



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

Calcein AM 细胞活性检测试剂盒(CCK-F)

产品编号	产品名称	包装
R32164-100T	Calcein AM 细胞活性检测试剂盒(CCK-F)	100T
R32164-500T	Calcein AM 细胞活性检测试剂盒(CCK-F)	500T
R32164-2500T	Calcein AM 细胞活性检测试剂盒(CCK-F)	2500T

产品简介:

源叶的 Calcein AM 细胞活性检测试剂盒(Calcein AM Cell Viability Assay Kit) 是一种通过 Calcein-AM 荧光探针标记活细胞从而简单、快速、灵敏、准确地用于细胞活性、细胞毒性或细胞增殖检测的试剂盒。本试剂盒由于能用于活细胞的精确定量, 也被称为细胞荧光计数试剂盒(Cell Fluorescence Counting Kit), 简称 Cell Fluorescence Counting Kit-F、CCK-F 或 CCKF。

本试剂盒检测速度快, 仅需约 30 分钟即可完成细胞活性检测。

本试剂盒检测灵敏度高, 线性范围宽。本试剂盒可检测低至 50 个活细胞, 并且在 50-50,000 个细胞范围内有很好的线性关系。对于不同的细胞线性范围略有差别。

本试剂盒通常推荐使用荧光酶标仪进行定量检测, 也可以使用流式细胞仪进行定量检测。如果有必要, 也可以使用荧光显微镜或共聚焦显微镜进行细胞的荧光检测。

Calcein AM (Calcein Acetoxymethyl Ester, 中文名称为钙黄绿素 AM 或钙黄绿素乙酰氧基甲酯), 是一种可渗透进入细胞、常用于测定真核细胞活力或线粒体通透性转换孔(Mitochondrial Permeability Transition Pore, MPTP)的绿色荧光探针, 近年来也被广泛用于细胞活性、细胞毒性或细胞增殖的检测。

Calcein AM 是在 Calcein (钙黄绿素)的基础上增加了乙酰氧基甲酯(AM)基团, 加强了疏水性, 因此能够很容易穿透活细胞膜, 进入细胞内, 从而标记细胞。Calcein AM 本身并无荧光, 进入细胞后被细胞中内源性酯酶水解生成具有强负电荷的不能通透细胞膜的极性分子钙黄绿素(Calcein), 从而被滞留在细胞内, 而 Calcein 可发出强绿色荧光。与其它同类探针相比, 由于 Calcein AM 的细胞毒性非常低, 几乎不会影响细胞功能如细胞增殖或淋巴细胞的趋化性等,

而且对 pH 值敏感性低, 所以 Calcein AM 是目前活细胞荧光染色的最理想探针之一。

由于死细胞缺乏酯酶, Calcein AM 进入细胞后仅活细胞会被染色为绿色荧光, 所以可对活细胞进行定量荧光检测。本检测方法无需任何放射性同位素标记(如 $[3H]$ -thymidine 掺入法)或溶解步骤(如 MTT 检测), 通常无须洗涤, 即可获得高度可重复性和精确性的细胞增殖检测结果。本试剂盒用于活细胞数量荧光检测的结果参考图 1。

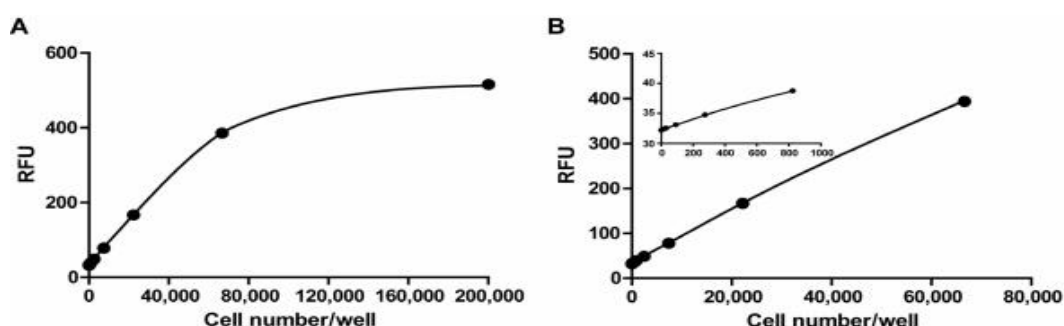


图 1. Calcein AM 细胞活性检测试剂盒用于检测 MOLM13 (人急性髓原白血病细胞)活细胞数量的效果图。MOLM13 细胞经计数后按 3 倍稀释接种到全黑 96 孔细胞培养板中, 加入 Calcein AM 检测工作液孵育 30 分钟, 随后直接在荧光酶标仪下检测 Ex/Em=494/517nm。

