

CAMSee

酯化鈣黃綠素螢光細胞活性分析套組使用說明

Calcein AM Cell Viability Assay Instructions

產品介紹

酯化鈣黃綠素(Calcein AM)是一種疏水性化合物，可輕鬆地穿過細胞膜進入活體細胞內，用於細胞活性測定。酯化鈣黃綠素染料不是螢光物質，在進入細胞後，被細胞中的酯酶水解得到鈣黃綠素(如下圖 1.)，該鈣黃綠素具有螢光特性並帶有高極性的羧酸基，無法再穿出細胞膜，而滯留在細胞質中，因此可用於計數活細胞數目。酯化鈣黃綠素細胞活性測定法靈敏可靠，不受溶液中氧化還原物質影響，最快可在 1 小時對活細胞進行染色和定量。酯化鈣黃綠素細胞活性測定法可適應各種螢光設備，例如 96 孔盤測定，螢光顯微鏡和流式細胞儀。該測定法可用於各種懸浮細胞和貼壁細胞之研究，例如細胞生存力、細胞黏附、趨化性(chemotaxis)、多重藥物耐藥性、細胞凋亡和細胞毒性等。

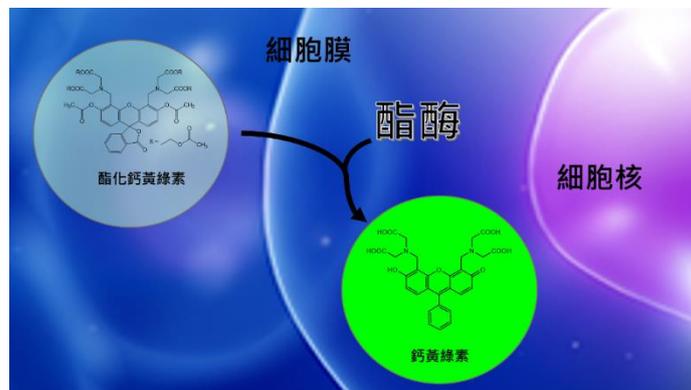


圖 1. 酯化鈣黃綠素(Calcein AM)原理介紹

產品內容(500 tests)

1. 定量酯化鈣黃綠素固體 * 1 (綠色標籤，咖啡色管)
2. DMSO 150 μ l * 1 (藍色標籤，半透明管)

保存與運送方式

產品名稱	運送資訊	包裝開封前保存資訊
CAMSee (貨號：294)	-20 °C 冷凍避光	-20 °C 冷凍避光保存。正確保存狀況下，可存放逾一年。

注意事項：

1. 使用前須將試劑從-20 °C冰箱中取出，在室溫下放置 30 分鐘，以解凍完全。
2. 當酯化鈣黃綠素溶解於 DMSO，配置成保存液，若未立即使用完，必須密封良好，並在避光與-20°C冰箱中保存。若妥善保存，此保存液可存放約數個月到半年。

註記：BASF 非離子型界面活性劑 Pluronic® F-127，可幫助酯化鈣黃綠素溶解。可使用 20% Pluronic® F-127 水溶液，與等體積的保存液混合，配置成新的保存液。但，不建議長時間存放上述保存液。請在需要時，再添加 20% Pluronic® F-127 水溶液，並立即使用完畢。此步驟並非必要，視保

存液溶解於下列步驟之緩衝水溶液的情況，選擇性添加。若您需要 Pluronic® F-127 樣品，請洽本公司技術人員。

3. 如果所研究的細胞中含有有機陰離子轉運蛋白，可將丙磺舒 (probenecid, 1~2.5 mM) 或次磺吡酮 (sulfinpyrozone, 0.1~0.25 mM) 添加到細胞培養緩衝液中，以減少鈣黃綠素從細胞質滲漏。

