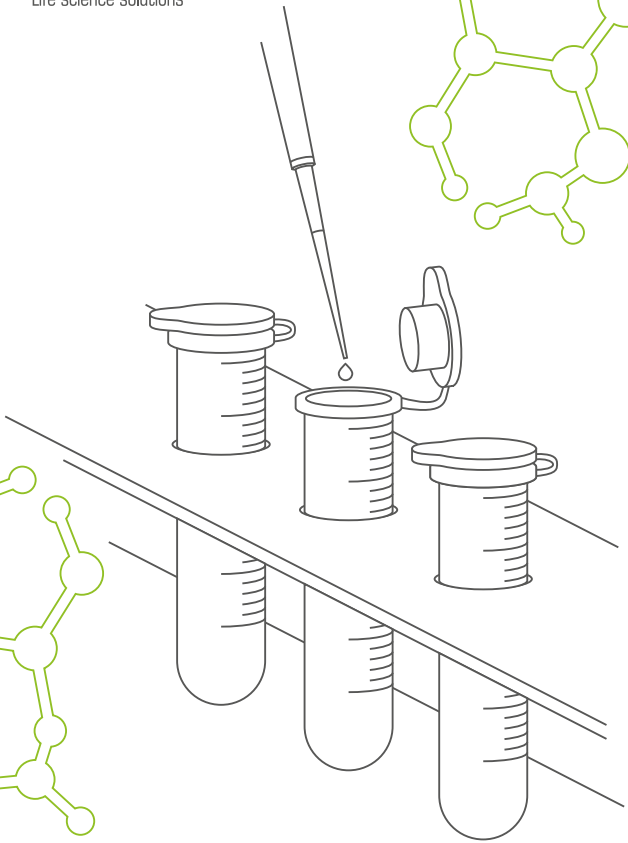
Lumiprobe
Life science solutions



Handbuch für das PKH Kits für die Zellmembranmarkierung

Lumiprobe Corporation. All rights reserved.

Contents

Deutsch: Handbuch für das PKH Kits für die Zellmembranmarkierung . 3-5

DE

Handbuch für das PKH Kits 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	14201 100 uL dye, 1x buffer	24201 100 uL dye, 5x buffer	34201 500 uL dye, 1x buffer	44201 500 uL dye, 5x buffer	17201 100 uL dye, 1x buffer	27201 100 uL dye, 5x buffer	37201 500 uL dye, 1x 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 azidhaltigen Lösungen bei Färbung mit den PKH-Farbstoffen.
- Die Verwendung einer Zellsuspension liefert eine homogenere 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 x *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 x *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 x *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.*

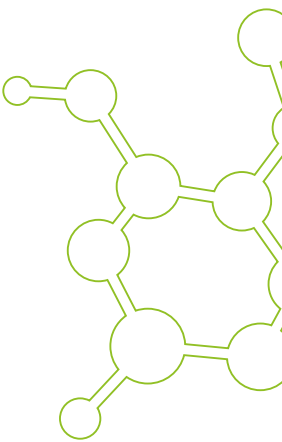
Lagerung:

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.

Ver. KRPF0

22.09.509-QM
Issued by INSPECT



www.lumiprobe.com