

Окрашивание эндоплазматического ретикулума живых клеток красителями LumiTracker ER

LumiTracker ER Green и LumiTracker ER Red — проникающие в клетки, высокоселективные в отношении эндоплазматического ретикулума (ЭР) красители, которые можно использовать для визуализации живых клеток. Оба красителя являются производными BDP и глибенкламида (глибурида). Глибенкламид связывается с сульфонилмочевинными (SUR) рецепторами АТФ-зависимых калиевых каналов (K_{ATP}), которые активно представлены в эндоплазматическом ретикулуме.

Окрашивание ЭР частично сохраняется после фиксации формальдегидом. LumiTracker ER Green и LumiTracker ER Red не подходят для окрашивания клеток после фиксации.

Важно! Фармакологическая активность глибенкламида может потенциально влиять на функционирование ЭР. Особенности экспрессии рецепторов сульфонилмочевины в некоторых специализированных типах клеток могут приводить к неспецифическому относительно ЭР окрашиванию.

Приготовление растворов

1.1 Приготовление стоковых растворов

- Растворите 50 мкг LumiTracker ER Green в 64 мкл ДМСО для получения 1 мМ стокового раствора.
- Растворите 50 мкг LumiTracker ER Red в 55 мкл ДМСО для получения 1 мМ стокового раствора.

Важно! Стоковые растворы рекомендуется хранить при температуре -20°C или -80°C без доступа света. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания.

1.2 Приготовление рабочего раствора

Для получения рабочего раствора LumiTracker ER разбавьте стоковый раствор красителя в сбалансированном солевом растворе Хэнка с кальцием и магнием (HBSS/Ca/Mg). Рекомендуемая концентрация — от 100 нМ до 1 мкМ. Разведение красителя LumiTracker ER зависит от типа клеток и их плотности и должно определяться в ходе пробных экспериментов.

Окрашивание клеток

2.1 Окрашивание суспензий клеток

1. Центрифугируйте суспензию клеток при 1000 g в течение 3-5 мин, удалите супернатант.
2. Промойте клетки дважды предварительно нагретым HBSS, каждый раз по 5 мин при $+37^{\circ}\text{C}$.
3. Рекомендуемая плотность клеток для окрашивания — 1×10^6 клеток/мл.
4. Добавьте в пробирку с клетками 1 мл предварительно нагретого рабочего раствора LumiTracker ER и инкубируйте

в течение 15–30 мин при +37°C и 5% CO₂.

5. Центрифугируйте клетки при 400 *g* в течение 3-4 мин, удалите супернатант.
6. Промойте клетки дважды бессывороточной средой, каждый раз по 5 мин.
7. Ресуспендируйте клетки в бессывороточной среде для культивирования клеток или PBS.
8. Суспензию окрашенных клеток можно использовать для проточной цитометрии.
9. Для флуоресцентной микроскопии перенесите каплю окрашенной суспензии клеток на предметное стекло. Накройте клетки покровным стеклом.

2.2 Окрашивание адгезированных клеток

1. Культивируйте клетки на стерильном покровном стекле.
2. Адгезированные клетки можно окрашивать непосредственно на покровном стекле.
3. Аспирируйте среду из лунки с покровным стеклом.
4. Промойте клетки предварительно нагретым HBSS при +37°C.
5. Добавьте 100 мкл предварительно нагретого рабочего раствора LumiTracker ER и осторожно встряхните его, чтобы полностью покрыть клетки.
6. Инкубируйте клетки в течение 5-30 мин при +37°C и 5% CO₂.
7. Дважды промойте окрашенные клетки средой для культивирования, каждый раз по 5 мин.
8. Для проточной цитометрии клетки желательно ресуспендировать перед окрашиванием.
9. Для флуоресцентной микроскопии заключите окрашенные клетки между предметным и покровным стёклами, перевернув покровное стекло и положив его на предметное.

Фиксация клеток

1. Если окрашенные клетки необходимо зафиксировать, инкубируйте их в 4% формальдегиде в течение 2 мин при +4°C.
2. Отмойте клетки в PBS дважды по 5 мин.
3. Заключите под покровное стекло при помощи [монтажной среды](#).