

Ready-to-use DiO Cell Membrane Probe (5 mM)

即用型 最快 20 min 染色细胞膜，多色兼容，适配活细胞与固定透化样本

产品货号：C22313

产品规格：50 μ L

储运条件：4 $^{\circ}$ C避光保存，冰袋运输

产品简介：

DiO是一种亲脂性细胞膜荧光探针，呈现绿色荧光。作为环境敏感型羧花青染料，DiO在水溶液中荧光微弱，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，且对细胞活性影响较小。专为细胞膜特异性标记及活细胞长期示踪需求设计。激发波长和发射波长分别为 484 nm 和 501 nm，可用标准 FITC 滤光片检测。尽管 DiO 可以在固定透化后进行质膜染色，但在染色后不建议进行透化的过程，这是因为透化可能会导致荧光信号的损失，影响后续的观察和分析。DiO 溶于无水乙醇、无水 DMSO 和无水 DMF。DMF、DMSO 作为溶剂优于无水乙醇，在无 DMSO 中的溶解度约为 10 mg/mL，较难溶解时，可以加热或者超声处理辅助其溶解。

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)。

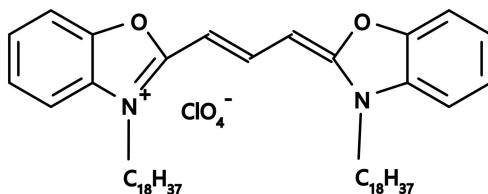
应用范围：细胞间融合和粘附，移植或发育过程中的细胞迁移追踪，通过 FRAP 检测脂在细胞膜上的扩散，细胞毒性检测，标记脂蛋白，外泌体染色；

产品特点：

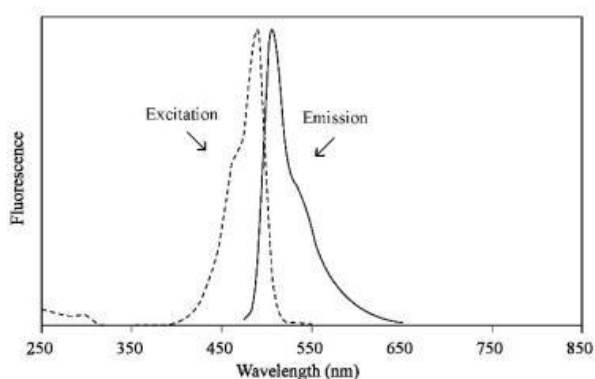
- **兼容性好：**无需调整染色方案，即可实现活细胞的细胞膜靶向染色，也适配固定透化后的细胞样本染色；
- **适合多色搭配：**DiO 绿色荧光与 DiI（红）、DiD（深红）、DiR（远红）膜染料光谱区分度高，无交叉干扰；
- **高效灵活：**染色时间 20 min 内即可完成，省时高效；
- **应用场景多样性：**覆盖基础研究（细胞膜动态观测、脂质扩散检测）与功能研究（细胞迁移追踪、细胞毒性评估、脂蛋白靶向标记）。

产品参数：

- **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	250 T
A. Ready-to-use DiO Cell Membrane Probe	50 μ L

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：

- 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。
- 使用前请将产品瞬时离心，再进行后续操作。
- 请勿使用含甘油的封片液，否则会导致染色异常和高背景。有机封片液同样不适用。
- 建议直接在 PBS（或其他水性缓冲液）中成像。
- 为了您的安全和健康，请遵循您所在常规实验室安全规定。
- 本产品仅限于科研用途并且不得存放于普通住宅内。

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）。
- 工作液制备：1 mL细胞培养基+2 μ L组分A(Ready-to-use DiO Cell Membrane Probe)制备成10 μ M的染色工作液。

注：染色液建议现用现配，配制完成后需立即进行染色。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。

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。

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

方案一：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）。37 $^{\circ}$ C 孵育 20 min。

注：工作液浓度及染色孵育时间均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，孵育时间以 20 min 作为起始时间进行摸索。

（2）去除染色工作液，加入预热至 37 $^{\circ}$ C 的培养基，37 $^{\circ}$ C 孵育 5-10 min 清洗细胞，去除生长培养基，再重复清洗步骤 2



次。

注：可缩短清洗时间以减少染料内化。

3. 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：悬浮细胞标记

1. 细胞准备

(1) 用常规生长培养基将细胞浓度调整为 1×10^6 个/mL。

2. 细胞染色：

(1) 每 1 mL 细胞悬浮液加入 2 μ L 组分 A(Ready-to-use DiO Cell Membrane Probe)，通过低速涡旋或者轻弹管壁使其充分混合。37 °C 孵育 20 min。

注：染色孵育时间可能因为不同的细胞种类要求不同，建议孵育时间以 20 min 作为起始时间进行摸索。

(2) 1000 rpm 离心 5 min。倾倒入清液，缓慢加入 37 °C 预热的生长培养液轻柔重悬细胞。

(3) 重复步骤 (2) 两次。

3. 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 分钟。

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 Plus 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) 制备染色缓冲液：按照向 1 mL PBS 中加入 2 μ L 组分 A(Ready-to-use DiO Cell Membrane Probe) 细胞标记液，立即涡旋充分混匀。

注：需立即进行步骤 (7)。1-2 分钟内，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。

(7) 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）。

(8) 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。

(9) 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）：

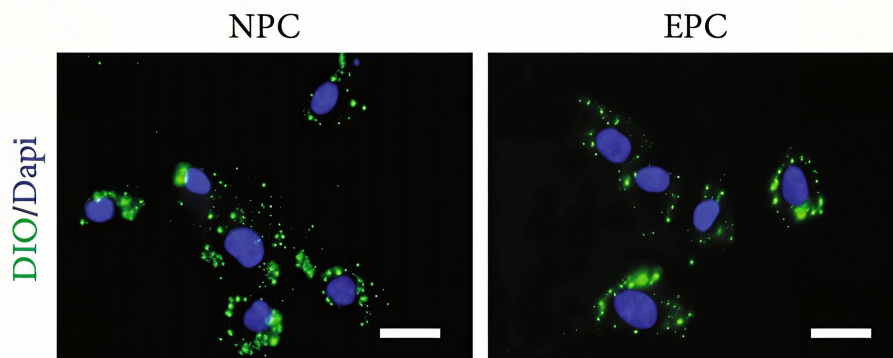


图 1. DiO 染料用于脂肪细胞染色的荧光显微成像



- 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：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% TritonX-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% TritonX-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。

