

Calcein AM细胞活性检测试剂盒(CCK-F)

产品编号	产品名称	包装
C2013S	Calcein AM细胞活性检测试剂盒(CCK-F)	100次
C2013M	Calcein AM细胞活性检测试剂盒(CCK-F)	500次
C2013L	Calcein AM细胞活性检测试剂盒(CCK-F)	2500次

产品简介:

- 碧云天的Calcein AM细胞活性检测试剂盒(Calcein AM Cell Viability Assay Kit)是一种通过Calcein-AM荧光探针标记活细胞从而简单、快速、灵敏、准确地用于细胞活性、细胞毒性或细胞增殖检测的试剂盒。本试剂盒由于能用于活细胞的精确定量,也被称为细胞荧光计数试剂盒(Cell Fluorescence Counting Kit),简称Cell Fluorescence Counting Kit-F、CCK-F或CCKF。
- 本试剂盒检测速度快,仅需约30分钟即可完成细胞活性检测。
- 本试剂盒检测灵敏度高,线性范围宽。本试剂盒可检测低至50个活细胞,并且在50-50,000个细胞范围内有很好的线性关系。对于不同的细胞线性范围略有差别。
- 本试剂盒通常推荐使用荧光酶标仪进行定量检测,也可以使用流式细胞仪进行定量检测。如果有必要,也可以使用荧光显微镜或共聚焦显微镜进行细胞的荧光检测。
- Calcein AM (Calcein Acetoxymethyl Ester, 中文名称为钙黄绿素AM或钙黄绿素乙酰氧基甲酯),是一种可渗透进入细胞、常用于测定真核细胞活力或线粒体通透性转换孔(Mitochondrial Permeability Transition Pore, MPTP)的绿色荧光探针,近年来也被广泛用于细胞活性、细胞毒性或细胞增殖的检测。
- Calcein AM是在Calcein (钙黄绿素)的基础上增加了乙酰氧基甲酯(AM)基团,加强了疏水性,因此能够很容易穿透活细胞膜,进入细胞内,从而标记细胞。Calcein AM本身并无荧光,进入细胞后被细胞中内源性酯酶水解生成具有强负电荷的不能通透细胞膜的极性分子钙黄绿素(Calcein),从而被滞留在细胞内,而Calcein可发出强绿色荧光。与其它同类探针相比,由于Calcein AM的细胞毒性非常低,几乎不会影响细胞功能如细胞增殖或淋巴细胞的趋化性等,而且对pH值敏感性低,所以Calcein AM是目前活细胞荧光染色的最理想探针之一。
- 由于死细胞缺乏酯酶,Calcein AM进入细胞后仅活细胞会被染色为绿色荧光,所以可对活细胞进行定量荧光检测。本检测方法无需任何放射性同位素标记(如 $[^3\text{H}]$ -thymidine掺入法)或溶解步骤(如MTT检测),通常无须洗涤,即可获得高度可重复性和精确性的细胞增殖检测结果。本试剂盒用于活细胞数量荧光检测的结果参考图1。

