

## Calcein AM 细胞活力检测试剂盒

### 1 产品基本信息

产品名称（中文）: Calcein AM 细胞活力检测试剂盒

产品名称（英文）: Calcein AM Cell Viability Assay Kit

产品编号: MX1522

### 2 规格或纯度

25  $\mu$ L, 500  $\mu$ L

### 3 产品介绍

产品简介:

BCECF, AM 是一种可以穿透细胞膜检测细胞内 pH 的荧光染料。BCECF, AM 没有荧光，进入细胞后可以被细胞内的酯酶剪切形成 BCECF，从而被滞留在细胞内在适当的 pH 值条件下可以被激发形成绿色荧光，最大激发波长和发射波长因 pH 的不同而有所不同，最大激发波长在 503 nm 左右，最大发射波长在 520 nm 左右，实际检测时推荐使用的激发波长为 488 nm，发射波长为 535 nm。

BCECF, AM 不仅被广泛用于哺乳动物细胞的研究，也用于动物组织、植物细胞、细菌和酵母等的体内 pH 水平检测。此外，在细胞内有 pH 变化的细胞毒性、细胞凋亡、细胞粘附、药物抵抗、细胞趋化等过程中 BCECF, AM 也被广泛应用。

产品特点:

- 稳定性好: 荧光亮度高且抗淬灭性好;
- 批间差小: 产品为公司自研，批间差控制的好;
- 使用方便: 我司提供多种细胞活力检测染料，选择灵活方便。

适用范围:

活细胞荧光示踪探针

产品参数

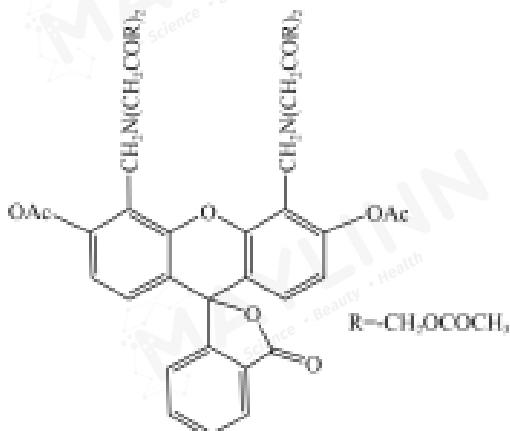
CAS 号: 148504-34-1

Ex/Em: 494/517 nm (pH=8)

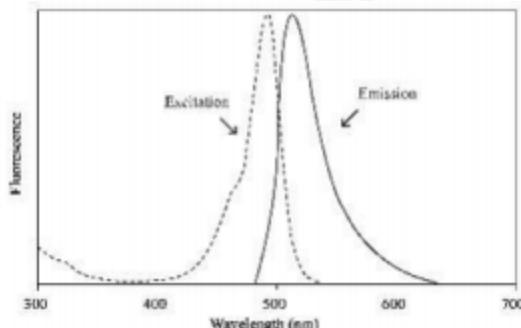
分子式: C<sub>46</sub>H<sub>46</sub>N<sub>2</sub>O<sub>23</sub>

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. Calcein AM 工作液的配置

(1)从冷冻状态下取出 Calcein AM 储存液原管, 静置 30 min 使其恢复至室温。

(2)在 10 mL 的 PBS 缓冲液(无血清培养基、HBSS 缓冲液、PBS 缓冲液等)中加入 10  $\mu$ L 的 2 mM Calcein AM 储存液。

