

Calcein-AM/PI 活细胞/死细胞双染试剂盒 C0021

描述: 钙黄绿素-AM (Calcein-AM) 和碘化丙啶 (PI) 可分别对活细胞和死细胞染色, 用于同时对活细胞和死细胞进行荧光染色分析。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), 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。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, 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。

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。试剂盒经过优化, 单次可进行 200 μ l 细胞悬液染色。

规格: 500 次

组成及保存:

Calcein-AM Solution (2mM) 50 μ L -20 $^{\circ}$ C 避光干燥保存

PI Solution (2 mM) 150 μ L -20 $^{\circ}$ C 避光干燥保存

一年有效

操作步骤:

1. 工作液的配制

1) 先将低温保存的 Calcein-AM 溶液 (2 mM) 和 PI 溶液 (2 mM) 平衡至室温。

注意: 第一次使用可对母液进行分装, 以减少反复冻融次数。

2) 取 5 μ l Calcein-AM 溶液 (2 mM) 和 12.5 μ l PI 溶液 (2 mM) 至 5ml 1xPBS 缓冲液 (pH 7.4), 充分混匀。得到 Calcein-AM 的工作液浓度 2 μ M, PI 的工作液浓度 5 μ M。

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。

注意: 由于 Calcein-AM 的稳定性比较差, 此染色工作液必须现配现用, 且在当天用完。

2. 染色步骤

2.1 贴壁细胞, 先用细胞刮刀或者胰酶-EDTA 消化细胞, 离心收集细胞 (1000 rpm, 3min)。

悬浮细胞, 直接离心 (1000 rpm, 3min) 收集细胞。

2.2 去上清, 用 1xPBS 缓冲液 (pH7.4) 洗涤细胞 2~3 次, 去除残留的酯酶活性。

注意: 由于培养基中的血清等含有酯酶, Calcein-AM 遇水会分解, 导致空白上升, 所以需要数次离心, 用 PBS 洗涤数次直到完全洗净。

2.3 制备细胞悬液, 使其密度为 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 细胞/ml。

2.4 取 100 μ l 染色工作液加入 200 μ l 细胞悬液内, 混匀, 37 $^{\circ}$ C 孵育 15min。

注意: 如果需要, 可延长孵育时间至 30min。

2.5 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: 可以使用以下方法优化两种荧光染料的最佳工作浓度。

- a) 在 0.1% 皂苷或 0.1-0.5% 毛地黄皂苷中孵育 10 分钟或在 70% 乙醇中孵育 30 分钟制备死细胞;
- b) 用 0.1-10 μ M 的 PI 溶液进行死细胞染色, 以得到仅对细胞核染色, 而不会对细胞质染色的最佳工作浓度。
- c) 用 0.1-10 μ M 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。

注意事项:

- 1) 由于 Calcein-AM 对湿度非常敏感, 若是 Calcein-AM 溶液每次取完需要量后, 必须紧紧密封盖子。建议根据单次用量, 分装密封保存。Calcein-AM 工作液必须现配现用。
- 2) 碘化丙啶 (PI) 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。
- 3) 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。