



Инструкция к набору для трекинга клеток
с помощью CFDA SE

Contents

Русский: Инструкция к набору для трекинга клеток с помощью CFDA SE	3-9
---	-----

Инструкция к набору для трекинга клеток с помощью CFDA SE

Набор для трекинга клеток CFDA SE используется для флуоресцентного мечения и долгосрочного отслеживания клеток. Каждый набор содержит микропробирки с сухим красителем и безводный ДМСО для приготовления небольших объемов рабочего окрашивающего раствора, что удобно для проведения экспериментов и их масштабирования без лишней потери красителя.

CFDA SE (сукцинимидиловый эфир (5,6)-карбоксифлуоресцеина диацетата) — стабильный, проникающий в клетки диацетатный предшественник CFSE. Краситель не флуоресцирует до тех пор, пока не произойдет отщепление ацетатных групп внутриклеточными эстеразами. При этом образуется CFSE — флуорофор с излучением в зеленой области спектра (максимум поглощения при ~492 нм, максимум излучения при ~517 нм). CFSE взаимодействует с клеточными аминами через свои сукцинимидильные группы и ковалентно связывается с внутриклеточными белками.

CFDA SE обычно используется для мечения клеток и оценки их пролиферации *in vivo* и *in vitro*, а также для трекинга клеток и мониторинга их подвижности. Внутри клетки CFDA SE не проявляет цитотоксичности и минимально воздействует на пролиферативную способность или биологию клетки. Во время пролиферации флуоресцентная метка распределяется примерно поровну между потомками, приводя к последовательному уменьшению интенсивности флуоресценции вдвое в ходе ряда клеточных делений. Это позволяет производить количественную оценку пролиферативной способности клеток.

Состав набора

Компонент набора	Количество	
	16231 3 vials	26231 15 vials
41615, CFDA SE, 500 µg	3	15
15050, ДМСО (диметилсульфоксид) для мечения, 1 mL	1	2

Транспортировка: до трех недель при комнатной температуре. Хранение: при -20°C.

Срок хранения 12 месяцев.

Перед началом работы

Настоящий протокол описывает процедуры окрашивания клеточных культур и их анализа методами флуоресцентной микроскопии и проточной цитометрии.

Предложенные нами начальные условия окрашивания могут потребовать корректировки из-за различий в типах клеток, условиях культивирования и других факторах. Оптимальная концентрация CFDA SE для окрашивания может меняться в зависимости от конкретного применения. Мы рекомендуем тестировать как минимум десятикратный диапазон концентраций красителя. Обычно для длительного окрашивания (более трех дней) или работы с быстро делящимися клетками требуется 5–10 мкМ красителя. Для более коротких экспериментов, таких как анализ жизнеспособности клеток, достаточно более низкой концентрации красителя (0,5–5 мкМ). Для методов микроскопии может потребоваться до 25 мкМ CFDA SE. Чтобы сохранить нормальное функционирование клеток и свести к минимуму потенциальные артефакты от избыточной загрузки красителя, рекомендуется использовать минимально эффективную концентрацию CFDA SE.

Важно! CFDA SE — краситель, реагирующий с аминами. Не используйте его с буферами, содержащими амины, или предметными стеклами, покрытыми полилизинном.

Приготовление стокового раствора

1. Прежде чем открывать пробирку, дайте ей нагреться до комнатной температуры.
2. Приготовьте 5 мМ стоковый раствор CFDA SE, растворив содержимое пробирки с красителем в 179 мкл прилагаемого в наборе ДМСО для мечения.
3. Готовый стоковый раствор можно разаликвотить и хранить замороженным при -20°C .

Мечение адгезированных клеток

1. Культивируйте клетки на покровных стеклах в чашках Петри, используя соответствующую культуральную среду, до достижения желаемой плотности.
2. Разбавьте 5 мМ стоковый раствор CFDA SE в фосфатно-солевом буфере (PBS) или другом подходящем буфере до желаемой рабочей концентрации (0,5–25 мкМ).
3. Замените среду в чашке предварительно нагретым до 37°C рабочим раствором CFDA SE.
4. Инкубируйте клетки с окрашивающим раствором в течение 15 мин при 37°C .
5. Замените окрашивающий раствор свежей, предварительно нагретой средой и продолжайте инкубировать клетки еще в течение 30 мин при 37°C , чтобы позволить CFDA SE деацетилироваться и превратиться во флуоресцентный CFSE.
6. При необходимости клетки могут быть фиксированы и окрашены дополнительными маркерами.

