

Viability/Cytotoxicity Plus Assay Kits for Animal Live & Dead Cells

最快 10 min 一步染色，三色无串扰，细胞活性/毒性增强版，精准死活检测

产品货号：C20703, C20704, C20705

产品规格：100 T, 300 T

储运条件：-20 °C避光保存，冰袋运输

产品简介：

Viability Cytotoxicity Plus Assay Kits for Animal Live & Dead Cells（细胞活力/毒性检测试剂盒）是一款集成化动物细胞死活及凋亡检测专用工具，专为解决传统细胞活力/毒性检测中区分不精准、定量不严谨、操作繁琐等问题而研发。系列包含三种配置，核心探针组合分别为Calcein AM + EthD Gold、Calcein AM + EthD Gold + Hoechst 33342 以及Calcein AM + PI + Hoechst 33342，采用酯酶活性检测+质膜完整性分析+全细胞核染色的多参数荧光标记策略。其核心原理为：Calcein AM可穿透完整细胞膜，被活细胞内酯酶水解为带负电的钙黄绿素并在胞内积累，使活细胞呈现特异性绿色荧光；EthD Gold作为膜非渗透性核酸染料，仅能进入细胞膜破损的细胞，与细胞核DNA特异性结合后荧光显著增强，使坏死细胞呈现明亮红色荧光，且仅结合DNA可有效避免RNA干扰，染色效果优于传统PI染料；Hoechst 33342 可穿透所有细胞的细胞膜，与双链DNA结合后对全细胞核进行普遍性染色，活细胞细胞核呈淡蓝色荧光，凋亡细胞染色质浓缩呈强蓝色荧光，作为细胞计数与定量校正的稳定内参。相较于传统双荧光试剂盒，本试剂盒新增Hoechst 33342 核染，可精准量化各类细胞占比；同时采用EthD Gold染料，荧光亮度较传统PI高 50%，有效避免假阳性，坏死标记更特异、结果更可靠。还省去多组分自行配制的繁琐流程，操作便捷，荧光染色和检测仅需约 10 min，染色后可直接进行荧光显微镜拍照、流式分析或荧光酶标仪定量等后续检测，且适配流式细胞仪象限分析与荧光显微镜形态学观察，荧光信号抗干扰能力强，能为检测提供更精准、高效的支持。

在生命科学研究领域，细胞活力评估与毒性检测是细胞生物学基础研究、药物筛选、病理机制探究等方向的核心实验环节，精准区分细胞存活、凋亡与坏死状态，量化细胞毒性作用，是获取可靠实验数据、推动研究进展的关键前提。本试剂盒依托成熟的荧光染色技术，兼容 2D、3D细胞培养体系，广泛应用于流式细胞术检测、荧光显微镜观察、药物筛选中的细胞毒性评估、细胞凋亡机制研究、细胞介导的细胞毒性检测等多个场景，可用于评估肿瘤坏死因子(TNF)、 β -淀粉样蛋白等各类物质的细胞毒性，也可量化凋亡细胞死亡情况，为相关研究提供稳定、可靠的检测依据。相较于台盼蓝排斥法、⁵¹Cr释放法等传统检测方法，本试剂盒更快速、安全、灵敏，能有效解决传统检测中灵敏度不足、操作复杂、无法同步区分三类细胞的痛点，助力科研人员高效获取准确实验数据，加速细胞活力与毒性相关研究进程，为药物研发、疾病机制研究等提供重要技术支撑。

注：效能等同于 Biotium Viability/Cytotoxicity Assay Kit for Animal Live & Dead 30002。

应用范围：活细胞、坏死细胞的实时动态观察与区分，细胞的活力/毒性快速检测，药物研发，细胞毒性机制研究，常规细胞培养质控，细胞库验收，复苏活力检测，高通量药物初筛；

