

Calcein AM 溶液(100 μ M)

货号: P-CA-023

规格: 100Tests / 500Tests / 500Tests \times 10

产品编号	产品名称	100Tests	500Tests	500Tests \times 10	Storage
P-CA-023	Calcein AM 溶液(100 μ M)	100 μ L	500 μ L	500 μ L \times 10	-5~-20°C, 避光
说明书				一份	

保存条件

-5~-20°C避光可保存1年。Calcein AM溶液(100 μ M)首次使用时建议适当分装并密封避光保存,防止潮湿环境中发生自发性酯水解。

产品简介

Calcein AM溶液(100 μ M)可用于检测含有酯酶活性的哺乳动物的活细胞, Calcein AM是在传统的Calcein上添加上乙酰甲氧基甲酯即(AM)基团,疏水性增加,能很容易穿透活细胞膜,进入细胞内。Calcein AM本身无荧光,进入细胞后被细胞中内源性酯酶水解,生成具有强负电荷且不能通过细胞膜的极性分子Calcein滞留在细胞内,而Calcein可发出强绿色荧光(Ex/Em=494nm/517nm)。由于死细胞缺乏酯酶,不能或很少能产生Calcein,因此仅活细胞会被染色为强绿色荧光,死细胞不能被染色或者染色非常弱,和其他活细胞染色探针相比, Calcein AM毒性小,不影响细胞的分化和增殖。

自备试剂

PBS 缓冲液 (pH7.2~7.4)。

操作指南

1. 流式细胞仪检测

1.1. 工作液的配制:

1.1.1 试剂准备: 取出冻存的 CalceinAM 溶液(100 μ M), 室温解冻后, 涡旋混匀各试剂。

1.1.2 配制Calcein AM染色工作液: 室温解冻后, 将涡旋混匀的Calcein AM溶液按照 $1\sim 5\times 10^5$ 个细胞/200 μ L配制染色工作液。根据实验用量参考下表配制染色工作液。



组分	Calcein AM 染色工作液体积		
	1 mL	5 mL	10 mL
Calcein AM 溶液(100 μ M)	0.1 μ L	0.5 μ L	1 μ L
PBS 或 Calcein AM Assay Buffer	1 mL	5 mL	10 mL

注：染色工作液中的Calcein AM易潮解，建议现配现用。

提示：为节约试剂及保证实验的准确性，可先将 Calcein AM 溶液进行梯度稀释，如用 PBS 或 Calcein AM Assay Buffer 将 Calcein AM 溶液(100 μ M) 稀释 100 倍到 1 μ M。染色前再使用 PBS 或 Calcein AM Assay Buffer 将 1 μ M 的 Calcein AM 溶液稀释 100 倍到染色浓度(0.01 μ M)，即 200 μ L PBS 或 Calcein AM Assay Buffer 中加入 2 μ L 1 μ M 的 Calcein AM 溶液。

1.2. 染色流程：

- 1.2.1. 收集细胞，300 \times g离心5 min，去上清，加入1 mL PBS重悬细胞沉淀，300 \times g离心5 min，去上清，重复洗涤1次，去上清。
- 1.2.2. 每组1~5 \times 10⁵个细胞加入200 μ L染色工作液重悬，室温避光孵育15~20 min。
- 1.2.3. 孵育完成后，可以直接进行流式细胞仪检测，若不能及时检测，建议避光置于4 $^{\circ}$ C冰箱，2小时内进行流式细胞仪检测。

注：流式细胞仪检测时，Calcein 可用 FITC 通道；需要同时区分死细胞时可选择 Propidium Iodide (PI) Solution(750 μ M)。

2. 荧光显微镜检测

2.1. 工作液的配制：

- 2.1.1. 试剂准备：取出冻存的 Calcein AM 溶液(100 μ M)，室温解冻后，涡旋混匀各试剂。
- 2.1.2. 配制 Calcein AM 染色工作液：室温解冻后，将涡旋混匀的 Calcein AM 溶液按照 96 孔板每孔 100 μ L 或 24 孔板每孔 200 μ L 配制染色工作液。根据实验用量参考下表配制染色工作液。

组分	Calcein AM 染色工作液体积		
	1 mL	5 mL	10 mL
Calcein AM 溶液(100 μ M)	10 μ L	50 μ L	100 μ L
PBS 或 Calcein AM Assay Buffer	1 mL	5 mL	10 mL

注：染色工作液中的Calcein AM易潮解，建议现配现用。

2.2. 染色流程：

- 2.2.1. 小心吸除贴壁细胞的培养基，每孔加入适量洗涤细胞，去除 PBS，重复洗涤 1 次，吸除 PBS。
- 2.2.2. 按照 96 孔板每孔 100 μ L 或 24 孔板每孔 200 μ L 的比例加入染色工作液，37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。



2.2.3. 孵育结束后,在荧光显微镜下观察染色效果(Calcein为绿色荧光,Ex/Em=494nm/517nm)。

注1:若是悬浮细胞,则收集细胞沉淀后,按照 $1\sim 5\times 10^5$ 个细胞加入200 μL 染色工作液重悬,室温避光孵育15~20 min,吸取细胞悬液滴加在载玻片上,轻轻盖上盖玻片即可在显微镜下观察拍照。

注2:需要同时区分死细胞时可选择Propidium Iodide (PI) Solution(750 μM)。PI为红色荧光,Ex/Em=535nm/617nm。

注意事项

1. 本产品仅限于专业人员的科学研究使用。
2. 请注意安全事项,遵守实验室试剂操作规范操作。为了您的安全和健康,请穿实验服并戴一次性手套操作。
3. 请按照合适的温度保存本产品,以免失效。
4. 染色前使用无血清培养基(血清中可能含有酯酶)或者PBS洗涤细胞,缓冲液中不能含有初级或次级胺,因为脂肪组胺可裂解AM酯并妨碍负载。
5. 染色温度为 37°C 可以降低染色所需时间。室温下染色可减轻荧光探针渗入细胞器的副作用。
6. Mn^{2+} 具有荧光淬灭作用,洗涤buffer中注意不要含有 Mn^{2+} 等金属离子。
7. 适用于任何含酯酶活性的动物细胞,植物和细菌因含有细胞壁,Calcein AM不能进入因此不能染色。
8. 离心机升速和降速过高会引起细胞的损失,建议调整升速不大于3,降速不大于2,即 $\text{Acc}\leq 3$, $\text{Dec}\leq 2$ 。

