

Calcein-AM/PI - живые и мёртвые клетки

Артикулы Servicebio: G1707-100T

ПРАКТИЧЕСКОЕ РУКОВОДСТВО / ПОДГОТОВКА И РАБОЧИЕ УСЛОВИЯ

Что подготовить

Подготовьте прибор с зелёным и красным каналами, клетки и расходные материалы для бережного сбора. Продумайте, будете ли вы считать отдельные клетки или измерять суммарную флуоресценцию. Эти результаты имеют разные единицы и не должны автоматически подменять друг друга. Проверьте, не перекрываются ли каналы с другими метками в образце.

ОСНОВНЫЕ УСЛОВИЯ ПО ИНСТРУКЦИИ SERVICEBIO

Для какой задачи

Двухцветная оценка живых и погибших клеток. Calcein-AM даёт зелёную метку живых клеток; PI выявляет клетки с повреждённой мембраной красным сигналом.

Подготовка

Доведите реагенты до комнатной температуры. Для десяти проб производитель предлагает 2 мкл Calcein-AM и 2 мкл PI на 1 мл буфера. Рабочий раствор готовят непосредственно перед применением. Указанные 100 реакций соответствуют системе по 100 мкл.

Основные этапы

После исследуемого воздействия соберите все клетки, включая находящиеся в надосадочной жидкости. Удалите остаточный трипсин двумя-тремя промывками PBS или другим подходящим буфером. Ресуспендируйте в рабочем растворе до 10^5 - 10^6 клеток/мл. Окрашивание проводят 15-30 мин при 37 °C, защищая от света.

Регистрация

Доступны флуоресцентная микроскопия, проточная цитометрия и планшетное измерение. Канал Calcein: возбуждение/эмиссия 494/517 нм; PI: 535/617 нм. Концентрацию зондов и время оптимизируют для конкретных клеток.

Что важно

Calcein-AM чувствителен к влаге; предусмотрено порционное хранение. Избегайте света, вызывающего выцветание сигнала. Хранение набора: -20 °C в темноте, 12 месяцев.

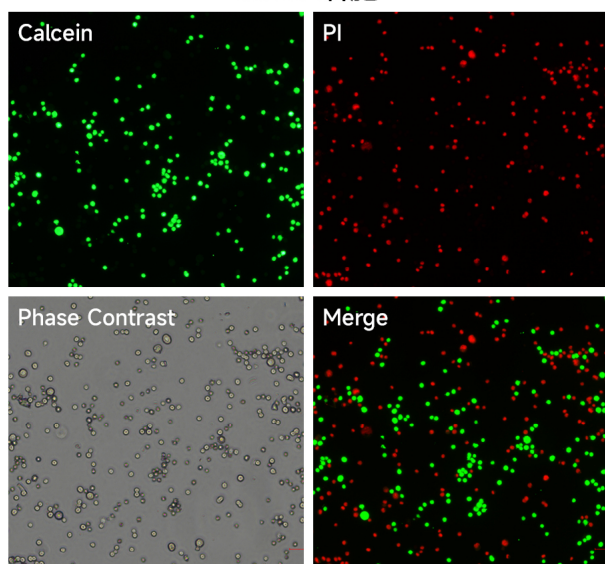
Как спланировать постановку • рекомендации Молекулаб

Предлагаем поставить неокрашенный и однокрасочные контроли, а также пробы с заведомо различающейся жизнеспособностью. Для микроскопии заранее задайте число и способ отбора полей. Если планируется клеточный подсчёт, определите правило обработки двойных и слабых сигналов до сравнения опытных групп. Все клетки из одного поля не являются независимыми экспериментами.

Результат и контроль качества

Пояснения к методу и практические рекомендации Молекулаб

CHO 细胞



Servicebio: клетки CHO. Calcein - зелёный канал, PI - красный; Phase Contrast - фазовый контраст, Merge - совмещение.

Что означает результат

Внутриклеточные эстеразы превращают Calcein-AM во флуоресцентный кальцеин, удерживаемый клетками с сохранной мембраной. PI выявляет нарушение мембранной целостности. Поэтому зелёный и красный сигналы описывают разные свойства клеток. Двойное окрашивание не определяет механизм повреждения и не заменяет специфический анализ апоптоза.

Какие контроли нужны

В проточной цитометрии однокрасочные пробы помогают оценить перекрытие каналов. В микроскопии важны одинаковые настройки съёмки и вычитание фона. Если измеряется суммарная яркость лунки, для её перевода в процент живых клеток требуется отдельная проверка связи сигнала с клеточным составом.

Если результат вызывает вопросы

Красный сигнал высок в контроле	Проверьте исходную жизнеспособность и повреждение при подготовке.
Зелёный фон вне клеток	Проверьте фон раствора и качество подготовки образца.
Сигнал слабеет при повторной съёмке	Сократите освещение и сравнивайте образцы при одинаковой экспозиции.

Что сохранить в лабораторном журнале

Сообщайте метод регистрации, число учтённых клеток или полей и правила классификации. Не используйте формулу «зелёная яркость / сумма яркостей» как универсальный процент жизнеспособности.