

活细胞示踪试剂盒（绿色荧光）

货号：PMK0990

保存：-20℃避光保存 12 个月

规格：100T/500T/2000T

适用样本：细胞

产品简介

研究细胞运动和定位，需要用到对活细胞无毒的专一性探针。活细胞示踪试剂盒提供了一种通用且保存良好的细胞示踪试剂（活细胞荧光示踪探针），用于监测细胞的移动，位置，增殖，迁移，趋化性和侵袭性。活细胞荧光示踪探针，可以通过被动扩散进入细胞，与细胞内蛋白共价结合，是一种长效细胞示踪染料。一旦进入细胞，非荧光性的活细胞荧光示踪探针会被胞内酯酶水解，产生绿色荧光（Ex/Em=494/521nm）。这些荧光产物只能积聚在具有完整细胞膜的细胞中，因此死细胞因无完整细胞膜不能被染色。活细胞荧光示踪探针对于 pH 变化不敏感，可以由甲醛或戊二醛固定。活细胞荧光示踪探针可以在活细胞中保留好几代，并可以显示荧光至少一周。探针可被转移到子细胞，但是不转移到群体中的相邻细胞。

产品内容

试剂盒组分	规格			储存条件
	100T	500T	2000T	
活细胞荧光示踪探针	50 μ L	250 μ L	1mL	-20℃，避光保存
反应缓冲液（5 \times ）	5mL	25mL	100mL	4℃

自备耗材

荧光显微镜或流式细胞仪、离心机

24 孔板、可调节式移液枪及枪头

去离子水、PBS

试剂准备

注意：各组分（小管试剂）开盖前，请先低速离心。

活细胞荧光示踪探针：冰上操作，分装避光保存，避免反复冻融。

1 \times 反应缓冲液：用去离子水把 5 \times 反应缓冲液 稀释到 1 \times 反应缓冲液。使用前预热到 37℃。

染色溶液配制：实验开始之前，将活细胞荧光示踪探针以 1: 1000 的比例稀释到 1 \times 反应缓冲液中。相应地扩大剂量以进行大样本量测定。使用前避光并预热至 37℃。

注意：对于不同的细胞类型和/或实验条件，应根据经验确定活细胞荧光示踪探针的最终浓度。通常，长期染色（超过约 3 天）或使用快速分裂的细胞需要使染料浓度加倍。对于较短的实验（例如生存力测定），可能需要使用浓度低至 1: 5000 稀释的染料。为了维持正常的细胞生理状态并减少潜在的伪影，应将染料的浓度保持在尽可能低的水平。

实验步骤

A. 流式细胞仪定量

1. 用所需的方法处理细胞，并建立平行对照组；

注意：平行对照组建议：未染色的细胞（即不加活细胞荧光示踪探针的细胞），用 1 \times 反应缓冲液悬浮；

2. 对于非贴壁细胞，通过离心（4℃，300g，5min）收集 0.5-1 $\times 10^6$ 个细胞。用预冷的 PBS 洗涤两次，并弃去 PBS。对于贴壁细胞，首先使用胰蛋白酶（不含 EDTA）消化细胞，然后离心；

3. 将细胞沉淀重悬于 500 μ L 染色溶液中；

4. 黑暗条件下，37℃ 孵育细胞 15-30min；

产品说明书

5. 以 500g 离心细胞，并弃去上清液；
6. 沉淀重悬在新鲜的预热培养基中，再孵育细胞 30min，以确保与探针完全接触，并再次用 PBS 洗涤细胞；
7. 以 5×10^5 到 1×10^6 细胞/mL 的密度将细胞沉淀重悬在预热的 PBS 中，并立即使用 FL1 通道（通常为 FL1），通过流式细胞仪分析细胞。

B. 荧光显微镜检测

1. 对于非贴壁细胞：按照步骤 A.1 到步骤 A.7 进行，将步骤 A.7 的细胞悬液放在载玻片上，用玻璃盖玻片盖住细胞。尽快使用适当的滤光片通过荧光显微镜分析细胞。如果要固定和透化细胞，请继续执行步骤 B.3。
2. 对于贴壁细胞：建议的方案如下
 - (1) 用 24 孔培养皿直接培养细胞。染色前，在 37°C 的 CO₂ 培养箱中培养至少 24h；
 - (2) 用所需的方法处理细胞；
 - (3) 用 PBS 洗涤细胞两次并弃去 PBS；
 - (4) 向细胞中加入 0.5mL 染色溶液，并在黑暗中于 37°C 孵育 15-30min；
 - (5) 弃去上清液，换上预热的新鲜生长培养基，然后在黑暗中于 37°C 下再孵育 30min；
 - (6) 用 PBS 或适当的缓冲液洗涤细胞两次。如果要固定和透化细胞，请继续进行步骤 B.3；
 - (7) 使用合适的滤光片进行观察。
3. 固定和透化
 - (1) 使用含醛的固定剂进行固定。通常，我们使用 3.7% 甲醛在室温下将细胞固定 15min；
 - (2) 固定后，用 PBS 洗细胞 3 次；
 - (3) 固定后，如果随后要用抗体检测细胞，应将其在冰冷的丙酮中孵育 10min 以使细胞通透，通透后，用 PBS 洗细胞 3 次。

相关产品：

PMK0989 Calcein-AM/PI 活/死细胞双染色试剂盒

PMK0991 细胞周期染色试剂盒

PMK0992 EdU-488 法细胞增殖成像检测试剂盒

PMK0993 EdU-555 法细胞增殖成像检测试剂盒

更多产品详情了解，请关注公众号：