### 2. 细胞活力检测

#### (3)荧光显微镜或荧光酶标仪检测

1)按实验要求将细胞接种 96 孔培养板, 推荐使用黑色板壁的培养板用于荧光检测。对于贴壁细胞, 需在检测前一天铺板, 并设定空白对照孔。

2)根据实验要求对细胞进行适当处理。

3)吸除每孔培养液, PBS 清洗细胞 1~2 遍。

**注:** 培养基中的血清可能含有酯酶活性, 会增强背景荧光。用 PBS 清洗细胞, 以降低残留血清的影响。

4)每孔加入 100  $\mu$ L 的 2  $\mu$ M Calcein AM 工作液。

5)37 °C 避光孵育 30 min 或者更长时间。

**注:** 不同的细胞最佳孵育时间有所不同, 根据所用细胞对孵育时间进行适当优化以得到更加理想的染色效果。

6)孵育结束后, 吸除培养液, 用 PBS 清洗 2~3 次, 然后加入无血清细胞培养液后即可在荧光显微镜下观察或荧光酶标仪检测。在荧光显微镜下 直接观察染色效果或在激发波长为 485 nm, 发射波长为 530 nm 的荧光检测仪测量培养板内的荧光。

**注:** 整个过程均需避光操作。

#### (4)流式细胞仪检测

1)贴壁细胞胰酶消化后用培养液重悬, 悬浮细胞直接使用, 计数, 取适量细胞 1000~1500 rpm 室温离心 5 min, 弃上清, 加入适当体积的 Calcein AM 染色工作液, 使细胞为单细胞悬液, 并且细胞密度为约  $1 \times 10^6$  cells/mL, 每个样品体积为 1 mL。

**注:** 需要准备好仅含缓冲液的细胞样品用作流式细胞仪检测时的阴性对照, 该缓冲液与配制 Calcein AM 染色工作液的缓冲液宜保持一致。

2)37 °C 避光孵育 30 min。

**注:** 不同的细胞最佳孵育时间有所不同, 根据所用细胞对孵育时间进行适当优化以得到更加理想的染色效果。

3) 孵育完成后, 1000~1500 rpm 室温离心 5 min 收集细胞。每个样品加入 1 mL 缓冲液, 轻轻重悬, 1000~1500 rpm 室温离心 5 min 收集细胞。

**注:** 本步骤可去除多余染料及可能引起荧光淬灭的试剂。

4) 用 400  $\mu$ L 缓冲液重悬细胞。如有需要, 也可进行进一步染色。染色后, 将样品置于冰上, 可以在 1 小时内进行流式细胞仪检测和分析。

**注:** 整个过程均需避光操作。

5) 注意使用仅含缓冲液的并且未经染色的细胞样品用于流式细胞仪的阴性对照设置。Calcein 的最大激发光波长为 494 nm, 最大发射光波长为 517 nm。

### 3. 结果展示

图 1 用 Calcein AM Cell Viability Assay Kit 定量 HeLa 细胞数。细胞在检测前 24 h 接种于 96 孔板内。

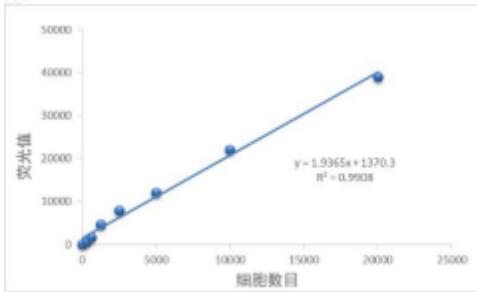


图 1 荧光酶标仪结果图

## 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。

(5) 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 的荧光, 这是为什么呢?**

**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, 钙黄绿素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, 加入活细胞中, 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吗?**

**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, 它们会自我淬灭。一旦质膜破裂或细胞死亡, 染料将被释放到细胞外介质中, 并变得不淬灭。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, 但其不结合到细胞组分。这意味着它们能够为“整个细胞”染色。这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(例如去垢剂或胰蛋白酶处理)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 时, 需要用染料荧光标记细胞, 有什么推荐的吗?

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

- 使用前请将产品瞬时离心, 再进行后续操作。
- Calcein AM 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。
- 荧光染料均存在淬灭问题, 实验操作时请尽量注意避光, 以减缓荧光淬灭。
- 本产品仅限于科研, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品和药品, 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。