



PKH Cell Membrane Labeling Kits manual

Lumiprobe Corporation. All rights reserved.

Contents

English: PKH Cell Membrane Labeling Kits manual	3-6
Deutsch: Handbuch für das PKH Kits für die Zellmembranmarkierung .	7-9
Русский: Инструкция к наборам для мечения клеточных мембран с помощью красителей PKH	10-13

PKH Cell Membrane Labeling Kits manual

Kit components

Kit component	Count											
	13201	23201	33201	43201	14201	24201	34201	44201	17201	27201	37201	47201
100 uL dye, 1x buffer	100	100	500	500	100	100	500	500	100	100	500	500
100 uL dye, 5x buffer	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5 uL dye, 1x buffer	1	1	5	5	—	—	—	—	—	—	—	—
100 uL 1 mM solution in isopropanol, 100 uL	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
K6150, PKH Dyes Diluent, 1x, 10 mL	5	—	25	—	5	—	25	—	5	—	25	—
K7150, PKH Dyes Diluent, 5x, 10 mL	—	1	—	5	—	1	—	5	—	1	—	5
2485-100uL, PKH2 dye, 1 mM solution in isopropanol, 100 uL	—	—	—	—	1	1	5	5	—	—	—	—
2801-100uL, PKH800 dye, 1 mM solution in isopropanol, 100 uL	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	5	5

Store at 4 °C. Warm to RT before use.

Shelf life 12 months.

Recommendations for using the kit

- Optimal concentrations of the dye and cells can vary depending on cell and study type, so evaluate cell viability, homogeneity, and fluorescence intensity after staining.
- Do not use azide-containing solutions when staining with PKH dyes.
- Staining is more homogeneous when cell suspension is used.

Protocol

Protocol for cell membrane labeling with PKH dyes for RAW264.7 adhesion culture, 1×10^6 cells/sample, the final concentration of PKH dye 2 μM , final volume 200 μL .

1. Prepare PKH dye solution immediately before staining. Add 1 μL of PKH dye solution (*PKH dye, 1 mM solution in isopropanol*) to 9 μL of 96% ethanol, and add 4 μL of the resulting solution to 100 μL of *PKH Dyes Diluent, 1x*.

**1x PKH Dyes Diluent is available either in ready-to-use form (K6150, PKH Dyes Diluent, 1x) or as a 5x concentrate (K7150, PKH Dyes Diluent, 5x). To dilute 5x PKH Dyes Diluent, use sterile bidistilled water.*
2. Remove the cell culture from the surface with a scraper in Hanks' solution (HBSS). Count the cells in the sample. Add 3 mL of Hanks' solution, centrifuge at 400 $\times g$ for 6 min at room temperature.

**Serum proteins and lipids also bind the dye, so it is recommended to wash the cells once with serum-free medium or phosphate buffer saline.*
3. Remove the supernatant with a pipette, and resuspend a necessary amount of cells (e. g. 1×10^6 cells) in 100 μL of *PKH Dyes Diluent, 1x*. Add 100 μL of PKH dye solution prepared in step 1. Pipette and allow to stand at room temperature for 5 min. The final PKH dye concentration in the cell solution is 2 μM .

**To obtain reproducible results, minimize the volume of the supernatant before cell resuspending.*

**Do not leave cells in PKH Dyes Diluent for a long period.*

**Staining is almost instant, so rapid cell dispersion in the dye solution is important to produce bright homogeneous and reproducible labeling.*
4. Add 2 mL of fetal bovine serum to stop the reaction, and incubate for 1 min. Centrifuge at 400 $\times g$ for 10 min at room temperature.

**To stop the reaction, do not use a serum-free medium or buffered salt solution that results in dye aggregates.*

5. Remove the supernatant, resuspend the cells in 5 mL of complete culture medium, and transfer them to a new tube. Take aliquots to evaluate cell viability with trypan blue. Centrifuge at 400 x g for 10 min at room temperature.
6. Resuspend the cells in a buffer for further analysis (microscopy, flow cytometry, etc.).

