



Инструкция к наборам для мечения
клеточных мембран с помощью
красителей РКН

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 РКН

Цианиновые красители семейства РКН 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 РКН 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 РКН с целью последующей оценки клеточной миграции или пролиферации.

Состав набора

Компонент набора	Количество											
	13201	23201	33201	43201	14201	24201	34201	44201	17201	27201	37201	47201
100 uL dye, 1x	100	100	500	500	100	100	500	500	100	100	500	500
100 uL dye, 5x	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
100 uL dye, 1x	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
100 uL dye, 5x	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
100 uL buffer	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2484-100uL, Краситель РКН26, 1mM раствор в изопропанолe, 100 uL	1	1	5	5	—	—	—	—	—	—	—	—
КБ150, Буфер для разведения РКН, 1x, 10 mL	5	—	25	—	5	—	25	—	5	—	25	—
К7150, Буфер для разведения РКН, 5x, 10 mL	—	1	—	5	—	1	—	5	—	1	—	5
2485-100uL, Краситель РКН2, 1mM раствор в изопропанолe, 100 uL	—	—	—	—	1	1	5	5	—	—	—	—
2801-100uL, Краситель РКН800, 1mM раствор в изопропанолe, 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 — $2 \mu\text{M}$, 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%-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 $400 \times g$ 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 *RKN Dyes Diluent*, 1×. 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 RKN 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 аликвоты для оценки жизнеспособности трипановым синим. Центрифугируйте при $400 \times g$ 10 мин при комнатной температуре.

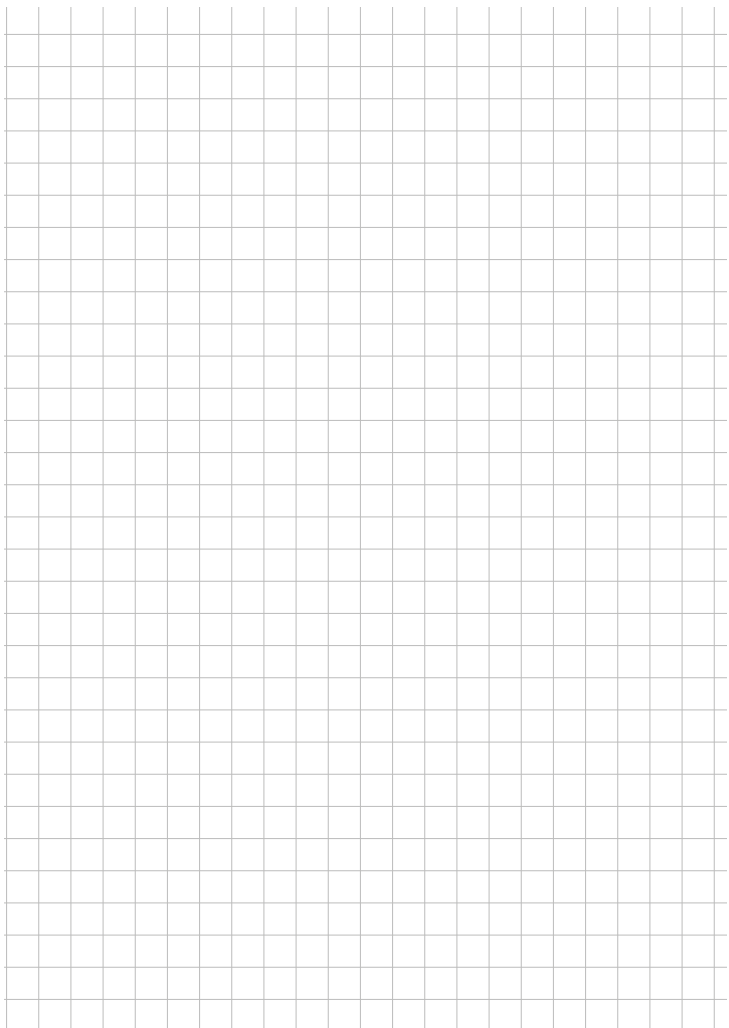
6. Ресуспендируйте клетки в буфере, необходимом для дальнейшего анализа (микроскопия, проточная цитофлуориметрия и др.).

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

Рекомендации по хранению:

Раствор красителей РКН 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 замечен осадок, слегка нагрейте его на водяной бане при +37 °С 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

