

Окрашивание клеток красителями Hoechst

Hoechst (бисбензимидазол, HOE) — это семейство проникающих в живые клетки флуоресцентных красителей, прочно связывающихся с богатыми аденином и тиминем областями малой бороздки двухцепочечной ДНК. Хотя красители Hoechst могут связываться со всеми нуклеиновыми кислотами, именно связывание этих красителей с нитями дцДНК, богатыми А и Т, значительно усиливает их флуоресценцию. Красители Hoechst широко используются во флуоресцентной микроскопии и проточной цитометрии для окрашивания хромосом и ядер живых и фиксированных клеток. Их также часто используют для различения конденсированных пикнотических ядер в апоптотических клетках, а также для сортировки клеток.

Семейство Hoechst содержит несколько красителей — Hoechst 33342, Hoechst 33258, Hoechst 34580 и Hoechst S769121 (Nuclear Yellow). Первые три из них представляют собой синие флуоресцентные красители с немного различающимися спектральными свойствами. Спектры возбуждения/эмиссии красителей Hoechst приведены в таблице ниже.

Спектральные характеристики красителей Hoechst (в комплексе с ДНК)*

	Макс. возбуждения	Макс. эмиссии
Hoechst 33342	351 нм	461 нм**
Hoechst 33258	351 нм	463 нм**
Hoechst 34580	380 нм	438 нм**
Hoechst S769121 (Nuclear Yellow)	360 нм	505 нм

*Интенсивность флуоресценции красителей Hoechst увеличивается с увеличением pH растворителя.

**Несвязанные красители Hoechst 33342, Hoechst 33258 и Hoechst 34580 флуоресцируют в диапазоне 510–540 нм. Зеленая флуоресценция несвязанного красителя может наблюдаться при использовании избыточной концентрации красителя или при недостаточной отмывке образца.

Прежде чем начать

- Флуоресценция красителей Hoechst гасится бромдезоксигуанидином (BrdU), обычно используемым для обнаружения делящихся клеток. Предполагается, что, когда BrdU интегрируется в ДНК, бром деформирует малую бороздку, не позволяя красителям Hoechst достичь оптимального места связывания. Это свойство Hoechst часто используется в исследованиях клеточного цикла.
- Обычно используемая концентрация красителя для окрашивания бактерий или клеток эукариот составляет 0,1–10 мкг/мл. Рабочее разведение красителей Hoechst зависит от типа и плотности клеток и должно определяться экспериментально.
- Оптимальная плотность клеток и продолжительность окрашивания для анализа содержания ДНК могут варьировать в зависимости от типа клеток. Протокол окрашивания рекомендуется оптимизировать в предварительных экспериментах для достижения наилучших результатов.

Приготовление стоковых растворов

1. Растворите 10 мг красителя Hoechst в 1 мл дистиллированной воды, чтобы получить исходный раствор с концентрацией 10 мг/мл.
2. Хорошо перемешайте до полного растворения красителя.
3. Храните стоковый раствор небольшими аликвотами при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ или $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ в защищенном от света месте. Избегайте повторяющихся циклов замораживания-оттаивания.

Окрашивание клеток

Окрашивание живых клеток для визуализации ядер

1. Культивируйте клетки на стерильных покровных стеклах. Адгезионные культуры клеток можно окрашивать непосредственно на покровном стекле.
2. Разбавьте стоковый раствор Hoechst до концентрации 1–5 мкг/мл в культуральной среде непосредственно перед использованием.
3. Добавьте раствор Hoechst к каждому образцу и инкубируйте при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 30–60 мин.
4. Отберите окрашивающий раствор и дважды промойте клетки $1\times$ PBS.
5. *(Опционально)* Окрашенные клетки можно зафиксировать в 4% формальдегиде в течение 2 мин при температуре $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Промойте фиксированные клетки дважды в $1\times$ PBS.
6. Для флуоресцентной микроскопии заключите клетки под покровное стекло, используя [монтажную среду](#).

(Опционально) Клетки можно анализировать без предварительной отмывки, однако это может увеличить фон от несвязанного красителя.

Окрашивание фиксированных клеток для визуализации ядер

1. Культивируйте клетки на стерильных покровных стеклах. Адгезионные культуры клеток можно окрашивать непосредственно на покровном стекле.
2. Фиксируйте и пермеабелизируйте клетки при необходимости.
3. Разбавьте стоковый раствор Hoechst до концентрации 0,5–2 мкг/мл в $1\times$ PBS непосредственно перед использованием.
4. Добавьте раствор Hoechst к каждому образцу и инкубируйте не менее 15 мин.
5. Отберите окрашивающий раствор и дважды промойте клетки $1\times$ PBS.
6. Для флуоресцентной микроскопии поместите клетки под покровное стекло, используя [монтажную среду](#).

(Опционально) Клетки можно анализировать без предварительной отмывки, однако это может увеличить фон от несвязанного красителя.

Окрашивание живых клеток для анализа содержания ДНК методом проточной цитометрии

1. Получите суспензионную культуру клеток.
2. Разбавьте исходный раствор Hoechst до концентрации 1–10 мкг/мл в культуральной среде непосредственно перед использованием.
3. Ресуспандируйте клетки в концентрации 1×10^6 клеток/мл в окрашивающем растворе.

В качестве альтернативы краситель Hoechst можно добавлять непосредственно в культуру клеток без их осаждения, если плотность клеток не превышает 1×10^6 клеток/мл.

4. Инкубируйте клетки при 37°C в течение 15–60 мин.
5. Осадите клетки центрифугированием при 400 *g* в течение 3–4 мин при комнатной температуре; отберите окрашивающий раствор.
6. *(Опционально)* Если после завершения анализа ДНК необходимо выполнить анализ РНК (например, секвенирование РНК), промойте клетки 2–3 раза в бессывороточном буфере (например, $1 \times$ PBS), чтобы полностью удалить остаточную РНКазу в культуральной среде.
7. Ресуспандируйте клетки в $1 \times$ PBS, после чего можно приступить к анализу методом проточной цитометрии. Используйте низкую скорость потока для достижения наилучшего результата. Увеличение скорости потока может приводить к более высокому % CV на гистограмме ДНК для каждой фазы клеточного цикла.

Важно! Если клетки необходимо сортировать, добавление Hoechst в буфер для анализа во время сбора данных предотвращает вымывание красителя во время сортировки.

Окрашивание фиксированных клеток для анализа содержания ДНК методом проточной цитометрии

1. Получите суспензионную клеточную культуру с плотностью $1-2 \times 10^6$ клеток/мл.
2. Фиксируйте клетки 70–80% ледяным этанолом в течение 30 мин.
3. Промойте клетки один раз $1 \times$ PBS.
4. Разбавьте стоковый раствор Hoechst до концентрации 0,2–2 мкг/мл в $1 \times$ PBS непосредственно перед использованием.
5. Окрашивайте клетки в течение 15 мин при комнатной температуре.
6. Приступите к анализу методом проточной цитометрии. Отмывать клетки от красителя перед анализом не требуется. Используйте низкую скорость потока для достижения наилучшего результата. Увеличение скорости потока может приводить к более высокому % CV на гистограмме ДНК для каждой фазы клеточного цикла.