

Calcein AM/ PI 细胞活性与细胞毒性检测试剂盒

Cat NO : IMFP-D002

产品描述

Calcein-AM 是一种对活细胞进行荧光标记的细胞染色试剂，发绿色荧光，其激发和发射波长分别为 490 nm 和 515 nm。因其在传统的 Calcein（钙黄绿素）基础上引入乙酰甲氧基甲酯（AM）基团，增加了疏水性，使其能够轻易穿透活细胞膜。一旦进入细胞后，Calcein-AM（本身不发荧光）被细胞内的酯酶剪切形成膜非渗透性的极性分子 Calcein，从而被滞留在细胞内并发出强绿色荧光。与其它同类试剂（如 BCECF-AM 和 CFDA）相比，由于 Calcein, AM 细胞毒性极低，是最适合用于活细胞染色的荧光探针，而且不会抑制任何的细胞功能，如增殖和淋巴球的趋化性。由于死细胞缺乏酯酶，Calcein-AM 仅用于对活细胞的细胞生存能力测试和短期标记。

PI 是一种 DNA 结合性染料，其激发和发射波长分别为 535nm 和 617nm，产生红色荧光，但无膜通透性，不能透过活细胞膜，只能穿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。因此，PI 仅对死细胞染色。

由于 Calcein 和 PI 都可被 490 nm 激发，因此可用荧光显微镜同时观察活细胞和死细胞。而用 545 nm 激发，仅可观察到死细胞。

本染色方法适用于荧光显微镜、荧光酶标仪等微孔板荧光扫描设备、流式细胞仪或其他的荧光设备。本染色方法适用于大多数真核细胞，包括贴壁细胞和某些组织样本，但不包括细菌和酵母样本。

产品信息

表 1. 试剂盒组成信息

产品名称	产品规格	储存	
Calcein-AM Staining Solution (1 mM)	100T	100 uL	-20°C 避光, 12 个月
PI Staining Solution (1.5 mM)	100T	135 uL	-20°C 避光, 12 个月
1 × Assay Buffer	100T	25 mL	-20°C 避光, 12 个月
Calcein-AM Staining Solution (1 mM)	50T	50 uL	-20°C 避光, 12 个月
PI Staining Solution (1.5 mM)	50T	67.5uL	-20°C 避光, 12 个月
1 × Assay Buffer	50T	12.5 mL	-20°C 避光, 12 个月
Calcein-AM Staining Solution (1 mM)	20T	20 uL	-20°C 避光, 12 个月
PI Staining Solution (1.5 mM)	20T	27 uL	-20°C 避光, 12 个月
1 × Assay Buffer	20T	5 mL	-20°C 避光, 12 个月

实验操作

1. 1×染色工作液的配制:

1) 将低温保存的 Calcein-AM 溶液和 PI 溶液回到室温 20-30 min。

注: 第一次使用可对母液进行分装, 以减少反复冻融次数。

2) 取 20 μL Calcein-AM (1 mM) 溶液和 27 μL PI(1.5 mM)溶液加入 5 mL 1×Assay Buffer, 充分混匀后, 得到 Calcein-AM 的工作液浓度为4 μM, PI 的工作液浓度为 8 μM。即 1×染色工作液。

注: 由于不同类器官的最佳染色条件不同, 初次实验建议做梯度实验, 以确定 Calcein-AM 和 PI 的最适浓度。梯度筛选的原则为使用最低的探针浓度得到最好的荧光结果。

2. 染色步骤:

以 48 孔板, 每孔 10 uL 类器官基质胶滴为例, 检测时只需弃除类器官培养液, 保留孔板内 10 μL 类器官基质胶凝聚物, 加入染色工作液即可。

1) 吸弃类器官培养基, 加入 PBS 清洗2-3 次, 以充分去除残留的酯酶酶活性。

2) 每孔加入 250 μL 混匀后的染色工作液, 37°C 孵育 30~60 min。

- 3) 荧光显微镜下使用 $490 \pm 10 \text{ nm}$ 激发滤片同时检测活细胞（黄绿色荧光）以及死细胞（红色荧光）。另外，使用 545 nm 的发射滤片仅能观察到死细胞。也可以直接在荧光酶标仪下使用合适的滤片进行检测。

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。
2. 由于 Calcein-AM 的稳定性较差，此染色工作液必须**现配现用**，并且在当天完。
3. 荧光染料容易淬灭，染色完成后需要尽快进行检测。使用和保存时都需要注意避光。
4. 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。
5. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。