

DiO Cell Membrane Probe

最快 5 min 染色细胞膜，多色兼容，适配活细胞与固定透化样本，应用广

产品货号：C22305

产品规格：10 mg

储运条件：4 °C避光保存，冰袋运输

产品简介：

DiO Cell Membrane Probe是一种亲脂性细胞膜荧光探针，呈现绿色荧光。DiO是一种亲脂性膜染料，DiO在进入细胞膜前荧光微弱，而当自发嵌入细胞膜脂质双层后，会通过疏水相互作用稳定结合并沿膜平面侧向扩散，最终实现整个细胞膜的均匀染色，同时荧光强度显著增强且光稳定性大幅提升。该染料具有高淬灭常数和长激发态寿命，对细胞活性影响极小，不会干扰细胞正常发育及生理功能；激发波长和发射波长分别为 487 nm和 501 nm，可直接使用标准FITC滤光片检测，适配常规荧光显微镜。相较于同类亲脂性膜染料，DiO染色高效便捷，最快 5 min即可完成染色，且兼容活细胞与多聚甲醛固定样本；需要注意的是，尽管DiO可在固定透化后进行质膜染色，但染色后不建议进行透化操作，以免导致荧光信号丢失，影响后续观察分析；此外，若用PBS稀释后再次出现不溶物，需继续加热并配合超声处理至染料完全溶解，待溶液温度降至室温后，再进行细胞孵育操作。

细胞膜作为细胞与外界环境的核心屏障，其结构完整性、流动性及细胞的迁移轨迹，是解析细胞增殖、分化、凋亡等生理过程，以及肿瘤转移、神经回路构建、免疫细胞归巢等病理进程的关键。DiO在细胞共培养实验中，还可与DiI等红色荧光膜染料联用实现双标示踪，清晰区分不同来源细胞的相互作用过程。DiO除了用于常见的细胞膜染色之外，由于其亲脂性特性还可以用于标记外泌体。

注：效能等同于Lumiprobe DiO, lipophilic tracer(2936)、Biotium DiO(60011)。

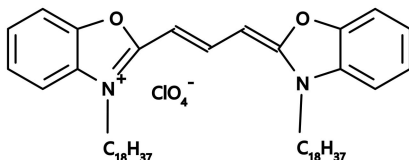
应用范围：细胞间融合和粘附，移植或发育过程中的细胞迁移追踪，通过 FRAP 检测脂在细胞膜上的扩散，细胞毒性检测，标记脂蛋白，外泌体染色等

产品特点：

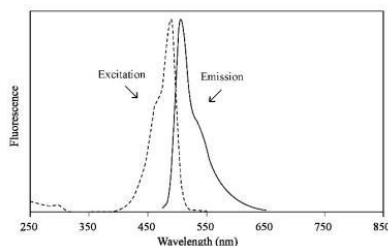
- **兼容性好：**无需调整染色方案，即可实现活细胞的细胞膜靶向染色，也适配固定透化后的细胞样本染色；
- **适合多色搭配：**DiO 绿色荧光与 DiI（红）、DiD（深红）、DiR（远红）膜染料光谱区分度高，无交叉干扰；
- **高效灵活：**染色时间最快 5 min 即可完成，省时高效；
- **应用场景多样性：**覆盖基础研究（细胞膜动态观测、脂质扩散检测）与功能研究（细胞迁移追踪、细胞毒性评估、脂蛋白靶向标记）。

产品参数：

- **外观：**橙黄色固体；
- **Ex/Em：**487/501 nm；
- **CAS 号：**34215-57-1(perchlorate), 28462-56-8；
- **分子式：** $C_{53}H_{85}ClN_2O_6$ ；
- **分子量：**881.72；
- **分子结构图：**



● 光谱图:



产品组分:

组分	11000 T
DiO Cell Membrane Probe	10 mg

注: 以每次使用 100 μ L 染色工作液, 染色工作液浓度 10 μ M 计算。

注意事项:

- 制备DiO染色储液时, 若出现不溶情况, 需加热5~10 min辅以超声处理, 直至染料完全溶解。
- 制备DiO染色工作液时, 若用PBS稀释储液后再次出现不溶物, 需继续加热并超声至染料完全溶解, 待溶液温度降至室温后, 再进行细胞孵育操作, 避免高温影响细胞活性及染色效果。
- DiO染色后的细胞固定建议用多聚甲醛而非其他甲醇等固定剂。
- 配制染色工作液后需立即进行后续步骤, 1~2 min内, 染色液中的染料会开始吸附到管壁, 导致染色效果微弱且不均匀。
- 使用前请将产品瞬时离心, 再进行后续操作。
- 本产品仅限于科研用途并且不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康, 请遵循您所在常规实验室安全规定。

