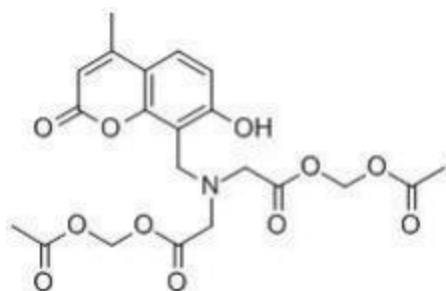


Calcein blue AM（钙黄绿素蓝乙酰甲酯）

Cat NO：IMFP-A002

产品简介

乙酰氧甲基（AM）的酯衍生物及其螯合剂组成的荧光探针广泛应用于活细胞研究中。羧酸经过修饰转化成 AM 酯基团变成不带电荷的分子，具有细胞膜通透性；一旦进入细胞内，亲脂性的保护基团发生非特性的水解，从而生成带电荷形式的分子滞留于细胞内。通常情况下，如果不发生水解，AM 酯形式的探针为无色荧光状态；这一特性可用于判断存储液是否发生自发水解。用于荧光探针的酯基与 AM 酯类似，处理方法基本一致。



产品信息

表 1.组成信息

产品名称	产品规格	储存条件	保质期
Calcein blue AM（钙黄绿素蓝乙酰甲酯）	1mg	-20℃	12 个月

使用说明

注意：产品中不包含可能需要使用到的 20%Pluronic F-127 助溶剂，客户需要另外购买或准备。

配制储存液

请使用高纯级的无水 DMSO 溶解产品，DMSO 应存放于密封好的氩或氮气并保持干燥。纯的乙酰氧甲基（AM）或其醋酸酯在 DMSO 中的溶解度较小（约 1 mg），溶解缓慢。由于溶剂极易吸水从而导致染料发生降解，配制好的储存液应密封良好，在干燥条件下冷冻保存，

储存液在适当的条件下至少可以稳定存放 6 个月，如需连续使用，请在配制后尽快用完。建议用户尽量配制高浓度的浓缩储存液以减少溶液中 DMSO 的含量(理想值 $\leq 0.1\%$)。

使用 Pluronic F-127 助溶剂

由于某些 AM 酯不溶于水，常常用低毒性的 Pluronic F-127®作为染料的助溶剂。可以将这种非离子型去污剂溶于 DMSO，配成终浓度为20% (w/v) 的溶液，然后用于配制染料储存液。40℃温和加热可以促进 Pluronic F-127®在 DMSO 中的溶解，但 Pluronic F-127®会降低乙酰氧甲基酯的稳定性，因此建议仅在配制染色工作液时加入。

注意：无论是否使用Pluronic F-127®， 请尽量将产品配制成高浓度浓缩储存液以减少溶液中 DMSO 的含量(理想值 $\leq 0.1\%$)。

Calcein AM 染色工作液的配制：

用合适的缓冲液，如无血清培养液、HBSS或 PBS稀释本产品，配制成浓度 0.1-5 μ M 的 Calcein AM 染色工作液。

注：Calcein AM 的最终浓度建议根据细胞类型和实验实际情况进行适当调整。

悬浮细胞的荧光显微镜检测或荧光酶标仪检测：

- 1、细胞按实验设计进行一定处理后，计数。取适当细胞 250 $\times$ g 室温离心 5min，弃上清，加入适当体积的 Calcein AM 染色工作液使细胞密度约为 1×10^6 /mL。
- 2、37℃孵育细胞30-45min，不同的细胞最佳孵育时间不同。可以考虑以30min 作为初始孵育时间，根据具体的实验情况进行适当优化得到更加理想的检测效果。
- 3、孵育结束后，250 $\times$ g 离心 5min，吸除上清液，缓慢加入 37℃预热的培养液重悬细胞。
- 4、重复步骤3 两次或以上以充分洗涤去除残留的染色液。
- 5、更换新鲜的37℃预热的培养液，37℃再避光孵育30 分钟，以保证细胞内酯酶充分水解Calcein AM 以生成有绿色荧光的 Calcein。
- 6、250 $\times$ g 室温离心 5min，吸除大部分培养液，用剩余培养液将细胞重悬后涂片，在荧光显微镜下观察或荧光酶标仪检测。Calcein 的最大激发光波长为494nm，最大发射光波长为 514nm。如有需要，也可进行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。

贴壁细胞的荧光显微镜检测或荧光酶标仪检测：

- 1、将细胞接种于培养皿、多孔细胞培养板或者细胞爬片上，按实验设计对细胞进行一定处理。
- 2、吸除培养液，用 PBS 清洗细胞 1-2 遍。
- 3、加入适当体积的 Calcein AM 染色工作液，轻轻晃动使染料均匀覆盖所有细胞。一般 96 孔板每孔体积为 100 μ L，24 孔板每孔体积为 250 μ L，12 孔板每孔体积为 500 μ L，6 孔板每孔体积为 1 mL。
- 4、37℃避光孵育 30-45min，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，根据所用细胞对孵育时间进行适当优化以得到更加理想的染色效果。
- 5、孵育结束后，更换成新鲜的 37℃预热的培养液，37℃再避光孵育 30min，以保证细胞内酯酶充分水解 Calcein AM 以生成有绿色荧光的 Calcein。
- 6、吸除培养液，用 PBS 清洗 2-3 次，然后加入无血清细胞培养液后即可在荧光显微镜下观察或荧光酶标仪检测。Calcein 的最大激发光波长为 494nm，最大发射光波长为 514nm。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。

流式细胞仪检测：

- 1、贴壁细胞胰酶消化后用培养液重悬，悬浮细胞直接使用，计数，取适量细胞 $250\times g$ 室温离心 5min，弃上清，加入适当体积的 Calcein AM 染色工作液，使细胞为单细胞悬液，并且细胞密度为约 $1\times 10^6/\text{mL}$ ，每个样品体积为 1mL。**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 染色工作液的缓冲液宜保持一致。**
- 2、37℃避光孵育 30min。
- 3、孵育完成后， $250\times g$ 室温离心 5min 收集细胞。每个样品加入 1mL 缓冲液，轻轻重悬， $250\times g$ 室温离心 5min 收集细胞。**注：本步骤可去除多余染料及可能引起荧光淬灭的试剂。**
- 4、用 400 μ L 缓冲液重悬细胞。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，可以在 1 小时内进行流式细胞仪检测和分析。

5、注意使用仅含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。Calcein 的最大激发光波长为494nm，最大发射光波长为 514nm。

注意事项

1、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。

2、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

3、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。

4、乙酰氧基甲基酯（AM）易吸潮，冰箱取出后请在干燥的环境放至室温后再开封。由于试剂微量，开封前请将其短暂离心，以保证粉末落入管底。

5、Calcein blue AM 对湿度非常敏感，粉末保存一定要干燥。Calcein blue AM 储存液需要分装避光冻存，且必须紧紧密封盖子，干燥保存。Calcein blue AM 工作液必须现配现用。