**Stained cells can be fixed with 2% paraformaldehyde, and staining remains stable for at least 3 weeks if samples are protected from light.*

Recommendations for storage

PKH dye solution can be stored at room temperature or in a refrigerator protected from light. Check the solution for precipitation before use. If a precipitate is seen in the dye solution, slightly warm it in a water bath at 37 °C and ultrasonicate or vortex until redissolved.

PKH Dyes Diluent is delivered as a 1x or a 5x solution in a sterile container. Store in a refrigerator and adjust to room temperature immediately before use.

Handbuch für das PKH Kits für die Zellmembranmarkierung

Bestandteile

Komponente	Anzahl											
	13201 100 uL dye, 1x buffer	23201 100 uL dye, 1x buffer	33201 500 uL dye, 5x buffer	43201 500 uL dye, 5x buffer	14201 100 uL dye, 1x buffer	24201 100 uL dye, 5x buffer	34201 500 uL dye, 1x buffer	44201 100 uL dye, 5x buffer	17201 100 uL dye, 1x buffer	27201 500 uL dye, 1x buffer	37201 500 uL dye, 5x buffer	47201 500 uL dye, 5x buffer
2484-100uL, Farbstoff PKH26, 1 mM Lösung in Isopropanol, 100 uL	1	1	5	5	—	—	—	—	—	—	—	—
K6150, PKH-Farbstoffpufferlösung, 1x, 10 mL	5	—	25	—	5	—	25	—	5	—	25	—
K7150, PKH-Farbstoffpufferlösung, 5x, 10 mL	—	1	—	5	—	1	—	5	—	1	—	5
2485-100uL, Farbstoff PKH2, 1 mM Lösung in Isopropanol, 100 uL	—	—	—	—	1	1	5	5	—	—	—	—
2801-100uL, Farbstoff PKH800, 1 mM Lösung in Isopropanol, 100 uL	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	5	5

Bei 4 °C lagern. Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur temperieren.

Haltbarkeit: 12 Monate.

Anwendungsempfehlungen:

- Die optimalen Farbstoff- und Zellkonzentrationen können abhängig von Zelltyp und Versuch variieren. Es wird daher empfohlen, nach der Färbung die Zellvitalität sowie Fluoreszenzhomogenität und -intensität auszuwerten.
- Benutzen Sie keine azidihaltigen Lösungen bei Färbung mit den PKH-Farbstoffen.
- Die Verwendung einer Zellsuspension liefert eine homogener Zellfärbung.

Kitprotokoll

Kitprotokoll für die Markierung von Zellmembranen mit dem Farbstoffe PKH am Beispiel der Haftkultur RAW264.7, 1×10^6 Zellen pro Probe mit einer PKH-Endkonzentration von 2 μM und dem Endvolumen von 200 μl .

1. Stellen Sie eine PKH-Färbelösung frisch vor der Färbung her. Mischen Sie dafür 1 μl einer PKH-Lösung (*PKH dye, 1 mM solution in isopropanol*) und 9 μl 96%igen Ethanols. Entnehmen Sie 4 μl der hergestellten Lösung und geben Sie sie zu 100 μl *PKH Dyes Diluent, 1x*.

**1x PKH Dyes Diluent ist entweder in gebrauchsfertiger Form (K6150, PKH Dyes Diluent, 1x) oder als 5x Konzentrat (K7150, PKH Dyes Diluent, 5x) erhältlich. Verwenden Sie zum Verdünnen von 5x PKH Dyes Diluent steriles bidestilliertes Wasser.*

2. Lösen Sie die Zellen mit einem Zellschaber in Hanks' BSS (HBSS) ab. Zählen Sie die Zellen in der Probe. Fügen Sie 3 ml von Hanks' BSS und zentrifugieren Sie 6 Minuten lang bei $400 \times g$ und Raumtemperatur.

