞：在干净的载玻片上滴加 10 μ L 的已染色的细胞溶液，覆以盖玻片。可以以指甲油密封，防止水分蒸发。
- 3、使用荧光显微镜在 490 $\pm$ 10nm 激发波长下同时观察活细胞（黄绿色荧光）和死细胞（红色荧光）。另外使用 545nm 激发波长单独观察死细胞。

荧光酶标仪检测：

- 1、按照实验要求准备对照样本，与实验组样本一起按照步骤二、三操作。对照样品可以有：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	样品名称（细胞种类）	检测发射波长	染色液	测得结果
A	实验组细胞样品	645 nm	Calcein-AM/PI	F(645)sam
B	实验组细胞样品	530 nm	Calcein-AM/PI	F(530)sam
C	死细胞对照样品	645 nm	PI	F(645)max
D	死细胞对照样品	645 nm	Calcein-AM	F(645)min
E	活细胞对照样品	530 nm	PI	F(530)min
F	活细胞对照样品	530 nm	Calcein-AM	F(530)max
G	无细胞样品	530 nm	Calcein-AM/PI	F(530)0
H	无细胞样品	645 nm	Calcein-AM/PI	F(645)0



2、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 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，每孔最大常用细胞检测值约为 106 个。】

3、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。Calcein 可以用（490 $\pm$ 10nm）的荧光光学滤光器激发，而 PI 可以用（530 $\pm$ 12.5nm）的典型罗丹明光学滤光器来兼容。而发射光信号可以通过滤光器得到很好的分开采集，Calcein 是 530 $\pm$ 12.5nm，PI 是 645 $\pm$ 20nm。

4、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：

$$\text{Live Cells\%} = (F(530)_{\text{sam}} - F(530)_{\text{min}}) / (F(530)_{\text{max}} - F(530)_{\text{min}})$$

$$\text{Dead Cells\%} = (F(645)_{\text{sam}} - F(645)_{\text{min}}) / (F(645)_{\text{max}} - F(645)_{\text{min}})$$

绝对活死细胞数量的计算：制作细胞数与荧光读数（530nm 和 645nm）的标准曲线，荧光强度与样本中的细胞数成线性正相关。

流式细胞仪分析：

悬浮细胞或经胰酶消化的贴壁细胞，可以类同步骤二、三的悬浮细胞染色操作。染色后的细胞悬液可直接上机检测。

保存条件：

-20 $^{\circ}$ C 保存，有效期 12 个月。

注意事项：

1、本试剂盒中的 Calcein-AM Solution 和 PI Solution 量很少，有可能会粘在盖子或管壁上，开封前请先适当离心至管底。

2、由于 Calcein-AM 储存液对湿度非常敏感，请在每次使用后紧紧密封 Calcein-AM 储存液的盖子。如果不能一次用完，建议根据单次用量分装密封保



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 400-666-5481 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: 3008007435@qq.com

存。例如分装成 10 μ L/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，并放入一包干燥剂，在-20℃密封避光保存。

3、Assay buffer 应在无菌环境中取用，否则可能会被微生物污染而影响使用效果，甚至无法继续使用。染色工作液必须现配现用，配制好的工作液请在当天使用。

4、荧光染料均存在淬灭问题，保存和使用本试剂盒的过程中请尽量注意避光，以减缓荧光淬灭。建议染色后尽量当天完成检测。

5、碘化丙啶对人体有刺激性，操作时请小心，并注意适当防护以避免直接接触人体或吸入体内。

6、为了您的安全和健康，操作时请穿着实验服并佩戴一次性手套。

