

CFDA SE Cell Proliferation and Cell Tracking Kit

细胞增殖与示踪检测试剂盒

产品简介

CFDA SE 细胞增殖与示踪检测试剂盒 (CFDA SE Cell Proliferation and Cell Tracking Kit) 是一款基于荧光探针 CFDA, SE, 用于细胞增殖检测和细胞荧光示踪的检测试剂盒。此方法目前广泛替代 MTT 法或者 3H-胸腺嘧啶核苷掺入法 (3H-thymidine incorporation) 等细胞增殖检测方法。本试剂盒包含粉末形式的 CFDA, SE 探针, 细胞培养级的溶剂, 以及细胞标记液, 使用方便, 操作简单。按照每个样本的标记体积为 1ml 来算, 我司提供两种规格的试剂盒, 分别可检测 500 个和 1000 个样品。

CFDA, SE, 英文全名 5(6)-Carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl ester, CAS NO. 150347-59-4, 是一种稳定的、细胞膜渗透性的非荧光染料, 由两个醋酸基团和一个琥珀酰亚胺酯 (SE) 官能团组成的一个荧光分子。一旦主动扩散进入细胞, 其醋酸基团被胞内酯酶切割, 生成荧光素酯 CFSE。CFSE 具有高度荧光, 且能通过其琥珀酰亚胺酯基团共价结合到细胞内的蛋白氨基基团。正是这个共价偶联反应, CFSE 能够极其长期的保留在细胞内, 长达数月。另外, 归因于这一稳定连接, 一旦染料进入细胞, 不会转移到邻近细胞。无活力细胞仍然是非荧光。而活细胞一旦分化, CFSE 能够很均匀的分散到子细胞中, 每分裂一次子代细胞约能得到亲本细胞 1/2 的荧光强度, 因此, 通过流式细胞仪对荧光强度的检测, 能够依次分选出未分裂细胞, 分裂一次的细胞 (1/2 荧光强度), 分裂两次的细胞 (1/4 荧光强度), 分裂三次的细胞 (1/8 荧光强度), 以及以此类推其他分裂次数的细胞。CFSE 可以检测分裂多达 8 次或更多次数的细胞增殖。

CFSE 广泛用于细胞增殖和体内细胞示踪研究。CFSE 的最大激发和发射波长分别为 492nm 和 517nm, 标记细胞后呈绿色荧光。使用流式细胞仪检测可用 FL1 检测通道。也能用荧光显微镜观察, 使用 FITC 滤片。

产品组成

产品编号	组分名称	保存方法	产品编号/规格	
			FS1159-500T	FS1159-1000T
FS1159-A	CFDA SE 粉末	-20°C 避光保存	1 管	1 管×2
FS1159-B	CFDA SE 溶剂	-20°C 避光保存	1ml	1ml×2
FS1159-C	细胞标记液 (10X)	-20°C~4°C 保存	50ml×2	50ml×4

使用方法

1. CFDA SE 储存液 (1000X) 制备

a) 将低温保存的 CFDA SE 粉末置于室温回温至少 20min, 之后短暂低速离心, 让所有粉末都掉落至管底。同时也提前将 CFDA SE 溶剂置于室温或 25°C 水浴片刻直至充分融解。

b) 吸取一定量 CFDA SE 溶剂 (比如 400μl) 到 CFDA SE 粉末中, 充分溶解, 短暂低速离心, 之后全部转移到剩下的 CFDA SE 溶剂中, 混匀后, 此即为 CFDA SE 储存液 (1000X)。

此配制过程需要避光。

c) 按照单次用量分装，用铝箔纸包好后，置于 $\leq -20^{\circ}\text{C}$ 避光干燥保存，最好一个月内用完，最长不超过三个月。 -70°C 保存能适当延长保存周期。

2. CFDA SE 标记液 (1X) 制备

准备适量无菌的细胞培养级去离子水，根据实验需要用量，配制适量的 CFDA SE 标记液 (1X)。比如，取 10ml 细胞标记液 (10X)，加入 90ml 去离子水，充分混匀后，即得到 CFDA SE 标记液 (1X)，短期置于 4°C 保存，长期不用可置于 -20°C 保存。

3. 染色步骤

a) 室温 $300\times\text{g}$ 离心细胞 5min，吸掉上清。

b) PBS 或其他生理缓冲液清洗细胞以去除任何残留的血清蛋白。之后再同上离心吸掉上清。

c) 用 1ml CFDA SE 标记液 (1X) 重悬细胞，调整密度为 $1-5 \times 10^6 \text{cells/mL}$ ，转移到 15ml 离心管内。

d) 用 CFDA SE 标记液 (1X) 将 CFDA SE 储存液 (1000X) 稀释到 2X。比如，取 2 μl CFDA SE 储存液 (1000X) 到 1ml CFDA SE 标记液 (1X)，混匀后即为 CFDA SE 储存液 (2X)。

e) 将 1ml CFDA SE 储存液 (2X) 加入到步骤 c) 中含 1ml 待标记细胞的 15ml 离心管内，轻轻混匀。

f) 37°C 避光孵育 15min。【具体的孵育时间可根据实际情况做适当调整，常用孵育时间 10-30min。】

g) 立即加入 10ml 完全细胞培养液 (含血清) 来淬灭染色过程，室温颠倒几次混匀。

h) 室温离心去上清，再用 5-10ml 完全细胞培养液清洗一次。

i) 再加入 5-10ml 完全细胞培养液， 37°C 孵育 5min，以促进 CFDA, SE 在细胞内的充分反应和未反应的 CFDA, SE 重新回到完全细胞培养液中。离心去上清，完成最后一次清洗。

j) 之后用完全细胞液重悬细胞，此时可用荧光显微镜 (Ex/Em=492/517nm, FITC 滤片) 或流式细胞仪 (FL1 通道) 来观察标记效果。或开始用药物刺激处理或继续常规培养。经适当时间后用流式细胞仪检测细胞增殖，或用于特定目的细胞示踪。标记细胞也可用于活体动物的移植，并用荧光进行示踪。标记的细胞呈绿色荧光。

常见应用和数据示例:

根据荧光信号的稀释来检测细胞增殖和分化 (示踪) (Cell proliferation and cell division by Dye Dilution Method)，此方法主要用来体内外检测淋巴细胞 (T 细胞和 B 细胞) 的增殖，也能用来检测 NK 细胞，成纤维细胞甚至细菌。也有用来研究可移植造血干细胞的增殖。

注意事项

1) 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

2) CFDA SE 溶剂在低温 (如 4°C ，冰浴) 等条件下会凝固而粘在离心管底、管壁或盖子上，可将其置于 25°C 温育片刻直至全部融解后使用。

3) 产品 -20°C 保存，开封前 1 年有效，其中组分 A (CFDA SE 粉末) 需严格避光，组分 B 避免强光照射。

4) CFDA SE 粉末经溶剂溶剂配制成储存液后一个月内用完最好，最多不超过三个月。因 CFDA SE 容易被水解，并在水溶液中变质。使用过程中尽量避免接触水。而在标记过程中接触到水是在允许范围内。

5) 荧光染料均存在淬灭问题，操作和储存过程中需注意避光，以减缓荧光淬灭。