

TransDetect[®] Cell LIVE/DEAD Viability/ Cytotoxicity Detection Kit

使用前请仔细阅读说明书

目录号: FC301

保存: -20°C避光保存一年。

产品说明

Calcein-AM是一种低细胞毒性的活细胞荧光染料,其本身不发光,在疏水基团乙酰甲氧基甲酯(AM)的作用下,可轻易穿透活细胞膜,被活细胞内的酯酶剪切形成极性分子Calcein,堆积在细胞内发出绿色荧光(Ex=490 nm, Em=515 nm)。

Calcein-AM只对活细胞进行标记且不会对细胞活性造成影响。

碘化丙啶(PI)是一种核酸染料,只能透过死细胞膜从而将细胞核染色,在特定激发光下呈红色荧光(Ex=535 nm, Em=617 nm)。将Calcein-AM和PI匹配使用,就可以将活细胞和死细胞区分开来。

特点

- 操作简单,荧光特异性强。
- 细胞毒性低。
- 可用于流式细胞仪进行活死细胞定量或分选。

试剂盒组成

Compenet	FC301-01 (100 rxns)
Calcein-AM Solution (1000×)	100 µl
PI Solution (1000×)	100 µl

实验操作

自备

Product Name	Catalog
PBS (1×)	TransGen, Cat. FG701-01

染色工作液的配制

- 1、将Calcein-AM Solution和PI Solution提前从冰箱取出,平衡至室温。建议首次使用前对液体进行分装,减少反复冻融。
- 2、双重染色工作液的配制:取1 µl Calcein-AM Solution (1000×)和1 µl PI Solution (1000×)加入到1 ml 1×PBS中,充分混匀。
- 3、单染工作液的配制:取1 µl Calcein-AM Solution (1000×)或1 µl PI Solution (1000×)加入到1 ml 1×PBS缓冲液中,充分混匀。
注意:由于不同细胞的染色条件存在差异,建议初次使用时对Calcein-AM和PI单染工作液设置不同的稀释倍数(200× - 5000×),摸索其对于活/死细胞染色的最佳使用浓度。
死细胞制备可以采用如下两种方法:4%多聚甲醛固定10分钟后,0.3% Triton-X-100透化5分钟;0.1%皂素或0.1-0.5%地高辛孵育细胞10分钟。

染色步骤

1、悬浮染色方法

- (1) 准备 5×10^5 - 1×10^6 个贴壁细胞,用胰酶消化,200×g离心5分钟,弃上清液,收集细胞。悬浮细胞可直接离心收集细胞。
- (2) 用1ml 1×PBS重悬细胞,200×g离心5分钟,弃上清液,收集细胞。重复一次。
- (3) 用500 µl-1 ml染色工作液重悬细胞,37°C避光孵育15-20分钟。
- (4) 200×g离心5分钟,弃染色液。
- (5) 用1ml 1×PBS重悬细胞,200×g离心5分钟,弃上清液,收集细胞。
- (6) 重复步骤(5) 1-2次,用500 µl 1×PBS重悬细胞,常温避光放置,在1小时内进行检测。

此方法适用于流式细胞仪或荧光显微镜检测。



2、贴壁染色方法

- (1) 将细胞以 2×10^5 个/ml的密度接种于24孔细胞培养板中，培养过夜。
- (2) 去掉原培养基，用 $1 \times$ PBS清洗细胞1-2次。
- (3) 吸净 $1 \times$ PBS，加入500 μ l染色工作液，37°C避光孵育15-20分钟。
- (4) 用 $1 \times$ PBS清洗细胞1-2次，避光放置，在1小时内进行检测。

此方法适用于荧光显微镜检测。

样品分析

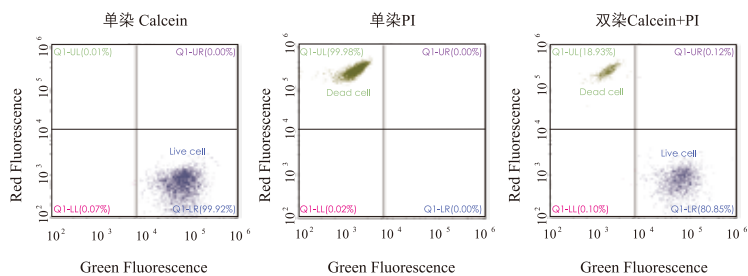
A 流式细胞仪检测

选择合适的电压并调节光补偿，建议除待测样品之外设置以下对照样品。

- (1) 不加任何染料的阴性对照
- (2) Calcein-AM单染阳性细胞对照
- (3) PI单染阳性细胞对照

流式细胞仪分析参考实例

将HeLa活细胞和固定透化的死细胞按照4:1的比例进行混合，按照上述步骤双重染色，流式细胞仪分析结果如下图所示。



B 荧光显微镜检测

(1) 悬浮细胞

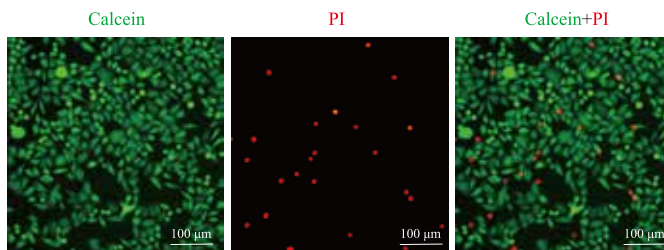
将染色后的细胞滴于载玻片上，盖上盖玻片，荧光显微镜观察，Calcein-AM标记活细胞 (Ex=490 nm, Em=515 nm) 呈绿色荧光，PI标记死细胞 (Ex=535 nm, Em=617 nm) 呈红色荧光。

(2) 贴壁细胞

可以用玻片培养细胞，直接染色进行镜检；也可以将细胞消化下来，染色后取部分悬液，滴于载玻片上，盖上盖玻片，荧光显微镜观察，Calcein-AM标记活细胞 (Ex=490 nm, Em=515 nm) 呈绿色荧光，PI标记死细胞 (Ex=535 nm, Em=617 nm) 呈红色荧光。

荧光显微镜检测参考实例

将HeLa细胞按照上述步骤双重染色，荧光显微镜检测结果如下图所示。



注意事项

- 本试剂盒需低温条件下避光保存。
- 染色工作液要现用现配，染色后在1小时内完成检测。
- 为了您的健康，请佩戴手套，规范实验操作。

本产品仅供研究，不用于临床诊断。

版本号: V1-202008

服务投诉电话 +86-10-57815020

服务投诉邮箱 complaints@transgen.com.cn

