# Окрашивание аппарата Гольджи церамидами, меченными 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 церамида в 87,2 мкл ДМСО для получения 1 мМ стокового раствора.
- Растворите 250 мкг BDP FL церамида в 436 мкл ДМСО для получения 1 мМ стокового раствора.

BDP® TMR церамид:

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

BDP® TR церамид:

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

**Lumiprobe Corporation**
201 International Circle, Suite 135
Hunt Valey, Maryland 21030
USA
Phone: +1 888 973 6353
Fax: +1 888 973 6354
Email: order@lumiprobe.com

**Lumiprobe GmbH**
Feodor-Lynen-Strasse 23
30625 Hannover
Germany
Phone: +49 511 16596811
Fax: +49 511 16596815
Email: de@lumiprobe.com

**Lumiprobe RUS Ltd**
Kotsyubinsky street, 4
121351 Moscow
Russian Federation
Phone: +7 800 775 3271
Email: ru@lumiprobe.com

### 1.2 Окрашивающий раствор

1. Отмерьте 10 мл забуференного солевого раствора Хэнкса, содержащего 10 мМ 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 мМ $Ca^{2+}$ и 0,5 мМ $Mg^{2+}$.

2. Добавьте 3,4 мг (0,34 мг/мл) обезжиренного БСА в пробирку с буфером.
3. Добавьте 50 мкл 1 мМ 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.

**Lumiprobe Corporation**
201 International Circle, Suite 135
Hunt Valey, Maryland 21030
USA
Phone: +1 888 973 6353
Fax: +1 888 973 6354
Email: order@lumiprobe.com

**Lumiprobe GmbH**
Feodor-Lynen-Strasse 23
30625 Hannover
Germany
Phone: +49 511 16596811
Fax: +49 511 16596815
Email: de@lumiprobe.com

**Lumiprobe RUS Ltd**
Kotsyubinsky street, 4
121351 Moscow
Russian Federation
Phone: +7 800 775 3271
Email: ru@lumiprobe.com

### 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 монтировочную 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).

**Lumiprobe Corporation**
201 International Circle, Suite 135
Hunt Valey, Maryland 21030
USA
Phone: +1 888 973 6353
Fax: +1 888 973 6354
Email: order@lumiprobe.com

**Lumiprobe GmbH**
Feodor-Lynen-Strasse 23
30625 Hannover
Germany
Phone: +49 511 16596811
Fax: +49 511 16596815
Email: de@lumiprobe.com

**Lumiprobe RUS Ltd**
Kotsyubinsky street, 4
121351 Moscow
Russian Federation
Phone: +7 800 775 3271
Email: ru@lumiprobe.com