

钙黄绿素 AM (Calcein AM)

1 产品基本信息

产品名称 (中文): 钙黄绿素 AM

产品名称 (英文): Calcein AM

产品编号: MX1477

2 规格或纯度

1 mg

3 产品介绍

产品简介:

Calcein AM 是一种对活细胞进行绿色荧光 (Ex:490 nm, Em: 515 nm) 标记的细胞染色试剂。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。Calcein AM 本身不发荧光, 进入细胞后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。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。与其它同类试剂 (如 BCECF AM 和 CFDA) 相比, Calcein AM 细胞毒性极低, 不会抑制任何的细胞功能, 如细胞增殖和淋巴球的趋化性等, 是最适合用于活细胞染色的荧光探针。

作为核染色染料的碘化丙啶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 (Ex:535 nm, Em:617 nm), 因此 PI 仅对死细胞染色。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。而用 545 nm 激发, 仅可观察到死细胞。根据以上特点, Calcein AM 可与碘化丙啶 (PI) (MX1472) 联合使用, 用于活细胞和死细胞的同时检测或者直接购买 UE 提供的 Calcein AM/PI 活细胞 / 死细胞双染试剂盒 (MX1541)。由于不同细胞系的最佳染色条件不同, 建议 Calcein AM 和 PI 的最适浓度也相应做出调整。

产品特点:

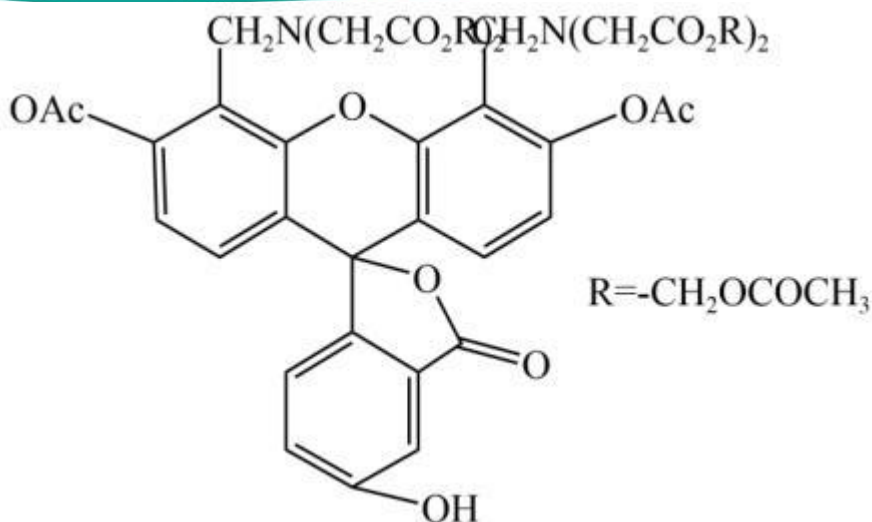
- 稳定性强: 荧光亮度强, 发光时间久, 不易淬灭
- 使用方便: 可搭配我司其它试剂使用, 方便灵活

适用范围:

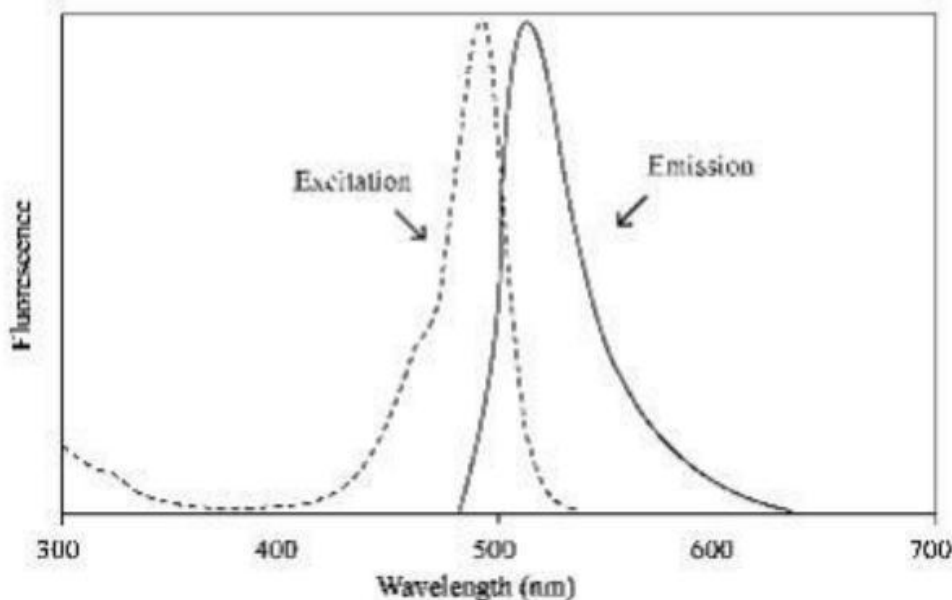
活细胞染色、细胞成像、细胞增殖和功能、细胞示踪、细胞计数

产品参数:

- 外观: 可溶于 DMSO 的灰白色固体
- CAS 号: 148504-34-1
- Ex/Em: 494/517 nm (pH=8)
- 分子式: $C_{46}H_{46}N_2O_{23}$
- 分子量: 994.9
- 分子结构图:



● 光谱图:



4 储存与运输

储存条件: -20°C 避光保存

运输条件: 冰袋运输

5 使用方法 (仅供参考)

