

LumiCell PKH26 cell membrane labeling kit manual

Contents

Deutsch: Handbuch für das LumiCell PKH26 Kit für die Zellmembranmarkierung	3-5
Русский: Инструкция к набору для мечения клеточных мембран LumiCell PKH26	6-8
English: LumiCell PKH26 cell membrane labeling kit manual	9-11

Handbuch für das LumiCell PKH26 Kit für die Zellmembranmarkierung

Bestandteile

Komponente	Anzahl			
	13201 100 uL dye, 1x buffer	23201 100 uL dye, 5x buffer	33201 500 uL dye, 1x buffer	43201 500 uL dye, 5x buffer
2484-100uL, PKH26 dye, 1 mM solution in isopropanol, 100 uL	1	1	5	5
K6150, PKH26 Diluent, 1x, 10 mL	5	—	25	—
K7150, PKH26 Diluent, 5x, 10 mL	—	1	—	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 azidhaltigen Lösungen bei Färbung mit dem Farbstoff PKH26.
- Die Verwendung einer Zellsuspension liefert eine homogenere Zellfärbung.

Kitprotokoll

Kitprotokoll für die Markierung von Zellmembranen mit dem Farbstoff PKH26 am Beispiel der Haftkultur RAW264.7, 1×10^6 Zellen pro Probe mit einer PKH26-

Endkonzentration von 2 μM und dem Endvolumen von 200 μl .

1. Stellen Sie eine PKH26-Färbelösung frisch vor der Färbung her. Mischen Sie dafür 1 ml einer 1 mM PKH26-Lösung und 9 μl 96%igen Ethanol. Entnehmen Sie 4 μl der hergestellten Lösung und geben Sie sie zu 100 μl PKH26 Diluent, 1x.
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 g und Raumtemperatur.

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

3. Pipettieren Sie den Überstand komplett ab und resuspendieren Sie die benötigte Zellzahl (zum Beispiel 10^6 Zellen) in 100 μl PKH26-Diluent, 1x. Fügen Sie 100 μl der im Schritt 1 hergestellten PKH26-Lösung hinzu. Pipettieren Sie und lassen Sie den Ansatz für 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen. Die PKH26-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 PKH26-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 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 kompletten Nährmediums. Überführen Sie die Lösung in ein neues Reaktionsgefäß. Entnehmen Sie Aliquots für die Beurteilung der Zellvitalität mit Trypanblau. Zentrifugieren Sie bei 400 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:

PKH26-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.

PKH26-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 набору для мечения клеточных мембран LumiCell PKH26

Состав набора

Компонент набора	Количество			
	13201	23201	33201	43201
	100 uL dye, 1x buffer	100 uL dye, 5x buffer	500 uL dye, 1x buffer	500 uL dye, 5x buffer
2484-100uL, PKH26 dye, 1 mM solution in isopropanol, 100 uL	1	1	5	5
K6150, PKH26 Diluent, 1x, 10 mL	5	—	25	—
K7150, PKH26 Diluent, 5x, 10 mL	—	1	—	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 красителем PKH26.
- Более однородное окрашивание достигается при использовании суспензии клеток.

Протокол

Протокол использования набора для мечения клеточных мембран красителем PKN26 на примере адгезионной культуры RAW264.7, 1×10^6 клеток в образце, финальная концентрация PKN26 — 2 μM , финальный объем 200 мкл.

1. Непосредственно перед окрашиванием приготовьте раствор PKN26. Добавьте 1 мкл 1 mM раствора PKN26 к 9 мкл 96% этанола, и 4 мкл полученного раствора добавьте к 100 мкл PKN26 Diluent, 1x.
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 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 PKN26 Diluent, 1x. Далее добавьте 100 мкл полученного на первом шаге раствора PKN26. Пипетируйте и оставьте при комнатной температуре на 5 мин. Конечная концентрация PKN26 в растворе с клетками — 2 μM .

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

**Не оставляйте клетки в PKN26 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 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 аликвоты для оценки жизнеспособности трипановым синим. Центрифугируйте при 400 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 красителя PKH26 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 замечен осадок, слегка нагрейте его на водяной бане при 37°C и обработайте ультразвуком или встряхните до повторного растворения.

