

V.2023.10.13

博視® Dr. View®

活/死哺乳類細胞螢光雙染色檢測套組使用說明

Live/Dead dual-staining kit for mammalian cells

Product Information

快速使用指引

1. 存放條件：避光與低溫下(<-20 °C)。
2. 激發/放光波長(nm)：活細胞(485/530)、死細胞(530/645)。
3. 使用螢光顯微鏡與螢光 96 孔盤掃描儀時，建議工作溶液染色濃度：
2 µg/mL 的 **GL** / 10 µg/mL 的 **RD** (稀釋 2000 倍)。細胞樣品溶液與染劑操作溶液混合比例：1:1。

一、產品簡介

本哺乳類細胞生存率/細胞毒性檢測套組，提供兩種不同顏色之螢光探針，可同時對活細胞與死細胞，分別進行染色，並利用螢光檢測儀器，例如：螢光顯微鏡(fluorescence microscopes)、螢光多孔盤掃描儀(fluorescence microplate reader)與流式細胞儀(flow cytometers)...等，進行定量。本套組可應用於大部分的真核細胞，包括貼壁細胞與組織，但不適用於細菌與真菌。

二、使用前注意事項

1. 保存方式：請將本產品避光，並保存於低溫下(<-20 °C)。
2. 保存期限：正確保存下，可存放一年以上。
3. 解凍：本產品使用DMSO (dimethyl sulfoxide)作為溶劑，在低溫時，DMSO可能會發生結凍的情況，在使用前，請先將本產品置於室溫下完全解凍(約30分鐘)，稍加搖晃均勻後，以離心機稍微離心，使溶液集中於瓶底後，再使用。
4. 反覆凍融：產品可反覆凍融。但活細胞染劑**GL**容易吸收濕氣而變質，請將產品完全解凍，恢復至室溫後使用。使用完畢立刻鎖緊瓶蓋。產品一但配置成操作溶液，不建議反覆凍融，請在兩小時內使用完畢。

三、套組內容：

1. Dr. View 活細胞染劑保存液(**GL**)，棕色瓶身，綠標籤)：
兩瓶，濃度 4 mg/mL，每瓶 50 µL。
2. Dr. View 死細胞染劑保存液(**RD**)，棕色瓶身，紅標籤)：
兩瓶，濃度 20 mg/mL，每瓶 50 µL。

四、產品使用步驟：

1. 螢光顯微鏡(fluorescence microscopes)：

1.1 濾鏡選擇：

染色後的死活細胞可同時觀察，也可以分別觀察。請參考下表，使用推薦的濾鏡組：

| | Omega 濾鏡組牌號 | Chroma 濾鏡組牌號 |
|-----------|-------------------|---------------------|
| 同時觀測活/死細胞 | XF25, XF26, XF115 | 11001, 41012, 71010 |

V.2023.10.13

| | | |
|--------|--------------------------|-------------------------------|
| 只觀測活細胞 | XF22, XF23 | 31001, 41001 |
| 只觀測死細胞 | XF32, XF43, XF102, XF108 | 31002, 31004, 41002, 41004 |

1.2 準備細胞樣品：

- 貼盤細胞可以在直接在無菌的蓋玻片上培養 2-3 天，直到獲得適當的細胞密度。懸浮細胞可以在 35 mm 的拋棄式塑膠培養皿中培養。兩者均需在染色前，清洗細胞，去除可能懸浮在培養液中的酯酶，避免影響實驗結果。
- 清洗貼盤細胞：可使用細胞培養液等量體積磷酸緩衝鹽溶液(Phosphate-Buffered Saline, PBS)清洗 1-2 次。
- 清洗懸浮細胞：可使用細胞培養液等量體積之 PBS 清洗，清洗後離心，使細胞沉澱，反覆清洗 1-2 次。將細胞以適量之 PBS 再次懸浮後，將 5-10 μL 的懸浮液轉移到蓋玻片上，在室溫下，35 mm 的有蓋培養皿中，等待細胞沉降在蓋玻片玻璃表面。

1.3 操作溶液(10 mL)配置方式(可視需求量等比例調整)：

- 將產品完全解凍，恢復至室溫後，稍加搖晃均勻，並以離心機稍微離心，使溶液集中於瓶底後，再使用。
- 取一裝有 10 ml PBS 的離心管，加入 5 μL 的 **RD**(紅標籤)，震盪混合均勻。
- 於上述溶液中，繼續加入 5 μL 的 **GL**(綠標籤)，震盪混合均勻，即為混合操作溶液 (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 **GL** / 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 **RD**)。此操作溶液應立即(兩小時內)使用完畢。

