



Инструкция к набору для определения
цитотоксичности и жизнеспособности
клеток с помощью Calcein AM и EthD-1

Contents

Русский: Инструкция к набору для определения цитотоксичности и жизнеспособности клеток с помощью Calcein AM и EthD-1	3-13
--	------

Инструкция к набору для определения цитотоксичности и жизнеспособности клеток с помощью Calcein AM и EthD-1

Cell Viability and Cytotoxicity Kit, with Calcein AM and EthD- 1 — готовый к применению набор для одновременной оценки жизнеспособности и цитотоксичности клеток на основе двойного флуоресцентного окрашивания.

Набор содержит два комплементарных индикатора:

- **Calcein AM** — неполярный, проникающий в живые клетки флуорогенный субстрат. Внутри клетки он гидролизуется цитозольными эстеразами с образованием ярко-зеленого флуоресцентного кальцеина, который удерживается в клетках с интактной мембраной. Интенсивность сигнала пропорциональна метаболической активности и количеству жизнеспособных клеток.
- **Ethidium homodimer-1 (EthD- 1)** — высокоаффинный интеркалирующий краситель нуклеиновых кислот, не проникающий в живые клетки благодаря большому размеру молекулы и дикатионной природе. В клетках с нарушенной целостностью мембраны EthD-1 пассивно проникает в цитоплазму и ядро, где интеркалирует в двухцепочечные нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК), сопровождаясь значительным усилением флуоресценции. Краситель служит индикатором погибших клеток и клеток на поздних стадиях апоптоза.

При совместной инкубации с клеточными культурами жизнеспособные клетки флуоресцируют зеленым (Calcein), тогда как погибшие и апоптотические — красным (EthD-1). Минимальное спектральное перекрытие позволяет проводить анализ в двухканальном режиме без сложных спектральных коррекций. Фоновая флуоресценция обычно низкая, поскольку оба зонда до соответствующего внутриклеточного превращения или связывания с нуклеиновыми кислотами обладают относительно слабой флуоресценцией.

Метод подходит для флуоресцентной микроскопии, флуоресцентных планшетных ридеров и проточной цитометрии. Он может быть адаптирован для широкого спектра типов эукариотических клеток, однако концентрации красителей и время инкубации следует оптимизировать для каждого типа клеток и прибора.

Метод не позволяет непосредственно измерять все формы клеточной гибели. Состояния клеток, не сопровождающиеся существенными изменениями внутриклеточной активности эстераз или целостности мембраны, могут классифицироваться неточно.

Перед началом работы

- Используйте только валидированные буферы, например, D-PBS. Феноловый красный и другие окрашенные добавки могут вносить вклад в фоновый сигнал или вызывать спектральные интерференции, поэтому их влияние следует оценивать экспериментально.
- Состав D-PBS, подходящий для метода: KCl — 200 мг/л, KH_2PO_4 — 200 мг/л, NaCl — 8 мг/л и Na_2HPO_4 — 1,15 мг/л.
- Также можно использовать другие валидированные солевые буферы при условии, что они не влияют на флуоресценцию или жизнеспособность клеток.
- Дайте замороженным исходным растворам нагреться до комнатной температуры и перед открыванием кратковременно центрифугируйте их.
- Calcein AM чувствителен к влаге. Минимизируйте воздействие атмосферной влаги на Calcein AM. Сразу после использования герметично закройте исходный раствор.
- Водные рабочие растворы Calcein AM готовьте непосредственно перед экспериментом. Не храните их для последующих экспериментов.
- EthD-1 значительно менее чувствителен к влаге и может храниться в виде замороженного исходного раствора при плотно закрытой емкости.
- Оптимальные концентрации зависят от типа клеток, плотности клеток, температуры инкубации, оптических фильтров и чувствительности прибора.

