

Инструкция к наборам для мечения
клеточных мембран с помощью
красителей PKH

Lumiprobe Corporation. All rights reserved.

Contents

| | |
|---|-----|
| Русский: Инструкция к наборам для мечения клеточных мембран с помощью красителей РКН | 3-7 |
|---|-----|

Инструкция к наборам для мечения клеточных мембран с помощью красителей PKH

Цианиновые красители семейства PKH содержат в структуре липофильные группы, позволяющие им быстро и нековалентно встраиваться в клеточные мембранны практически любых клеток, не влияя на клеточные рецепторы или трансмембранные белки. При этом клетки сохраняют свои биологические свойства и способность к пролиферации, что делает PKH красители подходящими для изучения как растительных, так и животных клеток *in vivo* и *in vitro*. Эти красители также подходят для изучения мембранных везикул.

Данный набор содержит все необходимые реагенты для мечения мембран клеток красителями PKH с целью последующей оценки клеточной миграции или пролиферации.

Состав набора

| Компонент набора | Количество | | | | | | | | | | | |
|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| | 13201 100 uL dye, 1x buffer | 23201 100 uL dye, 5x buffer | 33201 500 uL dye, 1x buffer | 43201 500 uL dye, 5x buffer | 14201 100 uL dye, 1x buffer | 24201 100 uL dye, 5x buffer | 34201 500 uL dye, 1x buffer | 44201 500 uL dye, 5x buffer | 17201 100 uL dye, 1x buffer | 27201 100 uL dye, 5x buffer | 37201 500 uL dye, 1x buffer | 47201 500 uL dye, 5x buffer |
| 2484-100uL, Краситель PKH2, 1mM раствор в изопропаноле, 100 uL | 1 | 1 | 5 | 5 | — | — | — | — | — | — | — | — |
| K6150, Буфер для разведения PKH, 1x, 10 mL | 5 | — | 25 | — | 5 | — | 25 | — | 5 | — | 25 | — |
| K7150, Буфер для разведения PKH, 5x, 10 mL | — | 1 | — | 5 | — | 1 | — | 5 | — | 1 | — | 5 |
| 2485-100uL, Краситель PKH2, 1mM раствор в изопропаноле, 100 uL | — | — | — | — | 1 | 1 | 5 | 5 | — | — | — | — |
| 2801-100uL, Краситель PKH800, 1mM раствор в изопропаноле, 100 uL | — | — | — | — | — | — | — | — | 1 | 1 | 5 | 5 |

Хранить при +4°C. Прогреть до комнатной температуры перед использованием.
 Транспортировка: до трех недель при комнатной температуре.

Срок хранения 12 месяцев.

Рекомендации по использованию набора

- В зависимости от типа клеток и эксперимента оптимальные концентрации красителя и клеток могут отличаться, поэтому рекомендуется оценивать жизнеспособность клеток, гомогенность и интенсивность флуоресценции после окрашивания.
- Не используйте растворы, содержащие азиды, при окрашивании красителями РКН.
- Более однородное окрашивание достигается при использовании суспензии клеток.

Протокол

Протокол использования набора для мечения клеточных мембран красителями РКН на примере адгезионной культуры RAW264.7, 1×10^6 клеток в образце, финальная концентрация красителей РКН — 2 μM , финальный объем 200 мкл.

1. Непосредственно перед окрашиванием приготовьте раствор красителя РКН. Добавьте 1 мкл раствора красителя РКН (*PKH dye, 1 mM solution in isopropanol*) к 9 мкл 96% этанола, и 4 мкл полученного раствора добавьте к 100 мкл *PKH Dyes Diluent, 1x*.

**1x PKH Dyes Diluent* поставляется либо в готовой форме (*K6150, PKH Dyes Diluent, 1x*), либо в виде 5x концентрата (*K7150, PKH Dyes Diluent, 5x*). Для разбавления 5x *PKH Dyes Diluent* используйте стерильную бидистиллированную воду.

2. Культуру клеток снимите с подложки скребком в растворе Хенкса (HBSS). Проведите подсчет клеток в образце. Далее добавьте 3 мл раствора Хенкса, центрифугируйте при 400 $\times g$ 6 мин при комнатной температуре.

*Сывороточные белки и липиды также связывают краситель, поэтому рекомендуется однократно промывать клетки бессывороточной средой или фосфатно-солевым буфером.

3. Супернатант удалите полностью пипеткой, необходимое количество клеток (например, 10^6 клеток) ресуспендируйте в 100 мкл *PKH Dyes Diluent, 1x*. Далее добавьте 100 мкл полученного на первом шаге раствора красителя РКН. Пипетируйте и оставьте при комнатной температуре на 5 мин. Конечная концентрация красителя РКН в растворе с клетками — 2 μM .

