



Cell-ID™ CFSE Cell Proliferation Kit

产品货号	包装规格
C025	1000 次

储存条件：-20℃，避光保存。

激发/发射波长：495/520 nm（水解产物）

产品说明书

晶科德生物科技（武汉）有限公司

Jinkede Biotechnology(Wuhan) Co.,Ltd

邮编：430000

电话：400-662-6996

网址：www.genecodex-bio.cn

Cell-ID™ CFSE Cell Proliferation Kit

货号：C025

试剂盒组分

组分	产品名称	数量	包装	储存条件	有效期
C025A	CFSE	500 µg	10 管	-20°C, 避光保存	6 个月
C025B	DMSO	1mL	1 管	-20°C	

产品介绍

Cell-ID™ CFSE 细胞增殖与示踪检测试剂盒采用一种荧光探针 CFSE 对细胞做标记用于细胞增殖检测和细胞荧光示踪。CFSE (Carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester) 中文全称羧基荧光素二醋酸琥珀酰亚胺酯, CFSE 可以通透细胞膜, 进入细胞后可以被细胞内酯酶的作用下发生水解, 产生明亮的绿色荧光。水解产物可以与细胞内蛋白的 Lysine 残基或其它氨基共价结合, 能够长期、稳定地进行细胞示踪。

由于 CFSE 标记细胞的荧光非常均匀和稳定, 每分裂一次子代细胞的荧光会减弱一半, 这样通过流式细胞仪检测就可以检测出没有分裂的细胞, 分裂一次的细胞(1/2 的荧光强度), 分离两次的细胞(1/4 的荧光强度), 分裂三次的细胞(1/8 的荧光强度)以及类似的其它分裂次数的细胞。采用 CFSE 通过流式细胞仪检测获得的检测结果参考如下示意图。每一个峰代表一种分裂次数的细胞, 从右至左的峰通常依次为分裂 0 次、1 次、2 次、3 次等次数的细胞。分裂次数较多后, 分裂 0 次或 1 次等没有分裂或分裂次数较少的细胞会逐渐减少直至检测不到。使用 CFSE 可以检测分裂多达 8-10 次细胞增殖。

CFSE 探针可用于细胞计数, 也可作为一种常规的细胞染色试剂。

注意事项

- 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。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

实验步骤

以下实验操作步骤仅供参考, 由于不同的细胞类型和不同的细胞培养条件, 使用者需根据实际情况对实验进行优化。建议使用 CFSE 的起始浓度为 1~10 µM。如果需要示踪 5 代或 5 代以上细胞代数的实验, 建议使用 5~10 µM 的 CFSE 浓度; 如果只需要示踪 5 代以内的细胞代数, 建议使用 1~2 µM 的 CFSE 浓度。荧光显微镜观察比流式细胞仪检测需要更高的染料浓度。在能够得到足够荧光信号的前提下, 尽量使用最低浓度的染料, 以降低对细胞的毒性。

做细胞计数的实验时, 建议做一个荧光强度与细胞密度的标准曲线, 确保所检测的荧光信号是在线性区间内, 与细胞数量成正比关系。做细胞传代示踪实验时, 需要对新鲜标记的还未分裂的部分细胞样本做流式分析, 已确定未分裂细胞的位置和相应的荧光值。

注意: CFSE 染料能与胺基发生反应, 所以不能使用含有胺基的缓冲液, 比如 Tris-缓冲液, 或者含多聚赖氨酸的培养皿或载体玻片。

CFSE 储存液制备

10 mM CFSE 储存液制备：取一管 500 μg 的 CFSE 染料管，加入 90 μl 无水 DMSO，摇匀溶解。

CFSE 工作液制备：在使用之前，用 PBS 或不含胺基的缓冲液将储存液稀释到一定的工作浓度。

剩余的 CFSE 储存液请于-80°C保存，最长不宜超过 2 个月。

悬浮细胞标记实验步骤

1.1 离心悬浮细胞，弃上清液。

1.2 加预热(37°C)的 CFSE 工作液重新悬浮细胞。建议使用 1~10 μM CFSE 浓度及 PBS 缓冲液。

1.3 在 37°C下孵育 20 分钟。

1.4 加入 5 倍体积的含血清细胞培养液，孵育 5 分钟。目的：去除溶液中剩余的荧光染料。

1.5 再次离心悬浮细胞，弃上清液，用预热的细胞培养液重悬细胞。 1.6 在 37°C下孵育至少 10~15 分钟，以确保 CFSE 充分水解。

1.7 如做细胞计数实验，使用 PBS 或其他类似的缓冲液洗涤细胞。然后转移到 96 孔板，用荧光酶标仪进行细胞定量分析，或制成细胞涂片在荧光显微镜下观察。

1.8 如做细胞传代示踪实验，使用者按照自己的实验设计对细胞进行诱导、孵育或分析，然后使用流式细胞仪进行分析。

贴壁细胞标记实验步骤

2.1 培养盖玻片或 96 孔板上的细胞到合适的生长密度。

2.2 移除培养基，加预热(37°C)的 CFSE 工作液，确保完全覆盖细胞。建议使用 1~10 μM CFSE 浓度及 PBS 缓冲液。

2.3 在 37°C下孵育 20 分钟。

2.4 使用新鲜的预热的细胞培养基，取代 CFSE 工作液。

2.5 在 37°C下孵育至少 10~15 分钟，以确保 CFSE 充分水解。

2.6 如做细胞计数实验，使用 PBS 或其他类似的缓冲液清洗细胞，然后用荧光酶标仪进行细胞定量分析，或在荧光显微镜下观察。

2.7 如做细胞传代示踪实验，使用者按照自己的实验设计对细胞进行诱导、孵育或分析，然后使用胰蛋白酶消化或其他细胞分离方法将细胞分离，再用流式细胞仪分析。

细胞固定和透化（可选）

3.1 在细胞固定之前，用 PBS 洗涤细胞。

3.2 使用含 4%甲醛的 PBS 溶液在常温下固定 15~20 分钟，注意避光。 3.3 使用 PBS 洗涤细胞。

3.4 如果需要，选用适当的方法对细胞进行透化处理。

3.5 细胞透化后，使用 PBS 洗涤细胞。

实验案例

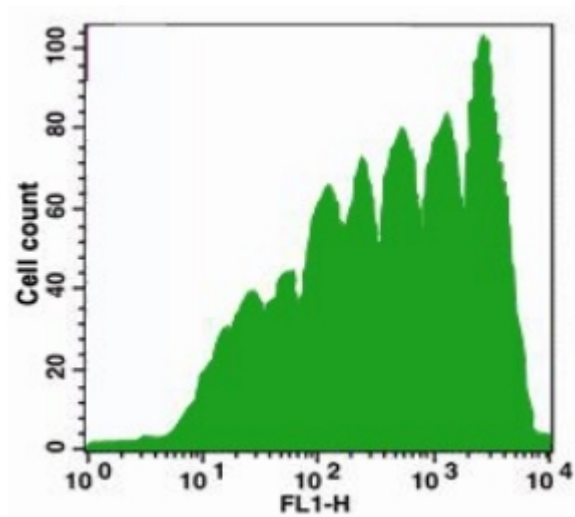


图 1. 淋巴细胞标记 Cell-ID™ CFSE 的流式细胞仪分析结果图。
淋巴细胞在第一天使用 Cell-ID™ CFSE 荧光染料进行标记。在细胞分裂之前捕获一部分细胞使用丝裂霉素进行处理，其余细胞使用植物凝集素进行处理，继续培养细胞至第五天，流式细胞术分析细胞传代情况。