

CFSE Cell Division Tracker Kit

Cat. No: E-CK-A345

Size: 500 Assays/2000 Assays

产品编号	产品名称	500 Assays	2000 Assays	Storage
E-CK-A345A	CFDA SE Reagent Powder	750 µg × 2 vials	750 µg × 8 vials	-20 °C, shading light
E-CK-A345B	CFDA SE Solvent	600 µL × 1 vial	600 µL × 4 vials	-20 °C, shading light
	说明书		一份	

保存条件

-20 °C 可避光保存一年。CFDA SE Solvent 具有吸湿性，注意避光密封保存。

检测原理

Elabscience® 的 CFSE Cell Division Tracker Kit 是一款使用荧光探针 CFDA SE 对细胞增殖进行荧光示踪检测的试剂盒，相比 MTT 法或[3H]-thymidine 掺入等其它细胞增殖检测方法，具有更稳定更灵敏，细胞毒性更低的优势，本试剂盒可应用于原代细胞和细胞系的增殖检测，细胞增殖后可和其他表型抗体共染，并通过流式细胞仪进行检测分析。

CFDA SE 是一种膜通透性的荧光素染料，本身不具有荧光发光性。当其透过细胞膜进入活细胞后，可被胞浆内的酯酶催化生成羧基荧光素琥珀酰亚胺酯 (carboxyfluorescein succinimidyl ester, CFSE)，后者可发强烈的绿色荧光，不能穿透细胞膜，能完好的保留在胞内。CFSE 还可自发性并不可逆地与细胞内蛋白的氨基结合从而偶联到这些蛋白上，同时过量且未被偶联的 CFDA SE 通过被动扩散回到细胞外培养基内，被后续清洗步骤所清除。

CFDA SE 标记细胞的荧光均一稳定，在细胞分裂增殖过程中，CFDA SE 标记的荧光可平均分配至两个子代细胞中，荧光强度变为亲代细胞的一半，流式细胞仪检测获得的检测结果，根据其荧光强度的不同，可检测出未分裂，分裂一次 (1/2 的荧光强度)，二次 (1/4 的荧光强度)，三次 (1/8 的荧光强度)，以及更多分裂次数的细胞。CFDA SE 可检测分裂多达 8 次甚至更多次数的细胞。经 CFDA SE 标记的细胞可用于体外和体内增殖研究，且不会使邻近细胞染色。CFDA SE 标记的细胞呈绿色荧光，Ex=494 nm, Em=521 nm，可以用流式细胞仪或者荧光显微镜进行检测。

自备试剂及仪器

PBS 缓冲液 (pH7.2~7.4)、离心机、二氧化碳培养箱、超净工作台、流式细胞仪。

试剂配制

CFDA SE 储存液 (5 mM) 的配制: CFDA SE Reagent Powder, 10000rpm 离心 1min 使干粉沉于管底, 吸取 270 μL CFDA SE Solvent 加入 1 管 CFDA SE Reagent Powder 中, 充分溶解混匀即得到 5 mM CFDA SE 储存液。

注意: 配制 CFDA SE 储存液需在超净工作台中避光操作, 配制后可按照每次实验需求用量进行分装, 后置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中密封避光保存, 并于 1 个月内使用完。

实验操作指南

※ 注意: 除流式检测外, 以下实验操作均在无菌条件下进行。

1. 细胞系检测

- 1) 收集细胞, 室温 $250\times\text{g}$ 离心 3~5 min, 弃上清。
- 2) 加入 5 mL PBS 缓冲液重悬细胞, 室温 $250\times\text{g}$ 离心 3~5 min, 弃上清。
- 3) 用适量 PBS 缓冲液重悬细胞, 并进行细胞计数, 调整细胞密度到 1×10^7 个/mL (最佳染色密度)。
按照下表加入 CFDA SE 储存液 (5 mM), 轻轻吹打混匀, 于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱中避光孵育 10 min。

