

DiO 绿光细胞膜染色试剂盒

货号：HK2071

【产品信息】

产品名称	产品货号	规格	有效期
DiO 绿光细胞膜染色试剂盒	HK2071	100T	一年

【产品简介】

DiO (又称 DiOC₁₈(3))，其化学全名为 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，是一种脂溶性、长链二烷基碳菁类荧光染料。该染料的分子量为 933.87 g/mol，具有高度的脂溶性，常用于细胞膜及其他脂质生物结构的标记。DiO 进入细胞膜后，通过横向扩散实现双层脂质膜的广泛染色，形成连续的细胞膜荧光标记，便于细胞形态和膜动态的观察。在脂质环境中与细胞膜结合后，荧光强度显著增强，DiO 在激发光照射下可发出橙绿色荧光，激发波长为 484 nm，发射最大波长为 501 nm。其性能使其成为活细胞和固定细胞膜成像的理想荧光探针。传统检测中，可利用标准的 FITC 滤光片进行激发和发射信号的检测。DiO 染色具有良好的细胞兼容性，不会显著影响细胞的存活率，因此广泛应用于细胞追踪、外泌体示踪以及膜动力学研究。由其优异的脂质亲和性和稳定的荧光性能，使其成为细胞膜成像和示踪研究中的重要工具。

本产品 DiO 绿光细胞膜染色试剂盒，集成了优化的 DiO 细胞膜染色缓冲液，能够实现快速、稳定且高效的细胞膜荧光标记，极大提升实验的效率与荧光的亮度与稳定性。

【产品组成】

产品货号	主要成分	产品规格
HK2071A	DiO 绿光细胞膜探针	40 μL
HK2071B	DiO 细胞膜染色缓冲液	10 mL

【储存与运输】

干冰运输；-20℃避光保存，探针避免反复冻融，有效期 6 个月。

【使用方法】

- 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。
- 悬浮活细胞染色：

- 2.1. 收集悬浮细胞，以 500-1000 g 室温离心 3-5 min，去除细胞上清；
- 2.2. 使用 DiO 染色工作液重悬细胞，使细胞密度在 $1-2 \times 10^6$ 个/mL；
- 2.3. 置于 37°C 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；
- 2.4. 孵育结束后，500-1000 g 室温离心 3-5 min，吸除 DiO 染色工作液；
- 2.5. 用 37°C 预热的 PBS 或细胞培养基重悬细胞，500-1000 g 离心 3-5 min，去除上清；
- 2.6. 重复 2.5 步骤一次；
- 2.7. 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 484 nm，最大发射波长 501nm。
3. 贴壁活细胞染色（6 孔板为例）：
 - 3.1. 将细胞提前以一定密度种植于 6 孔板中；
 - 3.2. 吸除细胞培养基，用 PBS 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）；
 - 3.3. 置于 37°C 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；
 - 3.4. 用 37°C 预热的 PBS 或细胞培养基，洗涤细胞 1-2 次；
加入 37°C 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 484 nm，最大发射波长 501nm。
4. 固定的贴壁细胞染色：
 - 4.1. 样本前处理：
对于细胞：去除细胞培养基，PBS 洗涤 1-2 次。加入 4%多聚甲醛固定液，室温固定 10 min。吸除固定液，用 PBS 洗涤 2-3 次；
 - 4.2. 加入 0.1-0.5% Triton-100（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；
 - 4.3. （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；
 - 4.4. 加入适量体积的 DiO 染色工作液覆盖细胞，37°C 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；
 - 4.5. 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：
 - 5.1. 将提取的外泌体沉淀，用适量 DiO 染色工作液重悬；
 - 5.2. 将样品置于 37°C 避光孵育 30 min；
 - 5.3. 用 10 倍体积 PBS 稀释样品体积（可选）；
 - 5.4. 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；
 - 5.5. 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。

【注意事项】

1. 荧光染料存在淬灭问题，请注意避光以减缓荧光淬灭。
2. 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. 由于细胞敏感性和实验目的的不同，探针的稀释比和孵育时间需根据实际情况适当调整。
5. 为了您的健康和安​​全，操作时请穿好实验服、戴好手套。