

细胞膜绿色荧光染色试剂盒(PKH67)

产品编号	产品名称	包装
C2073S	细胞膜绿色荧光染色试剂盒(PKH67)	50次
C2073M	细胞膜绿色荧光染色试剂盒(PKH67)	250次
C2073L	细胞膜绿色荧光染色试剂盒(PKH67)	1000次

产品简介:

- 碧云天的细胞膜绿色荧光染色试剂盒(PKH67), 即Cell Plasma Membrane Green Fluorescence Staining Kit with PKH67, 是一种以PKH67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绿色荧光染色和标记的试剂盒。
- 本产品和Sigma公司的PKH67 Green Fluorescent Cell Linker Kits for General Cell Membrane Labeling (MINI67, MIDI67, and PKH67GL)的染色原理和使用方法基本一致。
- PKH67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, CAS号为257277-27-3, 呈现绿色荧光。PKH67结构上带有很长的脂肪族碳尾(Carbon tails), 能稳定插入细胞膜、外泌体膜等的脂质区域。PKH67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。PKH67在体内的荧光半衰期为10-12天, 因此PKH67非常适合用于示踪研究, 也适用于细胞毒性实验, 可与Propidium Iodide/碘化丙啶(ST511/ST512)或7-AAD (7-氨基放线菌素D) (ST515)等细胞活力荧光探针联合使用, 或者与橙、红色荧光探针例如藻红蛋白、红色荧光蛋白(如RFP、mCherry等)等结合使用[1-2]。碧云天同时提供细胞膜红色荧光染色试剂盒(PKH26) (C2071)。
- PKH67可以稳定地与细胞膜脂质区结合并呈现明亮的绿色荧光。PKH67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490nm, 最大发射波长为502nm。

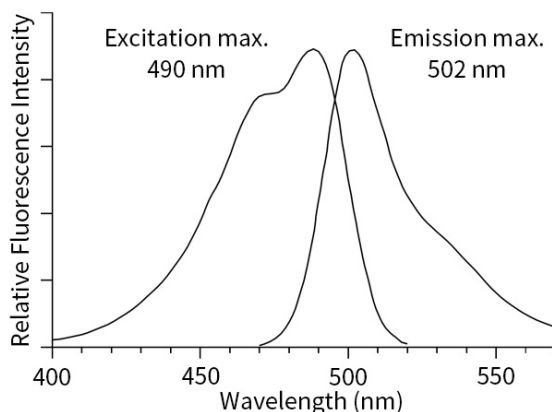


图1. PKH67和细胞膜脂质结合后的激发光谱和发射光谱。

- 本试剂盒中的PKH67对细胞的毒性较小, 荧光背景低, 并且染色细胞后不会使邻近细胞染色, 所以除了简单的细胞膜荧光标记外, 也被广泛用于体内外的细胞示踪。PKH67标记的细胞形态良好, 荧光稳定, 可以有效的观察细胞在体外的情况; 同时PKH67标记的细胞也可以用于体内观察, 可以观察长达数周之久。在细胞增殖中, PKH67的荧光会随着细胞的分裂平均分配到子代细胞中, 荧光信号逐级递减。根据这个特性, PKH67也可以用于检测细胞增殖[3-5]。
- 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, PKH67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。

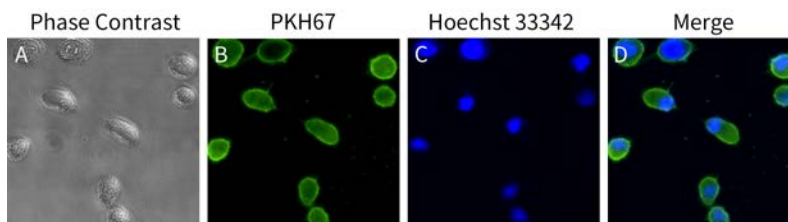


图2. 碧云天细胞膜绿色荧光染色试剂盒(PKH67) (C2073)对L929细胞的荧光染色效果图。PKH67染色液加入后37°C孵育5分钟,

然后4℃孵育15分钟，最后再进行Hoechst 33342染色。PKH67染色呈现非常明亮的绿色荧光，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
C2073S-1	PKH67 (250X)	20μl
C2073S-2	Staining Enhancer (400X)	20μl
C2073S-3	Assay Buffer	5ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
C2073M-1	PKH67 (250X)	100μl
C2073M-2	Staining Enhancer (400X)	100μl
C2073M-3	Assay Buffer	25ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
C2073L-1	PKH67 (250X)	400μl
C2073L-2	Staining Enhancer (400X)	400μl
C2073L-3	Assay Buffer	100ml
—	说明书	1份