**Der Farbstoff wird ebenfalls von Serumproteinen und -lipiden gebunden, deshalb ist ein einmaliger Waschschritt mit serumfreiem Medium oder PBS-Puffer empfohlen.*

3. Pipettieren Sie den Überstand komplett ab und resuspendieren Sie die benötigte Zellzahl (zum Beispiel 1×10^6 Zellen) in 100 μl *PKH Dyes Diluent, 1x*. Fügen Sie 100 μl der im Schritt 1 hergestellten PKH-Lösung hinzu. Pipettieren Sie und lassen Sie den Ansatz für 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen. Die PKH-Endkonzentration in der Zelllösung beträgt 2 μM .

**Für reproduzierbare Ergebnisse ist es wichtig, den Überstand vor dem Resuspendieren der Zellen möglichst vollständig abzunehmen.*

**Lassen Sie die Zellen nicht lange in PKH Dyes Diluent.*

**Da die Färbung fast sofort eintritt, ist eine schnelle Verteilung der Zellen in der Farbstofflösung für eine helle, homogene und reproduzierbare Markierung entscheidend.*

4. Stoppen Sie die Reaktion mit 2 ml fötalem Kälberserum ab und inkubieren Sie für 1 Minute. Zentrifugieren Sie bei $400 \times g$ 10 Minuten lang bei Raumtemperatur.

**Verwenden Sie zum Abstoppen der Reaktion keine serumfreie Medien oder Pufferlösungen, die zur Bildung von Farbstoffaggregaten führen.*

5. Entfernen Sie den Überstand und resuspendieren Sie das Pellet in 5 ml eines Kulturmediums. Überführen Sie die Lösung in ein neues Reaktionsgefäß. Entnehmen Sie Aliquots für die Beurteilung der Zellvitalität mit Trypanblau. Zentrifugieren Sie bei $400 \times g$ 10 Minuten lang bei Raumtemperatur.
6. Resuspendieren Sie die Zellen im jeweiligen für die weiteren Untersuchungen (Mikroskopie, Durchflusszytometrie u. a.) bestimmten Puffer.

**Die gefärbten Zellen können mit einer 2%igen Paraformaldehyd-Lösung fixiert werden. Bei einer lichtgeschützten Lagerung der Proben bleibt die Färbung mindestens drei Wochen lang stabil.*

Lagerung:

PKH-Lösung kann bei Raumtemperatur oder im Kühlschrank lichtgeschützt gelagert werden. Es wird empfohlen, die Lösung vor Gebrauch auf Bodensatzbildung zu kontrollieren. Eventuelle Bodensätze können durch leichtes Erwärmen im Wasserbad auf 37 °C und anschließend durch Ultraschall oder Schütteln gelöst werden.

PKH Dyes Diluent wird als sterile 1x- oder 5x-Lösung geliefert. Die Lösung sollte im Kühlschrank gelagert und erst unmittelbar vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht werden.

Инструкция к наборам для мечения клеточных мембран с помощью красителей PKH

Состав набора

Компонент набора	Количество											
	13201 100 uL dye, 1x buffer	23201 100 uL dye, 5x buffer	33201 500 uL dye, 1x buffer	43201 500 uL dye, 5x buffer	14201 100 uL dye, 1x buffer	24201 100 uL dye, 5x buffer	34201 500 uL dye, 1x buffer	44201 500 uL dye, 1x buffer	17201 100 uL dye, 5x buffer	27201 100 uL dye, 5x buffer	37201 500 uL dye, 1x buffer	47201 500 uL dye, 5x buffer
2484-100uL, Краситель PKH26, 1mM раствор в изопропаноле, 100 uL	1	1	5	5	—	—	—	—	—	—	—	—
K6150, Буфер для разведения PKH, 1x, 10 mL	5	—	25	—	5	—	25	—	5	—	25	—
K7150, Буфер для разведения PKH, 5x, 10 mL	—	1	—	5	—	1	—	5	—	1	—	5
2485-100uL, Краситель PKH2, 1mM раствор в изопропаноле, 100 uL	—	—	—	—	1	1	5	5	—	—	—	—
2801-100uL, Краситель PKH800, 1mM раствор в изопропаноле, 100 uL	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	5	5

Хранить при +4°C. Прогреть до комнатной температуры перед использованием.

