Code No. AG51007

AG51008

CytoDet Calcein AM / EthD-1 细胞活力检测试剂盒

CytoDet Calcein AM / EthD-1 Cell Viability Assay Kit

本产品仅供科学研究使用,不能用于人、动物的医疗或诊断程序,不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。 For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc.





> 产品概述

本产品是一款基于 Calcein AM 和 EthD-1 的双荧光染色法检测细胞活力的试剂盒。Calcein AM 与 EthD-1 可分别对活细胞与死细胞进行染色检测,其原理是 Calcein AM 有很强的疏水性,能够轻易穿透细胞膜进入细胞内,进入活细胞后被酯酶水解为 Calcein 留在细胞内,产生强烈的绿色荧光(Ex / Em = 494 nm / 517 nm);EthD-1 是一种高亲和性的核酸荧光染料,不能穿过活细胞膜,但能穿过死细胞膜到达细胞核,与死细胞的核酸结合产生强烈的红色荧光(Ex / Em = 528 nm / 617 nm);因此活细胞呈现绿色荧光,死细胞呈现红色荧光。

本产品操作简便,仅需染色 20~30 min 即可进行荧光显微镜拍照、流式细胞仪分析、激光共聚焦显微镜分析、酶标仪或其他荧光检测系统分析;适用范围广,可用于检测大多数真核动物细胞,但不适用于细菌和酵母。

▶ 产品组成

组分名称	AG51007 (50 rxns ^{*1})	AG51008 (150 rxns ^{*1})
Calcein AM (4 mM)	12.5 µ l	37.5 µ l
EthD-1 (2 mM)	50 μ Ι	150 μ Ι

*1:本试剂盒的反应次数以荧光显微镜检测时,12 孔板中1个孔用500 µ I工作液为1个反应计算。不同检测方法反应次数计算方法如下表:

检测方法	反应工作 液用量	Calcein AM (4 mM) *2	EthD-1 (2 mM) *2	AG51007 反应次数	AG51008 反应次数
荧光显微镜检测(12 孔板 1 个孔的用量)	500 µ I	0.25 μ Ι	1μΙ	50 rxns	150 rxns
流式细胞仪检测(1 个 检测样品的用量)	500 µ I	0.01 μ Ι	0.2 μ Ι	1250 rxns	3750 rxns
酶标仪检测(96 孔板 1 个孔的用量)	100 µ l	0.05 μ Ι	0.2 μ Ι	250 rxns	750 rxns

^{*2:} 表格中推荐的试剂用量可根据实际情况进行调整。

> 保存及运输

保存温度: -20℃避光保存运输温度: -20℃冰袋运输



▶ 产品优势

- 1. 本产品操作简便,可室温或 37℃检测,染色 20~30 min 即可进行检测。
- 2. Calecin AM 细胞毒性很低,一般不会抑制细胞功能。
- 3. EthD-1 较 PI(碘化丙啶)有更好的核酸结合性能和更高的发光强度。
- 4. 可用于多种仪器的检测,如流式细胞仪、荧光显微镜、激光共聚焦显微镜和酶标仪等。

> 实验原理

Calcein AM(Calcein Acetoxymethyl Ester,中文名称为钙黄绿素 AM 或钙黄绿素乙酰氧基甲酯),是一种对活细胞进行荧光标记的细胞染色试剂,具有很强的细胞膜渗透性,可轻易进入到细胞内,Calcein AM 本身并无荧光,进入细胞内被内源性酯酶水解生成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,Calcein 可发出强烈的绿色荧光(Ex / Em = 494 nm / 517 nm);由于死细胞缺乏酯酶,所以不会被 Calcein AM 染色或染色很弱。

EthD-1 是一种高亲和性的核酸荧光染料,与 DNA 结合后发出强烈的红色荧光(Ex/Em = 528 nm / 617 nm)。EthD-1 不能穿过活细胞的细胞膜;但能穿过死细胞膜的无序区域而到达细胞核。因此,EthD-1 可以对死细胞染色而不会染活细胞。

