

CytoDet Calcein AM / EthD-1 细胞活力检测试剂盒

CytoDet Calcein AM / EthD-1 Cell Viability Assay Kit

Code No. AG51007

包装量: 50 rxns
保存温度: -20°C

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

Calcein AM (4 mM)	12.5 μl
EthD-1 (2 mM)	50 μl

*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 μl 工作液为 1 个反应计算。

保存及运输

保存温度: -20°C 避光保存

运输温度: -20°C 冰袋运输

使用注意事项

1. 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。

实验操作

A. 荧光显微镜检测

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

- a) 将 Calcein AM 和 EthD-1 原液放置于室温融化，使其恢复室温备用。
- b) 将 5 μl 4 mM Calcein AM 和 20 μl 2 mM EthD-1 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 μM 范围内进行摸索。）

2. 细胞准备

- a) 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；
- b) 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，以去除残留酶与血清的影响）。

3. 染色

- 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 $1\sim 10 \times 10^5$ / ml。对于贴壁细胞，加入适量的染色工作液，轻轻晃动细胞培养板，以均匀覆盖所有细胞，通常 96 孔板每孔加入 100 μ l，24 孔板每孔加入 250 μ l，12 孔板每孔加入 500 μ l，6 孔板每孔加入 1 ml。
- 室温或 37°C 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）。
- 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

- 将 Calcein AM 和 EthD-1 原液放置于室温融化，使其恢复室温备用。
- 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。
- 将 8 μ l 10 μ M Calcein AM 和 4 μ l 2 mM EthD-1 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-1 均可以在 0.05~8 μ M 范围内进行摸索。）

2. 细胞准备

- 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，以去除残留酶与血清的影响）。
- 用 1 \times 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

- 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 $1\sim 10 \times 10^5$ / ml。
- 室温或 37°C 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）。
- 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

- 将 Calcein AM 和 EthD-1 原液放置于室温融化，使其恢复室温备用。
- 将 5 μ l 4 mM Calcein AM 和 20 μ l 2 mM EthD-1 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）

- 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 \times 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 \times PBS 重悬细胞，使细胞密度控制在 $1\sim 10 \times 10^5$ / 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，去除残留酶的影响，同时去除血清对染色效果干扰）。
- 对于贴壁细胞，可直接去除培养基，然后用 1 \times PBS 清洗细胞 1~2 次，最后每孔加入 100 μ l 1 \times 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-1 的终浓度为 2 μ M。
- 室温或 37°C 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）。
- 使用荧光酶标仪检测细胞荧光信号。