



Calcein-AM/PI 活死染色实验报告

一、实验器材及试剂

1、实验器材

名称	厂家	型号
立式冷藏柜	海尔	SC-332
台式高速冷冻离心机	湖南恒诺仪器设备有限公司	2-16R
超净工作台	苏净安泰	SW-CJ-1FD
CO2 细胞培养箱	Thermo	4131
倒置荧光显微镜	徕卡	DMi8

2、主要实验试剂及耗材

耗材	厂家	货号
1.5 ml 离心管	安徽科兔生物科技有限公司	KTL-15-W
2 ml 研磨管	安徽科兔生物科技有限公司	KTL-20-W
10 μ l 移液器	安徽科兔生物科技有限公司	KTY-10
100 μ l 移液器	安徽科兔生物科技有限公司	KTY-100
200 μ l 移液器	安徽科兔生物科技有限公司	KTY-200
1000 μ l 移液器	安徽科兔生物科技有限公司	KTY-1000
5000 μ l 移液器	安徽科兔生物科技有限公司	KTY-5000
T25	安徽科兔生物科技有限公司	KTP-25-T
12 孔板	安徽科兔生物科技有限公司	KTB-12
胰酶	安徽科兔生物科技有限公司	RG-CE-18
PBS 缓冲液	安徽科兔生物科技有限公司	RG-RT-01
DMEM 培养基	安徽科兔生物科技有限公司	RG-CE-2
血清	安徽科兔生物科技有限公司	CG-SR-02
Calcein-AM/PI 染色工作液	安徽科兔生物科技有限公司	RG-HX-01

二、实验步骤



- 1、细胞准备：**选择状态良好的细胞进行实验。根据实验目的设置不同处理组，如对照组、模型组、药物处理组、基因干预组或联合处理组等。实验前观察细胞状态，确认细胞无明显污染、无大量漂浮死亡细胞。若为贴壁细胞，可直接在培养板、爬片或共聚焦皿中进行染色；若为悬浮细胞，可收集细胞后离心、重悬后染色。
- 2、处理细胞：**按照实验设计对细胞进行药物、刺激因子、缺氧、氧化应激、转染或其他处理。处理结束后，准备进行活死染色检测。如需设置阳性对照，可使用较强细胞毒性处理诱导细胞死亡，用于验证染色体系是否有效。
- 3、配制染色工作液：**根据试剂盒说明书，用无血清培养基、PBS 或指定缓冲液配制 Calcein-AM/PI 染色工作液。一般情况下：Calcein-AM 用于标记活细胞；PI 用于标记死亡或细胞膜完整性受损的细胞。染色液应现配现用，并尽量避光操作。
- 4、清洗细胞：**弃去细胞培养基，用 PBS 轻轻清洗细胞 1-2 次，去除血清、死亡细胞碎片及残留药物。对于贴壁细胞，清洗动作应轻柔，避免细胞脱落。对于悬浮细胞，可低速离心后弃上清，再用 PBS 重悬清洗。
- 5、加入染色液：**向每孔或每个样本中加入适量活死染色工作液，使细胞充分覆盖或重悬。贴壁细胞可直接加入染色液覆盖细胞层；悬浮细胞需充分混匀，使染料与细胞均匀接触。
- 6、孵育染色：**将细胞置于 37 °C、避光条件下孵育，一般染色 15-30 min。具体孵育时间应根据试剂盒说明书和细胞类型进行调整。染色过程中应避免强光照射，以减少荧光淬灭。
- 7、染色后清洗：**孵育结束后，可用 PBS 轻轻清洗 1-2 次，去除多余染料。若试剂盒说明书建议不清洗，也可直接进行观察。
- 8、显微镜观察与拍：**使用荧光显微镜或共聚焦显微镜进行观察和拍照。

三、结果判读：

- 1、正常活细胞结果：**若细胞主要呈绿色荧光，红色荧光细胞较少，说明大部分细胞处于存活状态，细胞膜完整性较好。

四、注意事项：

- 1、染色液应现配现用：**Calcein-AM 和 PI 对光和保存条件较敏感，染色工作液应按说明书现配现用，避免长时间放置或反复冻融。
- 2、全程注意避光：**荧光染料容易发生光漂白，配液、孵育和拍照过程中应尽量避光操作，减少荧光信号衰减。