



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.

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 x 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 μ M.

**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 x 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 x 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 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°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