**Для воспроизводимых результатов важно минимизировать количество супернатанта перед ресуспендированием клеток.*

**Не оставляйте клетки в *PKH Dyes Diluent* в течение длительного времени.*

**Поскольку окрашивание происходит практически мгновенно, быстрое диспергирование клеток в растворе красителя имеет важное значение для яркого, однородного и воспроизводимого мечения.*

4. Добавьте 2 мл фетальной бычьей сыворотки для остановки реакции, инкубируйте 1 мин. Центрифугируйте при $400 \times g$ 10 мин при комнатной температуре.

**Не используйте для остановки реакции бессывороточную среду или буферные растворы, которые вызывают образование агрегатов красителя.*

5. Супернатант удалите, ресуспендируйте клетки в 5 мл полной питательной среды, перенесите в новую пробирку. Отберите аликовты для оценки жизнеспособности трипановым синим. Центрифугируйте при $400 \times g$ 10 мин при комнатной температуре.

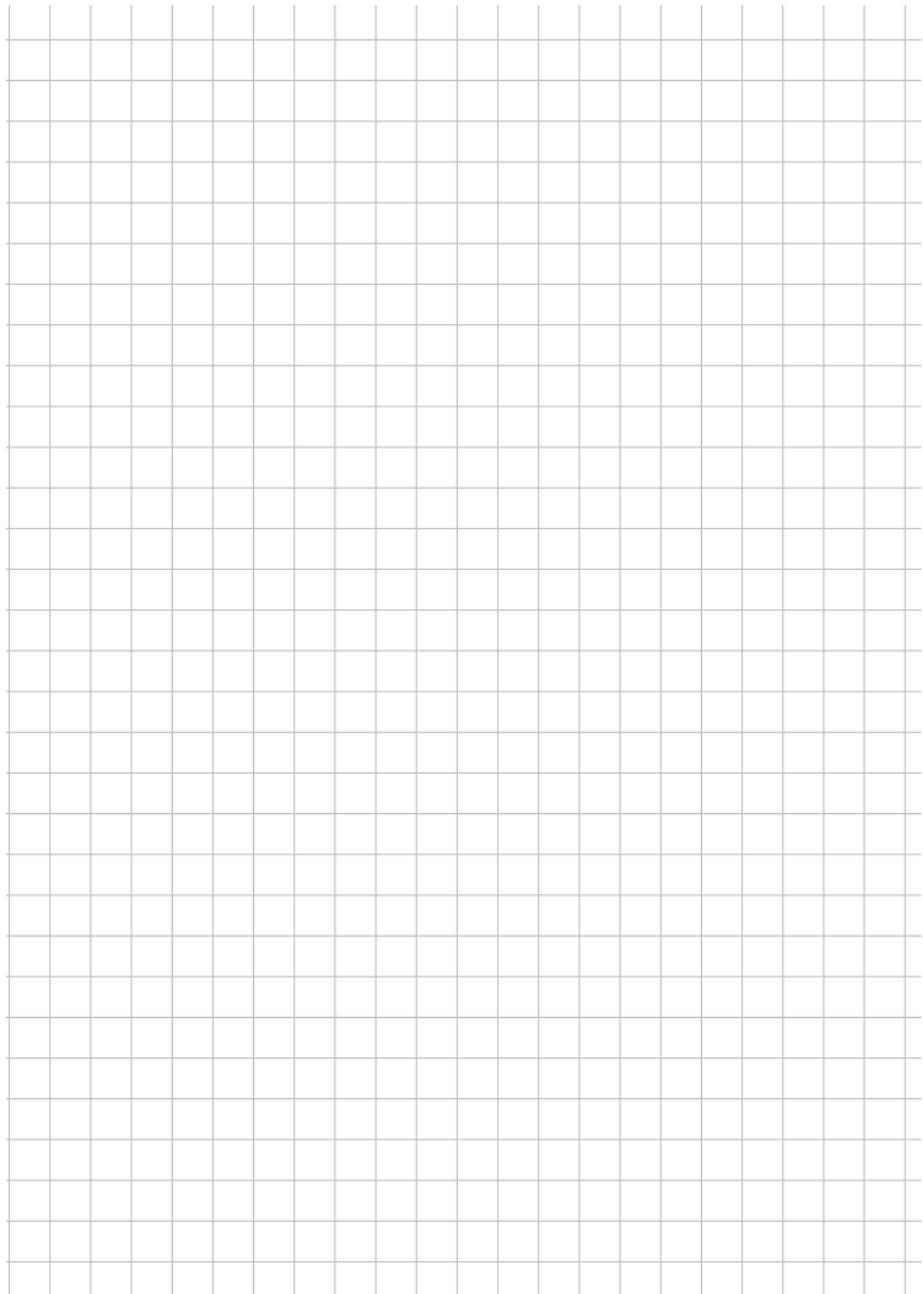
6. Ресуспендируйте клетки в буфере, необходимом для дальнейшего анализа (микроскопия, проточная цитофлуориметрия и др.).