产品特点：

- **三色荧光无串扰：**Calcein AM（绿色）、EthD Gold（红色）、Hoechst 33342（蓝色）发射波段差异显著，无信号重叠，规避细胞自发荧光干扰，检测结果误判率低；
- **染色高效稳定：**室温避光孵育仅需 10 min，EthD Gold 与 Hoechst 33342 荧光抗淬灭能力强，信号持久清晰；
- **坏死标记更特异：**采用 EthD Gold 染料，荧光亮度较传统 PI 高 50%，不标记晚期凋亡细胞、有效避免假阳性，坏死识别更准确；
- **细胞分型更严谨可靠：**新增 Hoechst 33342 全细胞核染色，提供稳定内参，可精准校正总细胞数，量化各类细胞占比；
- **多平台兼容通用：**适配荧光显微镜、流式细胞仪、荧光酶标仪，支持成像观察与定量分析，兼容 2D/3D 细胞培养体系；



产品参数:

- **Calcein AM Ex/Em:** 494/517 nm;
- **EthD Gold Ex/Em:** 532/625 nm(with DNA);
- **PI Ex/Em:** 527/624 nm(with DNA);
- **Hoechst 33342 Ex/Em:** 350/461 nm(with DNA)。

产品组分:

Viability/Cytotoxicity Plus Assay Kits for Animal Live & Dead Cells(Calcein AM, EthD Gold)(C20703)			
组分	规格	100 T	300 T
A. Calcein AM		10 μ L	30 μ L
B. EthD Gold		10 μ L	30 μ L

Viability/Cytotoxicity Plus Assay Kits for Animal Live & Dead Cells(Calcein AM, EthD Gold, Hoechst 33342)(C20704)			
组分	规格	100 T	300 T
A. Calcein AM		10 μ L	30 μ L
B. EthD Gold		10 μ L	30 μ L
C. Hoechst 33342		10 μ L	30 μ L

Viability/Cytotoxicity Plus Assay Kits for Animal Live & Dead Cells(Calcein AM, PI, Hoechst 33342)(C20705)			
组分	规格	100 T	300 T
A. Calcein AM		10 μ L	30 μ L
B. PI		30 μ L	90 μ L
C. Hoechst 33342		10 μ L	30 μ L

注: 试剂盒使用次数为进行 96 孔板荧光显微镜检测时可检测的微孔总数。

注: 试剂盒 C20705 中操作时染料 PI 使用量为 EthD Gold 的 3 倍进行染色。

注意事项:

- 本试剂盒所有组分均需“-20℃避光保存”，避免反复冻融；Calcein AM水溶液易水解，稀释后的工作液应当天用完，不可冷藏或冷冻保存。
- 使用贴壁细胞进行流式检测时，胰酶消化后必须使用含血清的培养基中和并去除胰酶，避免胰酶破坏细胞膜结构导致检测假阳性；消化时间需严格控制，过短/过长均会造成细胞机械损伤，影响检测结果。
- EthD Gold不可进行细胞固定，若对染色后的细胞进行甲醛等固定处理，染料会从坏死细胞中泄漏并进入活细胞，导致染色结果假阳性。
- 染色完成后1 h内进行流式检测，以保证荧光信号稳定。
- 本产品仅限于科研用途并且不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请遵循您所在常规实验室安全规定。

使用说明:

一、实验前准备

注: 以下实验步骤以 C20704 产品为例，仅供参考。

1. 试剂准备:

- 将试剂盒各组分恢复至室温(15-25℃)，准备足量PBS、HBSS等常规缓冲液。
- 配制凋亡/毒性诱导剂（如CCCP等），根据实验设计确定处理浓度与时间。

注: 缓冲液可以使用 pH7.4 的 PBS 缓冲液，以获得更优的清洗和染色效果，操作步骤中以 PBS 缓冲液为例。



仅限体外科研用途 不得用于临床诊断或治疗
 技术咨询 Contact@probelives.com
 订购咨询 Sales@probelives.com

中文网址 www.probelives.cn
 英文网址 www.probelives.com
 Suzhou Probelives Technology CO., LTD.