使用说明:

一、实验前准备

1. 试剂准备:

- 将试剂从储存条件 (如4 $^{\circ}$ C) 取出, 平衡至室温(15-25 $^{\circ}$ C)。
- 准备细胞培养基、无水DMF/DMSO、PBS。
- 染料储液: 根据需求称量一定的固体粉末转移至棕色不透光管子中, 瞬时离心至管壁, 用无水DMF/DMSO制备浓度为1~5 mM的DiO储液。举例: 称量5 mg DiO固体粉末至棕色不透光管子中, 制备5 mM的储液需要往管子中加入1.13 mL的溶剂溶解制备。

注: 未使用的储存液分装储存在-20 $^{\circ}$ C, 避免反复冻融。

注: 发现较难溶解时可以加热 5~10 min辅以超声处理, 直至染料完全溶解。

- 染色工作液制备: 1 mL PBS+2 μ L染料储液(5 mM)制备成10 μ M的染色工作液, 可参照下表进行配置。

样品数量	5	10	20
染色储液	1 μ L	2 μ L	4 μ L
PBS	500 μ L	1000 μ L	2 mL

注: 常用的工作液浓度为 5~10 μ M。通过低速涡旋或者轻弹管壁使其充分混合。

注: 工作液浓度可能因为不同的细胞种类要求不同, 建议染色终浓度在建议浓度 10 倍范围内摸索。

注: 工作液建议现配现用, 若用PBS稀释后再次出现不溶物, 加热 5~10 min辅以超声处理, 直至染料完全溶解, 待溶液温度降至室温后, 再进行细胞孵育操作。

2. 仪器准备:

- 荧光显微镜: 配备488 nm激发光源的荧光显微镜。

二、操作步骤



仅限体外科研用途 不得用于临床诊断或治疗
技术咨询 Contact@probelives.com
订购咨询 Sales@probelives.com

中文网址 www.probelives.cn
英文网址 www.probelives.com
Suzhou Probelives Technology CO., LTD.

方案一：悬浮细胞标记

1. 收集与洗涤细胞：

- (1) 收集待测悬浮细胞悬液至离心管中。
- (2) 1000 rpm，室温离心 5 min，小心吸弃上清液。

2. 细胞重悬与计数：

- (1) 使用 PBS 重悬并细胞计数。
- (2) 取 1×10^6 个细胞，1000 rpm 低速离心 5 min，去除 PBS。
- (3) 使用 PBS 洗涤 2~3 次。

注：显微镜法对细胞密度要求不严格，只要实验组与对照组密度一致即可。具体可根据样本种类与实验条件灵活调整，以显微镜下视野中细胞分布清晰可辨为宜。

3. 细胞染色：

- (1) 在96孔板中，每孔加入100 μ L DiO染色工作液，并充分混合。
- (2) 37 $^{\circ}$ C避光孵育5 min，孵育时长可根据实际观察到的染色效果进行灵活调整，调整区间为5~30 min。

注：染料的孵育时长、加样量可以根据实验所用的不同细胞种类、预实验结果或实验条件设置的使用量进行调整。

- (3) 1000 rpm 离心 5 min。倾倒上清液，缓慢加入 PBS 轻柔重悬细胞。
- (4) 重复步骤(3)两次。

4. 检测：

- (1) 在荧光显微镜下检测，可以在培养基中对细胞进行成像，使用488 nm的光源进行激发。

方案二：贴壁细胞标记

1. 细胞准备：

- (1) 接种培养：将细胞接种于 96 孔板等多孔板、细胞培养皿中或者细胞爬片上。

注：贴壁细胞荧光显微镜检测接种量为 24-48 h 后预期汇合度到达 80%~95%。

注：不同细胞类型需结合实际实验条件和细胞特性灵活调整。

2. 细胞清洗：

- (1) 直接在培养板中吸弃细胞培养液，PBS清洗2~3次。

3. 细胞染色：

- (1) 向各孔中加入对应体积的染色工作液（例如：96孔板加100 μ L/孔，48孔板加150 μ L/孔，24孔板加250 μ L/孔，12孔板加500 μ L/孔，6孔板加1 mL/孔）。

