Calcein AM/PI Double Staining Kit

Cat. No: E-CK-A354 **Size: 100 Assays/500 Assays/2000 Assays**

产品编号	产品名称	100 Assays	500 Assays	2000 Assays	Storage
E-CK-A164	Calcein AM Solution (100 μM)	100 μL	500 μL	500 μL× 4	-20°C, shading light
E-CK-A165	Propidium Iodide (PI) Solution(750 μ M)	100 μL	500 μL	500 μL× 4	2-8°C/-20°C, shading light
E-CK-A153	Calcein AM Assay Buffer	25 mL	55 mL× 2	110 mL× 4	-20°C
	说明书		一份		

保存条件

-20°C 避光可保存 1 年。Calcein AM Solution (100 μM)首次使用时建议适当分装并密封避光保存，防止潮湿环境中发生自发性酯水解。

产品简介

Elabscience® Calcein AM/PI Double Staining Kit 可用于区分含有酯酶活性的哺乳动物的死细胞和活细胞，Calcein AM 是在传统的 Calcein 上添加上乙酰甲氧基甲酯即（AM）基团，疏水性增加，能很容易穿透活细胞膜，进入细胞内。Calcein AM 本身无荧光，进入细胞后被细胞中内源性酯酶水解，生成具有强负电荷且不能通过细胞膜的极性分子 Calcein 滞留在细胞内，而 Calcein 可发出强绿色荧光（Ex/Em= 494nm/517nm）。由于死细胞缺乏酯酶，不能或很少能产生 Calcein，因此仅活细胞会被染色为强绿色荧光，死细胞不能被染色或者染色非常弱。死细胞的细胞膜选择透过性丧失，碘化丙啶（Propidium Iodide，PI）可以进入胞内与双链 DNA 特异性结合并产生强烈的红色荧光（Ex/Em=535nm/617nm），从而对死细胞进行标记。因此，Calcein AM 与碘化丙啶联合使用，可以对活细胞与死细胞同时进行双重荧光染色，可用于细胞活性与细胞毒性的检测。

自备试剂

PBS 缓冲液（pH7.2~7.4）。

操作指南

1. 流式细胞仪检测

1.1 工作液的配制：

1.1.1 试剂准备：取出冻存的 Calcein AM/PI Double Staining Kit，室温解冻后，涡旋混匀各试剂。

1.1.2 配制 Calcein AM/PI 染色工作液：室温解冻后，将涡旋混匀的 Calcein AM Solution 和 PI Solution 按照 1~5×10^5 个细胞/200 μL 配制染色工作液。根据实验用量参考下表配制染色工作液。

组分	Calcein AM/PI 染色工作液体积		
	1 mL	5 mL	10 mL
Calcein AM Solution (100 μM)	0.1 μL	0.5 μL	1 μL
PI Solution (750 μM)	1 μL	5 μL	10 μL
Calcein AM Assay Buffer	1 mL	5 mL	10 mL

注：染色工作液中的 Calcein AM 易潮解，建议现配现用。

提示：为节约试剂及保证实验的准确性，可先将 Calcein AM Solution 进行梯度稀释，如用 Calcein AM Assay Buffer 将 Calcein AM Solution(100 μM) 稀释 100 倍到 1 μM。染色前再使用 Calcein AM Assay Buffer 将 1 μM 的 Calcein AM Solution 稀释 100 倍到染色浓度（0.01 μM），即 200 μL Calcein AM Assay Buffer 中加入 2 μL 1 μM 的 Calcein AM Solution。

1.1.3 用于阴性对照与补偿调节的单染管工作液配制参考下表配制：

组分	Calcein AM 单染工作液（1 mL）	PI 单染工作液（1 mL）	阴性对照（1 mL）
Calcein AM Solution (100 μM)	0.1 μL	0 μL	0 μL
PI Solution (750 μM)	0 μL	1 μL	0 μL
Calcein AM Assay Buffer	1 mL	1 mL	1 mL

注：染色工作液中的 Calcein AM 易潮解，建议现配现用；阴性对照管与单染管的细胞选择阳性药物组细胞。

1.2 染色流程：

1.2.1 收集细胞，300×g 离心 5 min，去上清，加入 1 mL PBS 重悬细胞沉淀，300×g 离心 5 min，去上清，重复洗涤 1 次，去上清。