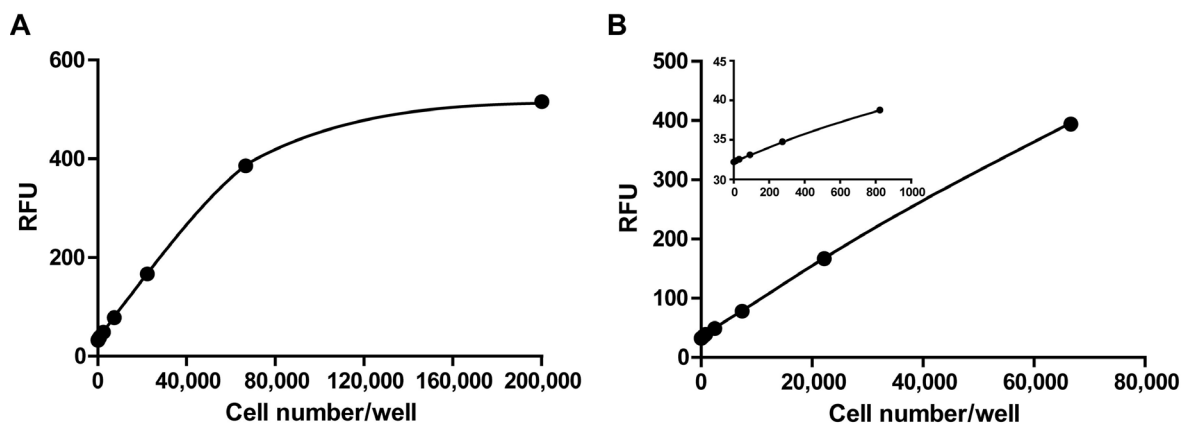


图1. Calcein AM细胞活性检测试剂盒用于检测MOLM13 (人急性髓原白血病细胞)活细胞数量的效果图。MOLM13细胞经计数后按3倍稀释接种到BeyoGold™全黑96孔细胞培养板(FCP966)中,加入Calcein AM检测工作液孵育30分钟,随后直接在荧光酶标仪下检测Ex/Em=494/517nm。实测数据会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异,图中数据仅供参考。

- 核酸红色荧光染料碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)由于不能穿透活细胞的细胞膜而只能染色细胞膜完整性被破坏的死细胞,所以Calcein AM常常与碘化丙啶(ST511)联合使用,对活细胞和死细胞同时进行双重荧光染色。本试剂盒中的Calcein AM (1000X)与碘化丙啶(需另购, ST511/ST512/ST1569)用于活细胞和死细胞双染的结果参考图2。

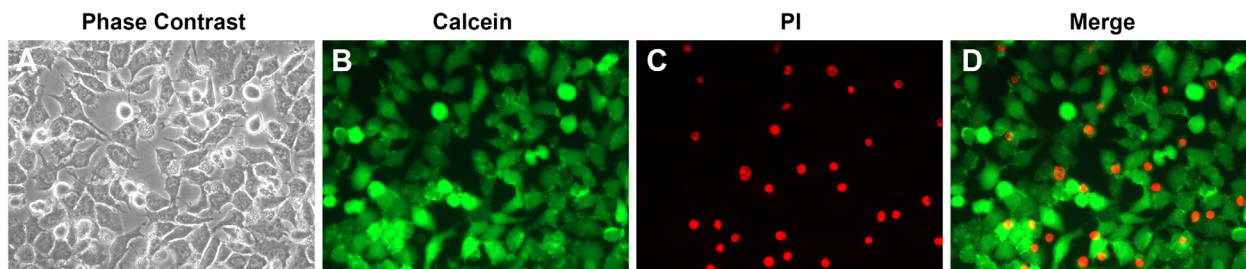


图2. Calcein AM细胞活性检测试剂盒与碘化丙啉(Propidium Iodide, PI)联合使用检测L-929活细胞与死细胞的效果图。L-929细胞在明场视野下可见明显的坏死细胞(图A); 绿色荧光标记的即为Calcein染色的活细胞(图B), 红色荧光标记的即为PI染色的死细胞(图C); Calcein和PI双染merge后更可以观察到活细胞和死细胞的差别(图D)。在本实验中, L-929细胞经TSZ处理3小时。TSZ为TNF α 、SM-164和Z-VAD-FMK组成的细胞程序性坏死诱导试剂盒(C1058)。实测数据会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异, 图中数据仅供参考。

- 本试剂盒可以应用于大多数的哺乳动物细胞。有报道称Calcein AM也可以用于某些植物细胞如拟南芥(*Arabidopsis*)的根边缘样细胞(root border-like cells)及某些酵母如*Pichia anomala*和*Saccharomyces cerevisiae*。某些寄生虫如*Leishmania*由于细胞膜组分的原因, Calcein AM不能进入活细胞, 但却可以进入凋亡早期的寄生虫细胞, 从而与PI联用用于检测凋亡早期的寄生虫。由于真菌和细菌有细胞壁, 会阻碍Calcein进入细胞, 因此Calcein AM不适合用于真菌和细菌。
- Calcein本身是一种金属络合指示剂, 在生理pH条件下和Co $^{2+}$ 、Ni $^{2+}$ 、Cu $^{2+}$ 、Fe $^{3+}$ 和Mn $^{2+}$ 等金属离子络合时, 荧光信号会发生淬灭。使用本试剂盒的时候需要避免在细胞培养液中额外添加这些影响Calcein荧光的物质。Calcein AM及其水解产物Calcein的分子结构式参考图3。