Calcein AM 和 EthD-1 的激发光谱和发射光谱参考图 1。

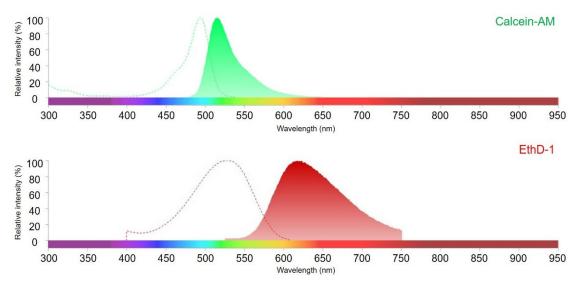


图 1.Calcein AM 和 EthD-1 的激发光谱和发射光谱

▶ 使用注意事项

使用前将 Calcein AM 和 EthD-1 溶液瞬时离心至管底,再进行后续实验。



- 2. Calcein AM 和 EthD-1 为荧光染料,均存在荧光淬灭的可能性,实验操作时注意尽量避光,以减缓荧光淬灭。
- 3. Calcein AM 需要保存在封闭、干燥的环境中,在潮湿环境容易水解,因此建议首次使用按照实验需求进行分装(本产品的包装袋中放置了干燥剂,分装后建议放回原包装袋,密封保存)。
- 4. Calcein AM 在水溶液中容易水解,因此 Calcein AM 工作液必须现配现用。
- 5. 血清对细胞染色有一定的干扰,建议实验时尽量用不含血清的缓冲液。

> 实验前准备

1. 试剂&耗材:

1.5 ml 离心管、流式管、细胞培养板、PBS等。

2. 仪器:

荧光显微镜、激光共聚焦显微镜、流式细胞仪、酶标仪或者其它等效仪器、 桌面离心机、振荡器、移液器等。

▶ 操作方法

A. 荧光显微镜检测

- 1. 准备 2 μ M Calcein AM 和 4 μ M EthD-1 的染色工作液
 - 1) 将 Calcein AM 和 EthD-1 原液放置于室温融化,使其恢复室温备用。
 - 2) 将 5 μ I 4 mM Calcein AM 和 20 μ I 2 mM EthD-I 加入到 10 ml PBS 或其他无血清培养基中,涡旋混匀,配制好的工作液,室温避光放置,可直接用于细胞染色 (注:由于 Calcein AM 在水溶液中易水解,因此 Calcein AM 工作液必须当天现配现用。不同的细胞最佳染色效果不一样,建议首次实验摸索最佳的 Calcein AM 和 EthD-1 的浓度,用最少的染色试剂达到最佳的染色效果。可以在 0.1~10 μ M 范围内进行摸索)。

2. 细胞准备

- 1) 对于悬浮细胞, 1000 rpm 室温离心 5 分钟, 去除上清, 收集细胞; 用 1×PBS 清洗细胞 1~2 次, 1000 rpm 室温离心 5 分钟, 去除上清, 保留沉淀进行染色实验;
- 2) 对于贴壁细胞,直接去除培养基,用 1×PBS 清洗细胞 1~2 次(注:吸弃上清的时候尽量不要吸到细胞;应尽量去除培养基,以去除残留酯酶与血清的影响)。

3. 染色



- 1) 向 PBS 清洗后的细胞中加入染色工作液。对于悬浮细胞,加入适量(例如 0.5~1 ml)染色工作液后,用手轻弹离心管,然后使用移液枪轻轻的吹打混匀,并使细胞密度控制在 1~10×10⁵/ ml。对于贴壁细胞,加入适量的染色工作液,轻轻晃荡细胞培养板,以均匀覆盖所有细胞,通常 96 孔板每孔加入 100 μl, 24 孔板每孔加入 250 μl, 12 孔板每孔加入 500 μl, 6 孔板每孔加入 1 ml。
- 2) 室温或 37℃避光孵育 20 分钟(注: 不同的细胞染色效果可能会有不同, 因此可根据染色效果, 调整优化染色时间)。
- 3) 荧光显微镜或激光共聚焦显微镜观察标记的细胞。

