



Viability/Cytotoxicity Kit for Animal Cells

(细胞活性和细胞毒性检测试剂盒)

产品货号	包装规格
C031	1000 次（荧光显微镜分析）； 100 次（流式细胞仪分析）

储存条件：-20°C，避光保存。

激发/发射波长 Calcein: 494/517 nm； Propidium iodide: 528/617 nm, 结合到 DNA 中。

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

Viability/Cytotoxicity Kit for Animal Cells

货号：C031

试剂盒组分

组分	试剂名称	包装	储存条件
C031A	Calcein AM	100 μ l, 4 mM	-20 $^{\circ}$ C, 避光保存
C031B	Propidium Iodide	100 μ l, 8 mM	-20 $^{\circ}$ C, 避光保存

产品介绍:

本试剂盒采用两种荧光探针分别用来识别活细胞和死细胞，可用于荧光显微镜或流式细胞仪等荧光检测系统。本试剂盒适用于大多数的哺乳动物细胞，包括贴壁细胞、非贴壁细胞及特定的组织，但是不适用于细菌或酵母菌的检测。与其他方法相比，本试剂盒操作简单，快速，安全，检测灵敏度高等优点。方法原理活细胞的重要特征在于细胞内存在着内酯酶活性。当 calcein AM 通过细胞膜进入细胞体内时可被内酯酶水解成钙黄绿素，钙黄绿素因有很多负电荷可以很好地保留在活细胞内，从而在活细胞内产生强烈而均匀的绿色荧光。碘化丙啶 (PI) 无法进入完整的细胞膜，只能进入细胞膜受损的死细胞，并与死细胞中核酸结合产生红色荧光。本方法采用的两种荧光探针在进入细胞前本身是没有荧光的，所以采用该检测方法荧光背景低。

方法原理:

活细胞的重要特征在于细胞内存在着内酯酶活性。当 calcein AM 通过细胞膜进入细胞体内时可被内酯酶水解成钙黄绿素，钙黄绿素因有很多负电荷可以很好地保留在活细胞内，从而在活细胞内产生强烈而均匀的绿色荧光。碘化丙啶 (PI) 无法进入完整的细胞膜，只能进入细胞膜受损的死细胞，并与死细胞中核酸结合产生红色荧光。本方法采用的两种荧光探针在进入细胞前本身是没有荧光的，所以采用该检测方法荧光背景低。

实验步骤

一、荧光显微镜分析

1. 制备染色工作液 (2 μ M calcein AM, 4 μ M PI)

2. 本实验操作步骤提供 calcein AM 标记活细胞，PI 标记死细胞，为了获得最佳的标记效果，建议根据不同的细胞类型，优化染色液的工作浓度。通常在获得较好的荧光信号的情况下优先选择最低的荧光染色液浓度，calcein AM 和 PI 的推荐使用浓度为 0.1~10 μ M。

1.1 从冰箱中取出试剂盒中的 calcein AM 和 PI 染色液，室温静置 30 分钟，确保液体彻底融化。

1.2 将染色液轻弹混匀，短暂离心。移液器吸取 5 μ l 的 8 mM PI 染色液，加到 10 ml 无菌的细胞级的 D-PBS 缓冲液中。轻柔颠倒混匀，配制成 4 μ M 的 PI 染色工作液。

1.2 移液器吸取 5 μ l 的 4 mM calcein AM 染色液到 10 ml 的 PI 染色工作液中。轻柔颠倒混匀，确保两种染色液充分混匀。

1.4 上述制备好的染色工作液 (2 μ M calcein AM, 4 μ M PI) 可以直接用于细胞染色。

注意：calcein AM 在水溶液中很容易发生水解作用，因此制备的 calcein AM 染色工作液需要在当天使用完毕。

2. 准备细胞样本

2.1 对于贴壁细胞，可以将细胞培养至无菌的玻璃盖玻片上。对于非贴壁细胞，可以将细胞培养于细胞培养皿或其他合适的无菌培养容器中。

2.2 细胞染色之前，需要对细胞进行清洗以去除培养基中的血清（血清中含有酯酶，酯酶活性会对染色效果产生影响）。建议使用 D-PBS 缓冲液清洗细胞。

3. 细胞活性分析

3.1 取 100~150 μ l calcein AM / PI 染色工作液到培养有细胞的盖玻片上，染色液全部清润细胞样本为宜。

3.2 室温孵育 30~45 分钟，最好将样本置于湿盒内，避免染色液蒸发影响染色效果，并注意避光。

3.3 孵育完毕后，用 D-PBS 清洗盖玻片。

3.4 用镊子小心地把有细胞的盖玻片倒置在载玻片上，四周用指甲油密封。

3.5 选择合适的滤光片在荧光显微镜下观察并成像。

滤光片的选择

Calcein 和 PI 这两种荧光染料可以使用长波通滤光片同时进行观察，也可以使用不同的滤光片分别进行观察。Calcein 可选用 FITC 滤光片进行观察，PI 可选用 PI 或者 Texas Red 滤光片进行观察。Calcein 和 PI 可选用的常用滤光片见表 1。

表 1 Calcein 和 PI 适用的常用滤光片

Omega Filters	Chroma Filters	Notes
XF25, XF26, XF115	11001, 41012, 71010	长波通滤光片同时观察 calcein 和 PI
XF22, XF23	31001, 41001	Calcein 滤光片
XF32, XF43, XF102, XF108	31002, 31004, 41002, 41004	PI 滤光片

二、流式细胞仪分析

4.1 从冰箱中取出试剂盒中的 calcein AM 和 PI 染色液，室温静置 30 分钟，确保液体彻底融化。

4.2 用 DMSO 将试剂盒中的 calcein AM（组份 A）进行 80 倍稀释，配制成 50 μ M 的染色工作液。比如移液器吸取 2 μ l calcein AM 到 158 μ l DMSO 中。

注意：当天配制的染色工作液需要当天使用完毕。

4.3 每个染色分析需要准备~1 ml 细胞悬液，细胞浓度约为 0.1~5 \times 10⁶cells/ml。

4.4 每组细胞悬液中加入 2 μ l 50 μ M 的 calcein AM 染色工作液及 1 μ l 8 mM PI 染色储存液。轻柔混匀，确保染色液与细胞样本充分混匀。

4.5 室温孵育 15~20 分钟，注意避光。**4.6** 孵育后尽快用流式细胞仪分析，选用 488 nm 激发光源，绿色通道用 530/30bandpass，红色通道用 610/20 bandpass。