

## CellTracker Green CMFDA (5-Chloromethylfluorescein Diacetate)

### 活细胞示踪剂 CMFDA (绿色)

#### 产品信息

产品名称	产品编号	规格
CellTracker Green CMFDA (5-Chloromethylfluorescein Diacetate)	40721ES50	50 µg
活细胞示踪剂 CMFDA (绿色)	40721ES60	2×50 µg
	40721ES72	5×50 µg

#### 产品描述

CMFDA, 英文全称 5-chloromethylfluorescein diacetate, 是一种可自由透过活细胞膜对细胞进行示踪的荧光染料。

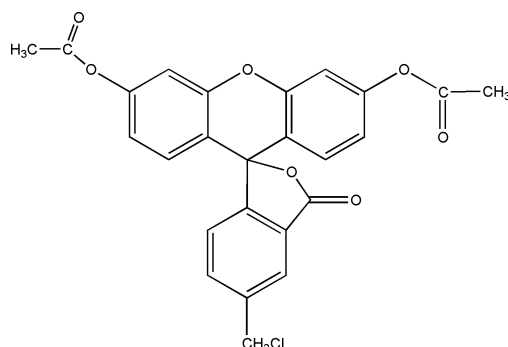
CMFDA 是二乙酸荧光素 (Fluorescein diacetate, FDA) 的氯甲基衍生物, 具细胞膜渗透性, 无色, 不具有荧光发光性。当通过被动运输穿透细胞膜进入活细胞后, CMFDA 中的亲脂性基团可被胞浆内非特异性酯酶水解, 生成 5-氯甲基荧光素 (5-chloromethylfluorescein); 5-氯甲基荧光素可发出绿色荧光, 因带电荷而不能自由穿透细胞膜, 并利用自身氯甲基与细胞内蛋白和多肽中的谷胱甘肽在谷胱甘肽巯基转移酶作用下生成加合物, 能完好的保留在胞内。经 CMFDA 标记的细胞, 荧光非常稳定, 稳定标记的时间可达数天 (至少 3 天), 因此非常适用于细胞分化和形态发生等研究。与常用的钙黄绿素和 FDA 相比, 具有较长时间的细胞内信号保留特点。

在细胞分裂增殖过程中, CMFDA 标记荧光可分配至两个子代细胞中, 且具有不会使邻近细胞染色的功能 (有极少情况下通过细胞间缝隙连接发生染色)。同时, CMFDA 标记荧光还主要用于分析细胞间融合、细胞粘附及多药耐药转运蛋白的研究。此外, CMFDA 还可用于与其他细胞示踪染料联合选择性标记感染细胞内的病原菌; 与膜不通透性核荧光探针共同使用, 可用于细胞活性研究。

本品具有细胞示踪试剂理想的特性: 稳定、无毒 (工作浓度范围内)、细胞内荧光保留性好、强荧光 (生理 pH 范围内)。CMFDA 标记细胞呈绿色荧光, Ex=492 nm, Em=517 nm, 可与其他颜色荧光染料, 如红色荧光蛋白 (red fluorescent protein, RFP) 等共染。本品以粉末形式提供, 需用 DMSO 制备储存液后再使用。

#### 产品性质

中文名称 (Chinese Synonym)	5-氯甲基荧光素二醋酸酯
英文名称 (English Synonym)	5-chloromethylfluorescein diacetate
CAS号 (CAS NO.)	136832-63-8
分子式 (Molecular Weight)	C <sub>25</sub> H <sub>17</sub> ClO <sub>7</sub>
分子量 (Molecular Fomular)	464.85
外观 (Appearance)	无色固体
Ex/ Em	492/517 nm
结构式 (Structure)	



## 运输与保存

室温运输。-20℃干燥避光保存，有效期一年。避免反复冻融。

## 注意事项

- 1) 不同的细胞其细胞内酯酶活性不同，因此染色效果具有差异性。
- 2) 荧光染料均存在淬灭问题，染色过程需尽量避光。
- 3) 避免使用含有巯基的缓冲液。
- 4) 为了您的健康，实验操作时请穿实验服和带一次性手套。

## 操作方法

### 1. CMFDA储存液（10 mM）的配制

将本品取出回温至室温。用10.8  $\mu$ L DMSO溶解50  $\mu$ g CMFDA，充分混匀即得到10 mM的储存液。第一次使用时，建议母液现配现用。且溶解后的试剂尽可能在短时间内使用，以保证实验效果。母液遇水极易分解，若单次不能用完，建议分装保存，用封口膜封口，并严格做到 $\leq$ -20℃密封干燥保存。【避免反复冻融】

- 【注】：① 本品容易吸潮，从冰箱取出后，请确认在干燥的环境放至室温后再开封。由于试剂极其微量，开封前请将其短暂离心，以保证粉末落入管底。
- ② 所用DMSO必须保证高质量，新鲜无水，否则将会导致醋酸酯水解，使荧光染料无法进入细胞，影响实验效果。
- ③ 建议您在正式实验前先摸索一下细胞量、荧光探针的终浓度、培养时间等，找到最佳实验条件。

### 2. CMFDA工作液（0.5-5 $\mu$ M）的配制

使用前用无血清培养基稀释上述储存液至工作液浓度（0.5-25  $\mu$ M），并将探针工作液于37℃预热。

- 【注】：针对不同的实验目的所需的工作液浓度不同，需根据具体情况进行优化。一般来讲：对于长期染色（至少3天）或快速分裂细胞的染色，推荐工作液浓度5-25  $\mu$ M。对于短期染色，如细胞活力分析等实验，推荐工作液浓度0.5-5  $\mu$ M。为避免过度加载造成细胞毒性，维持正常的细胞生理活性，建议在取得有效结果的基础上尽量使用最低探针浓度。

## 3. 染色方法

### 3.1 悬浮细胞染色

- 1) 离心收集细胞，并吸除上清。用预热的探针工作液轻柔地重悬细胞。
- 2) 于细胞正常生长条件下孵育15-45 min。
- 3) 离心并去除探针工作液。
- 4) 换用新鲜培养基继续培养30 min。
- 5) 清洗细胞，如需固定请参考如下步骤【4.固定和透化】。

### 3.2 贴壁细胞的染色

- 1) 吸除培养液。
- 2) 轻轻加入预热的探针工作液。
- 3) 于细胞正常生长条件下孵育15-45 min。
- 4) 换用新鲜培养基继续培养30 min。
- 5) 清洗细胞，如需固定，请参考后续步骤【4.固定和透化】。。

## 4.（可选）固定和通透处理

4.1 固定前，细胞需用PBS充分清洗。

- 【注】：当细胞包被在含有巯基或盖玻片表面上时，该清洗步骤尤为重要。

4.2 用3.7%多聚甲醛室温固定细胞15 min。

4.3 固定后于PBS中漂洗细胞。

4.4 （可选）后续如进行其他抗体染色，需对细胞进行通透处理，可将上述处理的细胞于预冷的丙酮中孵育10 min。

## 5 镜检

将上述处理的细胞用PBS漂洗后，进行检测。该探针呈绿色荧光，其Ex=492 nm，Em=517 nm。