

## Calcein-AM/PI Cell Viability/Cytotoxicity Assay Kit

### Calcein-AM/PI 细胞活性与细胞毒性检测试剂盒

| 产品编号   | 产品名称                        | 规格    |
|--------|-----------------------------|-------|
| MH1047 | Calcein-AM/PI细胞活性与细胞毒性检测试剂盒 | 100T  |
| MH1047 | Calcein-AM/PI细胞活性与细胞毒性检测试剂盒 | 500T  |
| MH1047 | Calcein-AM/PI细胞活性与细胞毒性检测试剂盒 | 1000T |

#### 产品简介:

Calcein AM (中文名称为钙黄绿素AM或钙黄绿素乙酰氧基甲酯)和碘化丙啶(PI)溶液, 分别对活细胞和死细胞染色, 可用于同时对活细胞和死细胞进行荧光染色。

Calcein AM是在Calcein(钙黄绿素)的基础上增加了乙酰氧基甲酯(AM)基团, 加强了疏水性, 因此能够很容易穿透细胞膜。Calcein AM本身并没有荧光, 进入细胞后被活细胞中内源性酯酶水解生成具有强负电荷的不能通透细胞膜的极性分子钙黄绿素(Calcein), 从而被滞留在细胞内, 而Calcein可发出强绿色荧光(激发: 490 nm, 发射: 515 nm)。由于死细胞缺乏酯酶或酯酶活性很低, Calcein AM进入细胞后含有酯酶的活细胞可以产生Calcein, 而死细胞不能或很少能产生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。

核酸红色荧光染料碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)由于不能穿透活细胞的细胞膜, 只能通过死细胞膜的无序区域而到达细胞核, 并嵌入细胞的DNA双螺旋从而产生红色荧光(激发: 535 nm, 发射: 617 nm)。因此, Calcein AM与碘化丙啶联合使用, 对活细胞和死细胞同时进行双重荧光染色, 就能用于细胞活性与细胞毒性的检测。

#### 产品组成:

| 组分  | 名称                  | 规格   |       |         | 保存       |
|-----|---------------------|------|-------|---------|----------|
|     |                     | 100T | 500T  | 1000T   |          |
| 试剂一 | Calcein-AM 溶液 (4mM) | 10μL | 50μL  | 2×50μL  | -20℃避光干燥 |
| 试剂二 | PI 溶液 (2 mM)        | 30μL | 150μL | 2×150μL | -20℃避光干燥 |

#### 使用方法:

##### 一、染色溶液的配制:

- 将低温保存的Calcein-AM溶液(4mM)和PI溶液(2 mM)拿出, 恢复室温20-30 min。
- 取5μL Calcein-AM溶液(4mM)和15μL PI溶液(2 mM)加入至5mL 1×PBS缓冲液中, 充分混匀, 制成染色溶液。Calcein-AM的终浓度为4 μmol/L, PI的终浓度为6 μmol/L。

【注】由于Calcein-AM的稳定性比较差, 此染色工作液必须现配现用, 并且在当天用完。

##### 二、细胞染色与检测:

- 将细胞接种于96孔板等多孔板、细胞培养皿中或者细胞爬片上, 按实验设计对细胞进行一定处理。
- 对于贴壁细胞, 吸除培养液, 用PBS洗涤细胞1遍; 对于细胞悬液800g左右离心5min, 去除上清液, 加入PBS洗涤细胞1遍。

【注】由于培养基中的血清等含有酯酶, Calcein-AM遇水会分解, 会导致空白上升, 所以需要离心数次,

用1×PBS 缓冲液清洗细胞2~3 次，以充分去除残留的酯酶活性。

3. 吸弃PBS 缓冲液，加入适当体积的Calcein AM/PI 染色工作液。通常96 孔板每孔加入100μL， 24 孔板每孔加入250μL， 12 孔板每孔加入500μL， 6 孔板每孔加入1mL。37℃ 避光孵育 15min。

【注】如果需要，可延长孵育时间至30min。

4. 孵育结束后，在荧光显微镜下观察染色效果。先用490±10 nm 波长激发，观察黄绿色的活细胞；然后用 545 nm 波长激发，能够看到红色的死细胞；也可以直接在荧光酶标仪下使用合适的滤片进行检测。

### 三、最佳浓度染色试剂确认

根据不同细胞种类，可以通过以下操作，找到不同细胞的最佳染色试剂浓度。

1. 通过在0.1%皂苷或0.1-0.5%毛地黄皂苷中孵育 10 分钟或通过70%乙醇中孵育30 分钟制备死细胞。
2. 用0.1-10 μM PI 溶液对死细胞染色，以便找到仅对细胞核染色而不对细胞质染色的PI 浓度。
3. 用0.1-10 μM Calcein-AM 溶液对死细胞染色，以便找到不对细胞质染色的Calcein-AM 浓度。接着用该浓度的Calcein-AM 对活细胞染色以检验活细胞可否被染色。

### 注意事项：

1. 由于Calcein-AM 对湿度非常敏感，若是Calcein-AM 溶液每次取完需要量后，必须紧紧密封盖子。建议根据单次用量，分装密封保存。Calcein-AM 工作液必须现配现用。
2. 碘化丙啶（PI）有一定的致癌性，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。
3. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品。
4. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

### 有效期：

-20℃ 避光保存一年。