

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

即用型 膜溶解性更优，扩散快，信号稳定，最快 5 min 染色细胞膜

产品货号：C22314

产品规格：25 μ L

储运条件：4 $^{\circ}$ C避光保存，冰袋运输

产品简介：

Ready-to-use DiO Plus Cell Membrane Probe是一款升级型亲脂性细胞膜绿色荧光探针，其核心作用原理为依靠亲脂性特性靶向结合细胞膜，未结合细胞膜时荧光信号微弱，一旦嵌入细胞膜脂质双分子层，荧光强度会发生显著增强，可通过标准FITC滤光片实现检测。DiO Plus可解决DiO荧光衰减高、易形成非荧光聚集体、膜横向扩散速度缓慢的缺点，具备更优异的膜溶解性，能有效减少非荧光聚集体的产生，避免聚集体对染料膜扩散速率的阻碍；且染色后若进行透化处理易造成荧光信号流失，因此更适配无需透化的细胞膜标记场景，为各类细胞膜相关观察提供更稳定的工具。

DiO Plus凭借其升级后的性能优势，成为细胞膜标记与动态观察的重要工具，可快速且均匀地在神经元细胞膜上扩散，助力清晰观察神经元的形态结构及膜电位变化相关的膜动态，该探针还可用于细胞迁移、细胞间连接等细胞膜相关生理过程的研究，在固定后未透化的样本中也能实现稳定的质膜染色，为科研人员探索细胞膜功能、解析细胞间相互作用机制提供了精准且可靠的技术支撑。

注：效能等同于AAT Bioquest Neuro-DiO(22065)、Biotium Neuro-DiO(60015)。

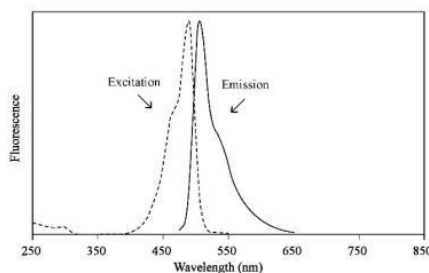
应用范围：细胞间融合和黏附，移植或发育过程中的细胞迁移追踪，通过 FRAP 检测脂在细胞膜上的扩散，细胞毒性检测，标记脂蛋白，外泌体染色等

产品特点：

- **信号稳定：**固定透化后细胞的染色，固定后 DiO 荧光衰减 50%，DiO Plus 仅 10%；
- **适合多色搭配：**DiO Plus 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：**最快 5 min 内完成均匀染色，省时高效；
- **长效示踪应用多样：**DiO Plus 不仅用于基础研究，还可应用于细胞迁移追踪、活体成像等；
- **分子结构升级：**完美解决 DiO 荧光易淬灭、易形成非荧光聚集体、膜横向扩散慢等短板；
- **膜溶解性优：**优异细胞膜溶解相容性，大幅降低染料聚集析出，消除扩散阻碍，染色均匀度高、荧光信号稳定持久。

产品参数：

- **Ex/Em：**484/501 nm；
- **分子式：** $C_{67}H_{105}ClN_2O_5S$ ；
- **分子量：**1086.0；
- **光谱图：**



产品组分:

组分	250 T
A. Ready-to-use DiO Plus Cell Membrane Probe	25 μ L

注：以每次使用 100 μ L 染色工作液，染色工作液浓度 5 μ M 计算。

注意事项:

- 制备DiO Plus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 Plus染色后的细胞固定建议用多聚甲醛而非其他含甲醇等固定剂。
- 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。
- 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。
- 染色工作液制备：1 mL PBS+1 μ L染料储液(5 mM)制备成5 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	0.5 μ L	1 μ L	2 μ L
PBS	500 μ L	1000 μ L	2 mL

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：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。

注：常用的工作液浓度为 1~5 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：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 Plus 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：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。

(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 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) 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：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）：



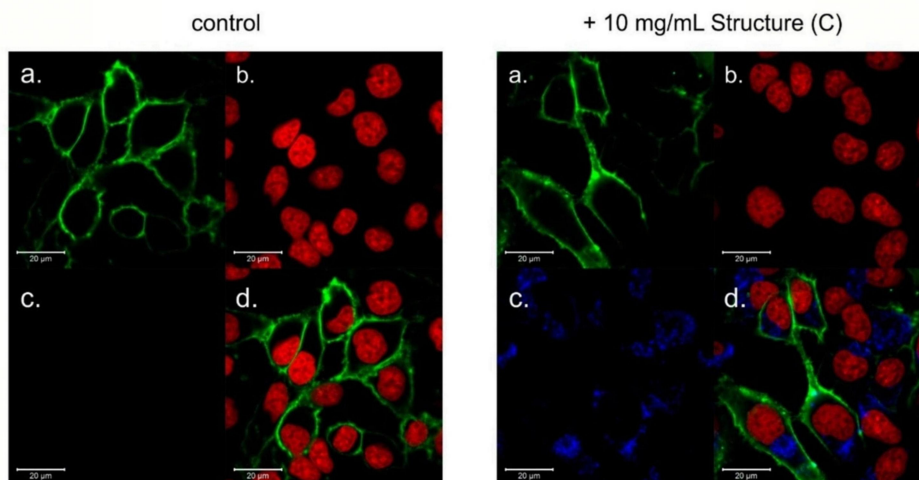


图 1. DiO Plus 染料用于 HeLa 细胞染色的荧光显微成像

- 正常细胞核与细胞膜定位：HeLa 细胞的蓝色荧光信号（树状大分子）完全位于绿色荧光信号（DiO Plus 染色细胞膜）包裹的细胞内部，红色 RedDot1 染料定位细胞核，蓝色荧光与红色荧光均未与细胞膜信号重叠。

注：图片引自参考文献《Synthesis, Internalization and Visualization of N-(4-Carbomethoxy) Pyrrolidone Terminated PAMAM [G5:G3-TREN] Tecto(dendrimers) in Mammalian Cells》(doi: 10.3390/molecules25194406.)

常见疑问与解答：

- 问：DiO Plus 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 Plus 染料标记细胞膜发现膜内也被染色上？

答：因 DiO Plus 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 Plus 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 Plus 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 Plus 染料与细胞膜的结合导致染色亮度变低，因此 DiO Plus 更推荐用于活细胞染色。

