外泌体绿色荧光（PKH67）标记试剂盒

产品描述：

YOBIBIO 外泌体绿色荧光（PKH67）标记试剂盒是一种以 PKH67 为荧光探针快速灵敏地标记外泌体的试剂盒。本试剂盒可用于研究外泌体的靶向、吞噬和运输机制等，可使用荧光显微镜、激光共聚焦显微镜、荧光酶标仪、流式细胞仪等荧光检测系统进行检测。

外泌体是一种由细胞分泌并释放的细胞外囊泡，直径约为 40-160nm，具有脂质双分子层结构，天然存在于血液、尿液、脑脊液，以及体外培养细胞的上清液中。外泌体通过被细胞识别和融合参与细胞间的相互调控，影响细胞功能。

PKH67 是一种新型具有脂质碳尾的荧光探针，可以通过与外泌体膜的脂质分子结合而标记外泌体。PKH67 呈绿色荧光，最大激发波长(Ex)为 490nm，最大发射波长(Em)是 502nm，与荧光素(Fluorescein)的荧光检测兼容。PKH67 与其它红色 PKH 探针互补，在混合细胞群里能定量分析，可与碘化丙啶(PI)等细胞活力荧光探针联合使用，或者与橙、红色荧光探针例如藻红蛋白、红色荧光蛋白（如 RFP、mCherry）等结合使用。伽碧艾同时提供外泌体红色荧光（PKH26）标记试剂盒（货号：U23-005E）。

本试剂盒提供专用于 PKH67 稀释的 Dilution Buffer，可以在染色过程中增加染色效率，同时维持细胞活力。

产品规格：

产品名称	货号	规格	保存条件
外泌体绿色荧光（PKH67）标记试剂盒	U23-006E	20μl	2-8℃避光

包装清单：

组分名称	规格	保存条件
PKH67 母液	20μl (1mM)	2-8℃避光
Dilution Buffer	200μl	2-8℃避光

使用说明：

1、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。

2、染料工作液制备：用 Dilution buffer 将 PKH67 母液稀释 10 倍，配制成浓度为 100μM 的染料工作液（注意避光操作，现配现用）。外泌体蛋白量为 10-200μg 时建议使用 50μl 染料工作液，外泌体蛋白量为 200-500μg 时建议使用 100μl 染料工作液。

3、外泌体标记：在外泌体中加入适量染料工作液，将离心管盖紧，通过涡旋振荡器混匀 1min，再静置孵育 10min。孵育结束后加入 10ml PBS 混匀，按照外泌体提取方法再次提取外泌体以去除多余染料，取 200μl PBS 重悬沉淀物，沉淀即为染色后的外泌体。

4、标记外泌体的细胞装载和示踪（以装载 6 孔板的一个孔细胞为例）。

对于悬浮细胞：

（1）取约 10^6-10^7 个细胞室温 600×g 离心 5min，弃上清。

（2）将 PKH67 染色后的外泌体（约 200-220μl）与新鲜的完全培养液（约 1.8ml）按 1:9 的体积进行混合，并用该混合液（约 2 ml）重悬细胞，加入 6 孔板中。

（3）37ºC 培养箱中孵育 1 - 24 h。不同细胞的最佳孵育时间不同，以 1h 作为初始孵育时间，根据实际情况对孵育时间进行适当优化以得到最佳的效果。

（4）孵育结束后，600×g 4ºC 离心 3-4min，沉淀细胞。弃上清，注意尽量不要吸除细胞。

（5）用 PBS 洗涤 2 次。每次加入 1ml PBS 重悬细胞，600×g 4ºC 离心 3-4min，弃上清。

（6）用适量 PBS 重悬细胞，用荧光显微镜或激光共聚焦显微镜对外泌体标记的细胞进行观察，也可以用荧光分光光度计检测或流式细胞仪分析。

对于贴壁细胞：

（1）吸除 6 孔板中的细胞培养液，PBS 洗涤细胞一次。

（2）将 PKH67 标记并终止后的外泌体（约 200-220μl）与新鲜的完全培养液（约 1.8 ml）按 1:9 的体积进行混合，并加入至 6 孔板中。

（3）37ºC培养箱中孵育 1-24 h。不同细胞的最佳孵育时间不同，以 1h 作为初始孵育时间，根据实际情况对孵育时间进行适当优化以得到最佳的效果。

（4）孵育结束后，吸除上清，PBS 洗涤细胞 2 次。

（5）用适量 PBS 重悬细胞，用荧光显微镜或激光共聚焦显微镜对外泌体标记的细胞进行观察。如果使用荧光酶标仪检测，建议使用合适的黑板或白板，避免孔间干扰。如果使用流式细胞仪检测，可以先消化并收集细胞，重悬后参考悬浮细胞的检测方法。

注意事项：

1、PKH67 母液易水解且易挥发，建议首次使用时分装并使用封口膜包紧后密封保存。

2、PKH67 工作液应现配现用，请勿提前配制，否则将影响染色效果。

3、PKH67 母液在较低温度下会凝固而粘在离心管管底、管壁或管盖内，可室温或 37℃水浴片刻至全部融解后短暂离心再使用。

4、含血清、BSA 或 BSA 类似物的溶液对 PKH67 的标记有干扰，须避免。

5、荧光染料均存在淬灭问题，请尽量注意避光，以减缓荧光淬灭。

6、过度染色会导致外泌体膜完整性丧失，最佳 PKH67 用量需根据自身实验而决定。

7、荧光酶标仪检测时须使用适合荧光检测的黑板或白板。

8、PKH67 有易燃性，操作时请小心，并注意有效防护，同时必须远离热源、明火、热表面等可能引起燃烧的环境；对人体有害或有刺激性，请小心操作，注意有效防护以避免直接接触人体或吸入体内。

9、本产品仅作体外科研使用，不可用于临床诊断或治疗。

10、实验员请穿实验服并佩戴一次性手套操作。

保存方法：

2-8℃避光保存，一年有效。

产品保质期及产品批号见试剂盒外包装标签。

使用前请仔细阅读此说明书，如果有任何问题请及时联系我们！

电话：400-681-8582

QQ：1296725867

邮箱：service@scigebio.com

网址：www.yobibio.com