

Superbrilliant[®] Calcein AM/PI 细胞双染试剂盒
Superbrilliant[®] Calcein AM/PI Double Stain Kit for Cells

Cat.No.: ZS-C31007

组分

货号	组分	ZS-C31007 (500T)
102035	Calcein-AM (4 mM in DMSO)	50 μ L
102036	PI (1.5 mM in water)	150 μ l
	说明书	1 份

储存: 4°C 避光, 可保存 12 个月。

简介: Superbrilliant™ Calcein AM /PI 细胞双染试剂盒内含两种染料: 钙黄绿素-AM (Calcein-AM) 和碘化丙啶(Propidium Iodide, PI), 分别对活细胞和死细胞染色。这个试剂盒可在荧光显微镜下同时观察在同一个细胞培养皿中的活细胞和死细胞。Calcein-AM 的乙酸甲基酯亲脂性很高, 可透过细胞膜, 通过活细胞内的酯酶作用脱去 AM 基团, 产生的 Calcein(钙黄绿素)发出强绿色荧光, 因此活细胞在荧光显微镜下可被检测到绿色荧光(激发: 490 nm, 发射: 515 nm)。另一方面作为核染色染料的 PI 可以通过受损的细胞膜进入到死细胞内并嵌入细胞的 DNA 双螺旋从而产生红色荧光, 因此死细胞会被检测到红色荧光(激发: 535 nm, 发射: 617 nm)。除了用荧光显微镜外, 也有报道可以用流式细胞仪和荧光酶标仪来进行定量检测。由于 Calcein 和 PI-DNA 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。用 545 nm 激发, 仅可观察到死细胞。

操作步骤

用荧光显微镜观察细胞形态, 由于不同细胞系的种类、浓度不同, 最佳的染色条件不同, 建议个别细胞摸索不同条件下的细胞贴壁情况, 并确定 Calcein-AM 和 PI 的最佳浓度条件。

1. 染色溶液的配制

- 1) 将 Calcein-AM 储备液和 PI 储备液恢复至室温;
- 2) 分别加 2.5 μl Calcein-AM 原液和 12.5 μl PI 原液至 5 mL PBS (pH=7.4) 中配制成染色工作液。Calcein-AM 的终浓度为 2 μmol/L, PI 的终浓度约为 5 μmol/L。

2. 细胞染色

- 1) 染色 HeLa 细胞等贴壁细胞时, 使用 Trypsin-EDTA 等消化细胞, 制备成细胞悬液。
- 2) 将细胞悬液离心 3 分钟 (1,000 rpm)。
- 3) 去除上清液, 加入 PBS 缓冲液, 细胞数量调整至 10^5 - 10^6 个/ml。再用移液器充分混匀。
- 4) 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 PBS 洗涤数次直到完全洗净。
- 5) 将 200 μ l 细胞悬液移至小试管中, 加入 100 μ l 染色溶液, 在 37°C 下孵育 15 分钟。
- 6) 在盖玻片上滴加适量的染色的细胞溶液。
- 7) 在荧光显微镜下, 先用 490 ± 10 nm 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 545 nm 波长激发, 能够看到红色的死细胞。

3. 染色试剂的最佳浓度

Calcein-AM 和 PI 最佳浓度根据不同的细胞种类而定, 通过以下的操作, 可以找到不同细胞染色试剂的最佳浓度。

- 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 μ 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 μM 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是否被染色。