B. 流式细胞仪检测

1. 准备 0.08 μ M Calcein AM 和 0.8 μ M EthD-1 的染色工作液

- 1) 将 Calcein AM 和 EthD-1 原液放置于室温融化,使其恢复室温备用。
- 2) 用于流式细胞仪所需染料浓度过低,直接添加量极少,易引入加大误差,建议先将 Calcein AM 稀释后进行操作: Calcein AM 母液稀释至 10 μ M: 如取 2 μ l 4 mM Calcein AM 加入到 800 μ l PBS 或其他无血清培养基中,混匀后备用。
- 3) 将 8 μ l 10 μ M Calcein AM 和 4 μ l 2 mM EthD-l 加入到 10 ml PBS 或其他无血清培养基中,涡旋混匀,配制好的工作液,室温避光放置,可直接用于细胞染色。(注:由于 Calcein AM 在水溶液中易水解,因此 Calcein AM 工作液必须当天现配现用。此外流式细胞仪灵敏度很高,且不同的流式细胞仪灵敏度不同,为了达到最佳染色效果,Calcein AM 与 EthD-l 均可以在 0.05~8 μ M 范围内进行摸索。)

2. 细胞准备

- 1) 对于悬浮细胞,1000 rpm 室温离心5分钟,去除上清,收集细胞;对于贴壁细胞,先使用胰酶将贴壁细胞消化为单细胞悬液,再按照1000 rpm 室温离心5分钟,去除上清,收集细胞(注:吸弃上清的时候尽量不要吸到细胞;尽量去除培养基,以去除残留酯酶与血清的影响)。
- 2) 用 1×PBS 清洗细胞 1~2 次, 1000 rpm 室温离心 5 分钟, 去除上清, 保留沉淀进行染色实验。

3. 染色

- 1) 向 PBS 清洗后的细胞中加入适量(例如 0.5~1~ml)的染色工作液重悬细胞,使细胞密度控制在 $1~10\times10^5/\text{ml}$ 。
- 2) 室温或 37℃避光孵育 20 分钟(**注:不同的细胞染色效果可能会有不同,因此可根据染色效果,调整优化染色时间**)。



3) 使用流式细胞仪检测细胞(Calcein AM 与 EthD-1 均可由 488 nm 激光激发,Calcein AM 发射光谱约在 525 nm 处,可以使用检测 GFP、FITC 的通道进行检测; EthD-1 发射光谱约在 610 nm 处,可以使用检测 PI 的通道进行检测)。

C. 荧光酶标仪检测

1. 准备 2 μ M Calcein AM 和 4 μ M EthD-1 的染色工作液

- 1) 将 Calcein AM 和 EthD-1 原液放置于室温融化,使其恢复室温备用。
- 2) 将 5 μ I 4 mM Calcein AM 和 20 μ I 2 mM EthD-I 加入到 10 ml PBS 或其他无血清培养基中,涡旋混匀,配制好的工作液,室温避光放置,可直接用于细胞染色。(注:由于 Calcein AM 在水溶液中易水解,因此 Calcein AM 工作液必须当天现配现用。不同的细胞最佳染色条件不一样,建议首次实验摸索最佳的 Calcein AM 和 EthD-1 的浓度,用最少的染色试剂达到最佳的染色效果,可以在 0.1~10 μ M 范围内进行摸索。)

2. 细胞准备(以96孔板为例)

- 1) 对于悬浮细胞,将细胞收集至离心管中,1000 rpm 室温离心 5 分钟,去除上清,收集细胞;然后用 1×PBS 清洗细胞 1~2 次,1000 rpm 室温离心 5 分钟,去除上清,最后用 1×PBS 重悬细胞,使细胞密度控制在 1~10×10⁵/ml,按照 100 μ l 每 孔将细胞悬液添加至 96 孔板 (注: 吸弃上清的时候尽量不要吸到细胞;尽量去除培养基,去除残留酯酶的影响,同时去除血清对染色效果干扰)。
- 2) 对于贴壁细胞,可直接去除培养基,然后用 1×PBS 清洗细胞 1~2 次,最后每孔加入 100 μ l 1×PBS (注: 吸弃上清的时候尽量不要吸到细胞; 尽量去除培养基,去除残留酯酶的影响,同时去除血清对染色效果干扰)。

3. 染色

- 向每孔细胞液中加入 100 μ l 染色工作液,使孔中 Calcein AM 的终浓度为 1 μ M, EthD-l 的终浓度为 2 μ M。
- 2) 室温或 37℃避光孵育 30~45 分钟 (**注:不同的细胞染色效果可能会有不同,因此** 可根据染色效果,调整优化染色时间)。
- 3) 使用荧光酶标仪检测细胞荧光信号。

4. 计算活细胞与死细胞的比例

下面方法可以计算出死细胞与活细胞的比例。需要的组别有:死细胞对照组、活细胞对照组及待测的样品组。用 0.1-0.5%洋地黄皂苷处理细胞 10 min,即可得到死细胞。



