



PKH67 Green Fluorescent Cell Linker Kit

货号: PK0067

存储条件: -20℃避光保存, 有效期 1 年。

组分:

组分名称	PKH67-0.1ml	PKH67-1ml	PKH67-5ml
PKH67 染料	0.1ml	1ml	5ml
稀释液 C	10ml	60ml	120ml

PKH67 标记细胞呈绿色荧光, 荧光波长: $\lambda_{ex}=490nm$, $\lambda_{em}=502nm$

产品描述

荧光染料 PKH67 适用于常规细胞膜标记, 是一种可对体外和体内细胞示踪的绿色荧光染料, 通过与膜结构的脂质分子结合而标记细胞。PKH67 对细胞毒性较小, 荧光背景低, 脂溶性高, 能够轻易穿透细胞膜, 有着强而稳定的绿色荧光。经 PKH67 标记的细胞可用于体外和体内增殖研究, 且具有不会使邻近细胞染色的功能。在细胞分裂增殖过程中, PKH67 的荧光强度会随着细胞的分裂而逐级递减, 标记荧光可平均分配至两个子代细胞中, 因此其荧光强度是亲代细胞的一半, 根据这一特性, 它可被用于检测细胞增殖, 细胞周期的估算及细胞分裂等方面。PKH67 标记细胞的荧光非常均一, 并且分裂后的子代细胞的荧光分配也更均一。在细胞分裂增殖过程中, PKH67 标记荧光可平均分配至两个子代细胞中, 荧光强度变为亲代细胞的一半, 通过流式细胞仪根据荧光强度的不同, 可检测出未分裂细胞, 分裂一次(1/2 的荧光强度), 二次(1/4 的荧光强度), 三次(1/8 的荧光强度), 以及更多分裂次数的细胞。PKH67 可检测分裂次数多达六次甚至更多。除了用于细胞增殖检测, PKH67 还可以用于细胞的体外盒体内示踪, 标记后荧光在胞内表达稳定, 阳性标记率达 98%以上, 标记细胞形态良好, 能有效地观察细胞在体外的诱导分化情况; 或将标记的细胞注入体内, 可以有效的显示移植细胞在活体组织中的迁移及分化。PKH67 标记的细胞用于体内观察可以长达数周之久, 它常被用来做活体细胞检测实验和用荧光电镜观察细胞长期活动的实验。PKH67 毒性较小, 不影响细胞的增殖能力。此方法操作简单, 且不用放射性同位素, 不存在安全隐患。可以更快、更准确和更安全地得到想要的实验数据。

由于炭尾长度更长, 内部研究已经证明 PKH67 比 PKH2 由更少的细胞间转移。在采用 PKH1 和 PKH2 进行的体内研究中, 荧光强度都会缓慢损失。由于这是绿色细胞 linker 染料而非红色细胞 linker 染料出现的行为特征, 因而 PKH67 会出现类似的性质。不分裂细胞的体外细胞膜留存和体内荧光半衰期的关联性揭示, PKH67 的体内荧光半衰期为 10-12 天。其他具有类似半衰期的绿色细胞 linker 染料已经被用于监测 1-2 月内的体内淋巴细胞和巨噬细胞运输, 结果表明 PKH67 还可用于中等时长的体内跟踪研究。

染料可以稳定的与细胞膜脂质区结合并发出荧光, 主要用于细胞体外标记、体外细胞增殖研究以及体内外的细胞示踪研究。PKH67 的体内荧光半衰期为 10-12 天。相比于 PKH-67, PKH-26 具有更长的半衰期, 标记在兔红细胞上的 PKH26 半衰期长达 100 天以上。特别适用于体外增殖研究以及长期的体内细胞跟踪研究。PKH67 标记细胞后通常用流式细胞仪进行细胞增殖检测。

注意事项:

- 染色浓度根据细胞种类的不同和每孔内细胞数量的多少而异。
- 配制的 PKH67 母液极易水解, 建议分装保存, $\leq -20^{\circ}C$ 冷冻干燥保存。
- PKH67 工作液应现配现用, 不能提前配制, 因为 PKH67 吸水会分解, 影响染色效果。





- PKH67 易被水解，在水溶液中会很快变质。母液请在使用过程中避免接触水。工作液在标记细胞的过程中和水接触是在许可的时间范围内的。
- PKH67 荧光染色剂为乙醇溶液，在 4℃、冰浴等较低温度情况下会凝固而粘在离心管管底、管壁或管盖内，从冰箱取出后恢复至室温，变成液体状态后离心至管底部再开盖。可以 37℃水浴片刻至全部融解后使用。
- 不同的细胞种类标记后可以示踪的代次或时间差异较大，请根据实际情况或参考文献进行检测。

使用方法

1.染色液制备:

(1) 从冰箱中取出 PKH67 试剂，静置几分钟至室温，或者 37℃水浴片刻后，离心盛放 PKH67 的管子，开盖前请务必离心几分钟让试剂充分落入管底后才能开盖。

(2) 根据检测的细胞样品数，用稀释液将探针 10 倍稀释，再用合适的溶液(如：无血清培养基，HBSS 或 PBS)将 PKH67 母液 25 倍稀释，配制成染色工作液。最佳工作液浓度请根据不同细胞和自身的实验体系来调整。一般细胞使用按试剂盒中的母液的终浓度 250 倍稀释即可，有些细胞可能需要适当增加浓度。

