

产品说明书

产品名称: Viability/Cytotoxicity Assay Kit for Animal Live & Dead Cells(Calcein AM, EthD-I 法)

产品货号: BN16023

产品规格: 150T, 300T

产品内容:

组分	L6023 (150T)	L6023 (300T)
A : Calcein AM (4 mM in anhydrous DMSO)	50 μ L	100 μ L
B : Ethidium homodimer-1(EthD-I) (2 mM in DMSO/H ₂ O 1:4(v/v))	150 μ L	300 μ L

注: 本试剂盒次数是按照流式细胞仪一个样品使用 0.5mL 工作液规定的。

光谱信息: Calcein AM: $\lambda_{Ex}/\lambda_{Em} = 494/517$ nm

EthD-I: $\lambda_{Ex}/\lambda_{Em} = 528/617$ nm(结合 DNA)

储存条件

-20°C 避光保存, 六个月有效。注意 Calcein AM 容易水解, 需密封干燥保存, 稀释工作液需当天配制。EthD-I 在 -20°C 保存, 一年有效。

产品介绍

Viability/Cytotoxicity Assay Kit for Animal Live & Dead Cells 是一种为动物细胞死活检测提供双荧光染色的试剂盒。试剂盒内的两种探针可分别测定细胞内酯酶活性和质膜完整性从而反映细胞活力。本试剂盒可用于荧光显微镜、流式细胞仪、酶标仪以及其他荧光检测系统。

Viability/Cytotoxicity Assay Kit for Animal Live & Dead Cells 可以应用于大多数的真核哺乳动物细胞, 包括贴壁细胞核的某些组织, 但不适用于真菌和酵母。该试剂盒与相同用处的台盼蓝相比, 更快捷安全且灵敏度更高。

使用方法

荧光显微镜检测

1. 准备工作液

准备 2 μ M Calcein AM 和 4 μ M EthD-I 的染色工液: 取出 Calcein AM 和 EthD-I 原液, 使其恢复室温。将 20 μ L 2 mM EthD-I 和 5 μ L 4 mM 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 EthD-I 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. 准备细胞并开展实验

2.1. 对于贴壁细胞, 可直接染色。对于悬浮细胞, 离心收集细胞染色。

2.2. 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。

2.3. 吸弃 PBS 溶液, 对于贴壁细胞, 加入足够量的 Calcein AM/EthD-I 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 10⁵/mL。

2.4. 37°C 孵育 15 min ~ 20 min(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)。

2.5. 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 μM Calcein AM 和 4 μM EthD-I 的染色工作液：取出 Calcein AM 和 EthD-I 原液，使其恢复室温。将 20 μL 2 mM EthD-I 和 5 μL 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 $1-5 \times 10^5/\text{mL}$ 。

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-I)，用于流式单染的补偿调节。

5. 室温避光孵育 15-20 min。
6. 在 1-2 h 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，EthD-I 发射光谱约在 610 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：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 μM Calcein AM 和 4 μM EthD-I 的染色工作液：取出 Calcein AM 和 EthD-I 原液，使其恢复室温。将 20 μL 2 mM EthD-I 和 5 μL 4 mM 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：10 mL 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 EthD-I 的浓度可在 0.1~10 μM 之间摸索。

注：Calcein AM 的水溶液易水解，应当天用完。EthD-I 工作液可保存在 -20 $^{\circ}\text{C}$ ，至少可保存一年。

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 μL PBS 清洗细胞。对于悬浮细胞，加 100 μL PBS 重悬细胞，离心分离细胞。重复上述操作。

4. 每孔中加入 100 μL PBS。
5. 每孔中加入 100 μL 染色工作液，使每孔总体积为 200 μL ，Calcein AM 的终浓度为 1 μM ，EthD-I 的终浓度为 2 μM 。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 Texas Red 时，可以检测 EthD-I。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 10min，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 μM Calcein AM 和 4 μM EthD-I 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 645nm 的测量值，记为 Calcein AM 和 EthD-I=F(645)sam。

B. 样品组在 530 nm 的测量值，记为 Calcein AM 和 EthD-I=F(530)sam。

E. 活细胞 EthD-I 单染对照组在 530 nm 的测量值，记为 EthD-I=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)，645nm 处的检测值记为 F(645)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 645 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。