

细胞活力(活死细胞染色)检测试剂盒 (CalceinAM, PI法, 适用于FACS、FM)

产品货号: 26642

产品规格: 500T/1000T

产品简介:

本试剂盒采用两种广泛应用的荧光探针——钙黄素AM (Calcein AM) 和碘化丙啶 (PI), 通过检测细胞内酯酶活性和质膜完整性共同反映细胞活力。Calcein AM具有细胞膜透性且本身无荧光, 当Calcein AM存在活细胞内时, 胞内无所不在的酯酶活性作用, 使其由几乎无荧光转化成具有强烈荧光信号的钙黄绿素 (Ex/Em: 495nm/520nm); 而对于细胞膜受损的细胞或者死细胞来说, 其胞内缺乏酯酶或酯酶活性很低, 钙黄素AM无法转化为强荧光信号的钙黄绿素, 故只有活细胞会被染色为强绿色荧光, 死细胞不能被染色或染色非常弱。与此同时, PI可以穿过细胞膜进入细胞, 且与核酸结合, 荧光信号从而放大40倍, 产生一个明亮的红色荧光信号 (Ex/Em: 530nm/620nm)。

本试剂盒适用于荧光显微镜、荧光酶标仪、扫描仪、流式细胞仪以及其他荧光检测系统。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、酵母、植物等样本。

产品组成:

产品名称	500T	1000T	保存条件
组份A: Calcein AM	50 μ L (4mM in DMSO)	100 μ L (4mM in DMSO)	-20 $^{\circ}$ C, 避光
组份B: PI	50 μ L (16mM in DMSO)	100 μ L (16mM in DMSO)	-20 $^{\circ}$ C, 避光

试剂盒以外自备仪器和试剂:

PBS、培养基、低速离心机、荧光显微镜、流式细胞仪、微量移液。

操作步骤:

(一) Calcein AM与PI工作液配制 (以贴壁细胞为例)

1. 取出 Calcein AM 和 PI 试剂原液, 室温平衡 30min。
2. 加入 5 μ L PI 试剂原液至 10mL 的 PBS/培养基中, 涡旋震荡混匀, 得到 8 μ M 的 PI 工作液。
3. 将 5 μ L Calcein AM 试剂原液加入到 10mL 的 PI 工作液中, 涡旋混匀, 得到 2 μ M 的 Calcein AM 工作液。
4. 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。

注意: Calcein AM 和 PI 的浓度选择依据所用的细胞类型不同而有区别, 应当根据具体细胞调节染料浓度以得到最佳效果。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。Calcein AM 和 PI 推荐浓度范围为 0.1-10 μ M。Calcein AM 的水溶液容易发生水解, 建议当天用完。

(二) 荧光显微镜检测

1. 贴壁细胞、悬浮细胞可以用培养瓶、培养皿、孔板进行培养。
2. 根据孔板体系加入适量上述配制所得的工作液 (以 12 孔板为例, 加入 1mL 工作液), 保证完全浸没单层细胞, 室温避光孵育 30-45min。
3. 孵育结束后, 在荧光显微镜下观察标记细胞, Calcein AM (Ex/Em: 495nm/520nm) 发绿色荧光, PI (Ex/Em: 530nm/620nm) 发红色荧光。

注意:

- ① 注意整个过程均需注意避光操作。
- ② 悬浮细胞需根据最终培养体系进行工作液配制。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

③ 如有需要，也可进一步进行其它荧光的复染，例如使用 Hoechst 33342 活细胞染色液染色细胞核等。

④ 培养基中含有少量的活性酯酶，可能会对实验结果有少量影响。

（三）流式细胞仪检测

1. 贴壁细胞用胰酶消化液将细胞消化，PBS 洗涤一次，离心收集。悬浮细胞可直接离心，PBS 洗涤一次，离心收集。
2. 在离心管中加入 500 μ L 上述配制所得工作液，室温避光孵育 30-45min。
3. 将细胞轻轻重悬，加入流式管，即可上机检测。Calcein AM (Ex/Em: 495nm/520nm)，PI (Ex/Em: 530nm/620nm)。

