

Окрашивание аппарата Гольджи церамидами, мечеными BDP красителями

Церамиды являются предшественниками сфинголипидов, состоящими из сфингозина и жирной кислоты, соединенных между собой амидной связью. BDP церамиды представляют собой синтетические флуоресцентные липиды, конъюгаты флуоресцентных красителей BDP со сфингозином. Внутри клетки BDP церамиды включаются в мембраны аппарата Гольджи, поэтому данные красители широко используются в клеточной биологии для визуализации аппарата Гольджи в живых и фиксированных клетках методами флуоресцентной микроскопии.

Приготовление растворов

1.1 Стоковые растворы

BDP FL церамид:

- Растворите 50 мкг BDP FL церамид в 87,2 мкл ДМСО для получения 1 мМ стокового раствора.
- Растворите 250 мкг BDP FL церамид в 436 мкл ДМСО для получения 1 мМ стокового раствора.

BDP TMR церамид:

- Растворите 50 мкг BDP TMR церамид в 73,6 мкл ДМСО для получения 1 мМ стокового раствора.
- Растворите 250 мкг BDP TMR церамид в 368 мкл ДМСО для получения 1 мМ стокового раствора.

BDP TR церамид:

- Растворите 50 мкг BDP TR церамид в 70,8 мкл ДМСО для получения 1 мМ стокового раствора.
- Растворите 250 мкг BDP TR церамид в 354 мкл ДМСО для получения 1 мМ стокового раствора.

Стоковые растворы можно хранить при -20°C или -80°C в защищенном от света месте. Избегайте повторяющихся циклов замораживания-оттаивания.

1.2 Окрашивающий раствор

1. Отмерьте 10 мл забуференного солевого раствора Хэнкса, содержащего 10 mM HEPES (HBSS/HEPES), pH 7,4, в пластиковую пробирку емкостью 50 мл. Также подходят другие бессывороточные солевые растворы, например, PBS.

(Опционально). Для предотвращения округления живых клеток и отделения их от стекла в буферный раствор можно добавить 1 mM Ca^{2+} и 0,5 mM Mg^{2+} .

2. Добавьте 3,4 мг (0,34 мг/мл) обезжиренного БСА в пробирку с буфером.
3. Добавьте 50 мкл 1 mM стокового раствора церамида, чтобы получить рабочий раствор, содержащий 5 мкМ церамида / 5 мкМ БСА. Точная концентрация церамида зависит от типа и плотности клеток и должна определяться экспериментально.

Полученный раствор комплекса церамид/БСА можно хранить в пластиковых флаконах при -20°C .

Окрашивание клеток

2.1 Живые клетки

1. Вырастите клетки на стерильном покровном стекле. Адгезивную культуру клеток можно окрашивать непосредственно на покровном стекле.
2. Аспирируйте среду из лунки с покровным стеклом.
3. Промойте клетки подходящей культуральной средой (например, HBSS/HEPES).
4. Инкубируйте клетки с 5 мкМ раствором церамида/БСА в течение 30 мин при 4°C .
5. Отмойте клетки несколько раз холодной культуральной средой.
6. Промойте клетки в растворе обезжиренного БСА (0,34 мг/мл) в HBSS/HEPES четыре раза по 30 мин при комнатной температуре.
7. Инкубируйте клетки в свежей среде при 37°C дополнительные 30 мин.
8. Промойте клетки свежей культуральной средой.
9. *(Опционально)* Окрашенные клетки можно фиксировать 4% формальдегидом в течение 2 мин при 4°C . Отмойте фиксированные клетки дважды PBS.
10. Для флуоресцентной микроскопии переверните покровное стекло с окрашенными клетками на предметное стекло, поместив таким образом клетки между стеклами.

2.2 Фиксированные клетки

1. Фиксируйте клетки 4% формальдегидом в течение 5 мин при 4°C.
2. Промойте фиксированные клетки PBS дважды по 5 мин.
3. Инкубируйте клетки с 5 мкМ комплексом церамид/БСА в PBS в течение 30 мин при 4°C.
4. Промойте клетки в растворе обезжиренного БСА (0,34 мг/мл) в PBS четыре раза по 30 мин при комнатной температуре.
5. Промойте клетки PBS два раза при комнатной температуре.
6. Для флуоресцентной микроскопии поместите клетки под покровное стекло, используя [монтажную среду](#).

Спектральные характеристики BDP-церамидов

	Макс. поглощения*	Макс. эмиссии*
BDP FL	503 нм	509 нм**
BDP TMR	542 нм	574 нм
BDP TR	589 нм	616 нм

*Максимумы поглощения и эмиссии определяли в метаноле. Максимумы в меченых клетках имеют сходные значения.

**BDP FL-церамид в клетках также имеет эмиссию в красном канале (~620 нм).