



CFSE/PI细胞毒性检测试剂盒说明书

货号：WGD-X-3100142

一 产品介绍

CFSE(Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester)是一种细胞膜渗透性荧光染料，CFSE 以非活性形式(CFDA-SE)进入细胞，被胞内酯酶水解生成荧光产物 CFSE，并与细胞内蛋白的氨基共价结合，形成稳定标记。激发波长约 490nm，发射波长 520nm（绿色荧光），兼容流式细胞仪的 FL1 通道。标记稳定性高，适用于长期追踪实验。

碘化丙啶（PI）是一种常用的高灵敏度、高特异性的细胞核荧光染料。PI 能够嵌入双链 DNA 或 RNA 碱基之间，在激发光下发出红色荧光。PI 在水溶液中的最大激发/发射波长是 493/636 nm，当与核酸结合后，荧光信号明显放大到 20～30 倍，其最大激发/发射波长转变为 535/617 nm。PI 作为一种非细胞膜渗透性荧光染料，不能穿透具有生物活性的细胞膜而被排斥在活细胞外，广泛应用于细胞凋亡与坏死检测、细胞周期分析及死细胞鉴定等。

CFSE/PI 细胞毒性检测试剂盒是利用 CFSE 标记靶细胞，与效应细胞共培养后，通过 PI 标记死细胞以评估细胞毒性作用。根据不同的实验方案设计，可以用于检测杀伤性 T 细胞或 NK 细胞介导的细胞毒性作用，也可用于检测化合物的细胞毒性作用。

二 产品目录

产品名称	规格
CFSE/PI 细胞毒性检测试剂盒	100 rxns
	500 rxns

三 产品组成

组分	100 rxns	500 rxns
CFSE	100 rxns	100 rxns × 5
DMSO	0.2 mL	1 mL
PI 染色液	0.5 mL	1.25 mL × 2

四 产品用途

本产品用于检测杀伤性 T 细胞或 NK 细胞介导的细胞毒性作用，也可用于检测化合物的细胞毒性作用，通过流式细胞仪、荧光显微镜等设备进行检测。

五 产品特点

- 广泛适用：适用于多种效应细胞与靶细胞，染料细胞毒性小，可用于原代细胞标记与检测。
- 标记持久：靶细胞荧光标记持续时间较长，满足长时间细胞杀伤实验。
- 精准检测：基于流式细胞仪可实现单细胞精度的细胞死活检测，并通过荧光标记有效区分效应细胞与靶细胞。
- 兼容性高：可在检测细胞毒性的同时，通过流式抗体检测多种细胞表位，为研究提供有力数据。

六 注意事项

- CFSE 溶解后可放置于-80℃保存 1 年，避免反复冻融，建议分装保存。
- 气温较低时 DMSO 会凝固，请先在 37℃水浴至溶解液完全融解后再进行配制，配制过程中注意避免溶液凝固，保持温度至 CFSE 溶解完全。
- PI 染色液在开盖前请短暂离心，将盖和管内壁上的液体离心至管底，避免开盖时试剂损失。
- 荧光染料均存在淬灭问题，应尽量避免光，以减缓荧光淬灭。
- PI 染色后宜尽快检测，时间过长可能会导致坏死细胞数量的增加。



6. PI 是已知的诱变剂，属于潜在致癌物，因此 PI 溶液在丢弃之前需要先经过活性炭处理。
7. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴口罩与一次性手套操作。
8. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗。

操作步骤

1. CFSE 工作液配制步骤：

1.1 CFSE 储存液（5 mM）配制：取出 DMSO 放置于室温平衡，完全融化后使用移液器吸取 100 μ L DMSO 加入 CFSE 管中充分混匀。配制完成后请及时使用，剩余储存液放置于 -80 $^{\circ}$ C 保存。

1.2 CFSE 染色工作液（5 μ M）配制：取 1 μ L CFSE 储存液加入 1 mL PBS 缓冲液中（推荐使用 5 μ M，根据实验需求可在 1 ~ 10 μ M 范围内选择合适浓度）。

2. 靶细胞 CFSE 染色标记步骤：

2.1 取 1×10^6 个待标记细胞，离心弃上清后，使用 1 mL CFSE 染色工作液重悬。

2.2 将细胞放置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱孵育 10 ~ 20 min。

2.3 加入 5 mL 完全培养基，37 $^{\circ}$ C 孵育 5 min，离心弃上清。

2.4 使用合适体积完全培养基重悬细胞，用于后续实验。

注意：染色工作液浓度和染色时间可根据实验需要自行调整，正式实验前建议进行预实验。

3. 效应细胞或者毒性药物处理步骤：

收集待检测的靶细胞进行相应的毒性药物处理或者效应细胞处理，效应细胞和靶细胞比例根据需要自行设定。

4. PI 染色标记步骤：

4.1 收集制备好的处理过的细胞样品，离心后用 200 μ L PBS 缓冲液重悬。

4.2 在细胞重悬液中加入 5 μ L PI 染色液，混匀后尽快上机检测，孵育时间过长（>10 min）可能导致假阳性，使用流式细胞仪或荧光显微镜检测。

注意：染色工作液浓度和染色时间可根据实验需要自行调整，正式实验前建议进行预实验。

5. 细胞检测步骤：

5.1 流式细胞仪检测：CFSE 的绿色荧光在 FL1 通道检测；PI 的红色荧光在 FL2 或 FL3 通道检测，建议使用 FL3，每个样本采集 10,000 events。用 FlowJo 等软件进行数据分析，FL1 为横坐标，FL3 为纵坐标，根据 CFSE 和 PI 荧光值分群划定十字门。典型的实验中细胞可分为四个亚群：被杀伤死亡的靶细胞为双阳性（CFSE⁺/PI⁺），未被杀伤的靶细胞为单阳性（CFSE⁺/PI⁻），死亡效应细胞为单阳性（CFSE⁻/PI⁺），存活效应细胞为双阴性（CFSE⁻/PI⁻）。

5.2 荧光显微镜检测（可选）：被杀伤的靶细胞同时带有红色与绿色荧光，未被杀伤的靶细胞仅带有绿色荧光，死亡效应细胞仅带有红色荧光，存活效应细胞不带荧光。

储存及运输条件

-25 ~ -15 $^{\circ}$ C 保存，有效期为 24 个月。2 ~ 8 $^{\circ}$ C 运输。

常见问题及解决方法

常见问题	可能原因	解决方法
CFSE 荧光强度过高	染色孵育时间过长或浓度偏高	减少孵育时间或重新摸索染色最适工作浓度（1 ~ 10 μ M）。
CFSE 染色后细胞状态差		
CFSE 荧光强度过低	染色孵育时间不够或浓度偏低	增加孵育时间或重新摸索染色最适工作浓度（1 ~ 10 μ M）。
染色效果变差	CFSE 染料降解	重新配制 CFSE 染色工作液并分装保存。
流式检测细胞分群不清晰	CFSE 与 PI 存在补偿	制备单阳管调节补偿。
	荧光强度异常	使用 561nm 激光器检测 PI。 调整染色与功能实验方案。