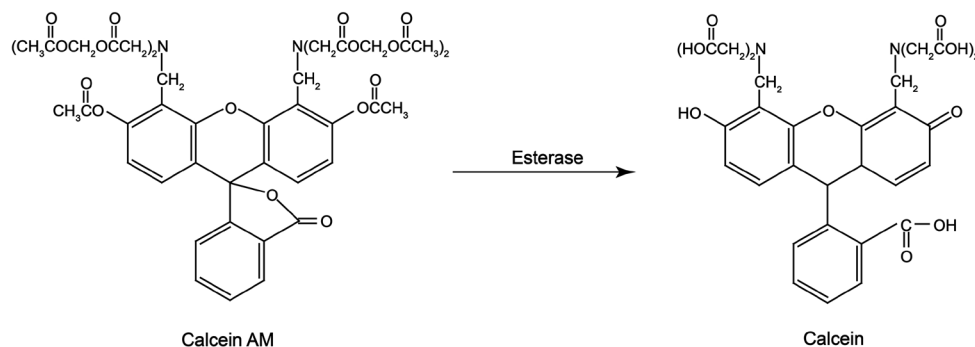


图3. Calcein AM及其水解产物Calcein的分子结构式。

- Calcein AM的水解产物Calcein的最大激发光波长为494nm, 最大发射波长为517nm。Calcein的激发光谱和发射光谱参考图4。

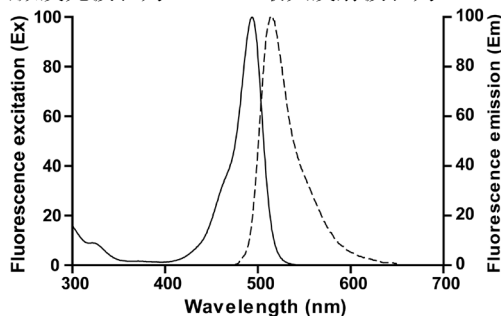


图4. Calcein的激发光谱和发射光谱。

- 本试剂盒提供的Calcein AM为1000X溶液。该1000X的Calcein AM溶液经过优化, 对大多数细胞都适用, 但为得到比较理想的结果, 也可根据细胞类型和实验实际情况对Calcein AM在500-2000稀释倍数之间进行适当调整。本试剂盒同时提供适合Calcein AM染色的检测缓冲液, 该染色液可在一段时间内维持细胞的正常状态, 并给细胞提供一定的营养, 效果比PBS或HBSS更好。
- 碧云天各种细胞增殖和细胞毒性检测试剂盒的比较和选择, 请参考<https://www.beyotime.com/support/cell-proliferation.htm>。
- 对于96孔板, 按1:1000配制Calcein AM检测工作液, 且每孔使用100 μ l Calcein AM检测工作液, 此时本试剂盒C2013S可进行100次检测, C2013M可进行500次检测, C2013L可进行2500次检测。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
C2013S-1	Calcein AM (1000X)	12 μ l
C2013S-2	检测缓冲液	12ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
C2013M-1	Calcein AM (1000X)	55µl
C2013M-2	检测缓冲液	55ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
C2013L-1	Calcein AM (1000X)	260µl
C2013L-2	检测缓冲液	260ml
—	说明书	1份

保存条件:

-20°C保存，一年有效。Calcein AM (1000X)需要避光保存。

注意事项:

- 如果后续使用荧光酶标仪进行荧光定量检测，细胞须接种于黑色多孔板，如BeyoGold™全黑96孔细胞培养板(FCP966)中。
- 荧光染料均存在淬灭问题，请尽量注意避光，以减缓荧光淬灭。
- Calcein AM (1000X)在潮湿环境中容易分解，收到产品后建议适当分装并-20°C密封保存。
- 由于Calcein AM在水溶液中不稳定，Calcein AM检测工作液须现配现用，不能配制后冻存。
- 培养液中的血清和酚红对Calcein AM的染色可能有一定的影响，使荧光背景增强，建议在加入Calcein AM检测工作液前适当洗涤细胞。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，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。