保存条件：

-20℃保存，一年有效。PKH67 (250X)须避光保存。Staining Enhancer (400X)和Assay Buffer也可4℃保存，至少3个月有效。

注意事项：

- PKH67 (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℃保存，以避免反复冻融并减少挥发。PKH67 (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。
- PKH67 (250X)在-20℃、4℃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℃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PKH67 (250X)聚集于管底。
- 含血清、BSA或BSA类似物的溶液对本PKH67的标记有干扰，须避免。
- PKH67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。
- PKH67 (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。
- PKH67 (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. PKH67 Staining Solution (2X)的配制。
 - a. PKH67 Staining Solution (2X)的用量：对于6、12、24、96孔板，每孔的PKH67 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PKH67 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PKH67 Staining Solution (2X)。
 - b. PKH67 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PKH67 Staining Solution (2X)

的总体积。以荧光显微镜检测96孔板为例，每个孔的PKH67 Staining Solution (2X)为50 μ l，参照下表配制PKH67 Staining Solution (2X)。

Samples	1	10	100
PKH67 (250X)	0.4 μ l	4 μ l	40 μ l
Staining Enhancer (400X)*	0.25 μ l	2.5 μ l	25 μ l
Assay Buffer	50 μ l	500 μ l	5ml
PKH67 Staining Solution (2X)	~50 μ l	~500 μ l	~5ml

注1：请严格按照上表中组分顺序和体积配制PKH67 Staining Solution (2X)，且PKH67 (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，PKH67 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。PKH67染色工作液的最终浓度提高时，Staining Enhancer的用量不变。

注3：如果PKH67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PKH67 Staining Solution (2X)为50 μ l，其它细胞数的检测试剂用量可进行适当调整。

a. 400 $\times$ 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 $\times$ 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50 μ l 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PKH67 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50 μ l细胞悬液与50 μ l PKH67 Staining Solution (2X)混合，并立即混匀。

注1：由于PKH67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PKH67 Staining Solution (2X)的比例，但需避免在很小(<100 μ l)或很大(>5ml)的体积下进行细胞膜染色。

e. 37 $^{\circ}$ C孵育5分钟，然后4 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C孵育结束后，4 $^{\circ}$ C，400 $\times$ 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 $^{\circ}$ C孵育结束后也可以加入等量的血清即100 μ l血清或500 μ l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 $\times$ g，室温离心10分钟以沉淀细胞，随后吸除上清。

g. 加入500 μ l完全培养液，重悬细胞沉淀，随后400 $\times$ g，室温离心10分钟以沉淀细胞，吸除上清后再加入500 μ l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。PKH67的最大激发光波长为490nm，最大发射光波长为502nm。

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50 μ l的Assay Buffer，再每孔加入50 μ l PKH67 Staining Solution (2X)，轻轻晃动使染料均匀覆盖所有细胞。

c. 37 $^{\circ}$ C孵育5分钟，然后4 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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100 μ l完全培养液即可在荧光显微镜下观察。PKH67的最大激发光波长为490nm，最大发射光波长为502nm。

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PKH67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 PKH67 Staining Solution (2X)加入50μl Assay Buffer的比例稀释为PKH67 Staining Solution (1X)。
- d. 加入100μl的PKH67 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PKH67 Staining Solution (1X)，用PBS洗涤2-3次，随后即可在荧光显微镜下观察。PKH67的最大激发光波长为490nm，最大发射光波长为502nm。

参考文献：

1. Horan PK, Melnicoff MJ, Jensen BD, Slezak SE. Methods Cell Biol. 1990. 33:469-90.
2. Teare GF, Horan PK, Slezak SE, Smith C, Hay JB. Cell Immunol. 1991. 134(1):157-70.
3. Tario JD Jr, Soh KT, Wallace PK, Muirhead KA. Methods Mol Biol. 2024. 2779:159-216.
4. Wallace PK, Tario JD Jr, Fisher JL, Wallace SS, Ernstoff MS, et al. 2008. 73(11):1019-34.
5. Gertner-Dardenne J, Poupot M, Gray B, Fournié JJ. Immunol Invest. 2007. 36(5-6):665-85.

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

Version 2025.04.24