

Calcein/PI 细胞活性与细胞毒性检测试剂盒

产品编号	产品名称	包装
R32165-100T	Calcein/PI 细胞活性与细胞毒性检测试剂盒	100T
R32165-500T	Calcein/PI 细胞活性与细胞毒性检测试剂盒	500T
R32165-2500T	Calcein/PI 细胞活性与细胞毒性检测试剂盒	2500T

产品简介:

源叶生产的 Calcein/PI 细胞活性与细胞毒性检测试剂盒(Calcein/PI Cell Viability/Cytotoxicity Assay Kit, 或 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 (碘化丙啶)双荧光染色法检测动物细胞死活的试剂盒。

本试剂盒使用便捷, 荧光染色和检测仅需约 30 分钟。本试剂盒染色 30 分钟后, 就可进行后续的荧光显微镜拍照、流式分析或者荧光酶标仪定量等荧光检测和分析。

本试剂盒的原理是两种探针可分别检测细胞内酯酶活性和细胞膜完整性, 从而反映细胞活性与细胞毒性。其中 Calcein AM 染色活细胞, 呈现绿色荧光; 而碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)染色死细胞, 呈现红色荧光。本试剂盒用于检测动物细胞活性与细胞毒性效果参考图 1。

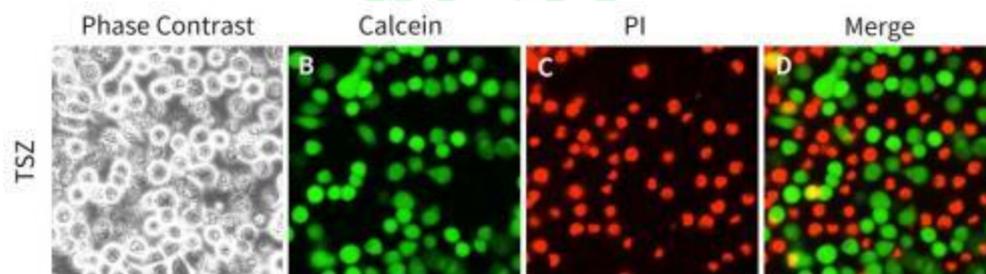


图 1. Calcein/PI 细胞活性与细胞毒性检测试剂盒用于 HT-29(人结肠癌细胞)细胞活性与细胞毒性检测的效果图。HT-29 细胞在明场视野下仔细观察可以看到有明显的坏死细胞(图 A); 绿色荧光标记的即为 Calcein 染色的活细胞(图 B), 红色荧光标记的即为 PI 染色的死细胞(图 C); Calcein 和 PI 双染叠加(merge)后可以非常清晰地观察到活细胞和死细胞的荧光染色差别(图 D)。在本实验中, HT-29 细胞经 TSZ 处理 4 小时。TSZ 为 $TNF\alpha$ 、SM-164 和 Z-

VAD-FMK 组成的细胞程序性坏死诱导试剂。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。

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), 是一种可以对活细胞进行荧光染色的细胞染色试剂, 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细胞膜。Calcein AM 本身并没有荧光, 进入细胞后被活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。由于死细胞缺乏酯酶或酯酶活性很低, Calcein AM 进入细胞后含有酯酶的活细胞可以产生 Calcein, 而死细胞不能或很少能产生 Calcein, 因此仅活细胞会被染色为强绿色荧光, 死细胞不能被染色或者染色非常弱。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。因此, Calcein AM 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, 就能用于细胞活性与细胞毒性的检测。

Calcein AM 水解产物 Calcein 的最大激发光波长为 494nm, 最大发射光波长为 517nm; PI-DNA 复合物的最大激发光波长为 535nm, 最大发射光波长为 617nm。Calcein 和 PI-DNA 的激发光谱和发射光谱参考图 2。

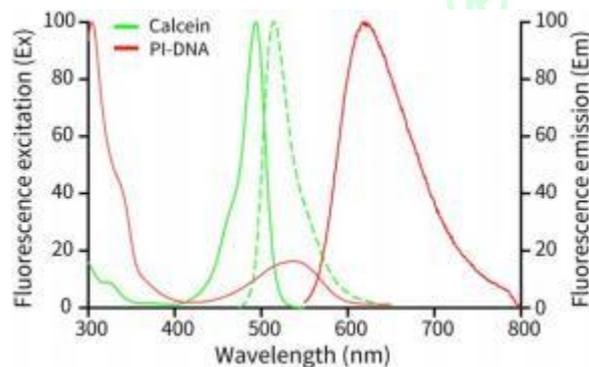


图 2. Calcein 和 PI-DNA 的激发光谱和发射光谱。

本试剂盒可以用于大多数的哺乳动物细胞的检测。有报道称 Calcein AM 也可以用于一些植物细胞如拟南芥(Arabidopsis)的根边缘样细胞(root border-like cells)、一些酵母如 Pichia anomala 和 Saccharomyces cerevisiae 和一些寄生虫如 Leishmania。由于一些寄生虫细胞膜组分比较特殊的原因, Calcein AM 不能进



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

入相应的活细胞, 但可以进入凋亡早期的寄生虫细胞, 从而与 PI 联用可以用于检测凋亡早期的寄生虫细胞。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。本试剂盒与类似用途的台盼蓝染色液相比, 更快捷且灵敏度更高。

本试剂盒提供的 Calcein AM 和 PI 为 1000X 溶液, 使用非常便捷。并且这两种溶液都经过优化, 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 或 PI 在 500-2000 稀释倍数之间进行适当调整。同时, 本试剂盒提供了检测缓冲液, 该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, 效果比 PBS 或 HBSS 更好。