Мечение суспензии клеток

1. Соберите клетки, центрифугируйте их в течение 7 мин при 500 *g* и аспирируйте супернатант.
2. Ресуспендируйте клетки в теплом (37°C) 0,1% растворе BSA/PBS до конечной концентрации 1×10^6 клеток/мл.

Важно! Чтобы добиться равномерного окрашивания, используйте суспензию отдельных клеток без агрегатов. Рекомендуемое количество клеток для экспериментов с мечением *in vitro* обычно колеблется от 10^5 до 10^6 клеток, в зависимости от предполагаемой продолжительности культивирования клеток после их мечения. Для адоптивного переноса метят $1-5 \times 10^7$ клеток.

3. Добавьте 2 мкл 5 мМ стокового раствора CFDA SE на 1 мл суспензии клеток до конечной рабочей концентрации 10 мкМ.

Важно! Оптимальную рабочую концентрацию CFDA SE следует определять опытным путем. Для этого перед загрузкой красителя разбавьте часть исходного раствора CFDA SE в ДМСО. Рекомендуемые рабочие концентрации находятся в диапазоне от 0,5 до 25 мкМ.

4. Инкубируйте клетки с окрашивающим раствором в течение 10 мин при 37°C.
5. Остановите процесс окрашивания, добавив к клеткам 5 объемов холодной культуральной среды.
6. *Опционально.* Инкубируйте клетки на льду в течение 5 мин.
7. Для осаждения клеток используйте центрифугирование.
8. Промойте клетки, ресуспендировав осадок в свежей культуральной среде. Повторите процесс два раза, выполнив суммарно три отмывки.
9. Культивируйте клетки *in vitro* в подходящих условиях или сделайте их адоптивный перенос.

10. При необходимости соберите клетки и окрасьте их дополнительными маркерами.

Фиксация и пермеабилзация

1. Перед фиксацией промойте клетки PBS или другим подходящим буфером.
2. Зафиксируйте клетки альдегидсодержащим фиксатором (например, 3,7% формальдегидом) в течение 15 мин при комнатной температуре.
3. Промойте клетки три раза в PBS.
4. Если клетки необходимо впоследствии пометить антителами, пермеабилизируйте их, инкубируя в ледяном ацетоне в течение 10 мин. После пермеабилзации клетки следует промыть в PBS.

Флуоресцентная микроскопия.

Приблизительные максимумы возбуждения и эмиссии CFSE составляют 492 нм и 517 нм соответственно. Используйте стандартные наборы фильтров для флуоресцеина для визуализации меченых клеток с помощью флуоресцентной микроскопии.

Проточная цитометрия

Анализируйте клетки с помощью проточного цитометра с фильтрами возбуждения и эмиссии 488 нм (канал флуоресцеина). Используйте неокрашенные клетки в качестве контроля.

Меченые клетки должны демонстрировать несколько пиков, что указывает на их пролиферацию и разбавление красителя между дочерними клетками.

Проблемы и их устранение

Проблема	Возможные причины	Способы решения
Нет сигнала	Эстеразная активность сыворотки в среде преждевременно расщепляет краситель, предотвращая проникновение красителя в клетки	- На этапе мечения используйте бессывороточную среду - Инактивируйте сыворотку перед добавлением в среду, инкубируя ее в течение 40 мин при 56°C
Слабый сигнал	А. Клетки нездоровы Б. Низкая концентрация CFDA SE В. Недостаточная продолжительность мечения Г. Тушение флуоресценции CFSE феноловым красным во время визуализации	А. Используйте только здоровые клетки Б. Проведите титрование для определения оптимальной концентрации CFDA SE В. Увеличьте время инкубации с красителем Г. Для визуализации используйте среду, не содержащую фенолового красного
Гибель клеток	А. Концентрация CFDA SE слишком высока Б. Концентрация экспериментального соединения слишком высока, что приводит к цитотоксичности	А. Проведите титрование для определения оптимальной концентрации CFDA SE Б. Уменьшите концентрацию экспериментального соединения
Перенос красителя к соседним клеткам	Избыточная загрузка красителя и насыщение клеточных эстераз, что приводит к утечке нерасщепленного красителя обратно в среду	- Уменьшите концентрацию красителя и/или время мечения - Увеличьте время культивирования и отмывок после мечения

**Широкий пик красителя
в нестимулированном
контроле**

А. Плохое смешивание CFDA SE с клетками
Б. Несколько типов клеток с различной пролиферативной активностью в культуре

А. Хорошо перемешайте клетки с CFDA SE сразу после добавления
Б. Фенотипируйте культивируемые клетки с помощью специфических антител



22.09.509-QM
Issued by INSPECT



www.lumiprobe.com