1.4 用螢光顯微鏡計算細胞生存率：

- 將步驟 **1.3** 之 100-150 μL 操作溶液，滴加到步驟 **1.2** 之蓋玻片，使溶液完全覆蓋蓋玻片上之細胞。在 35 mm 的有蓋培養皿中，室溫下，培養並染色細胞，染色時間約 30-45 分鐘。
- 添加 10 μL 的操作溶液於乾淨的載玻片上。使用尖端有塑膠套的細鑷子，將上述步驟 **1.4a** 染色完畢之蓋玻片，快速翻面，蓋在載玻片上。使用乾淨的擦拭紙吸收多餘的溶液，以密封膠將蓋玻片四周密封，避免水分散失。整個過程應避免蓋玻片滑動或是擠壓蓋玻片，使細胞受損。
- 利用螢光顯微鏡觀察，並計數不同顏色之細胞。死細胞呈現紅色螢光、活細胞呈現綠色螢光。

1.5 問題與解決方式：

- 死細胞配置：
在細胞染色前，可視需要，將細胞分裝成數份後，其中一份用藥劑殺死細胞。例如：以 0.1%皂素 (saponin) 溶液處理 10 分鐘；或是，以 0.1-0.5%毛地黃毒苷 (digitonin) 溶液處理 10 分鐘；或是，70%甲醇溶液處理 30 分鐘。
- 如何決定最佳操作濃度：
細胞染色效果可能依細胞種類與狀態而出現差異，若上述步驟 **1.3** 的操作溶液配置

V.2023.10.13

方式不適用於您的細胞，請嘗試以下列方式，決定最佳操作溶液配置方式(為求操作方便，可在室溫下進行。但為求標準化，操作者以亦可在定溫，如 37°C 下，進行操作。):

(1) 將死細胞染色：請將 **RD**(紅標籤)以 PBS 稀釋，在濃度為 10-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的區間內(稀釋倍率 2000-200 倍)，嘗試染色死細胞，以**最低濃度(最大稀釋比例)**為原則，將死細胞之細胞核以 **RD**稀釋液染色，染色時間約 30-45 分鐘，使死細胞在螢光顯微鏡下，**可**呈現明顯之紅色螢光。接著，將 **GL**(綠標籤)以 PBS 稀釋，在濃度為 2-20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的區間內(稀釋倍率 2000-200 倍)，將死細胞以活細胞染劑 **GL**染色，以**最高濃度(最小稀釋比例)**為原則，使死細胞之細胞質在螢光顯微鏡下，**不會**出現明顯之綠色螢光。

(2) 將活細胞染色：使用上述步驟之**最高濃度(最小稀釋比例)**之 **GL**稀釋液，染色活細胞，使活細胞之細胞質在螢光顯微鏡下出現明顯綠色螢光。若沒有明顯螢光，可嘗試將 **GL**活細胞染劑之濃度提高，但須注意此濃度下，死細胞**不會**出現明顯之綠色螢光。

2. 螢光 96 孔盤掃描儀(fluorescence microplate reader)：

2.1 激發光源與螢光放光波長選擇：

- a. **RD**死細胞染劑：
激發光源波長， $530 \pm 10 \text{ nm}$ ；螢光放光波長， $645 \pm 20 \text{ nm}$ 。
- b. **GL**活細胞染劑：
激發光源波長， $485 \pm 10 \text{ nm}$ ；螢光放光波長， $530 \pm 10 \text{ nm}$ 。

2.2 準備細胞樣品：

貼壁細胞或是懸浮細胞可以在 96 孔盤中培養 2-3 天，直到獲得適當的細胞密度(一般來說，儀器的最低偵測極限為每孔 200-500 個細胞，最高偵測極限，約為每孔 10^6 個細胞)。兩種細胞均需在染色前，清洗細胞，去除可能懸浮在培養液中的蛋白質，避免影響實驗結果。

- a. 貼盤細胞清洗：直接在 96 孔盤中加入 100 μL 的 PBS，抽吸數次後，再吸出溶液棄置，反覆清洗 1-2 次。
- b. 懸浮細胞清洗：離心使細胞沉澱在 96 孔盤底部，再加入 100 μL 的 PBS，使之懸浮。重複上述清洗步驟 1-2 次。
- c. 最後在每孔加入 100 μL 的 PBS。
- d. 死細胞配置：
在細胞染色前，需配置一組死細胞對照組，用以計算死活細胞百分比。可用藥劑殺死細胞，請參考步驟 **1.5a**。

2.3 實驗組混合操作液(9 mL)與對比組單一染劑溶液(1 mL)配置方式：(可視需求量等比例調整容量)：

- a. 將產品完全解凍，恢復至室溫後，稍加搖晃均勻，以離心機稍微離心，使溶液集中於瓶底後，再使用。
- b. 取一裝有 5 mL PBS 的離心管，加入 5 μL 的 **RD**(紅標籤)，震盪混合均勻，配置濃度為 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 **RD**。