2. 仪器准备:

- 荧光显微镜: 检测通道激发/发射波长Ex/Em: 494/517 nm(Calcein AM)、Ex/Em: 532/625 nm(EthD Gold)、Ex/Em: 350/461 nm(Hoechst 33342)。
- 流式细胞仪: 检测通道激发/发射波长Ex/Em: 494/517 nm(Calcein AM)、Ex/Em: 532/625 nm(EthD Gold)、Ex/Em: 350/461 nm(Hoechst 33342)。

3. 对照组设置:

组别	Calcein AM	EthD Gold	Hoechst 33342	样品细胞
空白对照	-	-	-	不做任何处理
阴性对照	+	+	+	不做任何处理
单阳对照 1	+	-	-	凋亡/毒性诱导后的细胞
单阳对照 2	-	+	-	凋亡/毒性诱导后的细胞
单阳对照 3	-	-	+	凋亡/毒性诱导后的细胞
实验组	+	+	+	实验组细胞

- 在实验中设置单染色的对照组, 流式检测中用于调节补偿。
- 空白对照组: 评估背景荧光干扰, 检测细胞自身的自发荧光, 在流式检测中用于调节阈值和电压。
- 阴性对照组: 排除染料的非特异性结合, 验证染色的特异性。
- 单阳对照组: 排除荧光串扰, 校准信号强度参数, 在流式检测中调节补偿。

4. 细胞准备:

- 根据实验设计, 对细胞进行相应的药物处理。

二、操作步骤

方案一: 荧光显微镜检测 (适用于悬浮细胞)

1. 收集与洗涤细胞:

- (1) 收集待测悬浮细胞悬液至离心管中。
- (2) 1000 rpm, 室温离心 5 min, 小心吸弃上清液。
- (3) 加入 100 μ L PBS 缓冲液轻柔重悬细胞, 进行洗涤。
- (4) 再次 1000 rpm, 室温离心 5 min, 彻底吸弃上清液。

2. 细胞重悬与计数:

- (1) 使用 PBS 缓冲液重悬细胞并进行计数。
- (2) 取 5×10^4 - 10^5 个细胞, 1000 rpm 低速离心 5 min, 去除 PBS 缓冲液。
- (3) 使用 100 μ L PBS 缓冲液重悬。1000 rpm 低速离心 5 min, 去除上清。

注: 显微镜法对细胞密度要求不严格, 只要实验组与对照组密度一致即可 (推荐范围: 10^5 - 10^7 cells/mL)。具体可根据样本种类与实验条件灵活调整, 以显微镜下视野中细胞分布清晰可辨为宜。

3. 染色工作液制备

- (1) 根据样品孔数, 取适量体积的PBS缓冲液, 按照每1 mL中三种染料分别为组分A (Calcein AM)1 μ L、组分B (EthD Gold)1 μ L和组分C (Hoechst 33342)1 μ L的使用量将染料加入PBS缓冲液中, 混匀备用 (现用现配)。可参考下表制备染色工作液:

样品数量	1	10	50	100
Calcein AM	0.1 μ L	1 μ L	5 μ L	10 μ L
EthD Gold	0.1 μ L	1 μ L	5 μ L	10 μ L
Hoechst 33342	0.1 μ L	1 μ L	5 μ L	10 μ L
PBS	100 μ L	1 mL	5 mL	10 mL
Working Solution	~100 μ L	~1 mL	~5 mL	~10 mL

注: 样品数量按照 96 孔板检测, 每孔染色工作液使用体积为 100 μ L 进行计算。



4. 细胞染色：

- (1) 取100 μL 染色工作液重悬细胞，轻轻吹打混匀（例如：96孔板加100 μL /孔，48孔板加150 μL /孔，24孔板加250 μL /孔，12孔板加500 μL /孔，6孔板加1 mL/孔）。
- (2) 室温避光孵育10 min，孵育时长可根据实际观察到的染色效果进行灵活调整，调整区间为10-30 min。

