

Calcein AM Solution (100 μ M)

Cat. No: E-CK-A164

Size: 100 Tests/500 Tests/500 Tests \times 10

产品编号	产品名称	100 Tests	500 Tests	500 Tests \times 10	Storage
E-CK-A164	Calcein AM Solution (100 μ M) 说明书	100 μ L	500 μ L	500 μ L \times 10 一份	-20 $^{\circ}$ C, shading light

保存条件

-20 $^{\circ}$ C 避光可保存 1 年。Calcein AM Solution (100 μ M)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®自主研发的 Calcein AM Solution (100 μ M)可用于检测含有酯酶活性的哺乳动物的活细胞，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，和其他活细胞染色探针相比，Calcein AM 毒性小，不影响细胞的分化和增殖。

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 Solution (100 μ M)，室温解冻后，涡旋混匀各试剂。

1.1.2 配制 Calcein AM 染色工作液：室温解冻后，将涡旋混匀的 Calcein AM Solution 按照 $1\sim 5\times 10^5$ 个细胞/200 μ L 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 染色工作液体积		
	1 mL	5 mL	10 mL
Calcein AM Solution (100 μ M)	0.1 μ L	0.5 μ L	1 μ L
PBS 或 Calcein AM Assay Buffer (E-CK-A153)	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 PBS 或 Calcein AM Assay Buffer 将 Calcein AM Solution(100 μ M) 稀释 100 倍到 1 μ M。染色前再使用 PBS 或 Calcein AM Assay Buffer 将 1 μ M 的 Calcein AM Solution 稀释 100 倍到染色浓度 (0.01 μ M)，即 200 μ L PBS 或 Calcein AM Assay Buffer 中加入 2 μ L 1 μ M 的 Calcein AM Solution。

1.2 染色流程：

- 1.2.1 收集细胞，300 \times g 离心 5 min，去上清，加入 1 mL PBS 重悬细胞沉淀，300 \times g 离心 5 min，去上清，重复洗涤 1 次，去上清。
- 1.2.2 每组 1~5 \times 10⁵ 个细胞加入 200 μ L 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 $^{\circ}$ 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；需要同时区分死细胞时可选择 Propidium Iodide (PI) Solution(750 μ M) (E-CK-A165)。

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 Solution (100 μ M)，室温解冻后，涡旋混匀各试剂。
- 2.1.2 配制 Calcein AM 染色工作液：室温解冻后，将涡旋混匀的 Calcein AM Solution 按照 96 孔板每孔 100 μ L 或 24 孔板每孔 200 μ L 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 染色工作液体积		
	1 mL	5 mL	10 mL
Calcein AM Solution (100 μ M)	10 μ L	50 μ L	100 μ L
PBS 或 Calcein AM Assay Buffer (E-CK-A153)	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 μ L 或 24 孔板每孔 200 μ L 的比例加入染色工作液，37 $^{\circ}$ 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，若需要同时区分死细胞，可在反应结束前 10 min 加入 PI 染色液。）

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）。

注 1：若是悬浮细胞，则收集细胞沉淀后，按照 $1\sim5\times 10^5$ 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 2：需要同时区分死细胞时可选择 Propidium Iodide (PI) Solution(750 μM) (E-CK-A165)。PI 为红色荧光，Ex/Em=535nm/617nm。

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 $^{\circ}\text{C}$ 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+} 具有荧光淬灭作用，洗涤 buffer 中注意不要含有 Mn^{2+} 等金属离子。
7. 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 不能进入因此不能染色。
8. 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 $\text{Acc} \leq 3$ ， $\text{Dec} \leq 2$ 。
9. 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。