

细胞膜红色荧光染色试剂盒(PKH26)

产品编号	产品名称	包装
C2071S	细胞膜红色荧光染色试剂盒(PKH26)	50次
C2071M	细胞膜红色荧光染色试剂盒(PKH26)	250次
C2071L	细胞膜红色荧光染色试剂盒(PKH26)	1000次

产品简介:

- 碧云天的细胞膜红色荧光染色试剂盒(PKH26), 即Cell Plasma Membrane Red Fluorescence Staining Kit with PKH26, 是一种以PKH26为荧光探针, 并提供了染色增强剂、能快速灵敏地对细胞膜进行红色荧光染色和标记的试剂盒。
- 本产品和Sigma公司的PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kits for General Cell Membrane Labeling (MINI26, MIDI26, and PKH26GL)的染色原理和使用方法基本一致。
- PKH26是一种新型的可用于细胞膜、外泌体标记和示踪的荧光探针, 分子式为 $C_{59}H_{97}IN_2$, 分子量为961.32, CAS号为154214-55-8, 呈现红色荧光。PKH26结构上带有较长的脂肪族碳尾(Carbon tails), 能稳定插入细胞膜、外泌体膜等的脂质区域[1-2]。PKH26荧光背景低, 脂溶性高, 荧光染色效果依赖于细胞与膜的类型, 主要用于细胞体外标记、体外细胞增殖研究以及长期的体内外细胞示踪研究。PKH26具有较长的体内半衰期, 超过100天, 有利于长期的体内研究。因此PKH26非常适合用于示踪研究, 也适用于细胞增殖研究和其它长期实验。PKH26与其它绿色PKH探针互补, 在混合细胞群里能定量分析, 且不会受PKH2、PKH67或FITC标记的影响[3-5]。碧云天同时提供细胞膜绿色荧光染色试剂盒(PKH67) (C2073)。
- PKH26可以稳定地与细胞膜脂质区结合并呈现明亮的红色荧光。荧光处于黄-橙色光谱区间, PKH26和细胞膜脂质结合后的激发光谱和发射光谱参考图1。其中, 最大激发波长为551nm, 最大发射波长为567nm。

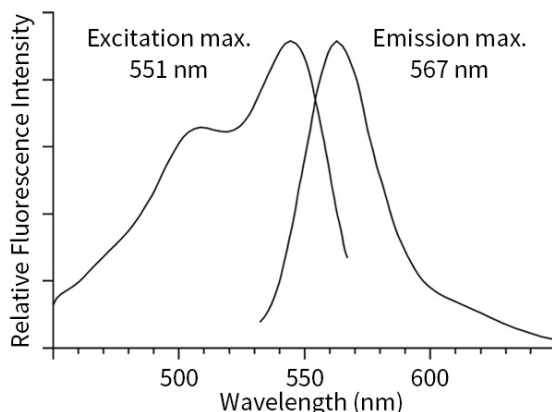


图1. PKH26和细胞膜脂质结合后的激发光谱和发射光谱。

- 本试剂盒除了细胞膜荧光标记外, 还可以用于细胞增殖分析以及鉴定正常或肿瘤组织中静止或缓慢分裂的干细胞或祖细胞。PKH26也被用于监测外泌体、病毒、血小板和其它纳米颗粒的摄取, 干细胞分裂过程中膜的分配, 细胞之间的膜转移, 细胞吞噬作用, 抗原递呈, 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。由于其极其稳定的荧光, PKH26通常是体内细胞示踪研究中细胞荧光染料的优选, 特别是标记的细胞研究周期超过一周的检测[6-8]。
- 本试剂盒提供的Assay Buffer与哺乳动物细胞等渗, 且不含去垢剂。在生理pH范围内, PKH26荧光强度通常不受染料定位模式的影响, 因此不影响染色效果。但为避免影响细胞活力, 不宜将细胞暴露在染色稀释液中过长时间。
- 本试剂盒提供了Staining Enhancer, 使细胞膜染色更加快速, 荧光染色更加明亮, 染色背景更低。
- 本试剂盒可以直接染色活的细胞或组织的细胞膜, 染色时间通常为5-20分钟。对于固定的细胞或组织, 通常宜使用配制在PBS中的4%多聚甲醛固定液(P0099)进行固定, 使用其它固定液可能会导致荧光背景较高。本试剂盒对L929细胞的染色效果请参考图2。