注：各染料的孵育时长、加样量可以根据实验所用的不同细胞种类、预实验结果或实验条件设置的使用量进行调整。

5. 洗涤与重悬：

- (1) 孵育结束后，1000 rpm，室温离心 5 min，收集细胞。
- (2) 小心吸弃含染料的上清液（此为废液，需妥善处理）。
- (3) 加入 100 μL PBS 缓冲液轻柔重悬细胞，进行洗涤。
- (4) 末次洗涤后，彻底吸净上清液，加入 100 μL PBS 缓冲液重悬细胞，制成待测样品。

6. 显微镜观察与拍照：

- (1) 96孔板法：将100 μL 细胞悬液加入96孔板中，静置片刻，待细胞自然沉降贴底后，置于荧光显微镜下观察。
- (2) 载玻片法：取20-30 μL 细胞悬液滴加于洁净载玻片上，轻轻盖上盖玻片，避免产生气泡，置于荧光显微镜下观察。
- (3) 在预设的滤光片条件下，寻找细胞并分别拍摄。

Calcein AM 检测活细胞群信号：选用 FITC 通道(Ex/Em: 494/517 nm)或相应滤光片；

EthD Gold 检测死细胞信号：选用 Texas Red 通道(Ex/Em: 532/625 nm)或相应滤光片；

Hoechst 33342 检测所有细胞信号：选用 DAPI 通道(Ex/Em: 350/461 nm)或相应滤光片。

方案二：荧光显微镜检测（适用于贴壁细胞）

1. 细胞清洗：

- (1) 直接在培养板中吸弃细胞培养液。
- (2) 根据培养板规格，加入对应体积的PBS缓冲液轻柔洗涤细胞一次（例如：96孔板加100 μL /孔，48孔板加150 μL /孔，24孔板加250 μL /孔，12孔板加500 μL /孔，6孔板加1 mL/孔）。洗涤后吸净PBS缓冲液。

2. 制备染色工作液：

- (1) 根据样品孔数，取适量体积的PBS缓冲液，按照每1 mL中三种染料分别为组分A (Calcein AM)1 μL 、组分B (EthD Gold)1 μL 和组分C (Hoechst 33342)1 μL 的使用量将染料加入PBS缓冲液中，混匀备用（现用现配）。可参考下表制备染色工作液：

样品数量	1	10	50	100
Calcein AM	0.1 μL	1 μL	5 μL	10 μL
EthD Gold	0.1 μL	1 μL	5 μL	10 μL
Hoechst 33342	0.1 μL	1 μL	5 μL	10 μL
PBS	100 μL	1 mL	5 mL	10 mL
Working Solution	~100 μL	~1 mL	~5 mL	~10 mL

注：样品数量按照 96 孔板检测，每孔染色工作液使用体积为 100 μL 进行计算。

3. 细胞染色：

- (1) 向各孔中加入对应体积的染色工作液（例如：96孔板加100 μL /孔，48孔板加150 μL /孔，24孔板加250 μL /孔，12孔板加500 μL /孔，6孔板加1 mL/孔）。
- (2) 室温避光孵育10 min，孵育时长可根据实际观察到的染色效果进行灵活调整，调整区间为10-30 min。