V.2023.10.13

- c. 另取一裝有 5 mL PBS 離心管，加入 5 μL 的 **GL**(綠標籤)，震盪混合均勻，配置濃度為 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 **GL**。
- d. 將步驟 **2.3b** 與 **2.3c** 的溶液，各取出 0.5 mL，分裝於含 0.5 mL PBS 的離心管中，使各別總體積為 1.0 mL。分別為標示 **<RD 操作液>**(濃度為 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 與 **<GL 操作液>**(濃度為 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。
- e. 將上述 **2.3b** 與 **2.3c** 的剩餘溶液混合，標示為 **<混合操作液>**(濃度為 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ **GL** / 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ **RD**)。

附註：使用者可參考步驟 **1.5b**，自行決定最佳操作濃度。

2.4 用螢光 96 孔盤掃描儀同時檢測死細胞與活細胞 (孔位安排可視實驗者習慣調整)：

- a. 配置實驗組細胞樣品(A 與 B 排)：

在 96 孔盤中之 A 與 B 排，每孔中含有 100 μL 的細胞液，再加入上述步驟 **2.3e** 之 **<混合操作液>** 100 μL 。在室溫下染色 30-45 分鐘。

A 排檢測 645 nm 螢光放光強度(A_{645})；

B 排檢測 530 nm 螢光放光強度(B_{530})
- b. 配置對比組細胞樣品(死細胞 C 排與 D 排；活細胞 E 排與 F 排)：
 - (1) 在 96 孔盤中之 C 排，每孔加入相同濃度之死細胞 100 μL ，再加入 100 μL 步驟 **2.3d** 的 **<RD 操作液>**。在室溫下染色 30-45 分鐘。C 排檢測 645 nm 螢光放光強度(C_{645})。
 - (2) 在 96 孔盤中之 D 排，每孔加入相同濃度之死細胞 100 μL ，再加入 100 μL 步驟 **2.3d** 的 **<GL 操作液>**。在室溫下染色 30-45 分鐘。D 排檢測 645 nm 螢光放光強度(D_{645})。
 - (3) 在 96 孔盤中之 E 排，每孔加入相同濃度之活細胞 100 μL ，再加入 100 μL 步驟 **2.3d** 的 **<RD 操作液>**。在室溫下染色 30-45 分鐘。E 排檢測 530 nm 螢光放光強度(E_{530})。
 - (4) 在 96 孔盤中之 F 排，每孔加入相同濃度之活細胞 100 μL ，再加入 100 μL 步驟 **2.3d** 的 **<GL 操作液>**。在室溫下染色 30~45 分鐘。F 排檢測 530 nm 螢光放光強度(F_{530})。
- c. 配置無細胞之空白實驗(G 與 H 排)：

可將無細胞，有/無染劑；或是含殺死細胞之藥劑；或是實驗中含其他添加物之空白試驗安排至 G 與 H 排，分別測量 645 與 530 nm 處之螢光強度 G_{645}^0 與 H_{530}^0 。

2.5 計算細胞死活相對百分比(%)：

死細胞以 **RD** 染色後，螢光放光強度主要坐落在波長大於 600 nm 的區域，530 nm 幾乎沒有螢光放光。相反的，活細胞以 **GL** 染色後，放光主要在 530 nm。所有的螢光放光強度數值，在做計算前，都必須減去背景值(G_{645}^0 與(H_{530}^0))，以得到較正確的結果。因此，細胞死活比例可表示成相對百分比，底下為計算的方式：

- a. 死細胞百分比(%)：

$$\text{死細胞百分比(\%)} = \frac{A_{645} - D_{645}}{C_{645} - D_{645}} \times 100\%$$

- b. 活細胞百分比(%)：

$$\text{活細胞百分比(\%)} = \frac{B_{530} - E_{530}}{F_{530} - E_{530}} \times 100\%$$

2.6 計算死活細胞絕對數目：

藉由藥劑殺死所有細胞，並以 **RD** 充分染色，檢測 645 nm 的螢光放光強度，此放光強度正比於死細胞數目，藉以計算求得細胞總數。此試驗可在進行完上述步驟 **2.4-2.5**，計算出死活細胞百分比後，接續進行，殺死細胞以求得樣品中死細胞總數，反推未殺死前，死活細胞絕對數目：

- 進行步驟 **2.4-2.5**，求得死活細胞相對百分比。
- 添加 2-5 μL 的 5% 皂素溶液(或是步驟 **1.5a** 之藥劑)，到每一孔中。
- 稍微搖晃一下孔盤，使皂素溶液混合均勻。等待 10 分鐘，使 645 nm 的螢光放光強度飽和，不再變化。
- 測量 645 nm 的螢光放光強度。此強度正比於已知死細胞濃度的檢量線。藉以求得死細胞在樣品中的絕對數目。並利用步驟 **2.5** 的結果，可獲得未加皂素(或是步驟 **1.5a** 之藥劑)前，樣品中死活細胞的絕對數目。