В целом, используйте минимальные концентрации, обеспечивающие четкое разделение жизнеспособной и нежизнеспособной популяций. В таблице приведены типичные концентрации красителей для различных применений:

Применение	Calcein AM	EthD- 1	Начальная инкубация
Микроскопия	0,1–10 мкМ; чаще ~2 мкМ	0,1–10 мкМ; чаще ~4 мкМ	30–45 мин, КТ
Планшетный ридер	0,1–5 мкМ; чаще ~1 мкМ	0,1–10 мкМ; чаще ~2 мкМ	30–45 мин, КТ
Проточная цитометрия	100 нМ	8 мкМ	15–20 мин, КТ

- Для анализов на планшетном ридере поддерживайте постоянными количество клеток, объем реагента, время инкубации, температуру и положение лунки.
- При необходимости количественных измерений флуоресценции включайте контроль жизнеспособных клеток, мертвых клеток, окрашенных отдельно каждым из красителей, и контроль без клеток.
- При проточной цитометрии выполняйте компенсацию с использованием контролей с одним красителем и устанавливайте гейты с использованием соответствующих необработанных и мертвых контролей.
- Не интерпретируйте популяцию Calcein-негативных/EthD-1-негативных клеток автоматически как жизнеспособную; слабое окрашивание может быть обусловлено недостаточной загрузкой красителя, низкой активностью эстераз, типом клеток или техническими факторами.
- Метод в основном позволяет оценивать активность эстераз и целостность клеточной мембраны. Для характеристики конкретных механизмов клеточной гибели могут потребоваться дополнительные методы анализа.

Протокол флуоресцентной микроскопии

Подготовка клеток

1. Вырастите адгезивные клетки на стерильных стеклянных покровных стеклах или другой подходящей поверхности для визуализации. Для анализа отдельных клеток обычно предпочтительны субконфлюэнтные культуры.
2. Для неприкрепленных клеток осторожно промойте суспензию примерно 500–1000 объемами D-PBS для культивирования клеток и осадите клетки центрифугированием.
3. Для адгезивных клеток перед окрашиванием осторожно промойте клетки примерно 500–1000 объемами D-PBS. Это снижает вклад внеклеточной активности эстераз, присутствующей в среде, содержащей сыворотку.
4. Нанесите требуемую цитотоксическую обработку до или во время окрашивания в соответствии с дизайном эксперимента.

Оптимизация концентрации красителей

1. Подготовьте репрезентативные образцы живых и мертвых клеток. Контроль мертвых клеток можно получить с использованием валидированного метода, подходящего для данного типа клеток.
2. Используя мертвые клетки, определите концентрацию EthD-1, обеспечивающую интенсивное окрашивание ядер при минимальной неспецифической цитоплазматической флуоресценции. Практический исходный диапазон составляет 0,1–10 мкМ.
3. Используя мертвые клетки, протестируйте Calcein AM в диапазоне примерно 0,1–10 мкМ и выберите концентрацию, при которой флуоресценция в мертвых клетках минимальна.
4. Подтвердите выбранную концентрацию Calcein AM на живых клетках и увеличивайте ее только в случае недостаточного зеленого сигнала.
5. Используйте полученные концентрации для эксперимента по оценке жизнеспособности при условии четкого разделения популяций.

Приготовление рабочего раствора

Удобный начальный состав для многих типов клеток млекопитающих — примерно 2 мкМ Calcein AM и 4 мкМ EthD-1 в D-PBS:

1. Добавьте 20 мкл 2 мМ стокового раствора EthD-1 к 10 мл D-PBS. Тщательно перемешайте для получения примерно 4 мкМ EthD-1.
2. Добавьте 5 мкл 4 мМ стокового раствора Calcein AM к раствору EthD-1 и тщательно перемешайте. Полученный раствор содержит примерно 2 мкМ Calcein AM и 4 мкМ EthD-1. Конечная концентрация DMSO составляет примерно 0,1%.
3. Используйте полученный рабочий раствор немедленно.

Окрашивание и визуализация

1. Добавьте примерно 100–150 мкл оптимизированного окрашивающего раствора (на покровное стекло диаметром 22 мм) или другой достаточный объем для полного покрытия клеток.
2. Инкубируйте 30–45 минут при комнатной температуре, защищая от чрезмерного воздействия света.
3. Перенесите примерно 10 мкл свежего окрашивающего раствора или D-PBS на чистое предметное стекло.
4. Осторожно переверните покровное стекло и поместите его на предметное стекло; во время визуализации минимизируйте испарение раствора.
5. Визуализируйте зеленый и красный каналы отдельно или одновременно с использованием подходящих наборов фильтров.

Краситель	Возбуждение	Эмиссия
Calcein	≈ 494 нм	≈ 517 нм
EthD-1	≈ 528 нм	≈ 617 нм; детекция в красной/дальнекрасной области

Протокол флуоресцентного анализа на планшетах

Настройки прибора

Для планшетных ридеров измеряйте флуоресценцию Calcein и EthD-1 отдельно. Практическая исходная конфигурация: возбуждение около 485 ± 10 нм и эмиссия около $530 \pm 12,5$ нм для Calcein; возбуждение около $530 \pm 12,5$ нм и эмиссия около 645 ± 20 нм для EthD-1. Для конкретного прибора может потребоваться оптимизация наборов фильтров.

