

1. 引言

我们的产品 Live-Dead Cell Staining Kit 被用于同时荧光染色活细胞和死细胞。该试剂盒包含两种染料-钙黄绿素-AM(Calcein-AM)和碘化丙啶 (PI)，分别染色活细胞和死细胞。

Calcein-AM 是 Calcein 的乙酰氧基甲酯，具有高度亲脂性，且可渗透细胞膜。尽管 Calcein-AM 本身不是荧光分子，但在经过活细胞中的酯酶消化后，它将转化为 Calcein，发出强烈的绿色荧光（最大激发波长：490 nm，最大发射波长：515nm）。因此，Calcein-AM 仅染色活细胞。

相反，PI（一种核染色染料）不能穿过活细胞膜。它能够穿过死细胞膜的无序区域到达细胞核，并插入细胞核的 DNA 双螺旋中，发出红色荧光（最大激发波长：535 nm，最大发射波长：617 nm）。

由于 calcein 和 PI-DNA 均可在 490 nm 处激发，因此可以通过荧光显微镜或流式细胞仪同时监测活细胞和死细胞。在 545 nm 激发下，只有死细胞才能发出红色荧光。由于最佳的染色条件会因细胞系的不同而变化，因此我们建议应分别确定 PI 和 Calcein-AM 的合适浓度。

请注意，PI 被怀疑具有高度致癌性；需要谨慎处理。

2. 操作指南

2.1. 将 Calcein-AM 溶液和 PI 溶液置于室温进行解冻。

将 5 μ L Calcein-AM 溶液（2 mM）和 15 μ L PI 溶液（1.5 mM）加入 5 mL PBS 中，充分混合。

在这种情况下，Calcein-AM 的工作浓度为 2 μ M，PI 为 4.5 μ M。

由于各种细胞系的最佳染色条件不同，因此建议在初始实验中进行梯度浓度筛选。原则上使用最低的探针浓度以获得最佳的荧光结果。

由于 Calcein-AM 在水溶液中的稳定性很差，因此只能在每次实验之前制备染色液，并在一天之内使用。

注意：PI 具有高度的致癌性和致突变性，因此在操作时应戴手套，安全护目镜和面罩。如果它与您的皮肤接触，请立即用大量自来水清洗。

2.2. 对于贴壁细胞，用胰蛋白酶消化细胞，然后通过离心（1000 rpm，3 分钟）收集细胞。

对于悬浮的细胞，通过离心（1000 rpm，3 分钟）收集细胞。

2.3. 用 PBS 洗涤细胞 2-3 次以除去培养基中的酯酶。

2.4. 用 PBS 制备细胞悬液，其中细胞密度为 1×10^5 至 1×10^6 细胞/ml。

2.5. 将 200 μ l 细胞悬液移至 EP 管中。然后将 100 μ l 染色溶液添加到细胞中。混匀并在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 15 分钟，避光。

注意：如果需要，将孵育时间延长至 30 分钟。

2.6. 如果使用荧光显微镜，则将 10 μ l 细胞和染色液放在载玻片上，并盖上盖玻片。

使用 490 nm 激发波长来检测荧光，可以同时监测活细胞和死细胞。在 545 nm 激发下，只能观察到死细胞。

您也可以使用流式细胞仪或其他机器。

3. 预实验

如果需要确定每种试剂的最佳浓度，请按照以下步骤操作：

3.1. 使用 0.1% 皂苷或 0.1-0.5% 洋地黄皂苷孵育细胞 10 分钟来制备死细胞。或者在 70% 乙醇中孵育 30 分钟。

3.2. 用 0.1-10 μM PI 溶液染色死细胞，以得到仅仅对细胞核染色，而不会对细胞质染色的最佳工作浓度。

用 0.1-10 μM Calcein-AM 溶液染色死细胞以得到不会对细胞质染色的最佳工作浓度。然后用此浓度进行活细胞染色，观察是否活细胞能被染色。

4.注意

4.1. 处理剩余的染料溶液时，请遵循有毒溶液处理准则和规定，并将处理委托给工业废物处理公司。

4.2. 在以前的实验中，CFSE 在一篇论文中被报道荧光染料被保留在细胞内长达 8 周。而 Calcein-AM 和 BCECF-AM 的被观察到荧光可以保持长达三天。

4.3. 如果染色后染料似乎没有留在活细胞内，则可能是因为活细胞由于细胞功能而将染料排出，或者使用的试剂不足。