



(3) 在盖玻片的一角加入 100 μ L 的染料工作液，轻轻晃动使染料均匀覆盖所有细胞。

(4) 37°C 孵育细胞 2~20 min，不同的细胞最佳培养时间不同。可以 20 min 作为起始孵育时间，之后优化体系以得到均一的标记效果。

(5) 吸干染料工作液，用培养液洗盖玻片 2~3 次，每次用预温的培养基覆盖所有细胞，孵育 5~10 min，然后吸干培养基。但要使表面保持湿润。

4. 结果检测

样品可在培养基中进行检测，可通过荧光显微镜成像或流式细胞仪分析。

注：绿色光激发，荧光显微镜滤光片可以选择 FITC 滤光片；流式细胞仪选择 FITC (BL1) 通道。

FAQ

1. 问：Di 系列细胞膜固体染料配制储液的溶解度多少合适？

答：不同的细胞膜染料溶解度不同，请根据相应的说明书进行溶解。下面是常用细胞膜染料的溶解度供参考。

(1) DiO (D4007) 在 DMSO 中溶解度是 5 mg/mL (需要进行超声 1~1.5 h 和 60°C 加热助溶)；在 DMF 中溶解度是 10 mg/mL (需要超声助溶)。

(2) DiA (D4059) 在 DMSO 中溶解度是 2 mg/mL (需要进行超声 1~1.5 h 和 60°C 加热助溶)。

(3) DiD (D4019) 在 DMSO 中溶解度是 25 mg/mL (需要进行超声 1~1.5 h 和 60°C 加热助溶)。

(4) DiI (D4010) 在 DMSO 中溶解度是 12.5 mg/mL (需要进行超声 1~1.5 h 和 60°C 加热助溶)。

(5) DiR (D4006) 在 DMSO 中溶解度是 10 mg/mL (需要进行超声 1~1.5 h 和 60°C 加热助溶)。

此外，请注意 DMSO 受潮问题可能会影响溶解度，请尽量使用新开封的 DMSO。

2. 问：染色发现背景有杂点的可能原因？且细胞大部分未染色，有什么好的改进方法吗？

答：考虑是染料稀释成工作液时发生聚集，溶解度问题导致。细胞膜染料为亲脂性染料，水溶解度不是很好，稀释成工作液时建议(1) 储液稀释成工作液时尽快振荡混匀；(2) 提前将稀释需要的液体如 PBS 水浴温热至 37°C，超声促进溶解；(3) 可用 10000 $\times$ g 离心 2 min 检查底部是否无明显颗粒，若有，说明稀释时染料发生聚集，该工作液需加热超声助溶。若仍然有杂点，稀释工作液时可以加入 0.25 mM β -环糊精与 0.04% F-127 促溶 (使染料本身更稳定)。

3. 问：Di 系列染料染色细胞后，用 4%多聚甲醛固定和 0.1% TritonX-100 透化后，染色亮度低的原因是什么？

答：Di 系列的细胞膜染料均是亲脂类染料。经 TritonX-100 进行透化处理后，磷脂双分子层被破坏，影响 Di 系列染料与细胞膜的结合导致染色亮度变低。Di 系列的染料较推荐活细胞的细胞膜染色。

4. 问：细胞追踪有很多产品，该如何选择？

答：可以先确定需要追踪细胞的时长，再结合染料的结合机制选择：

(1) 钙黄绿素染料 (C4041) 标记均匀，对短期细胞迁移示踪效果极佳，但会被部分细胞迅速外排。

(2) 亲脂性花青素染料，如 DiI/DiI (D4010)，DiO (D4007)，DiA (D4059)，DiD (D4019)，DiR (D4006) 能标记细胞膜而不破坏其功能，并且能持续更长时间，但如果发生膜融合则可能会染上其他细胞。此外，它们还会在透化过程中丢失。

(3) Cell Tracker 染料 (C4060) 更适合长期标记，它带有温和的氯甲基反应基团，能够与细胞组分共价结合。

(4) CFDA SE (4070) 也可以和细胞组分共价结合。

上述所有试剂在细胞内的保留情况，取决于细胞分裂速率和细胞固有特

性，包括主动外排能力、膜及蛋白质周转率等。共价结合试剂的细胞内保留时间明显长于非共价结合试剂。

5. 问：固定后的细胞，可以用 DiO 进行染色吗？

答：该类细胞膜染料可以染色固定后的细胞样本，但如果固定过程中，细胞膜破损，会影响染色的效果。

6. 问：DiO 也可以染色细胞内的细胞器膜吗？

答：可以，因为 DiO 染色细胞膜是非特异性的，所以细胞器的膜也会被染上色，如果不想细胞器染色太明显，可以减少孵育时间或者染料浓度。

同系列产品

产品货号	产品名称	选购指南
D4007	DiO (细胞膜绿色荧光探针)	细胞膜、外泌体染色，(长期) 示踪剂，较推荐活细胞
N4021	DiO Plus (细胞膜绿色荧光探针升级款)	细胞膜染料，细胞膜上染料横向迁移率低，溶解性更好，较推荐活细胞
D4019	DiD (细胞膜红色荧光探针)	细胞膜、外泌体染色，(长期) 示踪剂，活体成像，不易淬灭，较推荐活细胞
C4050	CytoMBrite™ 细胞膜红色荧光探针	可参考 D4019
D4006	DiR (细胞膜近红外荧光探针)	细胞膜、外泌体染色，示踪剂，更多用于活体成像，细胞间染料转移率低，较推荐活细胞
C4044	CytoMBrite™ 细胞膜近红外荧光探针	可参考 D4006
D4010	DiI (细胞膜橙红色荧光探针)	细胞膜染料，(长期) 示踪剂，与 DiA 常连用进行双色标记，较推荐活细胞
C4049	CytoMBrite™ 细胞膜橙红色荧光探针	可参考 D4010
C4060	Cell Tracker CM-DiI (细胞膜橙红色荧光探针)	细胞膜染料，示踪剂，72 h 荧光稳定，推荐活细胞或者醛固定的细胞。
D4053	Dilinoylel DiI (细胞膜橙红色荧光探针)	细胞膜染料，广泛用于神经元组织示踪，横向扩散效率较 DiI 高，较推荐活细胞
D4059	DiA (细胞膜绿色荧光探针)	细胞膜染色，相较于 DiO 细胞膜扩散效率高，常与 DiI 进行膜双色标记，较推荐活细胞