

外泌体绿色荧光标记试剂盒（PKH67）

Cat NO: IME-M001

产品描述

PKH67 是一种具有绿色荧光的荧光细胞连接染料。 PKH67（Ex/Em = 490/502 nm）主要用于对外泌体(Exosome)进行体外荧光标记示踪，细胞体外标记、体外细胞增殖研究以及长期的体内外细胞示踪研究，PKH67 的体内荧光半衰期为 10-12 天。

适用范围

本说明书适用于 PKH67 外泌体或细胞标记等相关信息，请严格参照说明书操作。

运输和存储条件

- （1）运输条件：冰袋运输，国内现货 2~3 天即可送达。
- （2）储存条件：4℃ 储存。

产品组成信息

表 1. 试剂盒组成信息

产品货号	产品名称	产品规格	储存
IME-M001	PKH 67	20 μ L	2℃-8℃， 6 个月
	Diluent C	200 μ L	2℃-8℃， 6 个月
	10kD 超滤管	10 Tubes	常温，2 年

操作流程

一、染料工作液制备

用 Diluent C 将 PKH67 储存液配制成浓度为 100 μ M 的染料工作液（储存浓度为 1mM，DMSO 配置，工作液应根据实验用量适当配置，现配现用，避光操作）。

二、外泌体染色

- 1、在外泌体中加入染料工作液，建议染料终浓度为2-5 μ M （可在 2~20 μ M 范围调节）。

- 2、加入染料工作液后将离心管盖紧，通过涡旋振荡器混匀 1 min，再避光静置孵育 10 min。
- 3、向孵育后的外泌体染料复合物中加入适量 1×PBS 混匀。
- 4、转移至 10kDa MWCO（截留分子量）的过滤柱中，在高速离心机中以 3000g 离心 10 分钟，然后根据需要进行 1-2 次洗滤，彻底去除未结合染料，最后将体积减少至 50~100μL。
- 5、从超滤柱中回收浓缩液，将其保存在微量离心管中并至于冰上，尽快使用标记的外泌体，以确保最高的荧光强度。

三、细胞摄取

- 1、将 PKH67 标记外泌体（约 20μg/孔）加入至细胞培养孔中，在 37℃ 孵育（4~8h），结束后，吸除上清，用 PBS 洗涤 2 次，后续正常制片做荧光拍照或共聚焦成像。

注意事项

- （1）体外追踪实验：PKH67（激发/发射波长 490/502 nm）适合短时（<72 小时）观察，但可能干扰膜流动性。体内长时追踪：选择近红外染料（如 DiR，激发/发射 750/780 nm），穿透力强且背景低。
- （2）由于外泌体染色效率难以达到 100%和在去游离染料过程中无法避免外泌体的损失，建议制备 2 倍于活体成像或示踪实验所需外泌体量以进行染料标记。
- （3）染料工作液应现配现用，不能提前配制，否则将影响染色效果。
- （4）仅用于科学研究。

常见问题

- （1）标记效率低

现象：流式检测信号弱或荧光显微镜下外泌体无荧光。

可能原因：染料浓度不足或孵育时间过短。

解决方案：建议用于染料标记的外泌体原始浓度大于 0.5~1.5 μg/μL，或梯度测试染料浓度（如 1 μM、2 μM、5 μM）。

- （2）高背景噪音

现象：流式细胞术或荧光成像中出现大量非特异性信号。

可能原因：游离染料未彻底去除。

解决方案：增加超速离心次数（如3次），延长超滤离心时间或 PBS 多洗几次。

（3）外泌体聚集或破裂

现象：电镜下外泌体聚集成团或膜结构不完整。

可能原因：染料浓度过高或孵育时间过长。离心速度过高（如 $>120,000\times g$ ）。

解决方案：降低染料浓度至 $2\ \mu\text{M}$ 以下，缩短孵育时间至 10 分钟。使用蔗糖垫（如 30%蔗糖层）保护外泌体结构。

（4）荧光淬灭

现象：标记后荧光信号随时间迅速减弱。

可能原因：样本反复冻融或长期暴露于光照。

解决方案：注意避光操作。分装标记后外泌体，避光 -80°C 保存。