

Calcein AM/PI Double Staining Kit

Cat. No: PBCA002

Size: 100T/500T/2000T

产品编号	产品名称	100T	500T	2000T	Storage
PBCB002	Calcein AM Solution	100 μ L	500 μ L	500 μ L $\times$ 4	-20 $^{\circ}$ C, shading light
PBCB003	PI Solution	100 μ L	500 μ L	500 μ L $\times$ 4	-20 $^{\circ}$ C, shading light
PBCB004	Calcein AM Assay Buffer	25mL	55mL $\times$ 2	110mL $\times$ 4	-20 $^{\circ}$ C
	说明书			一份	

保存条件

-20 $^{\circ}$ C 避光可保存 1 年。Calcein AM Solution 首次使用时建议适当分装并密封避光保存，防止潮湿环境中发生自发性酯水解。

产品简介

Calcein AM/PI Double Staining Kit 可用于区分含有酯酶活性的哺乳动物的死细胞和活细胞，Calcein AM 是在传统的 Calcein 上添加上乙酰甲氧基甲酯即（AM）基团，疏水性增加，能很容易穿透活细胞膜，进入细胞内。Calcein AM 本身无荧光，进入细胞后被细胞中内源性酯酶水解，生成具有强负电荷且不能通过细胞膜的极性分子 Calcein 滞留在细胞内，而 Calcein 可发出强绿色荧光（Ex/Em= 494nm/517nm）。由于死细胞缺乏酯酶，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。死细胞的细胞膜选择透过性丧失，碘化丙啶（Propidium Iodide, PI）可以进入胞内与双链 DNA 特异性结合并产生强烈的红色荧光（Ex/Em=535nm/617nm），从而对死细胞进行标记。因此，Calcein AM 与碘化丙啶联合使用，可以对活细胞与死细胞同时进行双重荧光染色，可用于细胞活性与细胞毒性的检测。

自备试剂

PBS 缓冲液（pH 7.2~7.4）。

操作指南

1. 流式细胞仪检测

1.1 工作液的配制：

1.1.1 试剂准备：取出冻存的 Calcein AM/PI Double Staining Kit，室温解冻后，涡旋混匀各试剂。

1.1.2 配制 Calcein AM/PI 染色工作液：室温解冻后，将涡旋混匀的 Calcein AM Solution 和 PI Solution 按照 $1\sim5\times10^5$ 个细胞/200 μ L 配制染色工作液。根据实验用量参考下表配制染色工作液。

组分	Calcein AM/PI 染色工作液体积		
	1mL	5mL	10mL
Calcein AM Solution	0.1μL	0.5μL	1μL
PI Solution	1μL	5μL	10μL
Calcein AM Assay Buffer	1mL	5mL	10mL

注：染色工作液中的 Calcein AM 易潮解，建议现配现用。

提示：为节约试剂及保证实验的准确性，可先将 Calcein AM Solution 进行梯度稀释，如用 Calcein AM Assay Buffer 将 Calcein AM Solution(100 μM)稀释 100 倍到 1 μM。染色前再使用 Calcein AM Assay Buffer 将 1 μM 的 Calcein AM Solution 稀释 100 倍到染色浓度(0.01 μM)，即 200 μL Calcein AM Assay Buffer 中加入 2 μL 1 μM 的 Calcein AM Solution。

1.1.3 用于阴性对照与补偿调节的单染管工作液配制参考下表配制：

组分	Calcein AM 单染工作液 (1mL)	PI 单染工作 液 (1mL)	阴性对照 (1mL)
Calcein AM Solution	0.1μL	0μL	0μL
PI Solution	0μL	1μL	0μL
Calcein AM Assay Buffer	1mL	1mL	1mL

注：染色工作液中的 Calcein AM 易潮解，建议现配现用；阴性对照管与单染管的细胞选择阳性药物组细胞。

1.2 染色流程：

1.2.1 收集细胞，300×g 离心 5 min，去上清，加入 1 mL PBS 重悬细胞沉淀，300×g 离心 5 min，去上清，重复洗涤 1 次，去上清。