注：各染料的孵育时长、加样量可以根据实验所用的不同细胞种类、预实验结果或实验条件设置的使用量进行调整。

4. 洗涤：

- (1) 孵育结束后，吸弃各孔中的染色工作液。
- (2) 按步骤1（2）的体积，加入PBS缓冲液洗涤细胞，清洗后吸去清洗缓冲液。

5. 显微镜观察与拍照：

- (1) 洗涤后，每孔加入对应体积的PBS缓冲液，以保持细胞湿润。
- (2) 直接将培养板置于荧光显微镜下观察和拍照。滤光片设置同方案一。

Calcein AM 检测活细胞群信号：选用 FITC 通道(Ex/Em: 494/517 nm)或相应滤光片；

EthD Gold 检测死细胞信号：选用 Texas Red 通道(Ex/Em: 532/625 nm)或相应滤光片；

Hoechst 33342 检测所有细胞信号：选用 DAPI 通道(Ex/Em: 350/461 nm)或相应滤光片。



方案三：流式细胞仪检测（适用于悬浮与贴壁细胞）
1. 收集与制备单细胞悬液：

- 悬浮细胞：同“方案一”的步骤1和2，最终取 $5 \times 10^5 - 10^6$ 个细胞。
- 贴壁细胞：
 - a. 将细胞培养基吸出至适合的离心管内备用。贴壁细胞用少量 PBS 缓冲液清洗一遍，清洗后的 PBS 缓冲液吸出后同样转移到盛装培养基的离心管内，1000 rpm，室温离心 5 min。
 - b. 加入适量不含 EDTA 的胰酶消化液（覆盖细胞即可），室温下置于显微镜下观察，待细胞变圆、间隙增大时，用移液器轻轻吹打，使细胞完全脱落。

注：胰酶消化步骤对于贴壁细胞很关键。消化时间过短，细胞需要用力吹打才能脱落容易造成机械损伤。

 - c. 关键：加入“a 步骤”离心管内备用的细胞培养基，终止消化。

注：离心管内备用的细胞培养基非常重要，不能直接丢弃，其中可能会含有坏死的目的细胞，且细胞培养基中的血清能够有效终止胰酶的消化作用，否则残留胰酶将会严重影响后续的检测。

 - d. 将细胞悬液转移至合适的离心管，1000 rpm，室温离心 5 min，吸弃上清。
 - e. 收集 a 步骤与 d 步骤中的细胞；
 - f. 用 PBS 缓冲液重悬细胞并进行细胞计数；
 - g. 取 $5 \times 10^4 - 10^5$ 个细胞，1000 rpm，室温离心 5 min，吸弃上清；
 - h. 100 μ L PBS 缓冲液清洗细胞，1000 rpm，室温离心 5 min，吸弃上清。

2. 制备染色工作液：

- (1) 根据样品孔数，取适量体积的 PBS 缓冲液，按照每 1 mL 中三种染料分别为组分 A (Calcein AM) 1 μ L、组分 B (EthD Gold) 1 μ L 和组分 C (Hoechst 33342) 1 μ L 的使用量将染料加入 PBS 缓冲液中，混匀备用（现用现配）。可参考下表制备染色工作液：

样品数量	1	10	20
Calcein AM	0.5 μ L	5 μ L	10 μ L
EthD Gold	0.5 μ L	5 μ L	10 μ L
Hoechst 33342	0.5 μ L	5 μ L	10 μ L
PBS	500 μ L	5 mL	10 mL
Working Solution	~500 μ L	~5 mL	~10 mL

注：样品数量按照流式检测，每个样品染色工作液使用体积为 500 μ L 进行计算。

3. 细胞染色：

- (1) 清洗后的细胞加入 500 μ L 染色工作液，轻轻吹打混匀成单细胞悬液。
- (2) 室温避光孵育 10 min，孵育时长可根据实际观察到的染色效果进行灵活调整，调整区间为 10-30 min。

注：各染料的孵育时长、加样量可以根据实验所用的不同细胞种类、预实验结果或实验条件设置的使用量进行调整；流式检测的染料浓度通常低于荧光显微镜检测，可根据荧光信号强度适当调整稀释倍数。

4. 洗涤与重悬：

- (1) 孵育结束后，1000 rpm，室温离心 5 min，收集细胞。
- (2) 吸弃上清液，加入 1 mL PBS 缓冲液轻柔重悬，进行洗涤。
- (3) 再次离心，彻底吸弃上清液。
- (4) 加入 1 mL PBS 缓冲液轻柔重悬细胞，制成流式上机样品。

5. 上机检测：

- (1) 用流式细胞仪在预设的检测通道下进行分析。
- (2) 首先通过空白对照（未染色细胞）调节电压，使细胞群位于坐标系左下角。
- (3) 依次检测单阳对照 1、2、3，调节荧光补偿，消除通道串扰。
- (4) 然后检测阴性对照和阳性对照，确认实验体系成立。
- (5) 最后检测实验样品，记录并分析细胞的平均荧光强度。

