

请在使用前仔细阅读说明书

## Live Cell Labeling Kit – CFSE (Code: LC01)

Technical Manual

荧光染料 CFSE(CFDA-SE)，是一种可对活细胞进行荧光标记的新型染料，可以标记活体细胞。其基本原理如下：CFSE 是一种带有琥珀酰亚胺(NHS)的荧光染料，可以结合细胞内的蛋白质。CFSE 在结构上将酚羟基部位改造成 AM 体，所以自身不发荧光，荧光背景低，脂溶性高，能够轻易穿透细胞膜，在活细胞内与胞内蛋白共价结合，进入细胞内的 CFSE 的 AM 部位能被细胞内酯酶水解发出绿色荧光。CFSE 的琥珀酰亚胺(NHS)和细胞内蛋白质的氨基部位结合，固定在细胞内，不会漏出细胞外。CFSE 进入细胞后定位于细胞膜、细胞质和细胞核，在细胞核的荧光最强。

在细胞分裂增殖过程中，CFSE 的荧光强度会随着细胞的分裂而逐级递减，标记荧光可平均分配至两个子代细胞中，因此其荧光强度是亲代细胞的一半，根据这一特性，它可被用于检测细胞增殖，细胞周期的估算及细胞分裂等方面。

另外，CFSE 标记的细胞用于体内观察可以长达数周之久，它常被用来做活体细胞检测实验和用荧光电镜观察细胞长期活动的实验。

有报道证实 CFSE 毒性小，不影响细胞的增殖能力。此方法操作简单，且不用放射性同位素，不存在安全隐患。可以更快速，更准确和更安全地得到想要的实验数据。

荧光波长： $\lambda_{ex}=496\text{ nm}$ ,  $\lambda_{em}=516\text{ nm}$

试剂盒内含：

CFSE: 50  $\mu\text{g}$   $\times$  3 管      PBS(-)片剂: 3 片      DMSO: 1 ml  $\times$  1 管 \*外带

PBS(-): 不含钙和镁离子的 PBS。

\* 如果从冰箱里取出试剂盒马上打开使用，CFSE 和 DMSO 易吸湿造成 CFSE 水解，影响标记效果，请务必先放至室温后再打开。

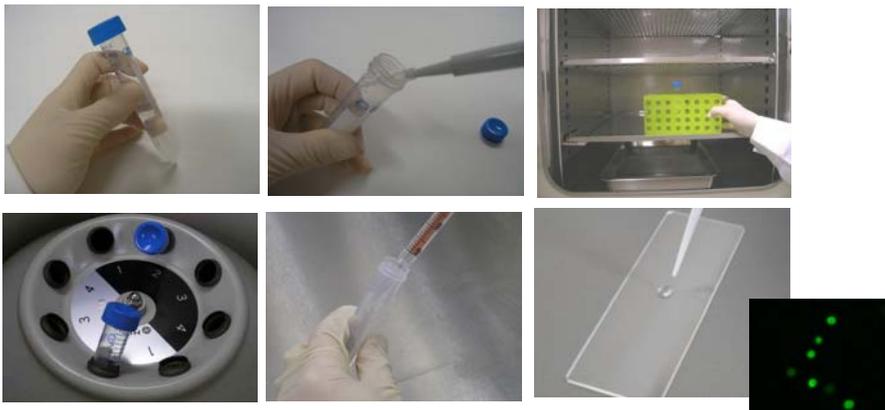
\* 打开 DMSO 瓶子取样后，请迅速密闭盖子，避免 DMSO 吸湿。条件允许的话，请将 DMSO 瓶子放在干燥器中在冷暗处保存。

**贮藏条件** 在-20℃的避光条件下保存

### 所需设备

培养箱(37 °C CO<sub>2</sub>)    移液器(20  $\mu\text{l}$ , 1000  $\mu\text{l}$ )  
荧光显微镜 (蓝色激发滤光片, 绿色发射滤光片)  
流式细胞仪(488 nm 光源, 绿色发射滤光片)