细胞数量	细胞体积 (PBS 重悬)	CFDA SE 储存液 (5 mM) 体积
1×10^6	100 μL	0.1 μL
5×10^6	500 μL	0.5 μL
1×10^7	1000 μL	1 μL
2×10^7	2000 μL	2 μL

- 4) 孵育完毕后立即加入 5~10 mL $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预热的细胞完全培养基, 室温下吹打混匀, 终止标记反应。
- 5) 室温 $250\times\text{g}$ 离心 3~5 min, 弃上清, 用 5~10 mL 细胞完全培养基重复洗涤细胞 1 次, 离心弃上清。
- 6) 加入 5 mL 细胞完全培养基重悬细胞, 并于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱中避光孵育 5~10 min。
- 7) 室温 $250\times\text{g}$ 离心 3~5 min, 弃上清。
- 8) 加入适量的完全培养基重悬细胞, 置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养。
- 9) 根据实验需求 (设计), 选择合适的时间点进行流式检测 (FITC 检测通道) 或显微镜观察细胞的增殖情况。

2. 原代细胞检测

- 1) 收集制备好的原代单细胞悬液, 室温 $250\times\text{g}$ 离心 3~5 min, 弃上清。
- 2) 加入 5 mL PBS 缓冲液重悬细胞, 室温 $250\times\text{g}$ 离心 3~5 min, 弃上清。
- 3) 用适量 PBS 缓冲液重悬细胞, 并进行细胞计数, 调整细胞密度到 1×10^7 个/mL (最佳染色密度)。
按照下表加入 CFDA SE 储存液 (5 mM), 轻轻吹打混匀, 于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱中避光孵育 5 min。

细胞数量	细胞体积 (PBS 重悬)	CFDA SE 储存液 (5 mM) 体积	细胞培养时间
5×10^6	500 μL	0.25 μL	24-72 h
1×10^7	1000 μL	0.5 μL	
2×10^7	2000 μL	1 μL	
5×10^6	500 μL	0.5 μL	72 h 以上
1×10^7	1000 μL	1 μL	
2×10^7	2000 μL	2 μL	

注意：原代细胞染色的最佳浓度与培养时间有关，可参考表中的细胞浓度和染色浓度进行染色。

- 4) 孵育完毕后立即加入 5~10 mL 37 °C 预热的细胞完全培养基，室温下吹打混匀，终止标记反应。
- 5) 室温 250×g 离心 3~5 min，弃上清。
- 6) 加入 5 mL 细胞完全培养基重悬细胞，并于 37 °C 细胞培养箱中避光孵育 5~ 10 min。
- 7) 室温 250×g 离心 3~5 min，弃上清。
- 8) 加入适量的完全培养基重悬细胞，置于 37 °C 培养箱中培养。
- 9) 根据实验需求（设计），选择合适的时间点进行流式检测（FITC 检测通道）或显微镜观察细胞的增殖情况。