- 1) 准备染色工作液及按上述步骤染色细胞。另外,分别准备 1 ml 2 μ M Calcein AM 和 4 μ M EthD-I 溶液,按照下列组别进行染色。对于下面组别的细胞或无细胞组,需要保持检测工作液浓度、孵育时间和孵育温度的完全一致。
- 2) 样品组及对照组测量:
 - A. 样品组在 645 nm 处的测量值,记为 Calcein AM 和 EthD-1=F(645)sam。
 - B. 样品组在 530 nm 处的测量值,记为 Calcein AM 和 EthD-1=F(530)sam。
 - C. 死细胞 EthD-1 单染对照组在 645 nm 的测量值, 记为 Calcein AM =F(645)_{max}。
 - D. 死细胞 Calcein AM 单染对照组在 645 nm 的测量值,记为 Calcein AM =F(645)min。
 - E. 活细胞 EthD-I 单染对照组在 530 nm 的测量值,记为 EthD-I=F(530)min。
 - F. 活细胞 Calcein AM 单染对照组在 530 nm 的测量值,记为 Calcein AM=F(530) maxo
 - G. 没有细胞的空白对照孔(加染料或不加染料均可), 530 nm 处的检测值记为 $F(530)_0$ 。
 - H. 没有细胞的空白对照孔(加染料或不加染料均可), 645 nm 处的检测值记为 F(645)₀。
- 3) 根据测量数据计算死细胞与活细胞的比例:

% Live Cells=
$$\frac{F(530)\text{sam}-F(530)\text{min}}{F(530)\text{max}-F(530)\text{min}} \times 100\%$$

% Dead Cells=
$$\frac{F(645)sam-F(645)min}{F(645)max-F(645)min} \times 100\%$$

> 实验例

1. 使用 70%甲醇致死处理 293T 细胞,用 2 μ M Calcein AM 和 4 μ M EthD−1 的染色工作液对细胞染色 20 min 后进行荧光显微镜观察,结果如图 2 所示。

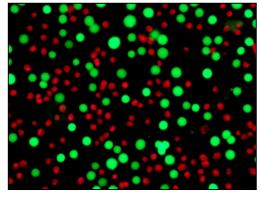


图 2: 绿色荧光: Calcein AM 染色的活细胞; 红色荧光: EthD-1 染色的死细胞。



使用 70%甲醇致死处理 293T 细胞, 用 0.08 μ M Calcein AM 和 0.8 μ M EthD-1 的染色工作液对细胞染色 20 min 后进行流式细胞仪检测,结果如图 3 所示。(流式细胞仪型号为 BECKMAN COMLTER-CytoFlex)。

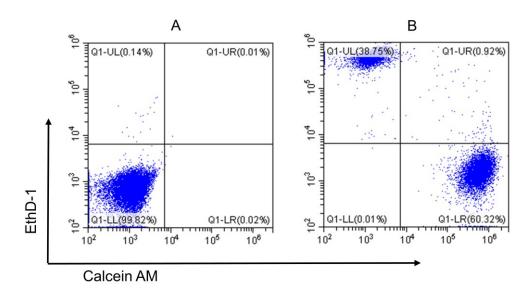


图 3: A: 未染色细胞; B: Calcein AM 与 EthD-1 染色的细胞。

> 产品注意事项

1. 合适的细胞浓度

❖ 显微镜观察或流式上机时细胞量少:建议增大初始细胞量。

2. 合适的染料浓度

- ◆ 使用合适的 Calcein AM 浓度:浓度过高,会导致荧光信号值偏强,可能会超出流式细胞仪检测的最大范围,同时可能会影响 EthD-1 荧光信号的检测;浓度过低,可能会导致荧光信号值偏低,对于荧光显微镜检测,可能会导致绿色荧光不清晰。可根据细胞染色情况调整 Calcein AM 浓度。
- ◆ 使用合适的 EthD-1 浓度:浓度过高,可能会导致荧光信号值较大,可能会超出流式细胞仪检测的最大范围;浓度过低,可能会导致荧光信号值偏低,对于荧光显微镜检测,可能会导致红色荧光不清晰;可根据细胞染色情况调整 EthD-1 浓度。

3. 背景信号值高

❖ 染色缓冲液使用 PBS 或者不含血清的培养基。