



## Calcein-AM/PI活细胞/死细胞双染试剂盒

### Calcein-AM/PI Double Stain Kit

| RK1001  | 产品名称                                    | 产品规格        | 产品数量 | 储存方式             |
|---------|---|-------------|------|------------------|
| RK1001A | Calcein-AM Reagent                      | 50 $\mu$ g  | 1    | -20 $^{\circ}$ C |
| RK1001B | PI Stock Solution (1.5 mmol/l) (1mg/ml) | 100 $\mu$ l | 1    | 4 $^{\circ}$ C   |
| RK1001C | DMSO                                    | 100 $\mu$ l | 1    | 4 $^{\circ}$ C   |

\*125 次：当每次用量为100  $\mu$ l 染色工作液（Calcein-AM的浓度为 2 $\mu$ mol/l，PI的浓度为4.5  $\mu$ mol/l）时，可以检测的次数。

### 概述

Calcein-AM/PI细胞双染试剂盒内含两种染料：Calcein-AM和Propidium Iodide (PI)。这个试剂盒可在荧光显微镜下同时观察在同一个细胞培养皿中的活细胞和死细胞。Calcein-AM可透过细胞膜，通过活细胞内的酯酶作用脱去AM基团，产生的Calcein (钙黄绿素)发出强绿色荧光，因此活细胞在荧光显微镜下可被检测到绿色荧光。另一方面PI可以通过受损的细胞膜进入到死细胞内并嵌入细胞的DNA双螺旋从而产生红色荧光，因此死细胞会被检测到红色荧光。除了用荧光显微镜外，也有报道可以用流式细胞仪和荧光酶标仪来进行定量检测。

### 荧光特性

Calcein-AM : ex = 490 nm, em = 515 nm PI : ex = 530 nm, em = 580 nm

### 染色试剂的最佳浓度

\* 由于不同细胞种类、细胞浓度的染色条件不同，我们建议自行摸索一下Calcein-AM和PI的最适浓度。

Calcein-AM和PI的最佳浓度是根据不同的细胞种类而定，通过以下的操作，我们可以找到不同细胞染色试剂的最佳浓度。

### 检测步骤

1. 通过在0.1%皂苷或0.1-0.5%毛地黄皂苷中培养10 min或通过在70%乙醇中培养30 min制备死细胞。
2. 用0.1-10 $\mu$ M PI溶液染死细胞，以便找到仅针对细胞核染色而不对细胞质染色的PI浓度。
3. 用0.1-10 $\mu$ M Calcein-AM溶液染死细胞，以便找到不对细胞质染色的Calcein-AM浓度，再以此浓度的Calcein-AM对活细胞染色以检验活细胞是否被染色。

#### 以HeLa细胞为例

制备1 mmol/l的Calcein-AM储存液

将50 $\mu$ l DMSO加入到含50 $\mu$ g Calcein-AM粉末的管中，用移液器吹打溶解。

\* Calcein-AM储存液需要避光，在-20 $^{\circ}$ C密封保存。

制备染色工作液

将Calcein-AM储存液和PI储存液恢复至室温后使用。

在5 ml的PBS (-) 中加入10 $\mu$ l Calcein-AM储存液和15 $\mu$ l PI储存液，混匀制成工作液。此时Calcein-AM的浓度为2 $\mu$ mol/l，而PI的浓度为4.5 $\mu$ mol/l。

### 染色步骤

1. 用Trypsin-EDTA消化细胞。
2. 通过离心收集细胞(1,000 rpm, 3 min)。
3. 去除上清液，加入PBS (-) 制备细胞悬液(10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> cells/ml为宜)。
4. 重复步骤2和步骤3数次以消除培养基中的酯酶活性。
5. 取100  $\mu$ l 染色工作液与200  $\mu$ l 细胞悬液混合，在37 $^{\circ}$ C培养15 min。
6. 在490 $\pm$ 10 nm激发波长下同时观察黄绿色荧光的活细胞和红色荧光的死细胞。另外用545 nm激发波长单独观察死细胞。



## 使用方法

### 荧光显微镜检测

#### 1. 准备工作液

准备2  $\mu$ M Calcein AM和4.5  $\mu$ M PI的染色工液：取出Calcein AM和PI原液，恢复至室温。将30  $\mu$ L 1.5mM PI和5  $\mu$ L 4mM Calcein AM与10 mL PBS或其他无血清缓冲液或培养基混合，涡旋混匀。上述工作液可直接用于细胞染色。

注：Calcein AM的水溶液易水解，应当天用完。Calcein AM和PI的浓度选择依据所用细胞类型不同而有所区别，推荐浓度范围为0.1~10。

#### 2. 准备细胞并开展实验

对于贴壁细胞，可直接进行染色。对于悬浮细胞，离心收集细胞染色。

用1 $\times$  PBS充分清洗细胞2~3次，以充分去除残留的酯酶活性。

对于贴壁细胞，加入足量的Calcein AM/PI染色工作液。对于悬浮细胞，加入适量的染色工作液，使细胞密度控制在1~5 $\times$ 10<sup>5</sup>/mL。

室温避光孵育15min~20min(如果工作液浓度较高或者孵育温度较高，应适当的减少孵育时间)。

荧光显微镜下观察标记的细胞。

### 流式细胞仪检测

1. 取出试剂，恢复至室温。

2. 准备2  $\mu$ M Calcein AM和4.5  $\mu$ M PI的染色工作液：取出Calcein AM和PI原液，恢复至室温。将30  $\mu$ L 1.5mM PI和5  $\mu$ L 4mM Calcein AM与10 mL PBS或其他无血清缓冲液或培养基混合，涡旋混匀。上述工作液可直接于细胞染色。