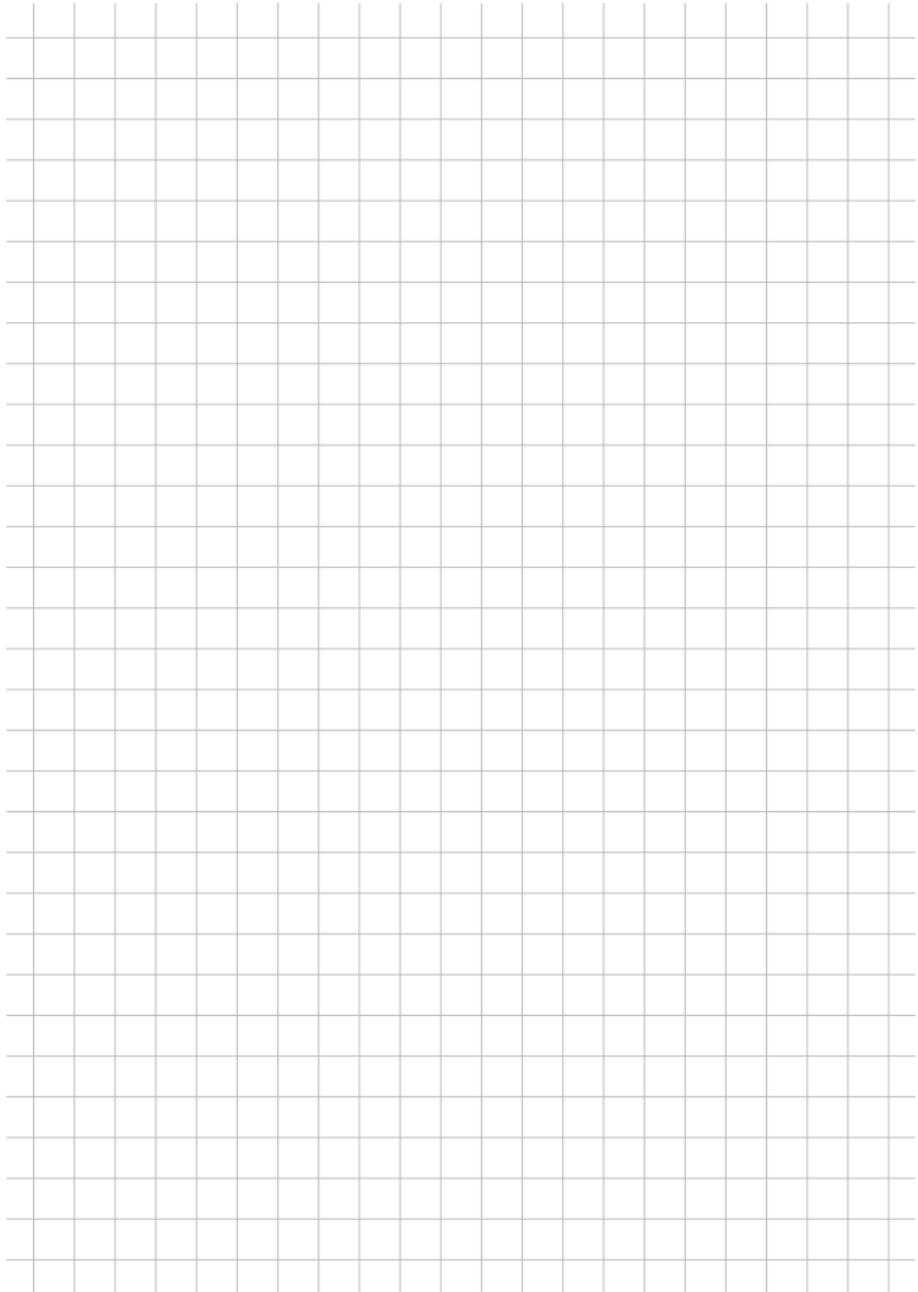
**Окрашенные клетки можно фиксировать 2% параформальдегидом, и окраска остается стабильной в течение не менее 3 недель, если образцы защищены от света.*

Рекомендации по хранению:

Раствор красителей PKH можно хранить при комнатной температуре или в холодильнике в защищенном от света месте. Рекомендуется проверить раствор на наличие осадка перед использованием. Если в растворе красителя заметен осадок, слегка нагрейте его на водяной бане при 37°C и обработайте ультразвуком или встряхните до повторного растворения.

Раствор *PKH Dyes Diluent* поставляется в виде однократного либо пятикратного раствора в стерильной емкости, его рекомендуется хранить в холодильнике и доводить до комнатной температуры непосредственно перед использованием.







22.09.509-QM
Issued by INSPECT



www.lumiprobe.com

