DiO 细胞膜绿色荧光染色试剂盒

DiO Cell Membrane Green Fluorescent Staining Kit

使 用 说 明 书

版本号：231111

货号及规格：

目录编号	包装规格
P343-01	100-1000T

试剂盒组成、储存、稳定性：

组分编号	组分名称	储存	P442-02(10T)
M343-1	DiO 细胞膜绿色荧光探针	-20℃	400uL
M343-2	染色缓冲液	-20℃	100mL

储存条件：干冰运输，-20℃避光保存，探针避免反复冻融，有效期至少 6 个月。

产品简介：

DiO 又称 $DiOC_{18}(3)$，中文全称 3-十八烷基-2-[3-(3-十八烷基-2(3H)-苯并恶唑-2-亚基)-1-丙烯-1-基]苯并恶唑高氯酸盐，分子量 881.72，是一类具有亲脂性的长链二烷基碳菁类染料荧光染料，常用于标记细胞膜以及其他脂溶性生物结构。DiO 进入细胞膜后可以侧向扩散，逐渐使整个细胞膜被染色。DiO 在进入细胞膜之前荧光非常弱，当与细胞结合后荧光强度会大大增强，被激发后可以发出绿色荧光，并可以用标准的 FITC 滤光片检测。DiO 最大激发波长 484nm，最大发射波长 501nm。根据 DiO 的特性，其可以用于活细胞以及固定细胞的染色。此外 DiO 探针一般不影响细胞的生存能力，故可正向或逆向的标记细胞或某些物质(外泌体)用作示踪检测。

本产品 DiO 细胞膜绿色荧光染色试剂盒，包含 DiO 荧光探针及优化的染色缓冲液，使细胞膜染色更加快速、荧光更加明亮稳定、效果更好。

操作步骤：

1. **DiO 染色工作液配制：**将 DiO 细胞膜绿色荧光探针与染色缓冲液以 1:250 比例混合稀释，配制成 DiO 染色工作液(现配现用)。

   注意：DiO 探针稀释比可根据具体情况在 1:250-1:500 进行调整，以获得最佳染色效果。

2. 悬浮活细胞染色：

1) 收集悬浮细胞，以 500-1000xg 室温离心 3-5 min，去除细胞上清。
2) 使用 DiO 染色工作液重悬细胞，使细胞密度在 1-2×10^6 个/mL。
3) 置于 37℃避光孵育 5-20 min；建议根据具体细胞调整染色时间，以获得最佳染色效果。
4) 孵育结束后，500-1000xg 室温离心 3-5 min，吸除 DiO 染色工作液。
5) 用 37℃预热的 PBS 或细胞培养基重悬细胞，500-1000xg 离心 3-5 min，去除上清。
6) 重复 2.5 步骤一次。
7) 流式细胞仪上机检测，或将细胞转移至多孔板、细胞培养皿或者载玻片上，在荧光显微镜下观察。DiO 最大激发波长 484nm，最大发射波长 501nm。

3. 贴壁活细胞染色(6 孔板为例)：

1) 将细胞提前以一定密度种植于 6 孔板中。
2) 吸除细胞培养基，用 PBS(货号：C511)洗涤细胞 2 次。加入 1 mL DiO 染色工作液(其他规格孔板，视情况调整，保证染料覆盖细胞)。
3) 置于 37℃避光孵育 5-20 min，吸除 DiO 染色工作液。建议根据具体细胞调整染色时间，以获得最佳染色效果。
4) 用 37℃预热的 PBS 或细胞培养基，洗涤细胞 1-2 次。
5) 加入 37℃预热的 PBS 或细胞培养基，荧光显微镜下观察。DiO 最大激发波长 484nm，最大发射波长 501nm。

4. 固定的贴壁细胞染色：

1) 样本前处理：去除细胞培养基，PBS 洗涤 1-2 次。加入 4%多聚甲醛固定液(货号：M329)，室温固定 10 min。吸除固定液，用 PBS 洗涤 2-3 次。
2) 加入 0.1-0.5% Triton-100(货号：M392 或 PBS 配制)处理细胞，室温通透 10 min；吸除通透液，用 PBS 洗涤 2-3 次。
3) (可选，免疫荧光标记)按照免疫荧光染色的方法进行抗体的孵育或其他染料进行染色。

   注意：抗体孵育过程中的封闭液、抗体稀释液、洗涤液等不能含有去垢剂。
4) 加入适量体积的 DiO 染色工作液覆盖细胞，37℃避光孵育 5-20 min，吸除 DiO 染色工作液。建议根据具体细胞样本调整染色时间，以获得最佳染色效果。
5) 细胞经 PBS 洗涤 2-3 次，然后置于荧光显微镜观察(细胞需以适量 PBS 覆盖)。DiO 最大激发波长 484nm，最大发射波长 501nm。

5. 外泌体荧光标记：

1) 将提取的外泌体沉淀，用适量 DiO 染色工作液重悬。
2) 将样品置于 37℃避光孵育 30 min。
3) (可选)用 10 倍体积 PBS 稀释样品体积(可选)。
4) 按照之前提取获得外泌体的方案，再一次提外泌体，以去除多余的染料。
5) 收集的外泌体沉淀，用 PBS 重悬，得到 DiO 标记的外泌体。可用于相应的后续实验(例如细胞摄取等)。

注意事项：

1. 荧光染料均存在淬灭问题，请注意避光以减缓荧光猝灭。
2. 探针亲脂性的特点，实验过程中请避免使用含有甘油或其它有机物的试剂，否则会影响染色效果。
3. 当需要固定操作时，样品宜在 4%多聚甲醛中(货号：M329)进行固定，其他不适当的固定液会导致荧光背景高。
4. 由于细胞间敏感性和实验目的的不同，探针的最佳稀释比和最佳孵育时间需根据实际情况适当调整。
5. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
6. 本制品仅供科研使用，严禁用于临床诊断和药物等用途。

==========

扫码关注我们