2.细胞染色

(1) 将制备好的待测细胞用 100μl 染色工作液重悬，至细胞浓度大约 10^7 /ml。也可以进行原位染色，染色液足够覆盖细胞即可。

(2) 在 2~8℃培养细胞 15~30 分钟，不同的细胞最佳培养时间不同。建议待标记细胞在染色工作液中于 37℃孵育 5min，再于 4℃孵育 15min。低温孵育可降低细胞对染料的内吞作用，有助于染料对质膜的标记，并且降低染料定位细胞质囊泡的可能性。

(3) 离心后去上清，收集细胞，用 PBS 或无血清培养基洗涤细胞 1-2 次，最后加入 PBS 或无血清培养基重悬细胞。

(4) 取 500μl 细胞悬液，用流式细胞仪检测。Ex/Em=490/502nm。

(5) 随后还可按照细胞的正常培养方法进行培养。

(6) 可以在荧光显微镜下直接观察标记效果，也可以在培养适当时间后再用流式细胞仪检测细胞增殖，或用于其他特定实验目的的细胞荧光示踪。

3.外泌体染色 (Exosome 染色)

外泌体作为细胞外囊泡(Extracellular vesicle;EV)的一种，与癌症的恶化与转移密切相关，外泌体相关的研究也逐渐成为了关注的热点。为了研究通过外泌体的细胞间通信，细胞摄入外泌体时的示踪技术非常重要。PKH26 和 PKH67 作为新型荧光染料，可满足多重染色在内的各种实验需求

外泌体蛋白定量:取适量外泌体进行 BCA 蛋白浓度测定以确定外泌体蛋白量。

配制 PKH 工作液:用稀释液 C 将 PKH 稀释 10 倍，配制成工作液(现配现用)

准备细胞:将细胞接种到培养皿中,并在 37℃, 5% CO₂ 培养箱中预培养一段时间。

Exosome 染色:

表 1 染色时所需的 Exosome 量

外泌体蛋白量	10-200μg
PKH 工作液用量	50μl

注:

- ①上述外泌体的量是使用超速离心法获得的外泌体的大概的量，
- ②染色所需的外泌体的量因外泌体纯化条件和细胞种类而异。第一次染色时，请预先摸索外泌体的最佳用量
- ③通过聚合物沉淀获得的外泌体会受到剩余聚合物的影响，因此无法用本试剂盒染色



- (1) 吸取 100 μ l 悬浮于 PBS 中的外泌体至微型管中。
- (2) 吸取 2 μ l PKH 工作液至步骤 1 的溶液中，并用涡旋混合器充分混合
- (3) 在 37°C 下培养 30 min。
- (4) 将全部溶液转移至过滤管中，
- (5) 在室温下以 3,000 $\times g$ 离心 5 min。
- (6) 向过滤管中加入 100 μ l PBS。
- (7) 在室温下 3,000 $\times g$ 离心 5 min。
- (8) 再次重复步骤 7 和 8。
- (9) 在室温下以 3,000 $\times g$ 再次离心 5 min，以使剩余溶液滤净。

注：当离心速度 > 3,000 $\times g$ 时，外泌体也会通过滤膜，导致回收量降低。如果溶液仍然存在，请重复离心直至所有溶液滤净。

(10) 吸取 50 μ l PBS 至过滤管中，注意枪头不要碰触到未反应的染料，轻轻吹打，并将收集的染色后外泌体转移到新微型管中。

注：由于未反应的染料也保留在滤膜上，枪头如果直接接残留的染料可能会造成污染。

向细胞中添加外泌体

- (11) 去除培养基，并用 PBS 洗涤 1 次。
- (12) 去除 PBS，然后加入新鲜的含血清培养基。
- (13) 吸取 1-50 μ l 染色的外泌体至细胞中，并在 37°C 5% CO₂ 培养箱中培养 1-24 h。
- (14) 去除上清液，用 PBS 洗涤 2 次。
- (15) 去除 PBS，加入新鲜的含血清培养基，用荧光显微镜观察！

4. 用 HeLa 细胞观察荧光强度随外泌体添加量和培养时间的变化

- (1) 将 HeLa 细胞 (1.25 $\times 10^4$ 个细胞/孔) 接种在 μ -Side8 Well Plate 上，并在 37°C, 5% CO₂ 培养箱中过夜培养。
- (2) 去除培养基，用 PBS 洗涤 1 次，并加入 200 μ l 新鲜的含 10% FBS 的 DMEM 培养基。
- (3) 将已用 ExoSparkder 外泌体膜染色试剂盒染色并纯化过的外泌体 (5/10 μ g 蛋白, 粒子数为 50/100 $\times 10^8$ 个)，加入到含有 HeLa 细胞的孔中。
- (4) 在 37°C, 5% CO₂ 培养箱中培养 2 或 4h。
- (5) 去除培养基，并用 PBS 洗涤 2 次。
- (6) 去除 PBS，加入 200 μ l 新鲜的含 10% FBS 的 DMEM 培养基，用荧光显微镜观察。

注：

- ① 用超速离心从悬浮细胞 HEK293 的上清液中纯化外泌体并使用。
- ② 用 BCA 法测量蛋白质的量，并且通过 Nanoparticles Tracking Analysis (NTA) 测量粒子数。

