

Calcein-AM/EthD-III 活细胞/死细胞双染试剂盒说明书

货号：CA1632

规格：500T（以 96 孔板为例）

保存：-20°C 避光干燥保存，一年有效。

产品内容：

编号	名称	500T	保存
A	Calcein-AM Solution(4mM)	50 μ L	-20°C 避光干燥保存
B	EthD-III (2.5mM)	120 μ L	-20°C 避光干燥保存
C	PBS (0.01M, PH=7.2-7.4)	120ml \times 2	2-8°C 保存

产品说明：

Calcein-AM 是一种对活细胞进行荧光标记的细胞染色试剂，发绿色荧光（Ex=490nm, Em=515nm）。因其在传统的 Calcein（钙黄绿素）基础上引入乙酰甲氧基甲酯（AM）基团，增加了疏水性，使其能够轻易穿透活细胞膜。一旦进入细胞后，Calcein-AM（本身不发荧光）被细胞内的酯酶剪切形成膜非渗透性的极性分子 Calcein，从而被滞留在细胞内并发出强绿色荧光。与其它同类试剂（如 BCECF-AM 和 CFDA）相比，由于 Calcein, AM 细胞毒性极低，是最适合用于活细胞染色的荧光探针，而且不会抑制任何的细胞功能，如增殖和淋巴球的趋化性。

由于死细胞缺乏酯酶，Calcein-AM 仅用于对活细胞的细胞生存能力测试和短期标记。而溴乙吡啶二聚体 3（Ethidium Homodimer III, EthD-III）是一种高亲和性的荧光核酸染料，是 EthD-I 的替代产品，与 EthD-I 有相似的光谱特征，自身荧光很弱，一旦与 DNA 结合后荧光明显增强，发明亮的红色荧光（大激发/发射波长约 530/620nm）。EthD-III 与 DNA 结合后的荧光强度比 EthD-1 高 45%。EthD-III 是一种膜非渗透性的探针，选择性染色具破损膜的死细胞。

本试剂盒的工作原理就在于 Calcein-AM 和 EthD-III 的双重染料，来进行活细胞和死细胞的双重染色标记，从而进行活细胞和死细胞水平的分析。**根据我司优化的实验体系，单次就 200 μ L 细胞悬液进行染色，可以做 500 次检测。**

使用方法（仅供参考）：

取出试剂，恢复至室温。

一、荧光显微镜检测

1、准备 2 μ M Calcein AM 和 3 μ M EthD-III 的染色工作液：取出 Calcein AM 和 EthD-III 原液，使其恢复室温。将 5 μ L 4 mM Calcein AM 和 12 μ L 2.5 mM EthD-III 原液与 10mL PBS（0.01M, PH=7.2-7.4）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，染色工作液应当天用完。Calcein AM 和 EthD-III 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 μ M。

2、对于贴壁细胞，可用 1 \times PBS 清洗 2~3 次后进行染色。对于悬浮细胞，250-1000 \times g 室温离心 5 min，收集细胞染色。

- 3、用 1×PBS 充分清洗细胞 2-3 次，以充分去除残留的酯酶活性。
- 4、吸弃 PBS 溶液，以 96 孔板为例，对于贴壁细胞，细胞量在每孔 $1-5 \times 10^5/\text{mL}$ 时，加入染色工作液 200ul；对于悬浮细胞，加入适量的染色工作液，使细胞密度控制在 $1-5 \times 10^5/\text{mL}$ 。
- 5、室温避光孵育 15-20min（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）。
- 6、荧光显微镜下观察标记的细胞。染料-DNA 复合物的最大激发波长 $490 \pm 10\text{nm}$ ，最大发射波长分别为 515nm 和 617nm。

注：在荧光显微镜下观察时，如果背景高，可以用 PBS 清洗完染料之后再观察。

- 7、结果分析：荧光显微镜下，使用 $490 \pm 10\text{nm}$ 波长激发，活细胞为黄绿色，死活细胞为红色。用 528nm 波长激发，能够看到红色的死细胞。

二、流式细胞检测

- 1、准备 $2\mu\text{M}$ Calcein AM 和 $3\mu\text{M}$ EthD-III 的染色工作液：取出 Calcein AM 和 EthD-III 原液，使其恢复室温。将 $5\mu\text{L}$ 4 mM Calcein AM 和 $12\mu\text{L}$ 2.5mM EthD-III 与 10 mL PBS（0.01M, PH=7.2-7.4）混合，涡旋混匀。上述工作液可直接用于细胞染色。

- 2、用 1×PBS 充分清洗细胞 2-3 次，以充分去除残留的酯酶活性。

- 3、用 0.5mL 染色工作液悬浮细胞，控制细胞密度为 $1-5 \times 10^5/\text{mL}$ 。

注：我们推荐准备两管额外的样品，每管只加入一种染料（Calcein AM 和 EthD-III），用于流式单染的补偿调节。

- 4、室温避光孵育 15-20 min。

- 5、在 30 min 内，通过流式细胞仪检测细胞活性。Calcein AM 可以由 488nm 激光激发，检测荧光发射光谱约在 530nm 处，EthD-III 发射光谱约在 610nm 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。

注意事项：

- (1) 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
- (2) 贴壁细胞也可以不消化，直接去除培养基，经 1×PBS 浸洗 2min，2 次。按上述细胞量和染色液浓度比例进行染色，染色时间和染色液工作浓度可按实际检测调整。
- (3) Calcein-AM 作用于细胞，一般细胞量在 $1-5 \times 10^5/\text{mL}$ ，Calcein-AM 的工作浓度基本在 $1-2\mu\text{M}$ ；EthD-III 的工作浓度在 $2.5-5\mu\text{M}$ 。但由于不同细胞系的最佳染色条件不同，初次实验建议做梯度实验，以确定 Calcein-AM 和 EthD-III 的最适浓度。梯度筛选的原则为使用最低的探针浓度得到最好的荧光结果。
- (4) 操作时一定要注意防护。若接触到皮肤，需要立即用自来水清洗。

注：可以使用以下方法来优化得到两种荧光染料针对不同细胞的最佳工作浓度。

a) 用 0.1%皂素或者 0.1-0.5%毛地黄皂苷处理细胞 10min，或者用 70%乙醇孵育细胞 30min，从而制备死细胞；

b) 用 $0.1-10\mu\text{M}$ 的 EthD-III 溶液进行死细胞染色，以得到仅仅对细胞核染色，而不会对细胞质染色的最佳工作浓度。

c) 用 $0.1-10\mu\text{M}$ 的 Calcein-AM 进行死细胞染色，以得到不会对细胞质染色的最佳工作浓度。然后用此浓度进行活细胞染色，去观察是否活细胞能被染色。