Подготовка клеток

1. Культивируйте адгезивные клетки непосредственно в многолунчном планшете до достижения требуемой плотности.
2. Осторожно промойте адгезивные клетки примерно 500–1000 объемами D-PBS и оставьте достаточное количество буфера, чтобы он покрывал дно лунки.
3. Аналогичным образом промойте суспензионные клетки и осадите их центрифугированием перед переносом в планшет.
4. В качестве отправной точки используйте примерно 100 мкл для плоскодонной лунки объемом 250–300 мкл, примерно 70 мкл для круглодонной лунки объемом 150–200 мкл или примерно 50 мкл для конической лунки объемом 100–150 мкл.
5. При необходимости произведите цитотоксические обработки.
6. Практический рабочий диапазон составляет примерно от 200–500 клеток/лунку как нижнего предела обнаружения до примерно 10^6 клеток/лунку как верхней исходной точки. Полезный диапазон зависит от прибора.

Оптимизация концентрации красителей

1. Подготовьте контрольные образцы живых и мертвых клеток и выберите

подходящие фильтры планшетного ридера и настройки чувствительности.

2. Определите минимальную концентрацию EthD-1, обеспечивающую близкую к максимальной флуоресценцию в мертвых клетках; подходящий исходный диапазон — 0,1–10 мкМ.
3. При постановке нового анализа отслеживайте временную динамику окрашивания, например с интервалами 10–15 минут.
4. Определите концентрацию Calcein AM, обеспечивающую пренебрежимо малый сигнал в мертвых клетках и четкий сигнал в живых; полезный исходный диапазон — 0,1–5 мкМ.
5. Используйте выбранные концентрации в последующих экспериментах.

Приготовление 2× рабочего раствора

Для получения конечной концентрации 1 мкМ Calcein AM и 2 мкМ EthD-1 после смешивания 1:1 с клеточной суспензией:

1. Добавьте 20 мкл 2 мМ стокового раствора EthD-1 к 10 мл D-PBS (≈ 4 мкМ EthD-1).
2. Добавьте 5 мкл 4 мМ стокового раствора Calcein AM и тщательно перемешайте (≈ 2 мкМ Calcein AM и 4 мкМ EthD-1).
3. Конечная концентрация DMSO после смешивания 1:1 с клеточной суспензией составляет примерно 0,1%.

Окрашивание

1. Внесите по 100 мкл клеточной суспензии в каждую лунку и добавьте 100 мкл 2× окрашивающего раствора.
2. Инкубируйте в течение оптимизированного периода; 30–45 минут при комнатной температуре является удобной отправной точкой.

Измерение флуоресценции и контроли

Используйте экспериментальные образцы одновременно с контролями живых/мертвых клеток, окрашенных отдельно каждым из красителей. Поддерживайте постоянными количество клеток, концентрацию реагентов, время инкубации, температуру и геометрию планшета во всех контролях и экспериментальных образцах.

Образец	Канал	Назначение	Условное обозначение
Экспериментальные клетки + Calcein AM + EthD-1	Calcein (F530) и EthD-1 (F645)	Измеряемый образец	F530 _{sample} и F645 _{sample}
Мертвые клетки + EthD-1	EthD-1 (F645)	Максимальный красный референс	F645 _{max}
Мертвые клетки + Calcein AM	EthD-1 (F645)	Минимальный красный референс/фон	F645 _{min}
Живые клетки + EthD-1	Calcein (F530)	Минимальный зеленый референс	F530 _{min}
Живые клетки + Calcein AM	Calcein (F530)	Максимальный зеленый референс	F530 _{max}
Бесклеточный буфер ± красители	Calcein (F530) и EthD-1 (F645)	Фоновый сигнал прибора/реагентов	F530 ₀ и F645 ₀

Интерпретация и расчет

После вычитания соответствующего фонового сигнала от контроля без клеток относительную долю живых и мертвых клеток можно оценить по откалиброванным диапазонам флуоресценции:

$$\% \text{ Live} = [(F530_{\text{sample}} - F530_{\text{min}}) / (F530_{\text{max}} - F530_{\text{min}})] \times 100\%$$

$$\% \text{ Dead} = [(F645_{\text{sample}} - F645_{\text{min}}) / (F645_{\text{max}} - F645_{\text{min}})] \times 100\%$$

где $F530_{\text{sample}}$ и $F645_{\text{sample}}$ — измеренные значения для образца в зеленом и красном каналах; $F530_{\text{max}}$ и $F530_{\text{min}}$ — значения для контролей зеленого канала; $F645_{\text{max}}$ и $F645_{\text{min}}$ — соответствующие значения для контролей красного канала. При необходимости перед расчетом следует вычесть значения фонового сигнала, измеренные в лунках без клеток ($F530_0$ и $F645_0$).