Раствор PKH26 Diluent поставляется в виде однократного либо пятикратного раствора в стерильной емкости, его рекомендуется хранить в холодильнике и доводить до комнатной температуры непосредственно перед использованием.

LumiCell PKH26 cell membrane labeling kit manual

Kit components

Kit component	Count			
	13201 100 uL dye, 1x buffer	23201 100 uL dye, 5x buffer	33201 500 uL dye, 1x buffer	43201 500 uL dye, 5x buffer
2484-100uL, PKH26 dye, 1 mM solution in isopropanol, 100 uL	1	1	5	5
K6150, PKH26 Diluent, 1x, 10 mL	5	—	25	—
K7150, PKH26 Diluent, 5x, 10 mL	—	1	—	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 PKH26 dye.
- Staining is more homogeneous when cell suspension is used.

Protocol

Protocol for cell membrane labeling with PKH26 for RAW264.7 adhesion culture, 1×10^6 cells/sample, the final concentration of PKH26 $2 \mu\text{M}$, final volume $200 \mu\text{L}$.

1. Prepare PKH26 solution immediately before staining. Add $1 \mu\text{L}$ of 1mM PKH26 solution to $9 \mu\text{L}$ of 96% ethanol, add $4 \mu\text{L}$ of the resulting solution to $100 \mu\text{L}$ of PKH26 Diluent, 1x.
2. Remove the cell culture from the surface with a scraper in Hanks' solution (HBSS). Count the cells in the sample. Add 3mL of Hanks' solution, centrifuge at 400g for 6min 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, resuspend a necessary amount of cells (e. g. 10^6 cells) in $100 \mu\text{L}$ of PKH26 Diluent, 1x. Add $100 \mu\text{L}$ of PKH26 solution prepared during step 1. Pipette and allow to stand at room temperature for 5min . The final PKH26 concentration in the cell solution is $2 \mu\text{M}$.

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

**Do not leave cells in PKH26 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 2mL of fetal bovine serum to stop the reaction, incubate for 1min . Centrifuge at 400g for 40min 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 5mL of complete culture medium, transfer to a new tube. Take aliquots to evaluate cell viability with trypan blue. Centrifuge at 400g for 40min at room temperature.
6. Resuspend the cells in a buffer for further analysis (microscopy, flow cytometry

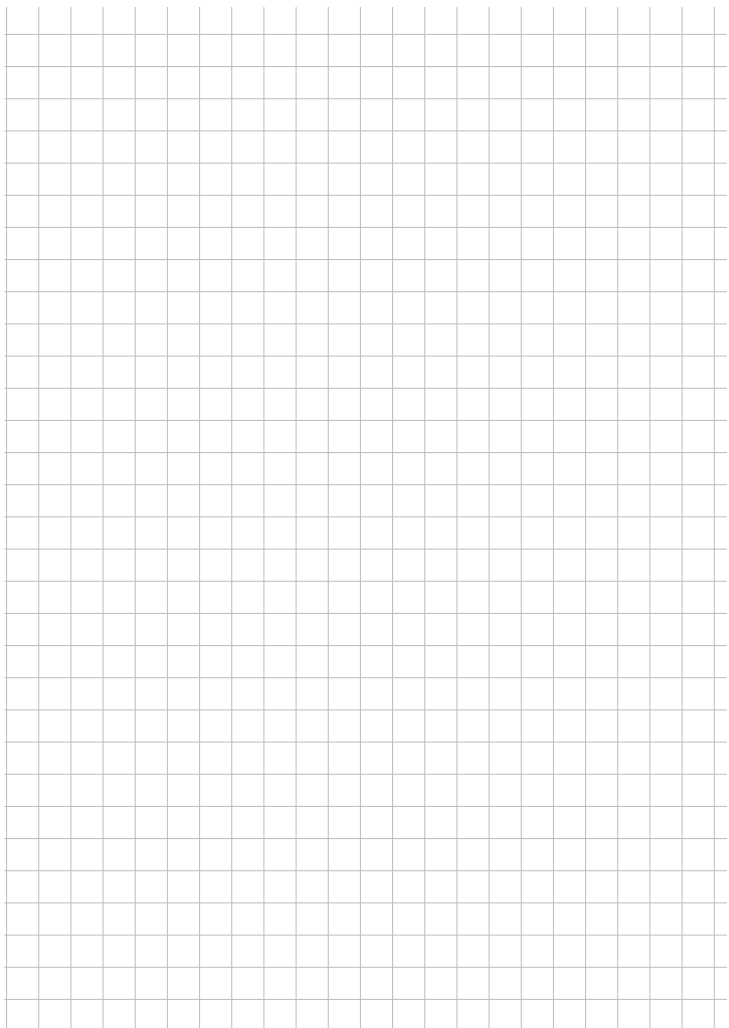
etc.).

