



BCECF, AM

——pH 探针

产品货号	包装规格
C028	1 mg
C029	500 µl

储存条件：-20°C，避光保存。

产品说明书

安迪福诺生物科技（武汉）有限公司

ABP Biosciences Inc

武汉市东湖新技术开发区高新大道666 号

光谷生物城生物创新园 C2-4 栋 5 楼

电话： 400-0667-718

邮箱： sales@abpbio.cn

网址： www.abpbio.com (英文)

www.abpbio.com.cn (中文)

BCECF, AM

产品货号: C028/C029

产品介绍

BCECF (2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxy fluorescein) 全称 2',7'-二-(2-羧乙基)-5(6)-羧基荧光素，被广泛地用于细胞内 pH 的测定。1982 年，Tsien 博士和其他人通过加入 2 个额外的羧化物基团改进了这种羧基荧光素。加入的两个羧基使得它能更好地被固定在细胞内。BCECF 具有很好的水溶性，是因为它在中性 pH 时带有 4~5 个负电荷。其 AM 形式的乙酰酯衍生物具有膜通透性，可以被动的穿过细胞膜。且 BCECF AM 本身不发荧光，通过胞内酯酶作用后成为 BCECF 发出荧光信号，可以作为细胞活力的判断依据之一。

BCECF 在适当的 pH 值情况下可以被激发形成绿色荧光。最大激发波长和发射波长因 pH 的不同而有所不同，最大激发波长在 503 nm 左右，最大发射波长在 520 nm 左右。实际检测时推荐使用的激发波长为 488 nm，发射波长为 535 nm。

BCECF, AM 不仅被广泛用于哺乳动物细胞的研究，也有报道用于动物组织、植物细胞、细菌和酵母等的细胞内 pH 水平检测。在有细胞内 pH 变化的细胞毒性、细胞凋亡、细胞粘附、药物抵抗、细胞趋化等过程中 BCECF, AM 被广泛应用。

产品特性

- 7.0 的 pKa 值是理想匹配到正常范围的细胞质的 pH（约为 6.8-7.4）；
- 荧光激发特性是 pH 依赖型，可以进行比率测定；
- 具有最大吸光度的 BCECF 碱形式激发谱非常接近 488 nm 氩激发，适合应用于激光共聚焦显微镜及流式细胞仪。

注意事项

- 荧光染料不可避免的存在淬灭问题，请存放及操作时尽量注意避光，以减缓荧光的淬灭。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

操作指南

配制 BCECF, AM 储存液

BCECF AM 需用无水 DMSO 配制，配制成 1~10 mM 的储存液。BCECF AM 储存液置于 $\leq -20^{\circ}\text{C}$ 干燥条件下保存。按照推荐的储存条件，该储存液可稳定保存至少 6 个月。常用的 BCECF, AM 工作液浓度为 1~10 μM ，使用去离子水进行稀释，现用现配，不建议将工作液进行保存。

哺乳动物细胞染色

低浓度的 BCECF AM 染色哺乳动物细胞时，大多数情况下可不经细胞透化处理。当染料分子进入细胞之后，在非特异的酯酶水解作用下去 AM 前体，形成 pH 敏感、具有荧光信号的

BCECF 探针，从而被滞留在细胞内产生明亮的荧光信号。一般来讲，BCECF 可在胞浆内自由的游离分布并富集，并不能扩散至胞外。

1. 制备细胞悬液，细胞密度约为 1×10^6 cells/ml。

注意：对于贴壁细胞，也请尽量保证细胞浓度约为 10^6 cells/mL，并使用相同的染色条件。

2. 使用缓冲溶液（如 HBSS、PBS 缓冲液等）将 1 mM BCECF AM 储存液稀释 100~500 倍。

注意：在保证获得较好的染色结果前提下，建议尽量使用最低浓度的染色液。通常情况下，应尽量减少 AM 酯的水解副产物（甲醛和乙酸）的富集，低至 $0.1 \mu\text{M}$ 的 BCECF AM 染色工作液已足以获得较好的染色效果。用于稀释储存液的染色液不应该含有氨基酸分子，比如稀释缓冲液中不应该含有伯、仲胺基基团，因为这些胺类有机分子可促成染料分子的水解，使其进入细胞之前很可能被剪切成 BCECF，从而影响荧光信号强度。另外，血清中很可能含有内源性的酯酶等，在染色完成前也须避免。

3. 按体积比 1:1 将稀释的 BCECF AM 染液加入细胞悬液中，混匀。4□或 37□孵育 15~60 分钟。

4. 使用新鲜的细胞培养液洗涤细胞，重复一次。

5. 使用荧光显微镜或带有图像分析系统的激光共聚焦显微镜检测细胞的荧光强度。

组织样本染色

组织样本的染色处理方法与哺乳动物细胞染色类似，比如大鼠动脉、大鼠唾液腺和胰腺、大鼠肾脏、兔胃腺体等。

1. 处理这些组织样本时，将样本安置在灌注室，建议以 $1 \sim 5 \mu\text{M}$ 的 BCECF,AM 工作浓度配制好灌流液，灌注时间为 5~60 分钟。随后用未改性的灌流液（普通灌流液）充分洗涤样本。