- (1) 用 DMSO 制备 1 mM 的 Calcein AM 溶液, 并用 PBS 将其稀释制成 1~50 μM 的 Calcein AM 溶液。

注: 不同的细胞适用的 Calcein AM 浓度不同, 2 μM 的 Calcein AM 适用的细胞有 NIH3T3、PtK2、HeLa、MDCK 等。

- (2) 染色 HeLa 等贴壁细胞时, 先用 Trypsin-EDTA 等消化细胞, 制备成细胞悬液。

- (3) 将细胞悬液离心 3 min (1000 rpm)。

- (4) 去除上清液, 加入 PBS 缓冲液, 细胞数量调整至 $10^5 \sim 10^6/\text{mL}$, 再用移液器充分混匀。

注: 由于培养基中的血清等含有酯酶, 会分解 Calcein AM, 导致空白背景数值上升, 所以需要离心数次, 用 PBS 洗涤数次直到完全洗净。

- (5) 在 200 μL 细胞悬液中加入 50 μL 稀释后的 Calcein AM 溶液, 在 37°C 下孵育 15 min。

(6) 在盖玻片上滴加适量的染色的细胞溶液。用 490 nm 激发波长, 515 nm 发射波长滤光片的荧光显微镜观察细胞。

注: 如果 Calcein AM 很难进入细胞, 可以使用表面活性剂处理, 如 Pluronic F127。

6 常见问题

Q1: 细胞追踪有很多产品, 该如何选择?

答:

首先确定追踪细胞的时间, 然后考虑染料结合机制。

(1) 钙黄绿素染料 (MX1477) 标记均匀且对短期细胞迁移示踪效果极佳, 但也会被某些类型细胞迅速外排。

(2) 亲脂性的花青素染料, 如 DiI (MX1448)、DIO (MX1445)、DiA (MX1493)、DiD (MX1457)、DiR (MX1444) 能标记细胞膜而不破坏其功能, 并且能持续更长时间, 但如果发生膜融合则可能会染上其他细胞。此外, 它们还会在透化过程中丢失。

(3) Cell Tracker 染料 (MX1494) 更有利于长期标记, 其带有温和的氯甲基反应基团使之能够与细胞组分共价结合。

(4) CFDA SE (MX1503) 也能共价地结合于细胞组分。在所有列出的试剂中, 细胞内保留与否取决于细胞分裂的速率和细胞的固有特性 (主动外排, 膜和蛋白质的周转率等)。其中共价结合试剂比非共价结合的试剂展现出更长的保留时间。

Q2: 用 Calcein AM 标记了细胞, 但是第二天成像时, 没有来自 Calcein AM 的荧光, 为什么?

答:

Calcein AM 是细胞追踪和普通细胞质染色的良好选择, 然而, 它不与任何东西结合, 可能会在几个小时内被主动抽出细胞, Calcein AM 在活细胞内的保留取决于细胞类型和培养条件的固有特性, 对于长期成像, 您可能需要考虑反应性细胞质染色, 如 CFDA, SE 染料。

Q3: 是否有染料, 将其在活细胞中加入, 在高浓度下可以自淬灭, 但如果细胞死亡, 染料将被释放并取消淬灭?

答:

有的, 这通常是通过 Calcein AM 或 FDA (荧光素二乙酸酯) 完成的, 这些染料在被酯酶分解之前不会发出荧光, 经酯酶修饰后, 在非常高的浓度下会自我淬灭, 一旦质膜破裂或细胞死亡, 染料将被释放到细胞外介质中, 无法淬灭, 必须优化浓度和培养时间, 以获得足够的淬灭效果。

Q4: 当我用 Calcein AM 对细胞进行染色时, 细胞经过固定处理后信号就消失了, 为什么?

答:

Calcein AM 扩散到细胞中, “AM” 部分由细胞酯酶裂解, 随后染料分子的荧光信号可以在细胞质中被观测到, 但不结合细胞组分。这意味着它们能够为 “整个细胞” 染色, 也意味着染料不能通过醛类固定剂进行交联, 因此染料会在固定时丢失, 此外, 质膜的任何干扰 (例如去污剂或胰蛋白酶处理) 都会导致染料从细胞中渗漏。

Q5: 实验中一个细胞迁移研究大约 4 h, 需要用染料荧光标记细胞, 是否有相关染料推荐?

答:

Calcein AM 和 FDA (荧光素二乙酸盐) 是用于该应用的一些染料的实例, 由于这些染料不与任何细胞组分结合或共价连接, 它们可能具有短的保留时间, 因为一些细胞类型可能主动将染料从细胞

中流出。

7 注意事项

- Calcein AM 的酯键遇到湿气会分解，使用后请在 -20°C 下密闭冷冻保存，防止水分进入。
- Calcein AM 储备液稀释后请及时使用，尽量现配现用。
- 由于 Calcein AM 在 PBS 等水溶液中不稳定，配制工作液后需尽快使用。
- 培养液中的血清和酚红对 Calcein AM 的染色有一定的影响，建议在加入 Calcein AM 工作液前充分洗涤细胞。
- Calcein AM 标记的细胞，荧光均匀，而且对短期细胞迁移示踪效果非常好，但荧光的持续时间与细胞类型、培养条件等因素相关，一般在几小时之内，而且有时也会被某些类型细胞迅速外排。如果需要长时间标记细胞，请使用 CFDA SE (MX1538) 等荧光探针。
- 本产品仅限于科研，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。