2.7 問題與解決方式：

- 根據細胞的種類與狀態，每次染劑的最佳稀釋比例可能不同。一般來說，以能得到可觀測訊號的同時，染劑的稀釋比例越高越好。可依循下列步驟，來決定最佳染劑稀釋比例：
 - 產品解凍：將產品完全恢復至室溫後，稍加搖晃均勻，以離心機稍微離心，使溶液集中於瓶底後再使用。設定螢光多孔盤掃描儀之激發光源波長與螢光放光波長。
 - 決定最佳稀釋比例與最佳染色時間（一般為求操作方便，可在室溫下進行。為求標準化，操作者以亦可在定溫，如 37°C 下，進行操作。）：
 - 將死細胞染色:殺死細胞的方式，請參考步驟 **1.5a**。請將 **RD**(紅標籤)以 PBS 稀釋，在濃度為 10-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的區間內(稀釋倍率 2000-200 倍)，嘗試染色死細胞，以**最低濃度(最大稀釋比例)**為原則，將死細胞之細胞核以 **RD** 稀釋液染色，使死細胞在螢光掃描儀的檢測範圍內，有明顯可識別的紅色螢光訊號。染色時間每隔 10-15 分鐘，測量一次螢光訊號。**一般來說，若死細胞濃度每孔有 120,000 個，使用 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ **RD** (2000 倍稀釋倍率)，在 45 分鐘染色後，螢光訊號達到飽和。**接著，將 **GL**(綠標籤)以 PBS 稀釋，在稀釋比例 2000-200 倍的範圍內，將死細胞以活細胞染劑 **GL** 染色，以**最高濃度(最小稀釋比例)**為原則，使死細胞在螢光掃描儀中，**不會出現明顯之綠色螢光訊號。**
 - 將活細胞染色：使用上述步驟之最高濃度(最小稀釋比例)之 **GL** 稀釋液，染色最低細胞濃度之活細胞，使活細胞在螢光掃描儀中出現明顯綠色螢光訊號。若沒有明顯螢光，可嘗試將 **GL** 濃度提高，或是，提高活細胞濃度。

3. 流式細胞儀(flow cytometers)：

3.1 解凍：將所需藥品、溶液恢復至室溫。

3.2 配置 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ **GL** (80 倍稀釋)操作液：

將 2 μL 的 **GL** 產品(綠色標籤)加入到 158 μL 的 DMSO 中，稍微搖晃，使混合均勻。

V.2023.10.13

此操作液必須在一天內使用完畢。

3.3 配置 1 mL 細胞懸浮液：

將細胞懸浮於培養液或是緩衝液中，每個樣品細胞濃度控制在 $0.1-5 \times 10^6$ 隻/mL 的範圍內。

3.4 細胞染色：

將步驟 3.2 之 **GL** 80 倍稀釋操作液 2 μ L，與 **RD** 產品(紅色標籤)1 μ L，加入步驟 3.3 的 1 ml 細胞懸浮液中，稍微搖晃，使混合均勻。在室溫避光下，培養 15-30 分鐘。

3.5 以流式細胞儀進行分析：

細胞染色後應立即進行分析(不可超過 2 小時)。以波長 488 nm 的光源激發，分別測量 **GL** 的 530 ± 30 nm 帶通(bandpass)的綠色螢光；與 **RD** 的 645 ± 20 nm 帶通(bandpass)的紅色螢光。利用閘門排除非細胞不純物。使用單色染色細胞，執行標準補償程序，細胞群落應呈現兩個群落：活細胞將出現綠色螢光，死細胞將出現紅色螢光。

五、困難排除

5.1 染劑變質：

活細胞染劑(**GL**，棕色瓶身，綠標籤)正常存放條件下，不會發生變質現象，或是僅發出微弱綠色螢光。若發生變質，會產生強烈螢光，可能會影響背景值，造成靈敏度下降。可在去除染劑溶液後，嘗試以 PBS 或是其他培養液清洗細胞，以降低背景值。若問題仍然無法解決，請聯絡本公司技術人員。

5.2 其他問題，請聯絡本公司技術人員。

*感謝林口長庚醫院選用本產品。

*感謝清華大學醫工所、生科院選用本產品。

*感謝成功大學醫學院選用本產品。

*感謝中山大學選用本產品。

*感謝高雄醫學大學附設中和紀念醫院選用本產品。

*感謝高雄醫學大學醫藥暨應用化學系、骨科學研究中心選用本產品。

聚創新材料股份有限公司

IMT FORMOSA New Materials Co., Ltd.

電話 Phone: 0926-159317

電郵 Email: polycreatives@outlook.com

聯絡人 Contact: Peter Hsu