Срок хранения 12 месяцев.

Рекомендации по использованию набора

- В зависимости от типа клеток и эксперимента оптимальные концентрации красителя и клеток могут отличаться, поэтому рекомендуется оценивать жизнеспособность клеток, гомогенность и интенсивность флуоресценции после окрашивания.
- Не используйте растворы, содержащие азиды, при окрашивании красителями РКН.
- Более однородное окрашивание достигается при использовании суспензии клеток.

Протокол

Протокол использования набора для мечения клеточных мембран красителями РКН на примере адгезионной культуры RAW264.7, 1×10^6 клеток в образце, финальная концентрация красителей РКН — 2 μM , финальный объем 200 мкл.

1. Непосредственно перед окрашиванием приготовьте раствор красителя РКН. Добавьте 1 мкл раствора красителя РКН (*PKH dye, 1 mM solution in isopropanol*) к 9 мкл 96% этанола, и 4 мкл полученного раствора добавьте к 100 мкл *PKH Dyes Diluent, 1x*.

**1x PKH Dyes Diluent* поставляется либо в готовой форме (*K6150, PKH Dyes Diluent, 1x*), либо в виде 5x концентрата (*K7150, PKH Dyes Diluent, 5x*). Для разбавления 5x *PKH Dyes Diluent* используйте стерильную бидистиллированную воду.

2. Культуру клеток снимите с подложки скребком в растворе Хенкса (HBSS). Проведите подсчет клеток в образце. Далее добавьте 3 мл раствора Хенкса, центрифугируйте при 400 $\times g$ 6 мин при комнатной температуре.

*Сывороточные белки и липиды также связывают краситель, поэтому рекомендуется однократно промывать клетки бессывороточной средой или фосфатно-солевым буфером.

3. Супернатант удалите полностью пипеткой, необходимое количество клеток (например, 10^6 клеток) ресуспендируйте в 100 мкл *PKH Dyes Diluent, 1x*. Далее добавьте 100 мкл полученного на первом шаге раствора красителя РКН. Пипетируйте и оставьте при комнатной температуре на 5 мин. Конечная концентрация красителя РКН в растворе с клетками — 2 μM .

**Для воспроизводимых результатов важно минимизировать количество супернатанта перед ресуспендированием клеток.*

**Не оставляйте клетки в *PKH Dyes Diluent* в течение длительного времени.*

**Поскольку окрашивание происходит практически мгновенно, быстрое диспергирование клеток в растворе красителя имеет важное значение для яркого, однородного и воспроизводимого мечения.*

4. Добавьте 2 мл фетальной бычьей сыворотки для остановки реакции, инкубируйте 1 мин. Центрифугируйте при $400 \times g$ 10 мин при комнатной температуре.

**Не используйте для остановки реакции бессывороточную среду или буферные растворы, которые вызывают образование агрегатов красителя.*

5. Супернатант удалите, ресуспендируйте клетки в 5 мл полной питательной среды, перенесите в новую пробирку. Отберите аликовты для оценки жизнеспособности трипановым синим. Центрифугируйте при $400 \times g$ 10 мин при комнатной температуре.

6. Ресуспендируйте клетки в буфере, необходимом для дальнейшего анализа (микроскопия, проточная цитофлуориметрия и др.).

**Окрашенные клетки можно фиксировать 2% параформальдегидом, и окраска остается стабильной в течение не менее 3 недель, если образцы защищены от света.*

Рекомендации по хранению:

Раствор красителей PKH можно хранить при комнатной температуре или в холодильнике в защищенном от света месте. Рекомендуется проверить раствор на наличие осадка перед использованием. Если в растворе красителя заметен осадок, слегка нагрейте его на водяной бане при 37°C и обработайте ультразвуком или встряхните до повторного растворения.

Раствор *PKH Dyes Diluent* поставляется в виде однократного либо пятикратного раствора в стерильной емкости, его рекомендуется хранить в холодильнике и доводить до комнатной температуры непосредственно перед использованием.



22.09.509-QM
Issued by INSPECT



www.lumiprobe.com

