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

Calcein-AM/PI活细胞/死细胞双染试剂盒

货号：R32166

储存条件：-20℃，避光

有效期：12个月

产品内容：

名称	100T	250T	500T	保存
Calcein-AM Solution(2mM)	10μL	25μL	50μL	-20°C 避光干燥保存
PI Solution（1.5 mM）	30μL	75μL	150μL	-20°C 避光干燥保存
10×Assay Buffer	10mL	25mL	50mL	-20℃保存，经常使用可放在 4℃保存。

产品说明：

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（Ex =490nm, Em=515nm）。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（Ex=535 nm, Em=617 nm），因此 PI 仅对死细胞染色。由于 Calcein 和 PI-DNA 都可被 490 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 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。根据我司优化的实验体系，单次就 100μL细胞悬液进行染色，可以做 500 次检测。

使用方法（仅供参考）：

1. 工作液的前处理

(1) 从低温冰箱内取出 10×Assay Buffer，根据单次用量无菌条件取出适量，用去离子水10 倍稀释以得到 1×Assay Buffer。

(2) 由于 Calcein-AM 的稳定性受温度影响较大，建议收到货后，可分装为小份，密封避光保存于-20℃，不能反复冻融。若染色液经稀释，建议当天用完。

2. 细胞处理

(1) 悬浮生长的细胞，收集至离心管，450g，离心 5min，去除上清。用 1x 的 Assay Buffer洗涤细胞，450g，离心 5min，2 次，去除残留酯酶。

(2) 贴壁细胞经 0.25%胰酶-EDTA 消化后，收集细胞，用 1x 的 Assay Buffer 洗涤细胞， 450g，离心 5min，2 次，去除胰酶及残留的酯酶。

3. 染色步骤

(1) 离心得到的细胞沉淀用 1×Assay Buffer 重悬，使重悬后细胞悬液计数细胞量为 $1 \times 10^{5\sim6}$ 个/ml。

(2) 每 1ml 的细胞量加入 1-2μl 的 Calcein-AM （原液）， 吹打混匀，37℃避光孵育20min-25min。

(3) 将试剂盒自带的 PI 原液取 3-5μl 加入上述染色细胞中，室温避光染色 5min。

(4) 孵育荧光后的细胞，450g，5min，离心去除染色液。

注：细胞进行荧光染色时建议全程避光。

(5) 用 1x 的 PBS 清洗细胞 450g，5min，离心后用 1x PBS 重悬细胞，取 3-5μl 滴在洁净的载玻片上，用干净的盖玻片压片后，请及时荧光镜检。

(6) 荧光显微镜下使用 490±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 545nm 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。

注意事项：

1．为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

2．贴壁细胞也可以不消化，直接去除培养基，经 1×Assay Buffer 浸洗 2min，2 次。按上述细胞量和染色液浓度比例进行染色，染色时间和染色液工作浓度可按实际检测调整。

3．Calcein-AM 作用于细胞，一般细胞量在 $1\times10^{5\text{-}6}$ 个时，Calcein-AM 的工作浓度基本在2-4μM（如遇镜检荧光亮度过强，稀释比例可适当调整在 1:500 到 1:2000 或更大）；PI 的工作浓度在 5μM 左右。但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。

4．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。

注：可以使用以下方法来优化得到两种荧光染料针对不同细胞的最佳工作浓度。

a) 用 0. 1%皂素或者 0.1-0.5%地高辛孵育细胞 10min，或者用 70%乙醇孵育细胞 30min，从而制备死细胞；

b) 用 0.1- 10μM 的 PI 溶液进行死细胞染色，以得到仅仅对细胞核染色，而不会对细胞质染色的最佳工作浓度。

c) 用 0.1- 10μM 的 Calcein-AM 进行死细胞染色，以得到不会对细胞质染色的最佳工作浓度。然后用此浓度进行活细胞染色，去观察是否活细胞能被染色。