注意：结束培养后的细胞，可以加入表型流式抗体进行孵育，洗涤后即可通过流式细胞仪检测，对特定的细胞群进行增殖分析。

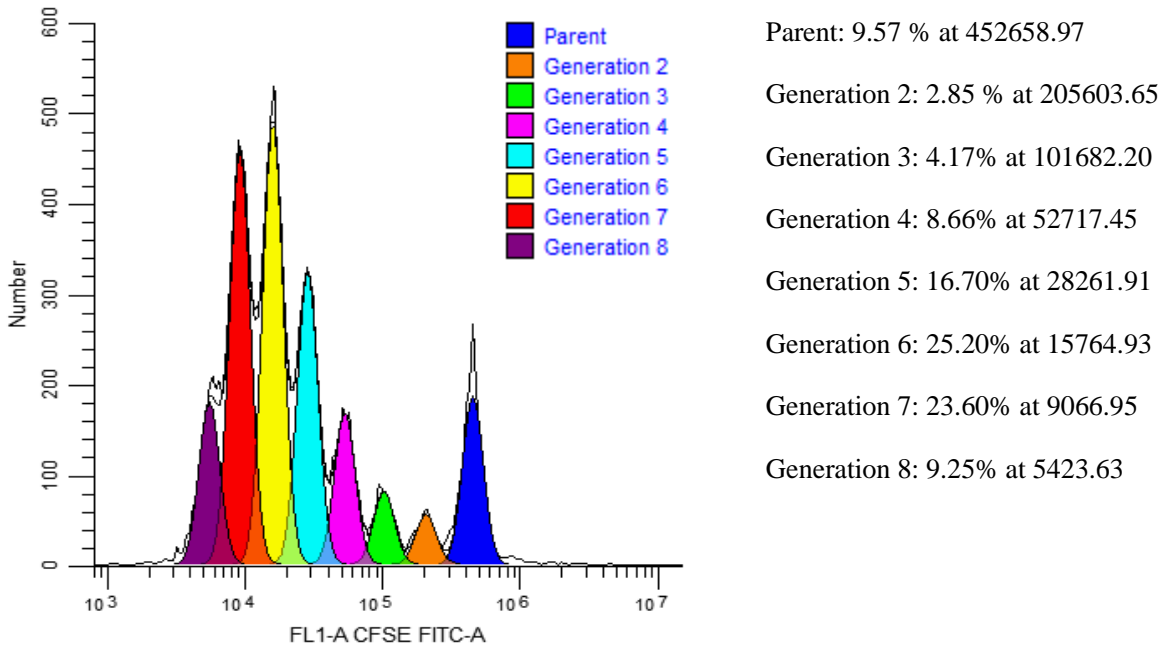
注意事项

1. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗。
2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
3. CFDA SE 易被水解，在水溶液中易变质，注意密封保存。
4. CFDA SE Solvent 在较低温度情况下会凝固而粘在离心管管底、管壁或管盖内，复温溶解后可适当离心，充分吹打混匀再使用。
5. 由于细胞类型不同，其酯酶活性不同，因此染色效果具有差异性，染色过强或者过弱的情况下建议根据细胞类型，培养条件及应用来摸索最佳的工作浓度。
6. 染料的浓度越高，染色时间越久，细胞荧光强度也越强，但是如果染料的浓度过高，也会降低细胞的活性和功能。
7. 荧光物质均易发生淬灭，在进行荧光观察时，尽量缩短观察时间，同时在操作和存放过程中也尽量注意避光。
8. 细胞离心洗涤的次数较多，为了尽可能降低离心洗涤带来的细胞损失，建议离心机设置中，调整离心力升速不大于 3，降速不大于 1，即 $\text{Acc} \leq 3$ ， $\text{Dec} \leq 1$ 。

常见问题及解决方案

现象	可能原因	建议
FITC 信号超界限	CFDA SE 染色浓度高	降低 CFDA SE 染色浓度
	染色细胞数目少	增加染色细胞量
	流式细胞仪器设置电压高	降低电压
未检测到细胞增殖	分离的细胞活力差	优化细胞分离过程
	细胞染色后活力低	增加细胞密度，降低 CFDA SE 染色浓度
	血清和细胞因子效果差	选择质量优异的血清和细胞因子
	细胞染色时间过久	细胞染色时间控制在 10 分钟内，原代细胞不超过 5 分钟
	刺激剂效果差	选择刺激效果更好的刺激剂

结果展示



体外诱导培养的小鼠骨髓来源树突状细胞通过 LPS 促成熟后和 4T1 荷瘤小鼠脾脏(E-CK-A345 染色) 进行共培养，再使用 Elab Fluor® Red 780 Anti-Mouse CD8a Antibody (E-AB-F1104S) 和 APC Anti-Mouse CD4 (E-AB-F1097E) 共染后，检测 CD8+T 细胞的增殖情况。