- (5) 37 $^{\circ}$ C避光孵育5 min，孵育时长可根据实际观察到的染色效果进行灵活调整，调整区间为5~30 min。

注：染料的孵育时长、加样量可以根据实验所用的不同细胞种类、预实验结果或实验条件设置的使用量进行调整。

- (2) 去除染色工作液，加入温热的 PBS，37 $^{\circ}$ C孵育 5~10 min 清洗细胞，去除 PBS，再重复清洗步骤 2 次。

注：可缩短清洗时间以减少染料内化。

4. 检测：

- (1) 在荧光显微镜下检测。可以在培养基中对细胞进行成像，使用488 nm的光源进行激发。

方案三：固定细胞标记

- (1) 使用4%多聚甲醛固定液进行固定。

注：细胞需使用甲醛固定。甲醇或其他溶剂固定会提取脂质，导致染色效果不佳。

- (2) 固定后用PBS清洗细胞。

- (3) 可选步骤：室温下用含0.1% Triton X-100的PBS透化细胞10 min。

注：该条件比使用洋地黄皂苷或皂素透化更能保留细胞质膜染色效果。但通透可能会影响 DiO 在细胞膜的定位并会增加细胞内的染色，具体实验中需根据实验的需求选择合适的细胞通透液。

- (4) 用PBS清洗细胞三次，彻底去除去污剂残留。

- (5) 可选步骤：用抗体或其他染料进行染色。封闭、抗体稀释及清洗过程中使用的缓冲液请勿添加去污剂。

- (6) 向各孔中加入对应体积的染色工作液（例如：96孔板加100 μ L/孔，48孔板加150 μ L/孔，24孔板加250 μ L/孔，12孔板加500 μ L/孔，6孔板加1 mL/孔）。

- (7) 室温避光孵育 10 min。

注：建议孵育时间以 10 min 作为起始时间进行摸索。

注：各染料的孵育时长、加样量可以根据实验所用的不同细胞种类、预实验结果或实验条件设置的使用量进行调整。



(8) 用 PBS 清洗细胞三次。

注：请勿使用含甘油的封片液，建议在 PBS 中成像。

三、结果判读

● 定性分析（显微镜）：

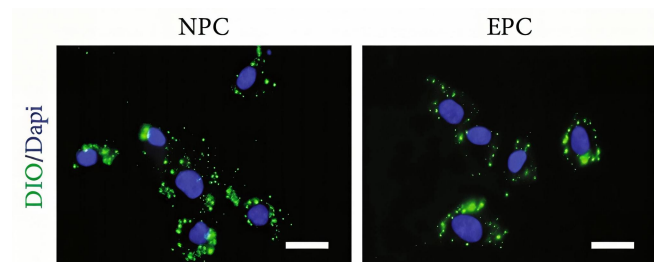


图 1. DiO 染料用于脂肪细胞染色的荧光显微成像

● **正常染色：**细胞膜或与细胞膜结构相同的囊泡呈现绿色荧光，与核区定位不重叠。

注：图片引自参考文献《Small Extracellular Vesicles Derived from Adipocytes Attenuate Intervertebral Disc Degeneration in Rats by Rejuvenating Senescent Nucleus Pulposus Cells and Endplate Cells by Delivering Exogenous NAMPT》(doi: 10.1155/2021/9955448.)先采用 DiO 荧光染料标记脂肪细胞，使其分泌的 Adipo-sEVs 携带 DiO 荧光信号；随后将 DiO 标记的 Adipo-sEVs 与 EPCs 共孵育 12 小时，最终通过荧光显微镜观察信号分布。

常见疑问与解答：

● 问：溶解 DiO 染料发现不好溶解有什么方法助溶吗？

答：更推荐在无水 DMSO 中溶解 DiO，需加热 5~10 min 辅以超声处理，直至染料完全溶解。

● 问：DiO 染料除了用于标记细胞膜外还可以用于标记外泌体吗？

答：是的。

● 问：为什么我用 DiO 染料标记细胞膜发现膜内也被染色上？

答：因 DiO 染料属于亲脂性染料，标记时间长后发现细胞内膜结构也被染上是正常现象。可以通过降低染色时间及染色浓度来避免。

● 问：DiO 染料标记细胞膜后用 4% 多聚甲醛固定和 0.1% Triton X-100 透化后，染色亮度低的原因是什么？

答：因 DiO 染料为亲脂性染料，经 0.1% Triton X-100 透化后的细胞，磷脂双分子层结构被破坏，影响 DiO 染料与细胞膜的结合导致染色亮度变低，因此 DiO 更推荐用于活细胞染色。

