

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

产品货号: 26688

产品规格: 1000 tests

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	1000 tests	保存条件
组份A: Calcein AM	100 μ L (4mM in DMSO)	-20 $^{\circ}$ C, 避光
组份B: PI	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

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.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。

死细胞与活细胞的计算比例：

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

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



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

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

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

<http://www.saint-bio.com>