实测数据会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异, 图中数据仅供参考。

核酸红色荧光染料碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)由于不能穿透活细胞的细胞膜而只能染色细胞膜完整性被破坏的死细胞, 所以 Calcein AM 常常与碘化丙啶联合使用, 对活细胞和死细胞同时进行双重荧光染色。本试剂盒中的 Calcein AM(1000X)与碘化丙啶(需另购)用于活细胞和死细胞双染的结果参考图 2。

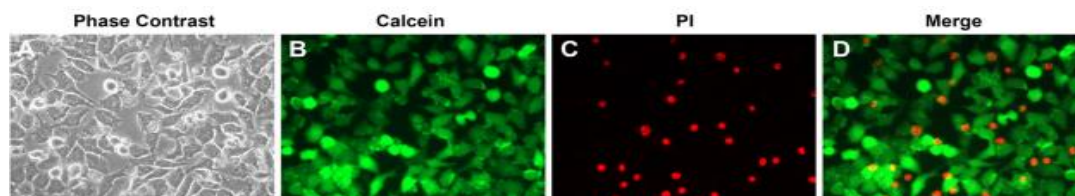


图 2. Calcein AM 细胞活性检测试剂盒与碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)联合使用检测 L-929 活细胞与死细胞的效果图。L-929 细胞在明场视野下可见明显的坏死细胞(图 A); 绿色荧光标记的即为 Calcein 染色的活细胞(图 B), 红色荧光标记的即为 PI 染色的死细胞(图 C);

Calcein 和 PI 双染 merge 后更可以观察到活细胞和死细胞的差别(图 D)。在本实验中, L-929 细胞经 TSZ 处理 3 小时。TSZ 为 $TNF\alpha$ 、SM-164 和 Z-VAD-FMK 组成的细胞程序性坏

死诱导试剂盒。实测数据会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

本试剂盒可以应用于大多数的哺乳动物细胞。有报道称 Calcein AM 也可以用于某些植物细胞如拟南芥(*Arabidopsis*)的根边缘样细胞(root border-like cells)及某些酵母如 *Pichia anomala* 和 *Saccharomyces cerevisiae*。某些寄生虫如 *Leishmania* 由于细胞膜组分的原因，Calcein AM 不能进入活细胞，但却可以进入凋亡早期的寄生虫细胞，从而与 PI 联用于检测凋亡早期的寄生虫。由于真菌和细菌有细胞壁，会阻碍 Calcein 进入细胞，因此 Calcein AM 不适合用于真菌和细菌。

Calcein 本身是一种金属络合指示剂，在生理 pH 条件下和 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 和 Mn^{2+} 等金属离子络合时，荧光信号会发生淬灭。使用本试剂盒的时候需要避免在细胞培养液中额外添加这些影响 Calcein 荧光的物质。Calcein AM 及其水解产物 Calcein 的分子结构式参考图 3。