对于 96 孔板, 按推荐稀释倍数配制相关检测试剂, 且每孔使用 100 μ l, 此时本试剂盒的小包装、中包装和大包装分别可以检测 100 次、500 次和 2500 次。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
R32165-100T	Calcein AM (1000X)	12 μ l
	PI (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
R32165-500T	Calcein AM (1000X)	55 μ l
	PI (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
R32165-2500T	Calcein AM (1000X)	260 μ l
	PI (1000X)	260 μ l
	检测缓冲液	260ml
—	说明书	1 份

保存条件:

-20 $^{\circ}$ C 保存, 12 个月有效。



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

注意事项:

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, 首次使用时建议适当分装并-20°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/PI 检测工作液的配制:

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

	10 个样品	100 个样品	1000 个样品
Calcein AM (1000X)	1 μ l	10 μ l	100 μ l
PI (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染色效果对 Calcein AM (1000X)和 PI (1000X)在 500-2000 稀释倍数之间进行适当调整。

注 2: 配制好的 Calcein AM/PI 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溶液, 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. 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。

b. 洗涤(选做)。对于贴壁细胞, 吸除培养液, 用 PBS 洗涤细胞 1 遍; 对于悬浮细胞, 250-1000×g 室温离心 5min, 吸除上清, 用 PBS 洗涤 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/PI 检测工作液。通常 96 孔板每孔加入 100μl, 24 孔板每孔加入 250μl, 12 孔板每孔加入 500μl, 6 孔板每孔加入 1ml。37°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, 在荧光显微镜下观察染色效果(Calcein AM 为绿色荧光, Ex/Em=494/517nm; PI 为红色荧光, Ex/Em=535/617nm)。对于贴壁细胞 HT-29, 本产品的荧光染色效果参考图 1。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。注意整个过程均需注意避光操作。

3. 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 个细胞。

b. 染色。对于上一步骤的 10⁶ 个细胞的沉淀, 加入 1ml Calcein AM/PI 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/PI 检测工作液的缓冲液宜保持一致。同时准备两管额外的细胞样品, 每管只加入一种染料(Calcein AM 或 PI), 用于流式单染的补偿调节。

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(Calcein AM 为绿色荧光, Ex/Em=494/517nm; PI 为红色荧光, Ex/Em=535/617nm)。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。注意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 小时内进行流式细胞仪检测和分析。

注 1: 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。

注 2: 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。

注 3: 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。

4. 荧光酶标仪检测细胞死活的变化:

a. 接种培养。将细胞接种于 96 孔板黑色多孔板中, 每孔的细胞数需要控制在 100-10,000 个, 通常宜在 2000-5000 个范围内。按实验设计对细胞进行一定处理。

b. 洗涤(选做)。对于贴壁细胞, 吸除培养液, 用 PBS 洗涤细胞 1 遍; 对于悬浮细胞, 250-1000×g 室温离心 5min, 吸除上清, 用 PBS 洗涤 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/PI 检测工作液, 通常 96 孔板每孔加入 100μl。37°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, 用荧光酶标仪检测(Calcein AM 为绿色荧光, Ex/Em=494/517nm; PI 为红色荧光, Ex/Em=535/617nm)。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。

5. 荧光酶标仪检测细胞死活的比例: 本方法通过设置对照, 可计算出死细胞与活细胞的比例。

a. 细胞培养和处理同前。

b. 除配制 Calcein AM/PI 检测工作液外, 还需要配制单独的 Calcein AM 检测工作液和 PI 检测工作液用于对照的检测。配制方法和稀释倍数与 Calcein AM/PI 检测工作液的配制一致。

c. 检测样品组和对照组设置:

对于下面组别的细胞或无细胞组, 需要保持细胞数量、检测工作液浓度、孵育时间和孵育温度的完全一致。

编号	组别	检测工作液	激发波长	发射波长	结果命名
(1)	样品组	Calcein AM/PI	494nm	517nm	F(517)sam
(2)	样品组	Calcein AM/PI	535nm	617nm	F(617)sam
(3)	活细胞组	PI	494nm	517nm	F(517)min
(4)	活细胞组	Calcein AM	494nm	517nm	F(517)max
(5)	死细胞组	PI	535nm	617nm	F(617)max
(6)	死细胞组	Calcein AM	535nm	617nm	F(617)min
(7)	无细胞组	Calcein AM/PI	494nm	517nm	F(517)0
(8)	无细胞组	Calcein AM/PI	535nm	617nm	F(617)0

活细胞组为没有加入药物处理的细胞; 死细胞组可用 0.1-0.5%洋地黄皂苷(ST1272)或 0.1%皂素处理细胞 10 分钟, 或 70%乙醇孵育细胞 30 分钟即可得到死细胞。

d. 染色和检测步骤同前。

e. 根据检测数据计算死细胞与活细胞的比例:

$$\% \text{ Live Cells} = \frac{F(517)_{sam} - F(517)_{min}}{F(517)_{max} - F(517)_{min}} \times 100\%$$

$$\% \text{ Dead Cells} = \frac{F(617)_{sam} - F(617)_{min}}{F(617)_{max} - F(617)_{min}} \times 100\%$$

注 1: 其中所有的 F(517)和 F(617)都减去相应的 F(517)₀和 F(617)₀。



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

注 2: 如果需要确定活细胞与死细胞的具体数量, 可制作不同数量活细胞与死细胞在 517nm 和 617nm 处的荧光光谱标准曲线。该标准曲线呈线性关系, 因此通过标准曲线和样品中两个染料的荧光强度可计算出活细胞与死细胞的数量。

