

产品组成:

规格	500-5000 assays	1000-10000 assays
CFSE 荧光探针	500ul	500ul*2
探针稀释液	10ml	20ml*2

储存条件:

探针-20℃避光保存, 稀释液 2-8℃保存, 避免反复冻融。

有效期:

六个月。

产品简介:

CFSE 细胞增殖检测试剂盒是利用细胞增殖示踪荧光染料 CFSE (CFDA-SE) 对细胞增殖情况进行检测的试剂盒。CFDA-SE 是一种可对活细胞进行荧光标记的新型染料, 可以标记活体细胞。CFDASE 是一种带有琥珀酰亚胺 (NHS) 的荧光染料, 可以结合细胞内的蛋白质。CFDASE 在结构上将酚羟基部位改造成 AM 体, 所以自身不发荧光, 荧光背景低, 脂溶性高, 能够轻易穿透细胞膜, 进入细胞内的 CFDASE 的 AM 部位能被细胞内酯酶水解生成 CFSE, 通过共价结合赖氨酸侧链的氨基而掺入细胞内和细胞表面的蛋白, 且结合后发出强的绿色荧光。CFSE 的琥珀酰亚胺 (NHS) 和细胞内蛋白质的氨基部位结合, 固定在细胞内, 不会漏出细胞外。CFSE 进入细胞后定位于细胞膜、细胞质和细胞核, 在细胞核的荧光最强。

在细胞分裂增殖过程中, CFSE 的荧光强度会随着细胞的分裂而逐级递减, 标记荧光可平均分配至两个子代细胞中, 因此其荧光强度是亲代细胞的一半, 根据这一特性, 它可被用于检测细胞增殖, 细胞周期的估算及细胞分裂等方面。而且这种荧光产物能够很好的保持, 并且可以用乙醛固定, 不会重新泄漏到胞外。

CFSE 标记细胞的荧光非常均一, 优于以前使用的其他细胞示踪荧光探针如 PKH26, 并且分裂后的子代细胞的荧光分配也更均一。在细胞分裂增殖过程中, CFSE 标记荧光可平均分配至两个子代细胞中, 荧光强度变为亲代细胞的一半, 通过流式细胞仪 (FL1 通道) 根据荧光强度的不同, 可检测出未分裂细胞, 分裂一次 (1/2 的荧光强度), 二次 (1/4 的荧光强度), 三次 (1/8 的荧光强度), 以及更多分裂次数的细胞。CFSE 可检测分裂次数多达八次甚至更多。经 CFSE 标记的细胞可用于体外和体内增殖研究, 且具有不会使邻近细胞染色的功能。CFSE 的优点在于染色更均匀, 因此比起核酸染料, 它在区分父子代细胞方面效率更高更准确, 比如利用流式细胞术, 您可以轻易区分 8-10 代淋巴细胞。

CFSE 标记的细胞用于体内观察可以长达数周之久, 它常被用来做活体细胞检测实验和用荧光显微镜观察细胞长期活动的实验。CFSE 毒性小, 不影响细胞的增殖能力。此方法操作简单, 且不用放射性同位素, 不存在安全隐患。可以更快速, 更准确和更安全地得到想要的实验数据。

CFSE 标记细胞后通常用流式细胞仪进行细胞增殖检测。最常用于淋巴细胞的增殖检测, 也可以用于成纤维细胞、NK 细胞等其它细胞的增殖检测。

CFSE 标记细胞呈绿色荧光, 荧光波长: $\lambda_{ex}=496\text{ nm}$, $\lambda_{em}=516\text{ nm}$ 。流式检测时的激发波长可以选择 488nm, 此时的发射波长为 516nm, 使用流式细胞仪检测时可以采用 FL1 detection channel。CFSE 标记的细胞除了流式细胞仪检测细胞增殖外, 还可用荧光酶标板定量活细胞数目, 或者用荧光显微镜进行均一染色的细胞示踪观察。

检测方法:

- 流式细胞仪
- 荧光显微镜
- 激光共聚焦

样本类型:

- 悬浮细胞
- 贴壁细胞

试剂盒以外自备试剂和仪器

- 仪器准备:**
- 流式细胞仪或荧光显微镜或激光共聚焦
 - 离心机
 - 移液器
 - 冰箱
 - 冰盒

试剂准备:

- PBS 缓冲液 (pH7.4, 实验室常用的10mM磷酸缓冲盐溶液 (1X))
(phosphate buffer saline/Dulbecco's PBS: 约含8mM Na₂HPO₄、2mM KH₂PO₄、137mM NaCl和3mM KCl)
- 或者HBSS (Hank's Balanced Salt Solution; With: Calcium Magnesium Glucose; Without: Phenol Red. Components: CaCl₂(anhydrous) 140mg/L(1.261mM)、MgCl₂·6H₂O 100mg/L(0.493mM)、MgSO₄·7H₂O 100mg/L(0.407mM)、KCl 400mg/L (5.333mM)、KH₂PO₄ 60mg/L(0.441mM)、NaHCO₃ 350mg/L(4.167mM)、NaCl 8000mg/L(137.931mM)、Na₂HPO₄(anhydrous) 48mg/L(0.338mM)、D-Glucose 1000mg/L(5.556mM))

耗材准备:

- 离心管
- 吸头
- 一次性手套

使用方法:

使用注意事项:

1. 旋帽离心管装的试剂在开盖前请短暂离心, 将盖内壁上的液体甩至管底, 避免开盖时液体洒落。
2. 染色浓度根据细胞种类的不同和每孔内细胞数量的多少而异。
3. 配制的CFSE 母液极易水解, 建议分装保存, 分装后用封口膜密封管口, 再用锡箔纸包裹, 最后和干燥剂一起用塑料袋密封, $\leq -20^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存。
4. CFSE 工作液应现配现用, 不能提前配制, 因为CFSE 吸水会分解, 影响染色效果。
5. CFSE 易被水解, 在水溶液中会很快变质。母液请在使用过程中避免接触水。工作液在标记细胞的过程中和水接触是在许可的时间范围内的。
6. CFSE 溶解液在4 $^{\circ}\text{C}$ 、冰浴等较低温度情况下会凝固而粘在离心管管底、管壁或管盖内, 可以37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴片刻至全部融解后使用。
7. CFSE 标记细胞仅需 5-15 分钟即可完成。对于不同细胞, 最佳标记时间需自行摸索。正式实验前, 建议先

做几个孔摸索染色浓度和加入 CFSE 试剂后的培养时间。

8. 荧光染料均存在淬灭问题，请尽量注意避光，以减缓荧光淬灭。

1. 根据需要检测的细胞样品数，用 CFSE 探针稀释液将 CFSE 母液 10 倍稀释，再用 HBSS 缓冲液 20-400 倍稀释，配制成 CFSE 染色工作液，终浓度相当于将 CFSE 母液 200-4000 倍稀释。不同的细胞需要根据预实验结果确定最佳染色浓度。如果荧光强度弱，可以适当提高 CFSE 的终浓度。如果背景太高，可以适当降低 CFSE 的终浓度，请摸索条件找到最佳浓度。
【注】：
 - 也可以不用试剂盒提供的探针稀释液，直接用 HBSS 等缓冲液或相应的无血清培养基稀释染料母液至所需浓度。
 - 开始实验前，使用 HBSS 缓冲液或无血清培养基稀释 CFSE 到需要的工作浓度。工作浓度为根据不同细胞的预实验结果确定的最佳工作浓度，一般染色终浓度 200-4000 倍稀释。
 - 一般起始浓度按 500-1000 倍稀释即可。
 - 为了降低过度加载染料导致的潜在背景和细胞毒性，在不影响实验结果的前提下应尽可能低浓度染色。
 - 工作液现配现用。
2. 将待测细胞用染色工作液重悬，至细胞浓度大约 10^7 /ml。
3. 在 37°C 培养箱中避光孵育 15-30 分钟。
4. 离心后去上清，收集细胞，用 PBS 或无血清培养基洗涤细胞 1-2 次，最后加入 PBS 或无血清培养基重悬细胞。
5. 取 500ul 细胞悬液，用流式细胞仪检测。
6. 随后还可按照细胞的正常培养方法进行培养。可以在荧光显微镜下直接观察标记效果，也可以在培养适当时间后再用流式细胞仪检测细胞增殖，或用于其他特定实验目的的细胞荧光示踪。标记的细胞也可以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。