Lumiprobe
Life science solutions



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 PKH 3-7

RU

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 мембраны 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 PKH26, 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.

RU

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 PKH.
- Более однородное окрашивание достигается при использовании суспензии клеток.

Протокол

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

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

   **1× PKH Dyes Diluent поставляется либо в готовой форме (K6150, PKH Dyes Diluent, 1×), либо в виде 5× концентрата (K7150, PKH Dyes Diluent, 5×). Для разбавления 5× 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 × *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, 1×*. Далее добавьте 100 мкл полученного на первом шаге раствора красителя PKH. Пипетируйте и оставьте при комнатной температуре на 5 мин. Конечная концентрация красителя PKH 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 × *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 аликвоты для оценки жизнеспособности трипановым синим. Центрифугируйте при 400 × *g* 10 мин при комнатной температуре.

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

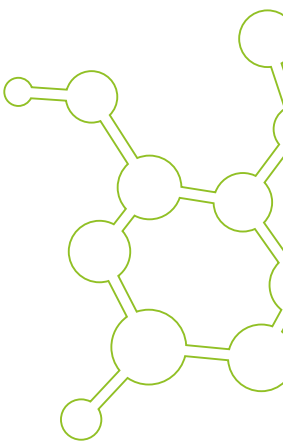
   **Окрашенные клетки можно фиксировать 2%-м параформальдегидом, и окраска остается стабильной в течение не менее 3 недель, если образцы защищены от света.*

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