

## Calcein-AM/PI 细胞活性与细胞毒性检测试剂盒

Calcein-AM/PI Cell Activity and Cytotoxicity Assay Kit

### 使用说明书

#### ◆货号及规格:

目录编号	包装规格
C225-01	500T
C225-02	1000T

#### ◆产品组成:

组分编号	试剂盒组分	储存条件	C225-01 (500T)	C225-02 (1000T)
C225-1	Calcein-AM 溶液(4mM)	-20℃(避光)	50uL	2*50uL
C225-2	PI 溶液(2mM)	-20℃(避光)	150uL	2*150uL

◆**储存条件:** 冰块运输, -20℃避光保存, 保质期 12 个月。

#### ◆产品概述:

Calcein AM(中文名称为钙黄绿素 AM 或钙黄绿素乙酰氧基甲酯)和碘化丙啶(PI)溶液, 分别对活细胞和死细胞染色, 可用于同时对活细胞和死细胞进行荧光染色。

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(激发: 490nm, 发射: 515nm)。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, 只能通过死细胞膜的无序区域而到达细胞核, 并嵌入细胞的 DNA 双螺旋从而产生红色荧光(激发: 535nm, 发射: 617nm)。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。

#### ◆使用方法:

##### 一、染色溶液的配制:

1. 将低温保存的 Calcein-AM 溶液(4mM)和 PI 溶液(2mM)拿出，恢复室温 20-30min。
2. 取 5 $\mu$ L Calcein-AM 溶液(4mM)和 15 $\mu$ L PI 溶液(2mM)加入至 5mL 1 $\times$ PBS 缓冲液中，充分混匀，制成染色溶液。Calcein-AM 的终浓度为 4 $\mu$ mol/L, PI 的终浓度为 6 $\mu$ mol/L。

**注：**由于 Calcein-AM 的稳定性比较差，此染色工作液必须现配现用，并且在当天用完。

## 二、细胞染色：

1. 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。
2. 对于贴壁细胞，吸除培养液，用 PBS 洗涤细胞 1 遍；对于细胞悬液 800xg 左右离心 5min，去除上清液，加入 1 $\times$ PBS 缓冲液悬浮细胞，充分混匀。

**注：**由于培养基中的血清等含有酯酶，Calcein-AM 遇水会分解，会导致空白上升，所以需要离心数次，用 1 $\times$ PBS 缓冲液清洗细胞 2~3 次，以充分去除残留的酯酶活性。

3. 将 200 $\mu$ L 细胞悬液移至小试管中，加入 100 $\mu$ L 染色溶液，混匀，在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 15min。

**注：**如果需要，可延长孵育时间至 30min。

4. 在载玻片上滴加适量的染色的细胞溶液。
5. 在荧光显微镜下，先用 490 $\pm$ 10nm 波长激发，观察黄绿色的活细胞，还可以同时观察到红色的死细胞，然后用 545nm 波长激发，能够看到红色的死细胞；也可以直接在荧光酶标仪下使用合适的滤片进行检测。

## 三、最佳浓度染色试剂确认：

根据不同细胞种类，可以通过以下操作，找到不同细胞的最佳染色试剂浓度。

1. 通过在 0.1% 皂苷或 0.1-0.5% 毛地黄皂苷中孵育 10 分钟或通过 70% 乙醇中孵育 30 分钟制备死细胞。
2. 用 0.1-10 $\mu$ M PI 溶液对死细胞染色，以便找到仅对细胞核染色而不对细胞质染色的 PI 浓度。
3. 用 0.1-10 $\mu$ M Calcein-AM 溶液对死细胞染色，以便找到不对细胞质染色的 Calcein-AM 浓度。接着用该浓度的 Calcein-AM 对活细胞染色以检验活细胞可否被染色。

### ◆注意事项：

1. 由于 Calcein-AM 对湿度非常敏感，若是 Calcein-AM 溶液每次取完需要量后，必须紧紧密封盖子，建议根据单次用量，分装密封保存；Calcein-AM 工作液必须现配现用。

2. 碘化丙啶(PI)有一定的致癌性，操作时一定要注意防护，若接触到皮肤，需要立即用自来水清洗。
3. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
4. 本产品仅限于专业人员科学研究使用，不得用于临床诊断和药品等用途。

=====