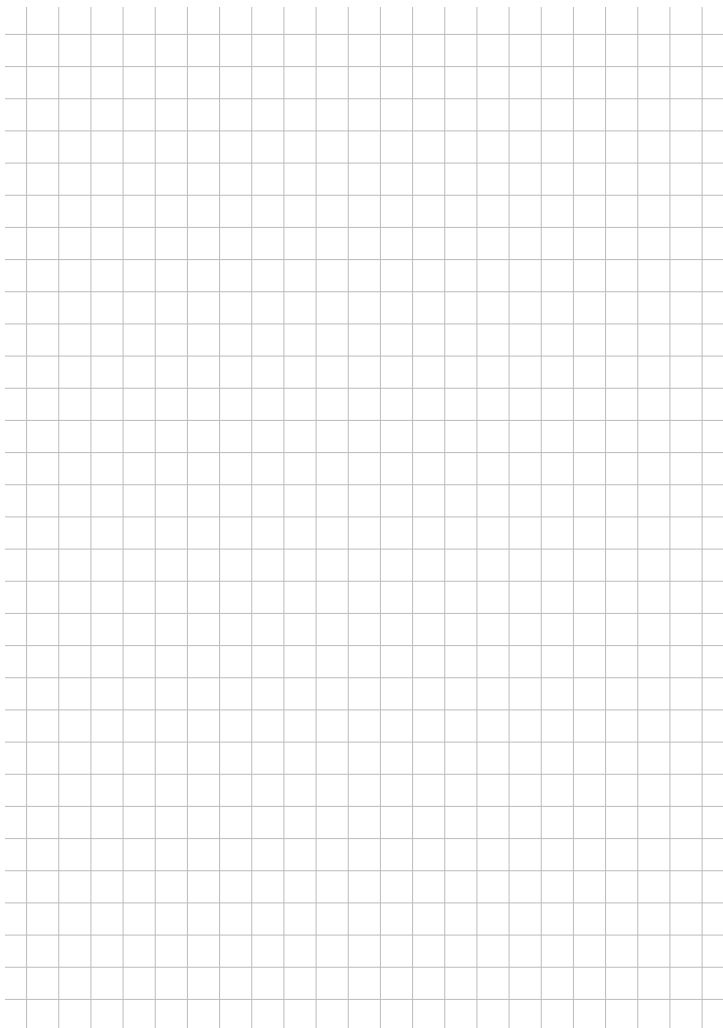
**Stained cells can be fixed with 2% paraformaldehyde, and staining remains stable for at least 3 weeks if samples are protected from light.*

Recommendations for storage

PKH26 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 up on a water bath at 37°C and ultrasonicate or vortex until redissolved.

PKH26 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.





Lumiprobe Corporation

(US and Worldwide)

9:00AM - 9:00PM EST

201 International Circle, Suite 135

Hunt Valley, Maryland 21030

USA

Phone: +1 888 973 63 53

Lumiprobe GmbH

(Germany and Europe)

8:00AM - 5:00PM CE(S)T

Feodor-Lynen-Strasse 23

30625 Hannover

Germany

Phone: +49 511 16596811

Lumiprobe RUS Ltd

(Russia and CIS)

8:00 - 19:00 GMT+3 (Moscow)

Kotsyubinskogo 4, bld. 3

121351 Moscow

Russian Federation

Phone: +7 800 775 3271



ISO 9001:2015

The certificate No.: 44 100 202070

Issued by TÜV NORD CERT GmbH

www.lumiprobe.com