Важно! Эти уравнения дают оценки на основе калибровки. Для количественного анализа проверьте линейность и динамический диапазон для конкретного планшетного ридера, плотности клеток и условий анализа.

Определение абсолютного количества клеток

Интенсивность флуоресценции линейно зависит от количества клеток в образце. Полученное значение можно сопоставить со стандартной кривой зависимости интенсивности флуоресценции от количества мертвых клеток.

1. Проведите измерение жизнеспособности, как описано выше.
2. После измерения убейте все клетки в образце, например, добавлением 0,1% сапонины в каждую лунку.
3. Перемешайте и дайте сигналу EthD-1 стабилизироваться, обычно в течение примерно 10 минут.
4. Измерьте флуоресценцию EthD-1 при 645 нм.
5. Постройте калибровочную кривую с использованием известных количеств

мертвых клеток, окрашенных насыщающей концентрацией EthD-1.

6. Для оценки общего количества клеток используйте линейный участок кривой.

Протокол проточной цитометрии

1. Доведите все реагенты до комнатной температуры.
2. Приготовьте 50 мкМ рабочий раствор Calcein AM, разбавив 4 мМ исходный раствор в DMSO в соотношении 1:80. Используйте рабочий раствор в течение одного дня.
3. Приготовьте 1 мл клеточной суспензии с концентрацией примерно $0,1\text{--}5 \times 10^6$ клеток/мл.
4. Добавьте 2 мкл 50 мкМ Calcein AM и 4 мкл 2 мМ EthD-1 на каждый 1 мл клеточной суспензии. Осторожно перемешайте.
5. Инкубируйте 15–20 минут при комнатной температуре, защищая от света.
6. Проанализируйте образцы как можно скорее, предпочтительно в течение 1–2 часов после окрашивания.
7. Используйте возбуждение примерно при 488 нм. Практическая исходная конфигурация — 530/30 для Calcein и 610/20 для EthD-1.
8. Гейтируйте клетки для исключения дебриса и используйте однокрасочные контроли для стандартной компенсации флуоресценции.
9. Живые клетки должны формировать популяцию Calcein-положительных/с низким уровнем EthD-1, тогда как клетки с нарушенной целостностью мембраны должны формировать популяцию с низким уровнем Calcein/положительную по EthD-1.

Проточная цитометрия с использованием счетных микросфер

1. Подготовьте и окрасьте клетки, как описано в протоколе проточной цитометрии.
2. Доведите суспензию счетных микросфер до комнатной температуры и непосредственно перед отбором пипеткой встряхивайте на вортексе примерно 30 с.
3. Добавьте 50 мкл суспензии счетных микросфер на каждый 1 мл окрашенного образца и перемешайте.
4. Незамедлительно проведите сбор данных с возбуждением 488 нм и теми же каналами зеленой/красной флуоресценции, которые использовались для анализа жизнеспособности.
5. Установите порог прямого светорассеяния достаточно низко, чтобы сохранить счетные микросферы. Гейтируйте клетки отдельно от микросфер и исключайте дебрис.
6. Соберите не менее 1000 событий микросфер для статистически полезной оценки объема образца.
7. Если микросферы невозможно разделить при выбранных параметрах флуоресценции, используйте другую комбинацию параметров светорассеяния/флуоресценции для гейта микросфер.
8. Расчет абсолютной концентрации клеток:

$$\text{Концентрация клеток (клеток/мкл)} = (A \times C) / (B \times D)$$

где **A** — количество событий клеток; **B** — количество событий микросфер; **C** — заданное количество микросфер в использованной аликвоте микросфер (микросфер на аликвоту); **D** — объем образца, представленный проанализированной клеточной суспензией (мкл).



22.09.509-QM
Issued by INSPECT



www.lumiprobe.com