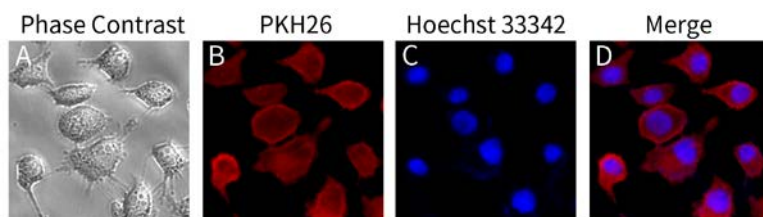


图2. 碧云天细胞膜红色荧光染色试剂盒(PKH26) (C2071)对L929细胞的荧光染色效果图。PKH26染色液加入后37°C孵育5分钟,

然后4°C孵育15分钟，最后再进行Hoechst 33342染色。PKH26染色呈现非常明亮的红色荧光，而Hoechst 33342染色呈现蓝色荧光。本试剂盒不提供Hoechst 33342，如有需要，可自行选购Hoechst 33342染色液相关产品(C1022/C1025-C1029)等。实际的染色效果会因为实验条件、检测仪器的不同而存在差异，本图仅供参考。

➢ 96孔板每孔检测体系的总体积为100μl时，或每个流式细胞检测的细胞数为100万时，本试剂盒小包装、中包装和大包装分别可以进行50次、250次和1000次检测。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
C2071S-1	PKH26 (250X)	20μl
C2071S-2	Staining Enhancer (400X)	20μl
C2071S-3	Assay Buffer	5ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
C2071M-1	PKH26 (250X)	100μl
C2071M-2	Staining Enhancer (400X)	100μl
C2071M-3	Assay Buffer	25ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
C2071L-1	PKH26 (250X)	400μl
C2071L-2	Staining Enhancer (400X)	400μl
C2071L-3	Assay Buffer	100ml
—	说明书	1份

保存条件：

-20°C保存，一年有效。PKH26 (250X)须避光保存。Staining Enhancer (400X)和Assay Buffer也可4°C保存，至少3个月有效。

注意事项：

- PKH26 (250X)易水解并且其溶剂易挥发，第一次使用时请分装成小包装后-20°C保存，以避免反复冻融并减少挥发。PKH26 (250X)每次取用时，请注意尽量减少开盖的时间，尽量即开即用，用后立即盖紧盖子。如果因为未及时盖紧盖子导致液体的挥发，后续使用时可以先测量体积，并按照实际的有效浓度进行使用。
- PKH26 (250X)在-20°C、4°C等较低温度情况下会凝固而粘在离心管管底、管壁或管盖内，可在室温或37°C水浴片刻至全部融解后，使用BeyoFuge™掌上离心机(5000rpm) (E6686)快速离心3-5秒，使附着在管盖或管壁上的PKH26 (250X)聚集于管底。
- 含血清、BSA或BSA类似物的溶液对本PKH26的标记有干扰，须避免。
- PKH26染色时，体系中不能含有叠氮化物或严重抑制细胞正常代谢的毒性物质。
- PKH26 (250X)不宜直接加入到细胞培养液中进行染色，否则将导致异质染色并降低细胞活力。
- 荧光酶标仪检测时须使用适合荧光检测的黑板或白板，推荐使用碧云天BeyoGold™全黑96孔细胞培养板(平底带盖，独立包装) (FCP966)或BeyoGold™黑色透明底96孔细胞培养板(平底带盖，独立包装) (FCP965)。
- Assay Buffer经过滤除菌处理，在使用时须注意避免微生物污染，否则很可能严重影响染色效果。如果Assay Buffer发生浑浊等明显的微生物污染，就不能继续使用。
- 本试剂盒可以对贴壁细胞进行标记，但使用单细胞悬浮液可以获得更均匀的染色。可以将贴壁细胞先消化并收集细胞，重悬后分散制备成单细胞悬液，可获得更佳的染色效果。
- 荧光染料均存在淬灭问题，请尽量注意避光，以减缓荧光淬灭。
- 如果染色时间过长或染色后细胞继续培养，探针也可能进入细胞内而染色其它细胞器的膜。
- PKH26 (250X)有易燃性，操作时请小心，并注意有效防护，同时必须远离热源、花火、明火、热表面等可能引起燃烧的环境；对人体有害或有刺激性，操作时请小心，并注意有效防护以避免直接接触人体或吸入体内。
- 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，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

- 1. PKH26 Staining Solution (2X)的配制。
 - a. PKH26 Staining Solution (2X)的用量：对于6、12、24、96孔板，每孔的PKH26 Staining Solution (2X)分别为500μl、250μl、100μl和50μl；对于悬浮细胞样品，每100万个细胞样品的PKH26 Staining Solution (2X)为50μl；对于切片，可以根据切片大小，每个切片使用50-100μl的PKH26 Staining Solution (2X)。
 - b. PKH26 Staining Solution (2X)的配制：根据样品数量和每个样品所需工作液的体积，计算出PKH26 Staining Solution (2X)