### 实验操作



\* 同仁化学研究所需要根据老师具体的实验目的，提供给老师更加详细的技术服务，以保证老师实验顺利、成功。

\* 建议您在正式实验前先摸索一下细胞量、CFSE 的终浓度、培养时间等，找到最佳实验条件。

#### 配制试剂:

1、从冰箱中取出 CFSE 试剂盒，放至室温后再打开。盛放 CFSE 的管子开盖前请轻弹管壁几次，让粉末充分落入管底，必要时可采用离心的方法。

2、取 PBS(-)1 片加入 100 ml 容量瓶中，用纯水溶解并将体积调至 100 ml。

3、加 50  $\mu$ l DMSO<sup>a)</sup>到CFSE管中溶解，加入DMSO后请先盖上盖子，反复颠倒把盖子和管壁上的试剂洗到底部，并用移液器反复吹打使溶解完全，配制成浓度为 1.8 mM的CFSE母液<sup>b)</sup>。

\* 如果想配其他浓度母液的话,请按照如下公式进行操作:

\*  $B=90/A$ ; 其中A为CFSE的母液浓度 (mM); B为DMSO的体积 ( $\mu$ l)。

\* 打开 DMSO 瓶子取样后，请迅速密闭盖子，避免 DMSO 吸潮。条件允许的话，请将 DMSO 瓶子放在干燥器中在冷暗处保存。

4、用PBS(-)缓冲液将其稀释成 100  $\mu$ M或其它浓度（如果采用载玻片观察法，建议浓度为 20  $\mu$ M）的工作液<sup>c)</sup>。

a) DMSO 需要保证新鲜无水，否则将会导致 AM 体水解，使荧光染料无法进入细胞，影响实验效果。

b)由于CFSE母液遇水极易分解，如果不能一次用完，建议分装保存，例如分装成5  $\mu$ l/管。

方法：分装后用封口膜密封管口，再用锡箔纸包裹，最后和干燥剂一起用塑料袋密封， $\leq -20^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存。

c) CFSE 工作液应现配现用，因为 CFSE 吸水会分解，影响染色效果。

#### 细胞染色(仅供参考):

##### 例 1 培养板观察法

1、准备细胞悬液，用PBS(-)等合适的培养基<sup>a)</sup>调整细胞浓度至约  $10^7$ 个 / ml。

2、取 1 ml细胞悬液至试管中，加入适量CFSE工作液，轻轻搅拌混匀（建议CFSE的终浓度参考相关论文或做个预实验：分别设定终浓度为 0.5,1,2,5,10,20  $\mu$ M...,以确定最佳染色浓度<sup>b)</sup>）。

3、在  $37^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 15-30 分钟。

4、离心后去上清，加入 2 ml PBS 溶液，再离心后去上清，重复此操作一次。

5、加入合适的培养基制成细胞悬液。

6、取500  $\mu$ l的细胞悬液加在培养孔中，用荧光显微镜观察，看到荧光后，根据自己实验的要求调整细胞数量<sup>c)</sup>进行实验。

##### 例2 载玻片观察法

1、准备1 ml细胞悬液，用PBS(-)等合适的培养基<sup>a)</sup>调整细胞浓度至约 $10^7$ 个 / ml。

2、取30  $\mu$ l细胞悬液至试管中，加入10  $\mu$ l浓度为20  $\mu$ M的CFSE工作液（终浓度为5  $\mu$ M），轻轻搅拌混匀<sup>b)</sup>）。

3、在 $37^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养15-30分钟。

4、滴10  $\mu$ l的细胞悬液在载玻片上，用荧光显微镜观察，看到荧光后，根据自己实验的要求调整细胞数量<sup>c)</sup>进行实验。

\* 如果背景高的话，第3步之后需要洗去多余的CFSE:

离心后去上清，加入90  $\mu$ l PBS溶液，再离心后去上清，重复此操作一次。

a)尽可能用不含血清的培养基，血清中的酶和蛋白质会分解 CFSE，可能会影响染色效果。

b)如果荧光强度弱，可以适当提高 CFSE 的终浓度。如果细胞毒性大或背景太高，可以适当降低 CFSE 的终浓度，请摸索条件找到最佳浓度。

c)根据不同的实验目的和要求，采用稀释的方法调整细胞数量。

#### 株式会社 日本同仁化学研究所 (Dojindo Laboratories)

如果您需要更多的信息或者有任何问题可以通过下列方式联系我们:

上海市零陵路 899 号飞洲国际广场 27 楼 J 座 北京市朝阳区德外马甸裕民路 12 号元辰鑫大厦 E1-210 室

邮编: 200030

邮编: 100029

电话: 800-988-0083

电话: 010-8225-1765

网址: <http://www.dojindo.cn>

E-mail: [info@dojindo.cn](mailto:info@dojindo.cn)