保存液與工作液配置

1. 將試劑從-20°C冰箱中取出，在室溫下放置 30 分鐘，以解凍完全。
2. **保存液配置**：將 50 µl 的 DMSO(藍色標籤，半透明管)加入到酯化鈣黃綠素固體管(綠色標籤，咖啡色管)中，震盪使固體完全溶解，配置成 1 mM 保存液。
3. **工作液配置**：將保存液進一步以緩衝水溶液稀釋，配置成工作溶液。此時酯化鈣黃綠素濃度為(1~10 µM)，每種細胞的最佳染色濃度略有差異，使用者須自行測試。一般而言，2 µM 濃度適合於 NIH3T3, PtK2, HeLa 與 MDCK...等細胞的染色。此工作溶液必須於 2~4 小時內，立即使用完畢。

使用步驟

懸浮細胞活性測試

1. 將細胞液置於 96 孔黑色培養盤中，每個測試條件至少重複一次。並同時進行無細胞之空白實驗。
注意：根據細胞種類的不同，使用者必須自行繪製細胞濃度檢量線，以決定最佳的細胞濃度。
2. 將所欲進行測試之條件或藥劑，施加或添加於孔中。每個條件至少重複一次。
3. 將 96 孔盤以 500 g 離心 5 分鐘。若無多孔盤離心機，可將細胞液吸出，轉置於微量離心管中，離心後，再轉回 96 孔盤。
4. 將每個孔位吸取上清液，棄置，以 100 µl 緩衝水溶液，洗滌細胞一次。
5. 將 96 孔盤以 500 g 離心 5 分鐘。
6. 將每個孔位吸取上清液，棄置，加入 100 µl 的工作液。
7. 放置上述混合液於細胞培養箱內，培養 30 分鐘至 1 小時(37°C, 5% CO₂)。
注意：對大部分的細胞來說，適合 30 分鐘的培養時間。
8. 利用 fluorescence plate reader，設定激發波長為 485 nm，測量混合液之 530 nm 的螢光強度。

貼壁細胞活性測試

1. 將細胞液置於 96 孔黑色培養盤中，每個測試條件至少重複一次。並同時進行無細胞之空白實驗。將細胞液靜置於細胞培養箱內，培養至隔夜(37°C, 5% CO₂)，使細胞貼附於壁上。
注意：根據細胞種類的不同，使用者必須自行繪製細胞濃度檢量線，以決定最佳接種濃度。
2. 隔天，將所欲進行測試之條件或藥劑，施加或添加於孔中。每個條件至少重複一次。
3. 將每個孔位吸取上清液，棄置，以 100 µl 緩衝水溶液洗滌細胞一次。
4. 將每個孔位吸取上清液，棄置，加入 100 µl 的工作液。
5. 放置上述混合液於細胞培養箱內，培養 30 分鐘至 1 小時(37°C, 5% CO₂)。
注意：對大部分的細胞來說，適合 30 分鐘的培養時間。
6. 利用 fluorescence plate reader，設定激發波長為 485 nm，測量混合液之 530 nm 的螢光強度。

困難排除

問題	可能原因	問題排除方式
螢光強度太低	所使用之酯化鈣黃綠素濃度太低	提高酯化鈣黃綠素的濃度
	96 孔盤與所使用之 fluorescence plate reader 不相容。	請使用黑色 96 孔盤
	使用工作液培養時，細胞變得不健康。	再培養時，可同時使用台盼藍(Trypan blue)，確認細胞的健康情況。
試驗再現性低	孔盤中有氣泡	吸取細胞液時，應小心避免氣泡的產生
	細胞數目取樣不準確	吸取細胞液時，體積未正確定量。或是重新懸浮細胞時，未均勻懸浮。
	清洗細胞時，造成細胞損失	請小心吸取上清液，避免吸取到底層細胞。
高背景值或高螢光強度	工作液已經失效	請重新配置新鮮的工作液
	細胞未清洗、清洗不完全或是移除細胞培養液不完全	增加細胞清洗次數，以完全移除細胞培養液
	細胞濃度太高	降低測試時細胞濃度
	使用工作液染色培養時間過久	降低染色培養時間

*特別感謝國內多所研究機構協助本產品測試並提供相關測試數據。

聚創新材料

IMT FORMOSA New Materials Co., Ltd.

電話 Phone: 0926-159317

電郵 Email: polycreatives@outlook.com

聯絡人 Contact: Peter Hsu

