

## Cytoplasmic Membrane Staining Kit with DiO (Green Fluorescence)

### 细胞膜绿色荧光染色试剂盒(DiO)

产品编号	产品名称	规格
BL777A	细胞膜绿色荧光染色试剂盒(DiO)	200-1000T

#### 产品简介:

DiO 即 DiOC18(3)是最常用的细胞膜荧光探针之一, 呈现绿色荧光。DiO 是一种亲脂性羰花青(carbocyanine)染料, 进入细胞膜后可以侧向扩散逐渐使整个细胞的细胞膜被染色, 染色后非常稳定。DiO 毒性很低, 通常不会影响细胞的生存力。DiO 在进入细胞膜之前荧光非常弱, 仅当进入到细胞膜后才可以被激发出很强的荧光。DiO 被激发后可以发出绿色的荧光, DiO 和磷脂双层膜结合后最大激发波长为 484nm, 最大发射波长为 501nm。

本试剂盒可以直接染色活的细胞或组织, 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%多聚甲醛进行固定, 使用其它不适当的固定液会导致荧光背景较高。DiO 对于细胞膜染色的荧光强度通常要低于 DiI, 有时对于某些经过固定的组织的染色效果欠佳。

本试剂盒如果用于流式细胞仪, 每个样品的检测体系体积为 0.5ml 时, 可以进行 200 次检测, 96 孔板每孔检测体系的体积为 100ul 时, 可以进行 1000 次检测。

#### 产品组份:

编号	产品名称	规格
BL777A-1	DiO(400X)	250ul
BL777A-2	染色增强剂(400X)	250ul
BL777A-3	染色缓冲液	100ml

#### 使用方法 (仅供参考):

##### 一、工作液的配制:

1. 染色工作液的用量: 对于 6、12、24、96 孔板, 每孔的细胞膜染色工作液分别为 1~2ml、0.5~1ml、300~500 $\mu$ l 和 50~100 $\mu$ l; 对于切片, 可以根据切片大小, 每个切片使用 100-200 $\mu$ l 的细胞膜染色工作液。

2. 染色工作液的配制: 根据样品数量和每个样品所需工作液的体积, 计算出染色工作液的总体积。以流式细胞仪检测为例, 每个样品的细胞膜染色工作液为 0.5ml, 参照下表配制细胞膜染色工作液。

样品数	2	20	200
DiO(400X)	2.5ul	25ul	250ul
染色增强剂(400X)	2.5ul	25ul	250ul
充分混匀			
染色缓冲液	995ul	9.95ml	99.5ml
染色工作液总体积	1ml	10ml	100ml

注: 请严格按照表中组分顺序和体积配制细胞膜染色工作液。对于活细胞染色, 如细胞对于培养条件非常敏感, 可使用细胞培养液代替染色缓冲液, 但可能会导致染色效果有所下降, 需要适当考虑延长染色时间或加大 DiO 染料浓度。

##### 二、贴壁细胞的染色:

1. 吸除细胞膜染色工作液, 用 Hanks' Balanced Salt Solution 或 PBS 洗涤 2-3 次, 然后加入 37° C

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.

注意: 在体外研究使用, 不用于诊断或治疗用途, 本产品不是医疗装置。



预热的细胞培养液即可在荧光显微镜下观察。

2. 将贴壁细胞种于细胞培养皿、多孔细胞培养板或者细胞爬片上。
3. 吸除培养液，缓冲液清洗 2-3 次。
4. 加入适当体积的染色工作液，轻轻晃动使染料均匀覆盖所有细胞。
5. 37°C 避光孵育 5~20 min，不同的细胞最佳培养时间不同。可以 5min 作为起始孵育时间，之后优化体系以得到均一的标记结果。
6. 吸除染色工作液，缓冲液清洗 2~3 次。
7. 加入 37°C 预热的培养基，即可荧光显微镜下观察。

### 三、悬浮细胞的染色：

1. 加入适当体积的染色工作液重悬细胞，使其密度为  $1-2 \times 10^6/\text{mL}$ 。
2. 37°C 避光孵育细胞 5~20 min，不同的细胞最佳培养时间不同。可以 5 min 作为起始孵育时间，之后优化体系以得到均一的标记结果。
3. 孵育结束，500-1000×g 室温离心 5 min。
4. 吸除上清液，再次缓慢加入 37°C 预热的细胞培养液重悬细胞。
5. 重复 3,4 步骤两次以上。
6. 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。

### 四、染色后的固定和通透：

1. 固定：如果样品需要进一步进行免疫荧光实验，建议使用 4% 多聚甲醛固定液进行固定。
2. 通透：建议使用 0.1% Triton X-100 或洋地黄皂苷进行通透。但通透可能会影响 DiO 在细胞膜的定位并会增加细胞内的染色，具体实验中需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。

### 五、固定后细胞或切片的染色：

1. 使用 4% 多聚甲醛固定液进行固定。
2. 吸除固定液，用 PBS 洗涤细胞 3 遍。  
**选做：**使用配制在 PBS 中的 0.1% Triton X-100 进行通透，室温 10min。然后用 PBS 洗涤细胞 3 遍。  
**选做：**按照免疫染色的方法进行抗体的孵育或用其它染料进行染色。抗体孵育步骤中的封闭液、抗体稀释液及洗涤液不能含有去垢剂。
3. 加入适当体积的染色工作液，轻轻晃动使染料均匀覆盖所有细胞或样品。
4. 37°C 避光孵育 5-20min，不同的细胞最佳培养时间不同。可以 5 min 作为起始孵育时间，之后优化体系以得到均一的标记结果。
5. 吸除细胞膜染色工作液，用 PBS 洗涤 2-3 次，随后即可在荧光显微镜下观察。

### 注意事项：

- 1、不同细胞的最佳染色浓度略有不同，细胞膜染色工作液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 1:100-1:400 之间进行调整。DiO 的最终浓度提高时，染色增强剂的用量不变。
- 2、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。
- 3、染色缓冲液经过过滤除菌处理，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。如果染色缓冲液发生浑浊等明显的微生物污染，就不能继续使用。
- 4、荧光染料不可避免的都存在一定的淬灭问题，请尽量注意避光，以减缓荧光淬灭。
- 5、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。
- 6、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

### 保存条件：

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.

注意：在体外研究使用，不用于诊断或治疗用途，本产品不是医疗装置。





-20°C避光保存，一年有效，避免反复冻融。染色增强剂(400X)和染色缓冲液也可保存在 4°C。

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.  
注意: 在体外研究使用, 不用于诊断或治疗用途, 本产品不是医疗装置。

电话: 400-600-4213

邮箱: techserv@labgic.com