的总体积。以荧光显微镜检测96孔板为例，每个孔的PKH26 Staining Solution (2X)为50μl，参照下表配制PKH26 Staining Solution (2X)。

Samples	1	10	100
PKH26 (250X)	0.4μl	4μl	40μl
Staining Enhancer (400X)*	0.25μl	2.5μl	25μl
Assay Buffer	50μl	500μl	5ml
PKH26 Staining Solution (2X)	~50μl	~500μl	~5ml

注1：请严格按照上表中组分顺序和体积配制PKH26 Staining Solution (2X)，且PKH26 (250X)和Staining Enhancer (400X)混匀后再加入Assay Buffer。

注2：不同细胞的最佳染色浓度略有不同，PKH26 Staining Solution (2X)的最终浓度建议根据不同细胞系和实验体系进行优化，可在0.5X-10X之间进行调整。PKH26染色工作液的最终浓度提高时，Staining Enhancer的用量不变。

注3：如果PKH26本身的染色效果就很好，也可以不加入Staining Enhancer (400X)。

2. 悬浮活细胞染色。

以100万个细胞为例，每个样品的PKH26 Staining Solution (2X)为50μl，其它细胞数的检测试剂用量可进行适当调整。

a. 400×g，室温离心5分钟，沉淀悬浮培养的约100万个细胞或消化后的重悬的约100万个贴壁细胞，吸除上清。

b. 加入适当体积的无血清细胞培养液重悬细胞，400×g，室温离心5分钟，吸除上清。

注：血清蛋白和脂质也会结合染料，降低用于膜标记的有效染料浓度。因此，在用Assay Buffer重悬细胞前须用无血清细胞培养液洗涤细胞一次。

c. 加入50μl Assay Buffer，重复重悬细胞，制备细胞悬液。

注：培养液的存在可能会干扰染料的染色效果，因此染色前需要用本试剂盒提供的Assay Buffer重悬细胞，同时也避免PKH26 Staining Solution (2X)直接加入导致染色不均匀以及可能对于细胞活力的影响。

d. 将50μl细胞悬液与50μl PKH26 Staining Solution (2X)混合，并立即混匀。

注1：由于PKH26的染色速度很快，须快速将细胞与染料混匀，从而确保得到明亮、均匀和可重复的标记结果。

注2：可根据实际情况适当调整细胞悬液和PKH26 Staining Solution (2X)的比例，但需避免在很小(<100μl)或很大(>5ml)的体积下进行细胞膜染色。

e. 37°C孵育5分钟，然后4°C孵育15分钟。不同的细胞最佳孵育时间不同，根据实际所用的细胞优化染色孵育时间，以得到最佳的荧光染色效果。

注：4°C的低温孵育可降低细胞对染料的内吞作用，有助于染料对质膜的标记，并且降低染料定位细胞质囊泡的可能性。

f. 4°C孵育结束后，4°C，400×g，离心10分钟以沉淀细胞。吸除上清，注意尽量不要吸除细胞。推荐使用碧云天的BeyoFuge™ 1524R高速台式冷冻离心机(15000rpm, 24孔) (E6943)。

注：4°C孵育结束后也可以加入等量的血清即100μl血清或500μl含10%血清的完全培养液并孵育1分钟以终止染色并结合多余的染料，然后400×g，室温离心10分钟以沉淀细胞，随后吸除上清。

g. 加入500μl完全培养液，重悬细胞沉淀，随后400×g，室温离心10分钟以沉淀细胞，吸除上清后再加入500μl完全培养液重悬细胞。

h. 流式细胞仪检测，或将细胞转移至多孔板、细胞培养皿或者细胞爬片上，在荧光显微镜下观察。PKH26的最大激发光波长为551nm，最大发射光波长为567nm。

3. 贴壁活细胞染色。

本步骤以96孔板为例进行描述，其它孔板检测试剂的用量参考96孔板的用量进行适当调整。

a. 吸除细胞培养液，用无血清的细胞培养液洗涤细胞2次。

b. 每孔加入50μl的Assay Buffer，再每孔加入50μl PKH26 Staining Solution (2X)，轻轻晃动使染料均匀覆盖所有细胞。

c. 37°C孵育5分钟，然后4°C孵育15分钟。不同的细胞最佳孵育时间不同，根据实际所用的细胞优化染色孵育时间，以得到最佳的荧光染色效果。

注：4°C的低温孵育可降低细胞对染料的内吞作用，有助于染料对质膜的标记，并且降低染料定位细胞质囊泡的可能性。

d. 吸除上清，用完全培养液洗涤1次，然后加入100μl完全培养液即可在荧光显微镜下观察。PKH26的最大激发光波长为551nm，最大发射光波长为567nm。

注：使用单细胞悬浮液可以获得更均匀的染色，可以酌情考虑先消化并收集细胞，并重悬后参考悬浮细胞的染色方法进行染色。

4. 染色后的固定和通透。

a. 固定：如果样品需要进一步进行免疫荧光染色，建议使用免疫染色固定液(P0098)或4%多聚甲醛固定液(P0099)进行固定。染色的细胞固定后避光保存，荧光染色效果至少可以稳定一周。

