

## 细胞活死染色试剂盒 (EFL-CLD-001)

### Live & Dead Viability Assay Kit for Animal Cells

#### 产品简介

本试剂盒为动物细胞死活检测提供了双色荧光染色方法。本试剂盒采用两种广泛常用的荧光探针, 通过检测细胞内酯酶活性和质膜完整性两个方面反映细胞活力。本试剂盒适用于荧光显微镜、激光共聚焦显微镜、流式细胞仪以及其他荧光检测系统。本试剂盒可以应用于大多数的真核哺乳动物细胞, 包括贴壁细胞核某些组织, 但不适用于细菌、酵母。该方法更快捷安全且灵敏度更高。

#### 工作原理

在钙黄素 AM 存在活细胞内时, 其特点就是由于胞内无所不在的酯酶活性作用, 由几乎无荧光、但具有细胞膜透性的钙黄素(AM)生成具有强烈荧光信号的绿色荧光物质 (Ex/Em: 495nm/520nm)。而对于受损的细胞膜来说, 碘化丙啶(PI)可以穿过进入细胞, 与核酸结合, 荧光信号从而放大 40 倍, 产生一个明亮的红色荧光信号的死细胞 (Ex/Em: 530nm/620nm)。

组份	规格: 1000T	存储条件
组份 A: Calcein AM	4mM in 无水 DMSO, 100 $\mu$ L	-20 避光保存, 12 个月
组份 B: PI	16mM in DMSO, 100 $\mu$ L	-20 避光保存, 12 个月

#### 使用说明

##### 一、制备工作液(2 $\mu$ M calcein AM, 8 $\mu$ M PI)

钙黄素 AM 和 PI 的浓度选择依据所用的细胞类型不同而有区别, 应当根据具体细胞调节染料浓度以得到最佳效果。一般来说, 满足信号足够的前提下, 尽可能选择最低浓度的染料剂量。钙黄素 AM 和 PI 推荐浓度范围为 0.1~10 $\mu$ M。

1. 取出 AM 和 PI 试剂原液, 4 度或室温复溶至液态;
2. 分别制备 AM 和 PI 工作液各 10ml:
  - (A) 在 10mL 的 PBS 中加入 5 $\mu$ L 16mM 的 PI 原液震荡混匀, 得到 8 $\mu$ M 的 PI 工作液。
  - (B) 在 10mL 的 PBS 中加入 5 $\mu$ L 4mM 的 AM 原液震荡混匀, 得到 2 $\mu$ M 的 AM 工作液。
3. 配制所得到的 AM 和 PI 工作液分别避光放置, 可直接用于染色细胞。

## 二、染色步骤

1. 贴壁细胞可以用培养瓶或者小室爬片。悬浮细胞同样可以。
2. 正式开始实验前，洗涤细胞，确保除去培养基中含有的活性酯酶。用 PBS 温和洗涤贴壁细胞，去除上清。悬浮细胞用离心管收集离心，PBS 洗涤去除上清。
3. 先加入足量配制好的 PI 工作液，保证没过细胞，室温孵育 10min。  
(注: PI 染色时间不要过久，避免因染色过程导致细胞死亡而着色)
4. 去除 PI 工作液，再用足量 PBS 温和洗涤一遍去除上清。
5. 加入足量配制好的 AM 工作液，保证没过细胞，室温孵育 20~45 分钟。
6. 去除 AM 工作液，再用足量 PBS 温和洗涤一遍去除上清。  
(注: 荧光观察分析之前，样本可一直浸泡在 AM 工作液中)
7. 滴加 PBS 或抗荧光淬灭剂，常规盖玻片封片后，即可镜下观察细胞活死标记情况。

## 三、流式细胞仪检测

本试剂盒可以方便地应用于流式细胞仪。悬浮细胞或经胰酶消化的贴壁细胞，通过 PBS 离心洗涤细胞再以 PBS 重悬，反复操作 2 次之后，先以 PI 工作液孵育 10min，PBS 洗涤 1 次后，再即孵育 AM 工作液 30min，PBS 洗涤 1 次后即可上机检测。

## 四、类器官及载细胞水凝胶支架检测

1. 取出样本，用 PBS 洗涤 1-2 次，洗去残留的培养基溶液。
2. 先加入足量配制好的 PI 工作液，保证没过细胞，室温孵育 10min。  
(注: PI 染色时间不要过久，避免因染色过程导致细胞死亡而着色)
3. 去除 PI 工作液，再用足量 PBS 温和洗涤一遍去除上清。
4. 加入足量配制好的 AM 工作液，保证没过细胞，室温孵育 20~45 分钟。
5. 去除 AM 工作液，再用足量 PBS 温和洗涤一遍去除上清。  
(注: 荧光观察分析之前，样本可一直浸泡在 AM 工作液中)
6. 滴加 PBS 或抗荧光淬灭剂，即可镜下观察细胞活死标记情况。  
(注: 样本较小可封片，样本体积较大可不封片直接镜下观察)

### 注意:

- 产品尽量避免反复冻融，初次解冻后可进行分装，每管 5 $\mu$ L。
- 钙黄素 AM 的水溶液容易发生水解，需当天用完，尽量在染色结束后 6h 内完成分析。