2. 对于细胞间质的 pH 测量，可以通过直接注射 $0.2 \sim 0.5 \text{ mM}$ BCECF 酸的方法，获得一个短暂的脉冲。BCECF 酸可以通过扩散作用被加载到分离的细胞或组织切片中，再通过荧光成像仪成像、或用电生理记录仪记录。

其它类型细胞染色

细菌：革兰氏阳性菌和阴性菌都可以通过简单的酸休克反应（ 0.5 mM BCECF 酸溶于 5 mM 的 HCl 溶液中，处理细菌细胞 5 分钟）从而完成 BCECF 染色。置于冰上孵育时，染料可以很好的滞留在细胞内，但在乳糖的刺激下可以导致电位变化，继而导致染料自胞内快速流出。

酵母菌与真菌：尝试用浓度为 $10 \mu\text{M}$ 的 BCECF AM 的孵育细胞，但结果显示染料对这两种菌的染色效果并不理想，可能是由于酵母细胞内的酯酶水解效率较低，在 *Neurospora crassa* 真菌内染色的结果甚至为染料不均匀分布，导致出现空泡堆积。

植物：培养悬浮原生质体（ 2×10^6 cells/ml），利用低浓度（ 10 nM ）的 BCECF AM 可以得到染料在胞内均匀分布的结果，而高浓度（ $3 \mu\text{M}$ ）的 BCECF AM 在加载到玉米根毛细胞中的结果显示染料基本富集于液泡中。

细胞内 pH 的校准

1. BCECF 具有 pH 依赖性的光谱位移，通过计算不同激发波长下的荧光素发射波的光密度比（见公式 1），从而计算出 pH 的变化情况。该比率计算公式不考虑光漂白、非均匀的加载指示灯以及细胞厚度、仪器稳定性等影响因素。

$$\left[\text{H}^+ \right] = K_a \frac{(R-R_A)}{(R_B-R)} \times \frac{F_{A(\lambda_2)}}{F_{B(\lambda_2)}} \quad (1)$$

其中，R 是测得的 $F_{(\lambda_1)}/F_{(\lambda_2)}$ 比值，F 代表分别在两个波长 λ_1 和 λ_2 下测得的荧光强度，下标 A 和 B 分别表示在酸性和碱性滴定的终点值。

注意：必须减去背景荧光信号值，从而校正计算 R 值。

通常 BCECF 计算应该用到双激发比率， $\lambda_1=490$ nm， $\lambda_2=440$ nm，其固定发射波长在 535 nm。荧光显微镜所用双激发滤光器可以参考 Omega Optical Inc.

(www.omegafilters.com, set XF16)和 Chroma Technology Corp. (www.chroma.com, set 71001)。

2. 对于激光共聚焦显微镜，用 442 nm 的氦-镉激光器与 488 nm 的氩离子激光器进行组合激发。

注意：以上提到的公式（1）中的 λ_2 激发波长选择 pH 非依赖性等色点（如，BCECF 为 439 nm），而不是用标准化因子 $F_{A(\lambda_1)}/F_{B(\lambda_2)}$ 。

虽然 BCECF 的发射光对于 pH 的依赖性要比激发光低得多，但是在 488 nm 的激发光条件下，其 525 nm/ 640 nm 的发射光谱比率也会偶尔应用于流式细胞仪上的 pH 计算。

公式（1）的对数形式为：

$$\text{pH} = \text{pK}_a - \log \frac{(R-R_A)}{(R_B-R)} \times \frac{F_{A(\lambda_2)}}{F_{B(\lambda_2)}} \quad (2)$$

这里可以得到一个线形图，斜率与截距 pKa 相等。控制胞外 pH 的缓冲液为 7.0，校准 BCECF 的荧光响应。当然，由于染料荷载的进行，这种相应可能会发生变化，最好能够为每次的实验体系进行原位校准，可以通过在离子载体存在的条件下，使用 100~150 mM 含 10~50 μM 的离子载体尼日利亚菌素的钾盐溶液将胞内的 pH 与胞外对照培养基进行平衡。BCECF 的原位校准方法在大量文献中已见报道。

细胞功能分析

利用 BCECF AM 在胞内的酯酶水解特点可以判断细胞膜的完整性、细胞活力指标等荧光细胞毒性实验。细胞毒性实验用 BCECF 可以应用于高通量的酶标仪。细胞粘附实验也可利用 BCECF AM 的类似特点。一个典型的例子是：CHO 细胞接种微孔板，然后再接种事先染上了 2 μM BCECF AM 的鼠 R1.1 细胞，在 37°C 环境下孵育 20-30 分钟。然后将平板洗涤，并检测结合滞留下来的 R1.1 细胞数。该细胞数与荧光强度正相关，可以通过荧光酶标仪检测读值。