注意：

- ① 每个样品推荐的细胞用量为 1×10^6 个细胞。
- ② 需额外准备 3 管细胞进行流式细胞仪检测时的阴性对照、Calcein AM 流式单染补偿对照、PI 流式单染补偿对照。

（四）荧光酶标仪检测细胞活死变化

每孔细胞的最低监测值大约为 200-500 个，细胞铺板宜在 2000-5000 个范围内。

1. 细胞需提前接种至 96 孔细胞培养板中（黑色），按照实验要求进行细胞处理。
2. 根据孔板体系加入适量上述配制所得的工作液（96 孔板每孔加入 100 μ L），保证完全浸没单层细胞，室温避光孵育 30-45min。
3. 使用荧光酶标仪测量荧光：Calcein AM 可以用（485 $\pm$ 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 AM 是 530 $\pm$ 12.5nm，PI 是 645 $\pm$ 20nm。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。

注意：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。

（五）荧光酶标仪检测细胞活死比例

1. 提前配制工作液；
2. 细胞需提前接种至 96 孔细胞培养板中（黑色边透明底），按照实验要求进行细胞处理；同时需准备活细胞与死细胞的对照样品。

注意：死细胞可以用 0.1%皂角苷或者 0.1-0.5%的毛地黄皂苷处理 10 分钟得到。

细胞铺板组别可按照以下方式进行设置

编号	组别	工作液	激发波长	发射波长	结果命名
A	无细胞对照组	Calcein AM/PI	495nm	520nm	F(530) ₀
B	无细胞对照组	Calcein AM/PI	530nm	620nm	F(645) ₀
C	死细胞对照组	Calcein AM	530nm	620nm	F(645) _{min}
D	死细胞对照组	PI	530nm	620nm	F(645) _{max}
E	活细胞对照组	Calcein AM	495nm	520nm	F(530) _{max}
F	活细胞对照组	PI	495nm	520nm	F(530) _{min}
G	实验样品组	Calcein AM/PI	495nm	520nm	F(530) _{sam}
H	实验样品组	Calcein AM/PI	530nm	620nm	F(645) _{sam}

3. 每孔加入 100 μ L 的工作液，每孔含 2 μ M Calcein AM 和/或 8 μ M PI 的终浓度。室温孵育 30-45min。
4. 使用荧光酶标仪测量荧光：Calcein AM 可以用（485 $\pm$ 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 AM 是 530 $\pm$ 12.5nm，PI 是 645 $\pm$ 20nm。
5. 根据检测数据计算死细胞与活细胞的比例
计算结果之前，可以将背景的荧光读数 F(530)₀ 和 F(645)₀ 分别从 F 值 530 和 645 中减去。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

死细胞与活细胞的计算比例：

$$\% \text{Live Cells} = [F(530)_{\text{sam}} - F(530)_{\text{min}}] / [F(530)_{\text{max}} - F(530)_{\text{min}}] \times 100\%$$

$$\% \text{Dead Cells} = [F(645)_{\text{sam}} - F(645)_{\text{min}}] / [F(645)_{\text{max}} - F(645)_{\text{min}}] \times 100\%$$

注意：若需计算绝对活死细胞数量，可制备不同细胞数量的活细胞与死细胞，加入相关工作液之后，在 530nm 和 645nm 处进行读数，制作标准曲线；荧光强度与样本中的细胞数成线性正相关，通过该标准曲线和样品的荧光强度读数，计算活细胞与死细胞的数量。

注意事项：

1. 本试剂盒荧光染料可少量分装，避免反复冻融。
2. 使用前请将产品瞬时离心至管底，再进行后续实验。
3. 荧光染料均存在淬灭问题，实验操作时请尽量注意避光，以减缓荧光淬灭。
4. 为保证您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

有效期：6个月有效。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com