Calcein AM 检测活细胞群信号：选用 FITC 通道(Ex/Em: 494/517 nm)；

EthD Gold 检测死细胞信号：选用 Texas Red 通道(Ex/Em: 532/625 nm)；

Hoechst 33342 检测所有细胞信号：选用 DAPI 通道(Ex/Em: 350/461 nm)。



方案四：荧光酶标仪检测（适用于高通量定量检测）

- 耗材准备：黑色全黑/黑底透明底96孔板。

1. 细胞准备：

- 按照实验需求设置样品组、活细胞对照组、死细胞对照组和无细胞对照组。
- 接种细胞：每孔接种2000-10000个贴壁细胞，培养至贴牢或稳定。
- 药物处理：按实验方案加入诱导剂/药物，设置复孔 ≥ 3 。
- 洗涤细胞：吸除培养液，每孔加100 μL PBS缓冲液轻柔洗涤1次，吸净PBS缓冲液（轻轻吸取，避免扰动细胞）。

2. 制备染色工作液：

- (1) 根据样品孔数，取适量体积的PBS缓冲液，按照每1 mL中三种染料分别为组分A (Calcein AM)1 μL 、组分B (EthD Gold)1 μL 和组分C (Hoechst 33342)1 μL 的使用量将染料加入PBS缓冲液中，混匀备用（现用现配）。可参考下表制备染色工作液：

样品数量	1	10	50	100
Calcein AM	0.1 μL	1 μL	5 μL	10 μL
EthD Gold	0.1 μL	1 μL	5 μL	10 μL
Hoechst 33342	0.1 μL	1 μL	5 μL	10 μL
PBS	100 μL	1 mL	5 mL	10 mL
Working Solution	~100 μL	~1 mL	~5 mL	~10 mL

注：样品数量按照 96 孔板检测，每孔染色工作液使用体积为 100 μL 进行计算。

3. 细胞染色：

- (1) 每孔加入100 μL 染色工作液。
- (2) 室温避光孵育10 min，孵育时长可根据实际观察到的染色效果进行灵活调整，调整区间为10-30 min。

注：各染料的孵育时长、加样量可以根据实验所用的不同细胞种类、预实验结果或实验条件设置的使用量进行调整。

4. 洗涤：

- (1) 孵育结束后，小心吸取微孔中的染色工作液，缓慢加入等体积的PBS缓冲液清洗一次。
- (2) 缓慢吸弃上清液，加入适量PBS缓冲液或细胞培养基。

5. 检测：

使用货号为 C20703 的产品时，用相应激发和发射滤光片测量实验组与对照组细胞样本的荧光强度，各组检测数据按照下列方式进行记录：

- (1) 用 Calcein AM 和 EthD Gold 标记的实验组细胞样本在 625 nm 处的荧光强度 = $F(625)_{\text{sam}}$ 。
- (2) 用 Calcein AM 和 EthD Gold 标记的实验组细胞样本在 517 nm 处的荧光强度 = $F(517)_{\text{sam}}$ 。
- (3) 仅用 EthD Gold 标记的全死亡细胞样本在 625 nm 处的荧光强度 = $F(625)_{\text{max}}$ 。
- (4) 仅用 Calcein AM 标记的全死亡细胞样本在 625 nm 处的荧光强度 = $F(625)_{\text{min}}$ 。
- (5) 仅用 EthD Gold 标记的全活细胞（或近全活细胞）样本在 517 nm 处的荧光强度 = $F(517)_{\text{min}}$ 。
- (6) 仅用 Calcein AM 标记的全活细胞（或近全活细胞）样本在 517 nm 处的荧光强度 = $F(517)_{\text{max}}$ 。
- (7) 加染料或未加染料的无细胞样本在 517 nm 处的荧光强度 = $F(517)_0$ 。
- (8) 加染料或未加染料的无细胞样本在 625 nm 处的荧光强度 = $F(625)_0$ 。
- (9) 使用货号为 C20704、C20705 的产品时，用相应激发和发射滤光片测量实验组与对照组细胞样本的荧光强度，各组检测数增加下列记录：
 - a. 用实验组细胞样本在 461 nm 处的荧光强度 = $F(461)_{\text{sam}}$ 。
 - b. 用无细胞样本在 461 nm 处的荧光强度 = $F(461)_0$ 。