使用说明:

1. Calcein AM检测工作液的配制:

按照96孔板每孔100µl Calcein AM检测工作液的体系，参考下表配制适量的Calcein AM检测工作液，需充分混匀。

	10个样品	100个样品	1000个样品
Calcein AM (1000X)	1µl	10µl	100µl
检测缓冲液	1ml	10ml	100ml
Calcein AM检测工作液	1ml	10ml	100ml

注1: 为得到比较理想的结果，可根据细胞类型和实际情况对Calcein AM (1000X)在500-2000稀释倍数之间进行适当调整。

注2: 配制好的Calcein AM检测工作液必须一次使用完毕，不能冻存。

注3: 也可以用其它合适的缓冲液，如无血清培养液、HBSS (C0218)或PBS (C0221A/C0221D)稀释Calcein AM (1000X)。本试剂盒配套提供的检测缓冲液可在一段时间内维持细胞的正常状态，并给细胞提供一定的营养，效果通常比PBS或HBSS更好。

2. 贴壁细胞的荧光酶标仪检测或荧光显微镜检测:

- 接种培养。**将细胞接种于96孔板等多孔板、细胞培养皿中或者细胞爬片上，按实验设计对细胞进行一定处理。如果用于96孔荧光酶标仪检测，细胞须接种于黑色多孔板，如BeyoGold™全黑96孔细胞培养板(FCP966)中，每孔的细胞数需要控制在100-10000个，通常宜在2000-5000个范围内。
- 洗涤(选做)。**吸除培养液，用PBS洗涤细胞1遍。酚红或血清对于本试剂盒的检测有一定的干扰，吸除培养液和PBS时最好使用真空泵。在能充分吸净残留液体的情况下，可以不使用PBS洗涤。
- 染色。**加入适当体积的Calcein AM检测工作液。通常96孔板每孔加入100µl，24孔板每孔加入250µl，12孔板每孔加入500µl，6孔板每孔加入1ml。37°C避光孵育30min。不同的细胞最佳孵育时间有所不同，以30min作为初始孵育时间，后续可以根据实际染色效果对染色时间进行适当调整和优化，以得到更加理想的染色效果。
- 检测。**孵育结束后，可以直接用荧光酶标仪(激发波长494nm，发射波长517nm，490nm和520nm也可以)检测荧光并计算细胞活性，细胞活性和荧光强度成正比。根据具体的实验目的，也可以在荧光显微镜下观察染色效果。对于贴壁细胞L-929，本产品与PI联合使用的效果参考图2。如有需要，也可进一步进行其它荧光的复染。例如使用Annexin V-PE细胞凋亡检测试剂盒(C1065)或Propidium Iodide/碘化丙啶(ST511)检测细胞凋亡、Mito-Tracker Red CMXRos (C1049)检测线粒体活力、Hoechst 33342活细胞染色液(C1027/C1028/C1029)染色细胞核等。注意整个过程均需避光操作。

3. 悬浮细胞的荧光酶标仪检测或荧光显微镜检测:

- 接种培养。**将细胞接种于96孔板等多孔板、细胞培养皿中，按实验设计对细胞进行一定处理。如果用于96孔荧光酶标仪检测，细胞须接种于黑色多孔板，如BeyoGold™全黑96孔细胞培养板(FCP966)中，每孔的细胞数需要控制在100-10000个，通常宜在2000-5000个范围内。
- 洗涤(选做)。**250-1000×g室温离心5min，吸除上清，用PBS洗涤1-2遍。酚红或血清对于本试剂盒的检测有一定的干扰，吸除培养液和PBS时最好使用真空泵。在能充分吸净残留液体的情况下，可以不使用PBS洗涤。
- 染色。**加入适当体积的Calcein AM检测工作液。通常96孔板每孔加入100µl，24孔板每孔加入250µl，12孔板每孔加入500µl，6孔板每孔加入1ml。37°C避光孵育30min。不同的细胞最佳孵育时间有所不同，以30min作为初始孵育时间，后续可以根据实际染色效果对染色时间进行适当调整和优化，以得到更加理想的染色效果。

