

几种细胞膜荧光探针的染色细节解析

几种细胞膜荧光探针的染色细节解析：DiA, DiI, DiO, DiD 和 DiR 染料是用于标记细胞膜和其他疏水结构的亲脂荧光染料家族。当掺入膜中或与亲脂性生物分子如蛋白质结合时，这些对环境敏感的染料的荧光大大增强，尽管它们在水中是弱荧光的。它们具有高消光系数，极性依赖性荧光和短激发态寿命。一旦应用于细胞，这些染料在细胞质膜内横向扩散，导致整个细胞在其最佳浓度下均匀染色。DiI（橙色荧光），DiO（绿色荧光），DiD（红色荧光）和DiR（深红色荧光）的独特荧光颜色为活细胞的多色成像和流式细胞分析提供了便利的工具。DiO 和 DiI 可分别与标准 FITC 和 TRITC 过滤器一起使用。其中 DiD 被 633 nm He-Ne 激光器激发，并且具有比 DiI 更长的激发和发射波长，为标记具有显着内在荧光的细胞和组织提供了有价值的替代方案。由于红外光通过细胞和组织的有效传输以及红外范围内的低水平自发荧光，DiR 可用于体内成像或示踪。

样品方案分析

1. 制备DiO, DiI DiD, DiS或DiR膜染色溶液：

1.1 制备DMSO或EtOH储备溶液：储备溶液应在DMSO或EtOH中以1-5mM制备。

注意：原液的未使用部分应储存在-20℃。避免反复冻/融循环。

1.2 准备工作溶液：将原液（步骤1.1）稀释到合适的缓冲液中，如无血清培养基，HBSS或PBS，制成1至5 M工作溶液。

注意：对于不同的细胞类型和/或实验条件，应根据经验确定工作溶液的最终浓度。建议在至少超过十倍范围的浓度下进行测试。

2. 将细胞染成悬浮液：

2.1 在染料加工溶液中悬浮细胞密度为 1×10^6 / mL（来自步骤1.2）。

2.2在37° C温育2-20分钟。最佳培养时间取决于细胞类型。首先孵育20分钟，然后根据需要进行优化以获得均匀的标记。

2.3将标记的悬浮管以1000至1500rpm离心5分钟。

2.4取出上清液，轻轻地将细胞重新悬浮在预热（37° C）的生长培养基中。

2.5按步骤2.3和2.4再洗两次。

3. 染色贴壁细胞：

3.1在无菌玻璃盖玻片上生长贴壁细胞。

3.2从生长培养基中取出盖玻片，轻轻地排出多余的培养基。将盖玻片放在湿度箱中。

3.3将100 μL染料工作溶液（来自步骤1.2）移至盖玻片的角上，轻轻搅拌直至所有细胞都被覆盖。

3.4将盖玻片在37° C孵育2-20分钟。最佳培养时间取决于细胞类型。首先孵育20分钟，然后根据需要进行优化以获得均匀的标记。

3.5排出染料工作溶液，用生长培养基清洗盖玻片两到三次。对于每个洗涤循环，用预热的生长培养基覆盖细胞，孵育5-10分钟，然后排出培养基。

4. 显微镜检测：

4.1说明书中的表1总结了DiD, DiO, DiI, DiS和DiR滤波器组的选择。

4.2对于多种染料的同时检测，多频带滤光片组如下：

- a) DiI和DiO = Omega XF52, Chroma 51004
- b) DiI和DiD = Omega XF92, Chroma 51007
- c) DiI, DiO和DiD = Omega XF93, Chroma 61005

5. 流式细胞仪检测:

用DiO, DiI, DiD, DiS和DiR标记的细胞可分别使用常规FL1, FL2, FL3和FL4流式细胞仪检测通道进行分析。

参考文献

1. Heinrich L, Freyria AM, Melin M, Tourneur Y, Maksoud R, Bernengo JC, Hartmann DJ. (2006) Confocal laser scanning microscopy using dialkylcarbocyanine dyes for celltracing in hard and soft biomaterials. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.*
2. Higashide T, Kawaguchi I, Ohkubo S, Takeda H, Sugiyama K. (2006) In vivo imaging and counting of rat retinal ganglion cells using a scanning laser ophthalmoscope. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47, 2943.
3. Kalchenko V, Shivtiel S, Malina V, Lapid K, Haramati S, Lapidot T, Brill A, Harmelin A. (2006) Use of lipophilic near-infrared dye in whole-body optical imaging of hematopoietic cell homing. *J Biomed Opt*, 11, 050507.
4. Wang G, Anrather J, Glass MJ, Tarsitano MJ, Zhou P, Frys KA, Pickel VM, Iadecola C. (2006) Nox2, Ca²⁺, and protein kinase C play a role in angiotensin II-induced free radical production in nucleus tractus solitarius. *Hypertension*, 48, 482.

以上是这几种细胞膜荧光探针的染色方法，与君共勉！