

## DiA (细胞膜绿色荧光探针)

### 产品介绍

DiA (4-Di-16-ASP) 是一种亲脂性氨基苯乙烯基探针，它在细胞膜中的扩散速度比 DiO 快，经常和 DiI 一起使用于细胞膜双色标记，用于神经元膜示踪。

DiA 染色后可进行多聚甲醛（不可使用甲醇等其他试剂）的固定，但不建议在染色后进行透化。DiA 对固定细胞的染色效果优于 DiO。

以每次使用 100  $\mu$ L 染色工作液，染色工作液浓度 10  $\mu$ M 计算，50 mg 配置为工作液大概可以用 63532 次。

### 应用范围

细胞膜荧光染料、神经元顺行和逆行示踪、细胞长期示踪。

### 产品货号

D4059

### 储运条件

-20°C 避光保存，有效期见外包装；冰袋运输。

### 产品特点

**稳定性好：** 荧光亮度强且抗淬灭性好，可以在细胞内很好地保留；

**批间差小：** 公司自研产品，批间差稳定；

**使用方便：** 可搭配我司其它试剂使用，方便灵活；

**扩散速度快：** 扩散速度快，广泛应用于神经元组织追踪等。

### 产品组分

| 组分              | D4059 |
|-----------------|-------|
| DiA (细胞膜绿色荧光探针) | 50 mg |

### 产品参数

**外观：** 可溶于DMSO的红色固体

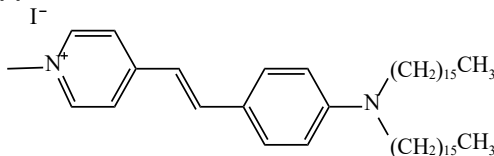
**Ex/Em：** 456/590 nm (MeOH)

**CAS号：** 114041-00-8

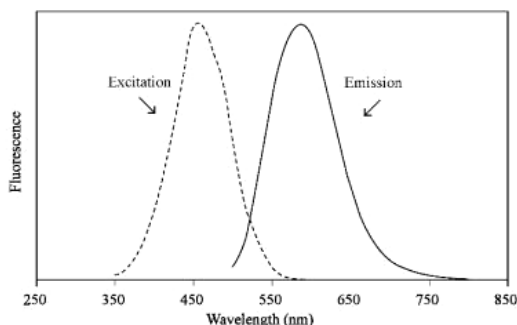
**分子式：** C<sub>46</sub>H<sub>79</sub>IN<sub>2</sub>

**分子量：** 787.0

**分子结构图：**



**光谱图：**



### 注意事项

- 使用前请将产品瞬时离心至管底，再进行后续实验。
- 荧光染料均存在淬灭问题，实验操作时请尽量注意避光，以减缓荧光淬灭。
- Di 系列染料为亲脂性染料，在水相中溶解度极低。若稀释步骤不当，染料极易聚集形成荧光微粒，吸附在细胞表面或玻片上。
- Di 系列染色固定的细胞或组织样品时，通常使用配制在 PBS 中的 4% 多聚甲醛进行固定，使用其它不适当的固定液会导致荧光背景较高。
- 本产品仅限于科研，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品和药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

### 自备材料

1. 耗材

(1) 离心管 (2) 盖玻片

2. 试剂

(1) 无水 DMSO 或无水 EtOH 或无水 DMF (2) 无血清培养基或 HBSS 或 PBS (3) 培养基 (预温)

3. 仪器

荧光显微镜或流式细胞仪

### 操作步骤

#### 1. 染色液制备

(1) 配制储液：储液用无水 DMSO、无水 DMF 或 EtOH 配制，浓度 1~5 mM。DiA 在无水 DMSO 和无水 DMF 中的溶解度比在 EtOH 中的溶解度高。未使用的储液建议分装后储存在 -20°C，避免反复冻融。

**注：**发现较难溶解时可以适当加热，并用超声处理以促进溶解。

(2) 工作液制备：用合适的缓冲液（如：无血清培养基，HBSS 或 PBS）稀释储液，配制浓度为 1~30  $\mu$ M 的工作液。最常用的工作液浓度为 5~10  $\mu$ M。

**注：**工作液最终浓度建议根据不同细胞系和实验体系来优化。建议从推荐浓度的 10 倍范围内开始最优浓度的摸索。如果后续染色效果不佳，可以稀释工作液时加入 0.25 mM  $\beta$ -环糊精与 0.04% F-127 促溶，使染料本身更稳定。

#### 2. 悬浮细胞染色

(1) 加入适当体积的染色工作液重悬细胞，使其密度为  $1 \times 10^6$ /mL。

(2) 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。

(3) 孵育结束，1000~1500 rpm 离心 5 min。倾倒入清液，再次缓慢加入 37°C 预热的生长培养液重悬细胞。

(4) 重复步骤(3)两次以上。

#### 3. 贴壁细胞染色

(1) 将贴壁细胞培养于无菌盖玻片上。

(2) 从培养基中移走盖玻片，吸走过量培养液，但要使表面保持湿润。

(3) 在盖玻片的一角加入 100  $\mu$ 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 5~20 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：**绿光激发，荧光显微镜滤光片可以选择 FITC (绿色) 或者 Cy3 (橙红色) 或者 Cy3.5 (深红色) 滤光片；流式细胞仪选择 BL1 (FL1) 或者 BL2 (FL2)。

## 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 水浴加热至 37°C，超声促进溶解；(3) 可用 10000xg 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  $\beta$ -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，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. 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 (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。

## 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 |