d. **检测。**孵育结束后，可以直接用荧光酶标仪(激发波长494nm，发射波长517nm，490nm和520nm也可以)检测荧光并计算细胞活性，细胞活性和荧光强度成正比。根据具体的实验目的，也可以在荧光显微镜下观察染色效果。对于悬浮细胞MOLM13，本产品未经洗涤直接使用荧光酶标仪检测不同细胞数的效果参考图1。

4. 流式细胞仪检测：

- a. **细胞准备。**贴壁细胞胰酶消化后用培养液重悬，并用PBS洗涤一次。悬浮细胞250-1000×g室温离心5min，弃上清，用PBS洗涤一次。每个样品推荐的细胞用量为 10^6 。
- b. **染色。**对于上一步骤的 10^6 个细胞的沉淀，加入1ml Calcein AM检测工作液，重悬为单细胞悬液。37℃光孵育30min。
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检测工作液的缓冲液宜保持一致。
- c. **检测。**孵育完成后，可以直接进行流式细胞仪检测，也可以250-1000×g室温离心5min沉淀细胞，吸净液体后每个样品加入0.5ml缓冲液重悬细胞后用流式细胞仪检测。如有需要，也可进行进一步染色。例如使用Annexin V-PE细胞凋亡检测试剂盒(C1065)或Propidium Iodide/碘化丙啶(ST511)检测细胞凋亡、Mito-Tracker Red CMXRos (C1049)检测线粒体活力、Hoechst 33342活细胞染色液(C1027/C1028/C1029)染色细胞核等。注意整个过程均需避光操作。染色后，将样品置于冰上，尽量在1小时内进行流式细胞仪检测和分析。注意使用仅含检测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。

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
C0218	Hanks' Balanced Salt Solution	500ml
C0221A	PBS	500ml
C0221D	D-PBS	500ml
C1027	Hoechst 33342活细胞染色液(100X)	0.1ml
C1028	Hoechst 33342活细胞染色液(100X)	0.5ml
C1029	Hoechst 33342活细胞染色液(100X)	3ml
C1031	CFDA SE (细胞增殖示踪荧光探针)	5mg
C1033	Actin-Tracker Green (微丝绿色荧光探针)	0.2ml
C1036	DiI (细胞膜红色荧光探针)	10mg
C1038	DiO (细胞膜绿色荧光探针)	10mg
C1041	ER-Tracker Red (内质网红色荧光探针)	20μl
C1043	Golgi-Tracker Red (高尔基体红色荧光探针)	1mg
C1046	Lyso-Tracker Red (溶酶体红色荧光探针)	50μl
C1048	Mito-Tracker Green (线粒体绿色荧光探针)	50μg
C1049-50μg	Mito-Tracker Red CMXRos (线粒体红色荧光探针)	50μg
C1049-250μg	Mito-Tracker Red CMXRos (线粒体红色荧光探针)	50μg×5
C1050	Tubulin-Tracker Red (微管红色荧光探针)	40μl
C1062S/M/L	Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒	20次/50次/100次
C1065S/M/L	Annexin V-PE细胞凋亡检测试剂盒	20次/50次/100次
C2006	线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)	>100次
C2012-0.1ml	Calcein AM (钙黄绿素AM)	2mM×0.1ml
C2012-0.5ml	Calcein AM (钙黄绿素AM)	2mM×0.5ml
C2013S	Calcein AM细胞活性检测试剂盒(CCK-F)	100次
C2013M	Calcein AM细胞活性检测试剂盒(CCK-F)	500次
C2013L	Calcein AM细胞活性检测试剂盒(CCK-F)	2500次
S1006	BCECF AM (pH荧光探针, 5mM)	50微升
ST511/ST512	Propidium Iodide/碘化丙啶	5/20mg
ST1569	碘化丙啶(≥94.0%, Reagent grade)	10/50/250mg

Version 2019.12.26