1.2.2 每组 1~5×10^5 个细胞加入 200 μL 染色工作液重悬，室温避光孵育 5~15 min。

1.2.3 孵育完成后，可以直接进行流式细胞仪检测，若不能及时检测，建议避光置于 4°C 冰箱，2 小时内进行流式细胞仪检测。

注：流式细胞仪检测时，Calcein 可用 FITC 通道，PI 可用 Percp/Cy5.5 通道或 PE 通道。

2. 荧光显微镜检测

2.1 工作液的配制：

2.1.1 试剂准备：取出冻存的 Calcein AM/PI Double Staining Kit，室温解冻后，涡旋混匀各试剂。

2.1.2 配制 Calcein AM/PI 染色工作液：室温解冻后，将涡旋混匀的 Calcein AM Solution 和 PI Solution 按照 96 孔板每孔 100 μL 或 24 孔板每孔 200 μL 配制染色工作液。根据实验用量参考下表配制染色工作液。

组分	Calcein AM/PI 染色工作液体积		
	1 mL	5 mL	10 mL
Calcein AM Solution (100 μM)	10 μL	50 μL	100 μL
PI Solution (750 μM)	10 μL	50 μL	100 μL
Calcein AM Assay Buffer	1 mL	5 mL	10 mL

注：染色工作液中的 Calcein AM 易潮解，建议现配现用。

Calcein AM Assay Buffer 有利于荧光探针的装载和荧光信号的维持，若贴壁细胞易脱落且敏感，建议使用基础培养基配制上述染色工作液。

2.2 染色流程：

2.2.1 小心吸除贴壁细胞的培养基，每孔加入适量 PBS 洗涤细胞，去除 PBS，重复洗涤 1 次，吸除 PBS。

2.2.2 按照 96 孔板每孔 100 μL 或 24 孔板每孔 200 μL 的比例加入染色工作液，37°C 孵育 10~30 min。（基础培养基配制染色工作液需延长染色时间至 30~60min，在反应结束前 10 min 加入 PI Solution。）

2.2.3 孵育结束后，在荧光显微镜下观察染色效果（Calcein 为绿色荧光，Ex/Em=494nm/517nm；PI 为红色荧光，Ex/Em=535nm/617nm）。

注：若是悬浮细胞，则收集细胞沉淀后，按照 1~5×10^5 个细胞加入 200 μL 染色工作液重悬，室温避光孵育 15~20 min，吸取细胞悬液滴加在载玻片上，轻轻盖上盖玻片即可在显微镜下观察拍照。

注意事项

1. 本产品仅限于专业人员的科学研究使用。
2. 请注意安全事项，遵守实验室试剂操作规范操作。为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
3. 请按照合适的温度保存本产品，以免失效。
4. 染色前使用无血清培养基（血清中可能含有酯酶）或者 PBS 洗涤细胞，缓冲液中不能含有初级或次级胺，因为脂肪组胺可裂解 AM 酯并妨碍负载。
5. 染色温度为 37°C 可以降低染色所需时间。室温下染色可减轻荧光探针渗入细胞器的副作用。
6. Mn^{2+}会加速荧光淬灭，洗涤 buffer 中注意不要含有 Mn^{2+}等金属离子。
7. 渗漏：AM 酯可被 P 糖蛋白多药载体排除。
8. 适用于任何含酯酶活性的动物细胞，植物和细菌因含有细胞壁，Calcein AM 不能进入细胞内，因此不适用于植物和细菌样本。
9. 可用 5%~20%的 DMSO 处理细胞 2-4h，或 70%的酒精处理细胞 30 分钟来获得阳性质控样本。
10. 离心机升速和降速过高会引起细胞的损失，建议调整升速不大于 3，降速不大于 2，即 Acc≦3，Dec≦2。
11. 用于荧光显微镜检测时，对于贴壁能力弱的细胞，建议先做防脱处理后再进行细胞接种和染色，且 PI 染色时间不要超过 30min，否则会导致 PI 假阳性，若需要延长 Calcein AM 染色时间，可在染色结束前的 10~30min 内加入 PI，染色后 1~2h 内及时拍照。