

Calcein/PI Live/Dead Viability/Cytotoxicity Assay Kit

Cat# CF0151

产品概述

Calcein/PI Live/Dead Viability/Cytotoxicity Assay Kit 是一种非常便捷的基于 Calcein-AM (钙黄绿素)和 PI (碘化丙啉) 双荧光染色法检测动物细胞活死的试剂盒。

试剂盒内含有两种染料：Calcein-AM 和 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: 494 nm/517 nm)，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: 535 nm/617 nm)，因此死细胞会被检测到红色荧光。用 490 nm 激发时可用荧光显微镜同时观察活细胞和死细胞；而用 545 nm 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；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。

产品信息

产品名称	货号	规格
Calcein/PI Live/Dead Viability/Cytotoxicity Assay Kit	CF0151-500T	500 T
Calcein/PI Live/Dead Viability/Cytotoxicity Assay Kit	CF0151-1000T	1000 T

组分信息

组分编码	产品组分	CF0151-500T	CF0151-1000T
CF0151-1	Calcein AM Solution (4 mM in DMSO)	0.05 mL	0.1 mL
CF0151-2	PI Solution (16 mM in DMSO)	0.05 mL	0.1 mL

储存方式

-25~-15℃避光保存。

使用说明

注意事项

- 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。
- 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存。例如分装成 10 μL/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。
- 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. 培养液中的血清和酚红对 Calcein AM 的染色可能有一定的影响，使荧光背景增强，建议在加入 Calcein AM 检测工作液前适当洗涤细胞。
5. 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。
6. 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。
7. 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。

操作概述

染色工作液的配制

Calcein-AM 和 PI 推荐浓度范围为 0.1~10 μM ，具体工作浓度可根据细胞种类、细胞浓度及染色条件不同自行摸索。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。以下以 2 μM Calcein AM, 8 μM PI 为例，进行染色工作液的配制：

1. 取出 Calcein AM Solution 和 PI Solution，室温平衡 30 min。
2. 在 10 mL PBS 中加入 5 μL PI Solution 和 5 μL Calcein AM Solution，涡旋震荡混匀制成工作液，此时 Calcein AM 的浓度为 2 μM ，PI 的浓度为 8 μM 。
3. 所得到的工作液（2 μM Calcein AM 和 8 μM PI）可直接用于染色细胞。

染色

1. 对于贴壁细胞：

- 1.1 将细胞接种至细胞培养板、微孔板或制作成细胞爬片，悬浮细胞也可制作成细胞爬片；
- 1.2 按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；
- 1.3 加入足量的染色工作液，保证没过单层细胞；
- 1.4 在 37°C 孵育 15~30 min。

2. 对于悬浮细胞：

- 2.1. 按实验要求处理细胞后，1000 rpm, 3 min 离心收集细胞 (10^4 - 10^5 cells)；
- 2.2. 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；
- 2.3. 用 100 μL 染色工作液重悬细胞，使细胞密度大约为 10^5 - 10^6 cells/mL；
- 2.4. 在 37°C 孵育 15~30 min。

荧光检测和分析

1. 荧光显微镜检测：

- 1.1 对于贴壁细胞：若为培养板孔中的细胞，吸出染色工作液终止孵育，加入 10 μL PBS，覆以干净的盖玻片；若为细胞爬片，在干净的载玻片上滴加 10 μL PBS，覆以细胞爬片。可以以指甲油密封，防止水分蒸发。
对于悬浮细胞：在干净的载玻片上滴加适量的染色的细胞溶液，覆以盖玻片。可以以指甲油密封，防止水分蒸发。
- 1.2 在荧光显微镜下使用 490 $\pm$ 10 nm 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 545 nm 激发波长单独观察死细胞。

2. 荧光酶标仪检测：

- 2.1. 按实验要求准备对照样本，与实验组样本一起加染色工作液处理。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）。死细胞对照可以在 0.1% 皂苷或 0.1-0.5% 毛地黄皂苷中培养 10 min 或在 70% 乙醇中培养 30 min 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	$F(645)_0$

2.2. 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，每孔最大常用细胞测值约为 10^6 个。

2.3. 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 $\pm$ 10 nm) 的荧光光学滤光器激发，而 PI 可以用 (530 $\pm$ 12.5 nm) 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 $\pm$ 12.5 nm，PI 是 645 $\pm$ 20 nm。

2.4. 结果分析与计算：

死细胞的特点是在 645 nm 下有强荧光信号，而 530 nm 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：

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

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

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

3. 流式细胞仪分析：

细胞染色孵育完成后，可以直接进行流式细胞仪检测，也可以 250-1000 $\times$ g 室温离心 5 min 沉淀细胞，吸净液体后每个样品加入 0.5 mL 缓冲液重悬细胞后用流式细胞仪检测。如有需要，也可进行进一步染色，例如使用 Hoechst 33342 活细胞染色液染色细胞核等。

【注】：

1. 整个过程均需注意避光操作。染色后，将样品置于冰上，并尽量在 1 h 内进行流式细胞仪检测和分析；
2. 使用仅含检测缓冲液并且未经染色的细胞样品用于流式细胞仪的阴性对照设置；
3. 细胞圈门(gate)时，注意不要圈入细胞碎片，并使用 Calcein AM 或 PI 单染的细胞进行调节补偿。双染细胞流式检测应获得两个相对独立的细胞群：绿色荧光的活细胞群和红色荧光的死细胞群。
4. 由于流式检测比较灵敏，使用的荧光探针浓度可能要比荧光显微镜检测时要低，此时可根据细胞类型和实际染色情况对 Calcein AM 或 PI 的稀释倍数进行适当调整。

Technical Support

Copyright © 2023 CYTOCH, All Rights Reserved. The CYTOCH logo is a registered trademark.

To place an order or to obtain a product information, please go to: www.cytoch.com.

Or contact us by:

E-mail: support@cytoch.com

Tel: 400-969-8881

For research use only.

CYTOCH