

小萤问号之钙黄绿素常见问题详解

百萤生物

1. 钙黄绿素产品的用途是什么？

答：钙黄绿素是用来标记和监测活细胞的细胞功能的一类荧光探针/试剂盒。它只针对活细胞进行染色，不能染已固定的细胞。

注：染色时间不可太久，保持在一天内，一天后，荧光会变得不明显。

2. 钙黄绿素中带 AM 与不带 AM 的探针有什么区别？它们的优点是什么？

答：不带 AM 的探针可以直接注射进入细胞，而带 AM 的探针，因为 AM 具有细胞膜渗透性，一旦进入细胞，被细胞内酯酶水解为钙黄绿素 (Calcein)，产生强烈的绿色荧光 (Ex/Em= 490nm/515nm)。因不具细胞膜渗透性，从而能被保留在细胞内。Calcein Red 和 Calcein Deep Red 两种类似物，使其能够替代 Calcein AM 用在活细胞的标记和功能分析的多重标记研究。AM 酯是非极性酯，其易于穿过活细胞膜，并且通过活细胞内的细胞酯酶快速水解。AM 酯广泛用于非侵入性地将各种极性荧光探针加载到活细胞中。但是，使用 AM 酯时必须小心，因为它们易于水解，特别是在溶液中。它们应在使用前重新配制成高质量的无水二甲基亚砷 (DMSO)。DMSO 储备溶液可以在 -20℃ 下干燥储存并避光。在这些条件下，AM 酯可以稳定数月。

3. 钙黄绿素的染色过程需要注意哪些问题？

答：细胞离心，去培养基，清洗细胞 1~2 次，以充分去除残留的培养基，稀释成工作浓度为 2-5 μM (PBS 或 HBSS-HEPES) 有时可添加一定量的非离子表面活性剂如 Pluronic F127 到 Calcein Red TM 储存液内来增强其水溶性 37℃ 孵育 20min~1h 用 PBS (或者其他缓冲液) 洗涤细胞两次去除多余染料。

- 注：1. 细胞活力理想的浓度范围应在 4-5 μM
2. 如果细胞中含有有机阴离子转运蛋白，可以在细胞培养基中加入丙磺舒（1-2.5 mM）或磺吡酮（0.1-0.25 mM），以减少脱酯化。
3. 因为背景高的原因，需要多清洗细胞几次去除多余染料。

4. 钙黄绿素适用于哪些仪器？

答：荧光显微镜、流式细胞仪

注：使用流式细胞仪时需要立即分析细胞样品，以确定在零时间没有洗涤的每个细胞的平均荧光。

5. 钙黄绿素与其他活细胞染料相比有何优势？

答：钙黄绿素与其他同类产品（如 CFDA、CFSE 等）相比是特别适合染活细胞的荧光探针，因为它的毒性特别低。并且它不会抑制细胞的各种功能，如增殖、趋化性等。

注：钙黄绿素和碘化丙啶（PI）常用于鉴别死活细胞。钙黄绿素的亲脂性很高，可以通过细胞膜，脱去 AM 后发生强烈绿色荧光；而碘化丙啶（PI）不能通过活细胞的细胞膜，它仅可以穿过死细胞膜，嵌入其 DNA 螺旋产生红色荧光。由于钙黄绿素与碘化丙啶在 490nm 处均可被激发，545nm 激发仅可观察死细胞。因此，他们被用于活细胞和死细胞双重染色。

6. 钙黄绿素在作为显色剂时如何很好的溶解？

答：钙黄绿素在在 1mol/L 的氢氧化钠溶液中，溶解度能达到 50mg，并且超声助溶不会破坏其结构。