

Calcein AM /PI 细胞双染试剂盒

钙黄绿素-AM (Calcein-AM) 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 的乙酸甲基酯亲脂性很高, 使其可透过细胞膜。尽管 Calcein-AM 本身并不是荧光分子, 但通过活细胞内的酯酶作用, Calcein-AM 能脱去 AM 基, 产生的 Calcein 能发出强绿色荧光 (激发: 490 nm, 发射: 515 nm)。因此 Calcein-AM 仅对活细胞染色。另一方面, 作为核染色染料的 PI 不能穿过活细胞的细胞膜。它穿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)。由于 Calcein 和 PI-DNA 都可被 490 nm 激发, 因此可用荧光显微镜同时观察活细胞和死细胞。用 545 nm 激发, 仅可观察到死细胞。由于不同细胞系的最佳染色条件不同, 我们建议个别确定 Calcein-AM 和 PI 的合适浓度。

I. 试剂 Calcein-AM 4mM 50uL in DMSO; Unit Size #500 assays • PI (2mM) 150uL in water

II. 操作说明

用荧光显微镜观察细胞形态, 以 HeLa 细胞染色为例, 请注意不同的细胞种类、不同浓度, 有不同的观察条件。根据细胞条件, 摸索不同条件下的细胞贴壁情况和试剂浓度的配制等最佳条件。

1. 染色溶液的配制

- 1) 将 Calcein-AM 储备液和 PI 储备液平衡到室温。
- 2) 分别加 2.5 μ l Calcein-AM 原液和 12.5 μ l PI 原液至 5 mL PBS (pH=7.4) 中配制成染色工作液。染色工作液中 Calcein-AM 的浓度为 2 μ mol/L, PI 的浓度约为 5 μ mol/L。

2. 细胞染色

- 1) 染色 HeLa 细胞等贴壁细胞时, 先用 Trypsin-EDTA 等消化细胞, 制备成细胞悬液。
- 2) 将细胞悬液离心 3 分钟 (1,000 rpm)。
- 3) 去除上清液, 加入 PBS 缓冲液, 细胞数量调整至 10^5 - 10^6 个/ml。再用移液器充分混匀。
- 4) 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 PBS 洗涤数次直到完全洗净。
- 5) 将 200 μ l 细胞悬液移至小试管中, 加入 100 μ l 染色工作液, 在 37°C 下孵育 15 分钟。
- 6) 在盖玻片上滴加适量的染色的细胞溶液。
- 7) 在荧光显微镜下, 先用 490 ± 10 nm 波长激发, 观察黄绿色的活细胞, 还可以同时观察到红色的死细胞, 然后用 545 nm 波长激发, 能够看到红色的死细胞。

3. 染色试剂的最佳浓度

Calcein-AM 和 PI 最佳浓度根据细胞种类而定，通过以下的操作，可找到不同细胞染色试剂的最佳浓度。

- 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。

III. 注意事项

- 1) Calcein-AM 的 ester 部位遇到湿气会分解，使用后请在 -20 度下密闭冷冻保存，防止水分进入。Calcein-AM 储备液用缓冲液或培养基等稀释时尽量现配现用。
- 2) 使用时一定要带手套、眼罩、口罩。万一接触到皮肤的话，迅速使用大量水清洗。