b. 通透(选做)：建议使用Triton X-100/曲拉通X-100 (ST795)或洋地黄皂苷(Reagent grade) (ST1272)进行通透。但通透可能会影响PKH26在细胞膜的定位并会增加细胞内的染色，具体须根据实验的需求选择合适的细胞通透液。

注：如果需要封片，建议直接用PBS进行封片。请避免使用含有甘油或其它有机物的封片剂，否则会影响染色并增加荧光背景。

5. 固定后冷冻切片的染色。

本步骤以一个冷冻切片为例进行描述，检测试剂的用量可以根据切片大小进行适当调整。

a. 按照常规方法进行取材、速冻、切片等步骤制备冰冻切片。

b. 切片用PBS洗涤3遍。

- c. 按照每50μl PKH26 Staining Solution (2X)加入50μl Assay Buffer的比例稀释为PKH26 Staining Solution (1X)。
- d. 加入100μl的PKH26 Staining Solution (1X)，轻轻晃动使染料均匀覆盖整个切片。
- e. 4℃避光孵育15~30分钟，最佳染色时间需要根据特定实验条件适当摸索，以达到最佳的荧光染色效果。
- f. 吸除PKH26 Staining Solution (1X)，用PBS洗涤2-3次，随后即可在荧光显微镜下观察。PKH26的最大激发光波长为551nm，最大发射光波长为567nm。

参考文献：

- Wallace PK, Tario JD Jr, Fisher JL, Wallace SS, Ernstoff MS, et al. 2008. 73(11):1019-34.
- Fischer K, Mackensen A. Methods. 2003. 31(2):135-42.
- Tario JD Jr, Humphrey K, Bantly AD, Muirhead KA, Moore JS, et al. J Vis Exp. 2012. (70):e4287.
- Horan PK, Melnicoff MJ, Jensen BD, Slezak SE. Methods Cell Biol. 1990. 33:469-90.
- Teare GF, Horan PK, Slezak SE, Smith C, Hay JB. Cell Immunol. 1991. 134(1):157-70.
- Wallace PK, Muirhead KA. Immunol Invest. 2007. 36(5-6):527-61.
- Balogh A, Pap M, Markó L, Koloszá I, Csatóry LK, et al. Enzyme Microb Technol. 2011. 49(3):255-9.
- Rieck B. Cell Biol Int. 2003. 27(5):445-7.

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
C1036	DiI (细胞膜红色荧光探针)	10mg
C1038	DiO (细胞膜绿色荧光探针)	10mg
C1039-10mg	DiD (细胞膜远红荧光探针)	10mg
C1041	ER-Tracker Red (内质网红色荧光探针)	20μl/100μl/500μl
C1042	ER-Tracker Green (内质网绿色荧光探针)	20μl/100μl/500μl
C1043	Golgi-Tracker Red (高尔基体红色荧光探针)	1mg
C1045S	Golgi-Tracker Green (高尔基体绿色荧光探针)	1mg
C1046	Lyso-Tracker Red (溶酶体红色荧光探针)	50μl
C1047S	Lyso-Tracker Green (溶酶体绿色荧光探针)	50μl
C1048	Mito-Tracker Green (线粒体绿色荧光探针)	50μg
C1049B	Mito-Tracker Red CMXRos (线粒体红色荧光探针)	50μg/250μg
C1050	Tubulin-Tracker Red (抗体法微管红色荧光探针)	40μl
C1051S	Tubulin-Tracker Green (抗体法微管绿色荧光探针)	40μl
C1991S	细胞膜红色荧光染色试剂盒(DiI)	200-1000次
C1993S	细胞膜绿色荧光染色试剂盒(DiO)	200-1000次
C1995S	细胞膜远红荧光染色试剂盒(DiD)	200-1000次
C2071	细胞膜红色荧光染色试剂盒(PKH26)	50次/250次/1000次
C2073	细胞膜绿色荧光染色试剂盒(PKH67)	50次/250次/1000次
C3635	BeyoExo™外泌体标记与示踪试剂盒(PKH67)	50次/250次
C3637	BeyoExo™外泌体标记与示踪试剂盒(PKH26)	50次/250次