6. 计算公式：

- (1) 扣除背景： $F(\text{校正}) = F(\text{测量}) - F(\text{背景})$
- (2) 细胞活力：

$$\text{Live Cell (\%)} = [F(\text{样品}, 517 \text{ nm}) - F(\text{死细胞}, 517 \text{ nm})] / [F(\text{活细胞}, 517 \text{ nm}) - F(\text{死细胞}, 517 \text{ nm})] \times 100\%$$

- (3) 细胞死亡率：

$$\text{Dead Cell (\%)} = [F(\text{样品}, 625 \text{ nm}) - F(\text{死细胞}, 625 \text{ nm})] / [F(\text{活细胞}, 625 \text{ nm}) - F(\text{死细胞}, 625 \text{ nm})] \times 100\%$$

- (4) 总细胞校正 (Hoechst)：相对总细胞数 = $F(\text{样品}, 461 \text{ nm}) / F(\text{对照}, 461 \text{ nm})$



三、结果判读：

1. 定性分析（显微镜）：

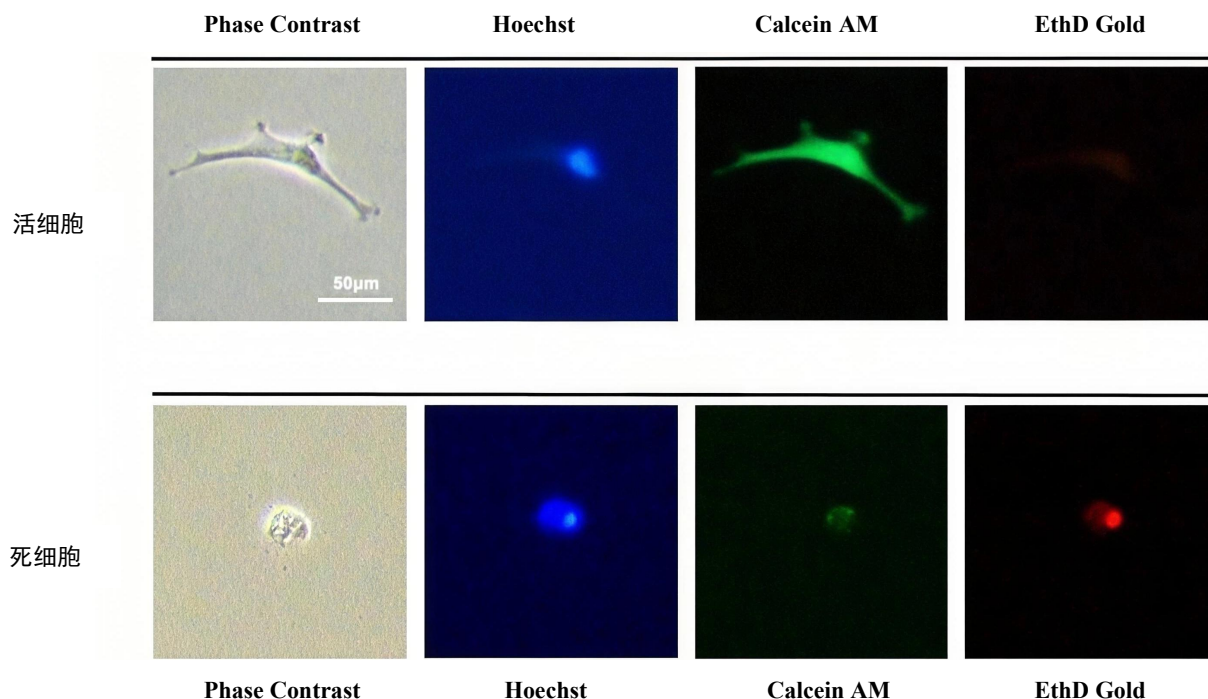


图 1.使用 Calcein AM, EthD Gold, Hoechst 33342 进行人 iPSC 衍生神经前体细胞(NPC)的细胞活力与细胞毒性检测纳米气泡对细胞的影响

