Green CMFDA

1. 产品描述

Green CMFDA（5-氯甲基荧光素二乙酸酯）是一种具有细胞膜渗透性可对细胞进行示踪的硫醇反应性（thiol-reactive）荧光染料。CMFDA 是二乙酸荧光素（Fluorescein diacetate，FDA）的氯甲基衍生物，本身没有荧光。当其穿透细胞膜进入活细胞后，CMFDA 中的亲脂性基团可被胞浆内酯酶水解，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（Ex=492nm，Em=517nm），后者因带电荷不能自由穿透细胞膜而留在细胞内，然后可以与细胞内含硫醇的蛋白质和肽反应形成醛固定的结合物。该探针也可以首先与细胞内含硫醇的生物分子反应，但是结合物是非荧光的，直到其乙酸酯被除去。

CMFDA 具有理想的“跟踪”特性，荧光非常稳定，无毒（工作浓度范围内），可以在活细胞中保留数代（通常三到六代），可以多代跟踪细胞运动。CMFDA 稳定标记的时间至少 72 小时。在细胞分裂增殖过程中，CMFDA 标记荧光可分配到两个子代细胞中，且几乎不会使邻近细胞染色（有极少情况下通过细胞间缝隙连接发生染色）。

CMFDA 最适合与红色荧光染料和蛋白质共染，如红色荧光蛋白(red fluorescent protein，RFP)，橙色 CMRA 和 CMRA 染料。CMFDA 通常被用来标记干细胞。

2. 产品信息

货号	产品名称	规格
C4913	Green CMFDA	1mg

3. 使用方法

（1）工作液配制

1）储存液配制：产品以粉末形式提供，开盖前需要经过瞬时离心。如果产品是从冰箱中取出则需要先置于室温进行回温再瞬时离心开盖（此步很重要，本产品容易吸潮）。取 93 μg Green CMFDA 粉末加入 20 μL 无水 DMSO（所用 DMSO 必须保证高质量，新鲜无水，否则会影响该染料进入细胞），室温颠倒混匀使其充分溶解，即得到浓度为 10 mM 的储存液。使用者可以根据实验需求调整储存液配制的浓度。储存液遇水极易分解，若单次不能用完，建议分装，用封口膜封口，干燥储存于-20℃，避免反复冻融。

2）工作液配制：用预热的无血清培养液直接稀释储存液到需要的工作液浓度（0.5-25 μM），充分混匀。通常对于长期染色（至少 3 天）或快速分裂细胞的染色，推荐工作液浓度 5-25 μM。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 μM。具体的工作液浓度使用者可根据自身实验体系，预实验或参考资料进行调整。【注意】：在细胞实验过程中控制好总体稀释倍数，DMSO 在培养液中的浓度不能超过 0.1%，以避免 DMSO 对细胞的影响。

（2）染色方法

悬浮细胞染色

1）离心收集细胞，去掉上清。用 37℃预热的 CMFDA 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 15-45min。
3）离心并去除探针工作液。
4）换用新鲜细胞培养液继续培养 30min。
5）清洗细胞。如需固定请参考步骤（3）。

贴壁细胞染色

1）细胞铺板，过夜培养。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 15-45min。
4）换用新鲜细胞培养液继续培养 30min。
5）清洗细胞。如需固定请参考步骤（3）。

（3）（可选）固定和通透处理

1）固定细胞之前，要用 PBS 充分洗涤。
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。
2）用 3.7%多聚甲醛室温固定细胞 15min。
3）固定后于 PBS 中漂洗细胞。
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 10min。

（4）荧光显微镜检测

将上述处理的细胞用 PBS 漂洗后，在荧光显微镜下进行检测。CMFDA 标记的细胞呈绿色荧光，Ex=492nm，Em=517nm。

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）因该染料是硫醇反应性的，所以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。