

Cell-Life Dye 可固定的细胞活性染料试剂盒

说明书

产品信息

产品货号	产品名称	Laser Line (nm)	Abs/Em Maxima (nm)
QH-66-6001	Cell-Life Dye 330/410	355/375	310/410
QH-66-6002	Cell-Life Dye 350/450	355/375	350/450
QH-66-6003	Cell-Life Dye 405/450	405	405/450
QH-66-6004	Cell-Life Dye 405/540	405	405/540
QH-66-6005	Cell-Life Dye 488/520	488	488/520
QH-66-6006	Cell-Life Dye 510/550	488/532	510/550
QH-66-6007	Cell-Life Dye 568/583	488/532/561	568/583
QH-66-6008	Cell-Life Dye 375/600	355/375/405	375/600
QH-66-6009	Cell-Life Dye 594/614	488/532/561	594/614
QH-66-6010	Cell-Life Dye 642/662	633-640	642/662
QH-66-6011	Cell-Life Dye 665/685	633-640/785	665/685
QH-66-6012	Cell-Life Dye 633/740	633-640	633/740
QH-66-6013	Cell-Life Dye 633/780	633-640	633/780
QH-66-6014	Cell-Life Dye 787/808	785/808	787/808

储存与处理

- **固体染料和无水 DMSO:** 请在 **-20°C、干燥且避光** 条件下储存。
- **固体染料有效期:** 按照上述条件储存时, 固体染料自收货之日起至少稳定 **1 年**。
- **储备溶液:** 可在 DMSO 中配制储备溶液。溶液可分装, 并在 **-20°C、干燥剂保护下、避光** 储存至少 **1 年**。

产品描述

Cell-Life Dye 可固定的活性染色试剂盒设计用于在流式细胞术或显微镜检查中区分活细胞和死细胞。

- **应用价值：**在通过流式细胞术分析细胞表面蛋白表达时，包含活/死染色探针非常有用。它们可以排除那些因质膜通透性增加而导致胞内荧光信号的死细胞，从而确保分析结果仅反映活细胞的信号。
- **作用原理：**Cell-Life Dye 可固定的活性染料是无法穿透活细胞膜的胺反应性染料。这些染料能够进入膜结构受损的死细胞，并与胞内蛋白质上的游离氨基发生共价结合。
- **稳定性优势：**这种染料标记极其稳定。即使细胞后续经过固定和透化处理，也不会导致荧光信号丢失或染料在细胞间发生转移。
- **优化设计：**Cell-Life Dye 染色方案经过优化，旨在最大化活/死细胞的区分效果，同时最大限度地减少对活细胞的染色，从而避免干扰后续的免疫染色实验。

流式细胞术活/死细胞区分染色方案

本染色方案使用人源 Jurkat 淋巴细胞系进行。对于其他细胞类型，可能需要另行优化。

操作步骤：

1. **细胞培养与准备：**根据实验要求进行细胞培养。对于贴壁细胞，请使用胰蛋白酶或细胞解离试剂将其从培养皿上解离下来，计数细胞。建议每次染色反应至少使用 1×10^6 个细胞。
2. **（可选）制备阳性（死亡）对照细胞：**如果需要阳性对照（死亡）细胞，将细胞在 56°C 孵育 45 分钟，然后冷却至室温，再进行后续步骤。
3. **离心收集细胞：**将所需数量的细胞在 350 g 下离心 5 分钟，轻轻倾倒弃去上清液。
***注意：**在后续所有步骤中，每次孵育或洗涤后均需通过离心沉淀细胞。
4. **洗涤并重悬细胞：**用 PBS 洗涤细胞一次，然后用 PBS 重悬细胞至浓度为 1×10^6 个细胞/mL。
***注意：**此步骤请勿使用含有 BSA 或血清的 FACS 洗涤缓冲液来洗涤或重悬细胞，因为 FACS 洗涤缓冲液中的蛋白质可能会干扰后续的活细胞荧光染料（Cell-Life Dye）染色。
5. **分装细胞：**将细胞分装到流式管中，每管 1 mL（含 1×10^6 个细胞）。