3. 用1 $\times$  PBS充分清洗细胞2~3次。

4. 用0.5 mL染色工作液悬浮细胞，控制细胞密度为1~5 $\times$ 10<sup>5</sup>/mL。

5. 室温避光孵育15-20 min。

6. 在1-2h内，通过流式细胞仪检测细胞活性。Calcein AM可以由488 nm激光激发，检测荧光发射光谱约在530 nm处，PI发射光谱约在617 nm处。

注：细胞圈门时，注意排除细胞碎片，使用单染管调节补偿，双染管流式检测应获得两个相对独立的细胞群：显示绿色荧光的活细胞群和红色荧光的死细胞群。

### 酶标仪检测

1 在96孔板中培养适量的贴壁或悬浮细胞。

注意：用1%的皂苷或0.1-0.5%洋地黄皂苷处理细胞10 min，即可得到死细胞。

2 准备2  $\mu$ M Calcein AM和4.5  $\mu$ M PI的染色工作液：取出Calcein AM和PI原液，使其恢复室温。将30  $\mu$ L 1.5mM PI和5  $\mu$ L 4mM Calcein AM与10 mL PBS或其他无血清缓冲液或培养基混合，涡旋混匀。

注：10mL的染色液足够染色一个96孔板，可根据实验需要调整染色液的体积。Calcein AM和PI的浓度可在0.1~10  $\mu$ M之间摸索。

注：Calcein AM的水溶液易水解，应当天用完。

3 用1 $\times$  PBS充分清洗细胞，以充分去除残留的酯酶活性。对于贴壁细胞，每孔加100  $\mu$ L PBS清洗细胞。对于悬浮细胞，加100  $\mu$ L PBS重悬细胞，离心去上清。重复上述操作。

4 每孔中加入100  $\mu$ L PBS。

5 每孔中加入100  $\mu$ L染色工作液，使每孔总体积为200  $\mu$ L，Calcein AM的终浓度为1 mM，PI的终浓度为2.25  $\mu$ M。轻轻摇晃培养板，使液体均匀覆盖细胞。

6 室温避光孵育30~45 min。

7 酶标仪检测。当酶标仪设置为fluorescein时，可以检测Calcein AM；当酶标仪设置为rhodamine或TexasRed时，可以



检测PI。根据光谱特性选择最佳的发射及激发波长。注：通过对比样品组与对照组测量的 Relative fluorescence values (RFU)，可以得出死细胞与活细胞数量的变化。下面也提供了另一种数据分析的方法。

计算某个区域活细胞与死细胞的比例

下面方法可以计算出死细胞与活细胞的比例。需要的样品有死细胞对照组、活细胞对照组及要测的样品组。用1%的皂苷或0.1-0.5%洋地黄皂苷处理细胞 10 min，即可得到死细胞。

1 准备染色工作液及按上述步骤染色细胞。另外，分别准备 1 mL 2  $\mu$ M Calcein AM 和 4  $\mu$ M EthD-III 溶液，按照下列指示来染色对照组。

2 样品组及对照组测量：

- A. 样品组在617 nm的测量值，记为Calcein AM 和 PI=F(617) sam。
- B. 样品组在530 nm的测量值，记为Calcein AM 和 PI=F(530) sam。
- C. 死细胞 PI 单染对照组在 617 nm 的测量值，记为 PI=F(617) max。
- D. 死细胞Calcein AM 单染对照组在 617 nm 的测量值，记为Calcein AM=F(617) min。
- E. 活细胞PI 单染对照组在 530 nm 的测量值，记为PI=F(530) min。
- F. 活细胞Calcein AM 单染对照组在 530 nm 的测量值，记为Calcein AM=F(530) max。
- G. 没有细胞的空白对照孔(加染料或不加染料均可)，530nm 处的检测值记为F(530) 0。
- H. 没有细胞的空白对照孔(加染料或不加染料均可)，617nm 处的检测值记为F(617) 0。

3 根据测量数据计算死细胞与活细胞的比例：

$$\% \text{ Live Cells} = (B - E) \div (F - E)$$

$$\% \text{ Dead Cells} = (A - D) \div (C - D)$$

确定某个区域活细胞与死细胞的比例

通过制作530 nm 和 617 nm 处的荧光光谱标准曲线，可以确定死细胞与活细胞的数量，每个染料的荧光强度分别与样品中死细胞或活细胞的数量成直线型关系。

## 注意事项

1. 由于本试剂盒中的Calcein-AM Reagent粉末和PI Stock Solution量很少，有可能会粘在盖子或管壁上，开封前请务必先涡旋以使其振落下来。
2. 由于Calcein-AM储存液对潮气敏感，请在使用后密闭Calcein-AM储存液的盖子。如果不能一次用完，建议分装保存，例如分装成10  $\mu$ l/管，用封口膜封口，并用铝箔纸包裹，放在一个密闭性能好的塑料袋中，并放入一包干燥剂，在 $\leq -20^{\circ}\text{C}$ 密封避光保存。
3. 配制好的染色工作液请在当天使用。
4. PI有疑似致癌性，使用前应注意以下几点：
  - 1) 使用时请带好手套，口罩，防护眼镜等，不要接触到或呼吸到。
  - 2) 当PI不慎接触到皮肤时，请立刻用大量的水冲洗。
  - 3) 处理方法清洗容器的清洗液和废液请按照实验室的有毒有害物质的处理方法进行处理，或按照以下方法处理：
    - 用UV照射的方法进行分解
    - 用次氯酸钠氧化分解后，进行中和处理

RV: 2. 0-2023