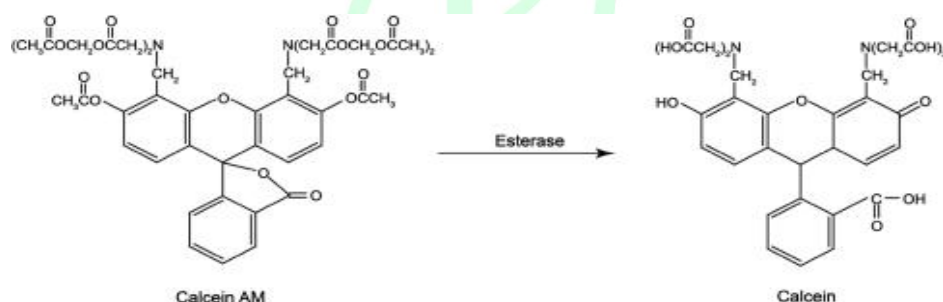


图 3. Calcein AM 及其水解产物 Calcein 的分子结构式。

Calcein AM 的水解产物 Calcein 的最大激发光波长为 494nm，最大发射波长为 517nm。Calcein 的激发光谱和发射光谱参考图 4。

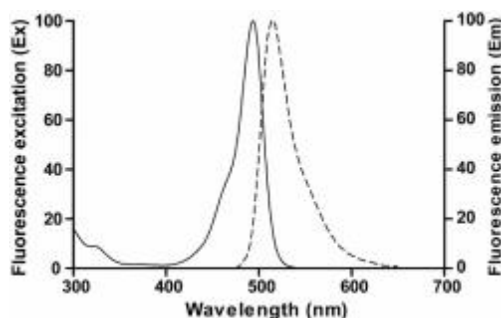


图 4. Calcein 的激发光谱和发射光谱。



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

本试剂盒提供的 Calcein AM 为 1000X 溶液。该 1000X 的 Calcein AM 溶液经过优化, 对大多数细胞都适用, 但为得到比较理想的结果, 也可根据细胞类型和实验实际情况对 Calcein AM 在 500-2000 稀释倍数之间进行适当调整。本试剂盒同时提供适合 Calcein AM 染色的检测缓冲液, 该染色液可在一段时间内维持细胞的正常状态, 并给细胞提供一定的营养, 效果比 PBS 或 HBSS 更好。

对于 96 孔板, 按 1:1000 配制 Calcein AM 检测工作液, 且每孔使用 100 μ l Calcein AM 检测工作液, 此时本试剂盒 R32164-100T 可进行 100 次检测, R32164-500T 可进行 500 次检测, R32164-2500T 可进行 2500 次检测。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
R32164-100T	Calcein AM (1000X)	12 μ l
	检测缓冲液	12ml
—	说明书	1 份

产品编号	产品名称	包装
R32164-500T	Calcein AM (1000X)	55 μ l
	检测缓冲液	55ml
—	说明书	1 份

产品编号	产品名称	包装
R32164-2500T	Calcein AM (1000X)	260 μ l
	检测缓冲液	260ml
—	说明书	1 份

保存条件:

-20 $^{\circ}$ C 保存, 60 个月有效。

注意事项:

如果后续使用荧光酶标仪进行荧光定量检测, 细胞须接种于黑色多孔板。

荧光染料均存在淬灭问题, 请尽量注意避光, 以减缓荧光淬灭。

Calcein AM (1000X)在潮湿环境中容易分解, 收到产品后建议适当分装并-20 $^{\circ}$ C 密封保存。



由于 Calcein AM 在水溶液中不稳定, Calcein AM 检测工作液须现配现用, 不能配制后冻存。

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。

本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。

为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明:

1. Calcein AM 检测工作液的配制:

按照 96 孔板每孔 100 μ l Calcein AM 检测工作液的体系, 参考下表配制适量的 Calcein AM 检测工作液, 需充分混匀。

	10 个样品	100 个样品	1000 个样品
Calcein AM (1000X)	1 μ l	10 μ l	100 μ l
检测缓冲液	1ml	10ml	100ml
Calcein AM 检测工作液	1ml	10ml	100ml

注 1: 为得到比较理想的结果, 可根据细胞类型和实际情况对 Calcein AM (1000X)在 500-2000 稀释倍数之间进行适当调整。

注 2: 配制好的 Calcein AM 检测工作液必须一次使用完毕, 不能冻存。

注 3: 也可以用其它合适的缓冲液, 如无血清培养液、HBSS 或 PBS 稀释 Calcein AM (1000X)。本试剂盒配套提供的检测缓冲液可在一段时间内维持细胞的正常状态, 并给细胞提供一定的营养, 效果通常比 PBS 或 HBSS 更好。