注：图片引自文献《Stable charged nanobubbles with distinct polarities in culture media differentially affect the viability of human iPSC-derived neurons》（doi: 10.1038/s41598-026-41156-4）

结果判读：

细胞类型	Calcein AM 绿色荧光	Hoechst 33342 蓝色荧光	EthD Gold 红色荧光	结果说明
活细胞	强荧光	蓝光荧光均匀分布	无荧光	膜完整，核完整，边界清晰
死细胞	无荧光	强蓝色荧光明显聚集	强荧光	膜破裂，核肿胀，弥散絮状

注：实际检测结果可能因检测仪器、操作条件、细胞类型等差异产生不同，本示例仅提供参考。

常见疑问与解答：

- 问：为什么Calcein AM的荧光信号容易淬灭？如何缓解？
答：Calcein AM 的荧光基团对光照敏感，易发生光淬灭；可以在实验中的缓解方法有：
a. 实验全程严格避光操作，染色后尽快完成检测；
b. 荧光显微镜拍照时先拍摄 Hoechst 33342 通道，再拍摄 Calcein AM 通道，减少其曝光时间；
c. 避免使用含甘油的抗淬灭剂，甘油的黏性与透光性会影响快速检测。
- 问：使用贴壁细胞进行流式检测时为什么要保留培养细胞的培养基？
答：药物处理后的细胞已经存在凋亡或坏死细胞，这些细胞的贴壁能力逐渐降低，会游离在培养基中，染色检测时需要考虑这部分细胞，否则检测结果中可能导致细胞活力检测结果偏高、坏死率偏低，对药物效果或者细胞处理效果的评价会产生错误判断。
- 问：使用CCCP诱导贴壁细胞凋亡时，细胞易脱落如何解决？
答：CCCP 易导致贴壁细胞凋亡后脱落，造成检测结果偏低；可替换诱导剂为 10%无水乙醇，其诱导的细胞凋亡更温和，贴壁细胞脱落现象显著缓解，且不影响三种染料的染色效果。
- 问：试剂盒有将EthD Gold替换为PI的染料配置，使用PI染料的试剂盒使用时需注意什么？
答：PI 为常用的死细胞染色染料，但其可与 RNA 结合，染色特异性低于 EthD Gold；使用 PI 染色时需注意：
a. PI 的使用量为 EthD Gold 的 3 倍（如显微镜检测时 1 mL 工作液加 3 µL PI）；
b. PI 的激发/发射波长为 527/624 nm，仍使用流式 PE 通道与荧光显微镜 Cy3 滤片检测。



● 问：我司有三款同系列试剂盒该如何进行选择？

答：三款试剂盒的选择可参考下表：

产品货号	核心探针组合	定位	核心优势	适用场景
C20703	Calcein AM + EthD Gold	基础升级款（双染）	EthD Gold 替代 PI，假阳性低、特异性强，高性价比，操作便捷	常规死活检测、药物毒性初筛、传统双染方案升级
C20704	Calcein AM + EthD Gold + Hoechst 33342	旗舰科研款（三染）	EthD Gold 加持，新增核染内参，定量精准、抗干扰强	高精度活力检测、科研级毒性评估、高端流式分析
C20705	Calcein AM + PI + Hoechst 33342	经典兼容款（三染）	保留 PI 通用性，新增核染提升定量，适配传统实验流程	常规实验、教学实验、批量初筛、延续 PI 检测习惯

