

PKH67 常规细胞膜标记试剂盒

产品信息

| 产品名称 | 编号 | 规格 |
|------------------|---------|-----------|
| PKH67 常规细胞膜标记试剂盒 | DY50232 | 0.1ml/1ml |

产品描述

亲脂性荧光染料 PKH67(Green) 适用于常规细胞膜标记。PKH67 常规细胞膜标记试剂盒采用膜标记技术，能够将带有较长脂质尾巴的绿色荧光染料结合到细胞膜脂质区域上。染色方式依赖于细胞与膜的类型，主要用于细胞体外标记、体外细胞增殖研究及体内外细胞示踪研究。试剂盒中提供染色过程中所需的溶剂（稀释液 C），该溶剂可以在染色过程中，增加染料溶解度和染色效率，同时维持细胞活力。稀释液 C 与哺乳动物细胞等渗，且不含去垢剂或有机溶剂，也不含生理盐水和缓冲盐。根据细胞类型及标记后细胞膜内在的变化，标记后的细胞表面会由均一透亮变得有点状凸起或补丁状。但在生理范围内，PKH67 荧光不受 pH 的影响，每个细胞的荧光强度与染料标记位置无关。

PKH67 标记细胞呈绿色荧光 ($\lambda_{ex}=490\text{ nm}$, $\lambda_{em}=502\text{ nm}$)，可用来标记追踪体内外多种细胞。PKH67 最常被用于基于染料稀释增殖的分析的染料稀释应用，包括建立抗原特异性前体频谱和正常或肿瘤组织中静止或缓慢干细胞或祖细胞的鉴定。同时 PKH67 也可用于监测外来病毒、血小板、外泌体和其他纳米颗粒的摄入；干细胞分裂过程中膜的分配；细胞-细胞之间膜的转移；细胞吞噬作用；抗原呈递；粘附；通过间隙连接的信号传递；以及组织切片中的神经元迁移。PKH67 荧光稳定性很强，可用于超过一周的体内细胞追踪研究。

保存方式

2-8°C避光保存，有效期 1 年

产品组成

| 产品编号 | PKH67 染料 | 稀释液 C |
|---------------|----------|-------|
| DY50232-0.1ml | 0.1ml | 10ml |
| DY50232-1ml | 1ml | 60ml |

操作说明

本过程可用于体内体外细胞的标记，包括干细胞、淋巴细胞、单核细胞、内皮细胞、神经细胞或者任何其他细胞。体内细胞的标记过程需一定的改进，如血小板的染色，或者选择性标记吞噬细胞。下述染色过程中细胞浓度和染料浓度代表操作的起始浓度。该浓度被证明适用于多种细胞。使用者需通过评估染色后细胞活率（如，PI 染色）、荧光强度、染色均匀度及是否对所研究细胞功能有影响等，根据实验目的，确定最优的染料浓度和细胞浓度。

(1) 胰酶和/或 EDTA 消化细胞形成单细胞悬液，将 2×10^7 个细胞于锥形离心管中，用无血清培养基洗一次。注意：血清蛋白和脂质会与染料结合，降低与细胞膜结合的染料浓度。最好在用稀释液 C 重悬细胞染色前（第四步）用无血清培养基或缓冲液洗细胞一次（第一步）。

(2) $400 \times g$ 离心 5 分钟形成松散的细胞团。注意：PKH67 染料不能直接加到离心沉淀中，这样会造成细胞染色不均一和细胞活力降低。

- (3) 离心后，小心吸弃上层清液，细胞团上剩余液体<25ul。注意：为得到可重复的实验结果，在用稀释液 C 重悬时，减少残留培养基或缓冲液体积。
- (4) 加入 1mL 稀释液 C，用移液管轻轻吹打混匀，制备 2×细胞悬液。重悬细胞保证完全离散，别震荡，不要让细胞在稀释液 C 中保存太长时间。注意：生理盐的存在会使得染料结团并大幅降低染色效率。需确保染色时细胞悬浮于稀释液 C 中，不含培养基或缓冲盐。
- (5) 临染色之前，将 4μL PKH67 染料加入 1mL 稀释液 C 中，充分混匀，配制的 2×染色液。
- (6) 快速将 1mL 2×细胞悬液（步骤 4）加入 1mL 2×染色液（步骤 5）中，立即用吸管均匀快速混合样品，因为均匀的染色是在瞬间发生的，整个混合过程要保证快速（最终细胞浓度为 $1 \times 10^7/\text{mL}$ ）。
- (7) 混匀后的染色的细胞 25°C 孵育 2-5min，定时轻轻颠倒离心管保证充分混匀。由于染色速度较快，延长孵育时间对实验没有帮助。
- (8) 加入等体积的血清（2mL）或 1%BSA 中止染色反应，孵育 1min 以结合多余的染料。
- (9) 将细胞在 20-25°C 条件下 400×g 离心 10 min，小心吸弃上清。用 10mL 完全培养基（含血清的组织培养基）重悬，将重悬液转移至另一新的无菌离心管中，20-25°C 条件下 400×g 离心 5 min。用 10mL 完全培养基再清洗两遍以除去没结合的染料。
- (10) 最后一步清洗后，用 10mL 完全培养基重悬细胞评估细胞回收率，细胞活率和荧光强度。离心重悬细胞至所需活细胞浓度。注意 1：染色后的细胞可以用中性甲醛固定，避光条件下，荧光强度至少 3 周内保持稳定。
- (11) 荧光显微镜/流式细胞仪分析细胞。检查细胞复苏情况、传代情况及荧光浓度。

本操作步骤适用于外泌体染色过程

- 1、外泌体蛋白定量：取适量外泌体进行 BCA 蛋白浓度测定以确定外泌体蛋白量；
- 2、染料工作液制备：用稀释液 C 将 PKH67 染料稀释 10 倍（避光操作，工作液应根据实验用量适当配置，现配现用）；
- 3、外泌体染色：
 - (1) 在外泌体中加入染料工作液，建议加入剂量如下：

| 外泌体蛋白量 | 加入染料工作液剂量 |
|-------------|-----------|
| 10-200 ug | 50ul |
| 200-500 ug | 100ul |
| 500-1000 ug | 200ul |

- (2) 加入染料工作液后将离心管盖紧，通过涡旋振荡器混匀 1 min，再静置孵育 10min；
- (3) 向孵育后的外泌体-染料复合物中加入 10 mL 的 1X PBS 混匀；
- (4) 按照外泌体提取方法再次提取外泌体以去除多余染料；
- (5) 取 200 μL 1×PBS 重悬沉淀物，沉淀即为染色后的外泌体。

注意事项：

1. 染料的工作液随用随配，不要将配好的染料贮存，影响染色效果。
2. 整个实验操作过程应在无菌条件下进行。
3. PKH67 染色过程中，不能存在叠氮化物或代谢毒性物。
4. 虽然贴壁细胞也可以染色，但为获得均匀染色，单细胞悬液最佳。因此用蛋白酶（trypsin/EDTA）将贴壁细胞消化，形成细胞悬液效果较好。
5. 盐的存在会导致染料形成颗粒，干扰染色反应。因此，加染料前细胞重新悬置是很重要的。染料应直接加到细胞悬液中，而不是加到细胞团上。
6. 制备和保存含 PKH 标记细胞切片时要冰冻切片和特殊的封固标本技术。

本产品仅作科研用途