2. 贴壁细胞的荧光酶标仪检测或荧光显微镜检测:

a. 接种培养。将细胞接种于 96 孔板等多孔板、细胞培养皿中或者细胞爬片上, 按实验设计对细胞进行一定处理。如果用于 96 孔荧光酶标仪检测, 细胞须接种于黑色多孔板, 每孔的细胞数需要控制在 100-10000 个, 通常宜在 2000-5000 个范围内。



b. 洗涤(选做)。吸除培养液，用 PBS 洗涤细胞 1 遍。酚红或血清对于本试剂盒的检测有一定的干扰，吸除培养液和 PBS 时最好使用真空泵。在能充分吸净残留液体的情况下，可以不使用 PBS 洗涤。

c. 染色。加入适当体积的 Calcein AM 检测工作液。通常 96 孔板每孔加入 100 μ l，24 孔板每孔加入 250 μ l，12 孔板每孔加入 500 μ l，6 孔板每孔加入 1ml。37 $^{\circ}$ C 避光孵育 30min。不同的细胞最佳孵育时间有所不同，以 30min 作为初始孵育时间，后续可以根据实际染色效果对染色时间进行适当调整和优化，以得到更加理想的染色效果。

d. 检测。孵育结束后，可以直接用荧光酶标仪(激发波长 494nm，发射波长 517nm，490nm 和 520nm 也可以)检测荧光并计算细胞活性，细胞活性和荧光强度成正比。根据具体的实验目的，也可以在荧光显微镜下观察染色效果。对于贴壁细胞 L-929，本产品与 PI 联合使用的效果参考图 2。如有需要，也可进一步进行其它荧光的复染。例如使用 Annexin V-PE 细胞凋亡检测试剂盒或 Propidium Iodide/ 碘化丙啶检测细胞凋亡、Mito-Tracker Red CMXRos 检测线粒体活力、Hoechst 33342 活细胞染色液染色细胞核等。注意整个过程均需避光操作。

3. 悬浮细胞的荧光酶标仪检测或荧光显微镜检测：

a. 接种培养。将细胞接种于 96 孔板等多孔板、细胞培养皿中，按实验设计对细胞进行一定处理。如果用于 96 孔荧光酶标仪检测，细胞须接种于黑色多孔板，，每孔的细胞数需要控制在 100-10000 个，通常宜在 2000-5000 个范围内。

b. 洗涤(选做)。250-1000 \times g 室温离心 5min，吸除上清，用 PBS 洗涤 1-2 遍。酚红或血清对于本试剂盒的检测有一定的干扰，吸除培养液和 PBS 时最好使用真空泵。在能充分吸净残留液体的情况下，可以不使用 PBS 洗涤。

c. 染色。加入适当体积的 Calcein AM 检测工作液。通常 96 孔板每孔加入 100 μ l，24 孔板每孔加入 250 μ l，12 孔板每孔加入 500 μ l，6 孔板每孔加入 1ml。37 $^{\circ}$ C 避光孵育 30min。不同的细胞最佳孵育时间有所不同，以 30min



作为初始孵育时间，后续可以根据实际染色效果对染色时间进行适当调整和优化，以得到更加理想的染色效果。

d. 检测。孵育结束后，可以直接用荧光酶标仪(激发波长 494nm，发射波长 517nm，490nm 和 520nm 也可以)检测荧光并计算细胞活性，细胞活性和荧光强度成正比。根据具体的实验目的，也可以在荧光显微镜下观察染色效果。对于悬浮细胞 MOLM13，本产品未经洗涤直接使用荧光酶标仪检测不同细胞数的效果参考图 1。

4. 流式细胞仪检测：

a. 细胞准备。贴壁细胞胰酶消化后用培养液重悬，并用 PBS 洗涤一次。悬浮细胞 250-1000×g 室温离心 5min，弃上清，用 PBS 洗涤一次。每个样品推荐的细胞用量为 10⁶。

b. 染色。对于上一步骤的 10⁶ 个细胞的沉淀，加入 1ml Calcein AM 检测工作液，重悬为单细胞悬液。37 °C 避光孵育 30min。

注：需要准备好仅含缓冲液的细胞样品用作流式细胞仪检测时的阴性对照，该缓冲液与配制 Calcein AM 检测工作液的缓冲液宜保持一致。

c. 检测。孵育完成后，可以直接进行流式细胞仪检测，也可以 250-1000×g 室温离心 5min 沉淀细胞，吸净液体后每个样品加入 0.5ml 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 Annexin V-PE 细胞凋亡检测试剂盒或 Propidium Iodide/碘化丙啶检测细胞凋亡、Mito-Tracker Red CMXRos 检测线粒体活力、Hoechst 33342 活细胞染色液染色细胞核等。注意整个过程均需避光操作。染色后，将样品置于冰上，尽量在 1 小时内进行流式细胞仪检测和分析。注意使用仅含检测缓冲液的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。