1.2.2 每组 1~5×10⁵ 个细胞加入 200μL 染色工作液重悬，室温避光孵育 5~15 min。

1.2.3 孵育完成后，可以直接进行流式细胞仪检测，若不能及时检测，建议避光置于 4℃ 冰箱，2h 内进行流式细胞仪检测。

注：流式细胞仪检测时，Calcein 可用 FITC 通道，PI 可用 Percp/Cy5.5 通道或 PE 通道。

2. 荧光显微镜检测

2.1 工作液的配制：

2.1.1 试剂准备：取出冻存的 Calcein AM/PI Double Staining Kit，室温解冻后，涡旋混匀各试剂。

2.1.2 配制 Calcein AM/PI 染色工作液：室温解冻后，将涡旋混匀的 Calcein AM Solution 和 PI Solution 按照 96 孔板每孔 100μL 或 24 孔板每孔 200μL 配制染色工作液。根据实验用量参考下表配制染色工作液。

组分	Calcein AM/PI 染色工作液体积		
	1mL	5mL	10mL
Calcein AM Solution	10μL	50μL	100μL
PI Solution	10μL	50μL	100μL
Calcein AM Assay Buffer	1mL	5mL	10mL

注：染色工作液中的 Calcein AM 易潮解，建议现配现用。

Calcein AM Assay Buffer 有利于荧光探针的装载和荧光信号的维持，若贴壁细胞易脱落且敏感，建议使用基础培养基配制上述染色工作液。

2.2 染色流程：

2.2.1 小心吸除贴壁细胞的培养基，每孔加入适量 PBS 洗涤细胞，去除 PBS，重复洗涤 1 次，

吸除 PBS。

2.2.2 按照 96 孔板每孔 100 μ L 或 24 孔板每孔 200 μ L 的比例加入染色工作液, 37 $^{\circ}$ C 孵育 10~30min。
(基础培养基配制染色工作液需延长染色时间至 30~60min, 在反应结束 10min 加入 PI Solution。)

2.2.3 孵育结束后, 在荧光显微镜下观察染色效果 (Calcein 为绿色荧光, Ex/Em=494nm/517nm;
PI 为红色荧光, Ex/Em=535nm/617nm)。

注: 若是悬浮细胞, 则收集细胞沉淀后, 按照 $1\sim5\times10^5$ 个细胞加入 200 μ L 染色工作液重悬, 室温避光孵育 15~20min, 吸取细胞悬液滴加在载玻片上, 轻轻盖上盖玻片即可在显微镜下观察拍照。

注意事项

1. 本产品仅限于专业人员的科学研究使用。
2. 请注意安全事项, 遵守实验室试剂操作规范操作。为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。
3. 请按照合适的温度保存本产品, 以免失效。
4. 染色前使用无血清培养基 (血清中可能含有酯酶) 或者 PBS 洗涤细胞, 缓冲液中不能含有初级或次级胺, 因为脂肪组胺可裂解 AM 酯并妨碍负载。
5. 染色温度为 37 $^{\circ}$ C 可以降低染色所需时间。室温下染色可减轻荧光探针渗入细胞器的副作用。
6. Mn^{2+} 会加速荧光淬灭, 洗涤 buffer 中注意不要含有 Mn^{2+} 等金属离子。
7. 渗漏: AM 酯可被 P 糖蛋白多药载体排除。
8. 适用于任何含酯酶活性的动物细胞, 植物和细菌因含有细胞壁, Calcein AM 不能进入细胞内, 因此不适用于植物和细菌样本。
9. 可用 5%~20% 的 DMSO 处理细胞 2~4h, 或 70% 的酒精处理细胞 30min 来获得阳性质控样本。
10. 离心机升速和降速过高会引起细胞的损失, 建议调整升速不大于 3, 降速不大于 2, 即 $Acc \leq 3$, $Dec \leq 2$ 。
11. 用于荧光显微镜检测时, 对于贴壁能力弱的细胞, 建议先做防脱处理后再进行细胞接种和染色, 且 PI 染色时间不要超过 30min, 否则会导致 PI 假阳性, 若需要延长 Calcein AM 染色时间, 可在染色结束前的 10~30min 内加入 PI, 染色后 1~2h 内及时拍照。