6. **加入染料：** 向每毫升细胞悬液中加入 1 μ L 可固定死细胞荧光染料（Fixable Dead Cell Dye），并立即充分混匀。

7. **孵育染色：** 在室温或冰上避光孵育 30 分钟。

8. **洗涤细胞：** 用 1 mL PBS 洗涤细胞一次。

***注意：** 如需进行表面抗原染色，请进行步骤 9。如需固定并进行胞内染色，请跳至步骤 10。否则，请跳至步骤 13。

9. **表面抗原染色：**

- a. 向 PBS 中的细胞加入适量的特异性一抗。
- b. 在冰上避光孵育 15 分钟。
- c. 用 1 mL PBS 洗涤细胞两次。
- d. 如有必要，使用适量的二抗重复步骤 a-c。
- e. 如需固定，请进行步骤 10；否则，请跳至步骤 13。

10. **固定细胞：** 使用固定缓冲液、2-4% 甲醛或您首选的固定试剂，在室温下固定细胞 20 分钟。

***注意：** 对于胞内染色，其他固定方法可能对特定抗体更优。由于活细胞荧光染料（Cell-Life Dye）染色是共价结合的，因此与常用的固定方法兼容。

11. **洗涤细胞：** 用 1 mL FACS 缓冲液（PBS + 1% 血清，或类似缓冲液）洗涤细胞两次。如需进行胞内染色，请进行步骤 12；否则，请跳至步骤 13。

12. **胞内染色：**

- a. 用 100 μ L 破膜缓冲液、PBS + 0.1% Triton X-100 或您首选的破膜缓冲液重悬细胞。
- b. 向破膜缓冲液中的细胞加入适量的特异性一抗。
- c. 在室温下避光孵育 30 分钟。
- d. 用 1 mL FACS 缓冲液洗涤两次。
- e. 如有必要，向洗涤缓冲液中的细胞加入适量的二抗，并重复步骤 c-d。

13. **重悬与分析：** 用 1 mL PBS 或 FACS 缓冲液（见步骤 11）重悬细胞，并在流式细胞仪相应的通道中进行分析（参见表 1）。

***注意：** 染色并固定后的细胞可在 4°C 避光条件下保存数天后再进行分析。

显微镜活/死细胞区分染色方案

本染色方案使用贴壁的人源 HeLa 细胞系进行。对于其他细胞类型，可能需要另行优化。

操作步骤：

- 1. 细胞培养：** 根据实验要求进行细胞培养。对于贴壁细胞，染色可在腔室载玻片 (chamber slide)、多孔板或盖玻片上进行。
- 2. (可选) 制备含活/死细胞的阳性对照孔：** 如果需要包含活细胞和死细胞混合物的阳性对照孔，请向该孔中加入乙醇至终浓度为 15%，孵育 10 分钟，然后用 PBS 洗涤一次。换上 PBS 或生长培养基，再进行后续步骤。

- 3. 加入死细胞染料：**

方法一： 用 PBS 洗涤细胞，然后换上含有 1:1000 稀释比例的可固定死细胞荧光染料 (Fixable Dead Cell Dye) 的 PBS。

方法二： 或者，也可以将染料直接加入细胞培养基中。

***注意：** 为避免细胞瞬时暴露于局部高浓度染料，我们建议先将染料母液用少量培养基稀释，再加入细胞中。例如：使用前立即将 1 μL 染料加入 100 μL 培养基中混匀，再将此混合液全部加入到含有 1 mL 培养基的细胞中。

- 4. 孵育染色：** 在室温或冰上避光孵育细胞 30 分钟。
- 5. 洗涤细胞：** 用 PBS 洗涤细胞一次。
***注意：** 如需固定和破膜进行免疫荧光染色，请进行步骤 6。如需进行活细胞成像，请跳至步骤 11。
- 6. 固定细胞：** 用 4% 多聚甲醛在室温下避光固定细胞 15 分钟。
- 7. 洗涤细胞：** 用 PBS 洗涤细胞两次。
- 8. 破膜处理：** 用 0.1-0.5% Triton X-100 破膜处理细胞 5-10 分钟。
- 9. 进行目的染色：** 继续进行您选择的免疫染色和/或细胞染色。细胞也可用适当的 DNA 染料 (如 DAPI、Hoechst) 进行染色。
- 10. 最终洗涤：** 再用 PBS 洗涤细胞一次。
- 11. 显微镜观察：**

细胞可在腔室载玻片或培养皿中立即成像，固定的细胞如需保存，可使用抗淬灭封片剂进行封片。