Окрашивание клеток флуоресцентным красителем для нуклеиновых кислот LUCS® 5

LUCS® 5 (1,5-бис{[2-(ди-метиламино)этил]амино}-4,8-дигидроксиантрацен-9,10-дион) — проникающий в клетки флуоресцентный ДНК краситель дальнего красного диапазона для визуализации и анализа живых и фиксированных клеток. LUCS® 5 является полным структурным аналогом красителя DRAQ5®.

LUCS® 5 способен легко проникать через клеточные мембраны и внедряться между A и T основаниями двуцепочечной ДНК (дцДНК). Краситель имеет высокое сродство к дцДНК и лишь незначительно связывается с РНК и мтДНК. При этом LUCS® 5 не усиливает флуоресценцию при связывании ДНК, и измеренная флуоресценция красителя пропорциональна и стехиометрична количеству ядерной ДНК в клетке.

Благодаря проницаемости в клетки LUCS® 5 может быть использован для определения содержания ДНК и изучения клеточного цикла, однако, он не подходит для оценки жизнеспособности клеток. Как и другие проникающие в клетки интеркалирующие ДНК красители, LUCS® 5 может ингибировать клеточные деления в долгосрочных экспериментах, поэтому данный эффект необходимо исследовать перед основным экспериментом.

В микроскопии и многопараметрическом анализе LUCS® 5 может быть использован в качестве ядерного контрастирующего красителя как для живых, так и для фиксированных образцов. В проточной цитометрии LUCS® 5 позволяет напрямую различать клетки крови и костного мозга без предварительного лизиса, фиксации, пермеабилизации или обработки РНКазой эритроцитов.

LUCS® 5 имеет пики поглощения при 603 нм и 646 нм и пик эмиссии при 697 нм (при связывании с дцДНК). Таким образом, данный краситель спектрально совместим с наиболее распространенными метками, такими как GFP, FITC, R-PE или RFP. LUCS® 5 также обладает высокой фотостабильностью и не проявляет эффекта фотообесцвечивания при визуализации.

Lumiprobe Corporation
115 Airport Dr Suite 160
Westminster, Maryland 21157
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

Lumiprobe Limited
Suite 12, 3/F, Great Eagle Centre
23 Harbour Road, Wan Chai
Hong Kong
Mob.: +852-5929-0488 (from HK)
Phone: +86-147-14316277 (from China)
Email: hk@lumiprobe.com

Lumiprobe LTD
2 Tuvim St.
3223562, Haifa
Israel
Phone: +972-(0)4-374-0377
Email: il@lumiprobe.com

Lumiprobe Co., Ltd.
10H-11, Shenmao Commercial Center
No. 59 Xinwen Rd., Meiling Community
Lianhua Street, Futian District
Shenzhen, China
Phone: +86-1471431-6277
Email: cn@lumiprobe.com

Прежде чем начать

- Раствор LUCS® 5 следует хранить при температуре 2—8°C. НЕ замораживайте раствор! При замораживании LUCS® 5 может выпадать из раствора в осадок, который затем сложно повторно растворить.
- Азид натрия препятствует окрашиванию LUCS® 5, поэтому, рекомендуется проводить окрашивание в буфере Дульбекко (DPBS), PBS или культуральной среде, не содержащей азид натрия.
- Обычно используемая концентрация красителя для окрашивания клеток составляет 5–20 мкМ. Рабочее разведение зависит от типа и плотности клеток и должно определяться экспериментально.
- Оптимальная плотность клеток и продолжительность окрашивания для анализа содержания ДНК может варьировать в зависимости от типа клеток. Протокол окрашивания необходимо оптимизировать в пилотных экспериментах для достижения наилучшего результата.
- Комплекс LUCS® 5 с дцДНК обладает яркой флуоресценцией в ядре, при этом несвязанный краситель может тускло флуоресцировать в цитоплазме, что позволяет сегментировать в клетке цитоплазматический и ядерный компартменты.

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 раствор LUCS® 5 до концентрации 5–20 мкМ в полной культуральной среде или другом буфере, не содержащем азидов, непосредственно перед использованием.
3. Добавьте раствор LUCS® 5 к образцам и инкубируйте при 37°C в течение 5–30 мин в темноте.
4. Аспирируйте красящий раствор LUCS® 5 и дважды промойте клетки 1× PBS.

   (Опционально) Клетки можно анализировать без предварительной отмывки, однако это может увеличить фон от несвязанного красителя.
5. Для флуоресцентной микроскопии поместите клетки под покровное стекло, используя заключающую среду.
6. Для визуализации рекомендуется использовать 715LP или более длинноволновый фильтр. Краситель также хорошо детектируется в фильтрах, обычно используемых для детекции AF 647 (например, 660/20 или 692/40 нм).

Lumiprobe Corporation
115 Airport Dr Suite 160
Westminster, Maryland 21157
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

Lumiprobe Limited
Suite 12, 3/F, Great Eagle Centre
23 Harbour Road, Wan Chai
Hong Kong
Mob.: +852-5929-0488 (from HK)
Phone: +86-147-14316277 (from China)
Email: hk@lumiprobe.com

Lumiprobe LTD
2 Tuvim St.
3223562, Haifa
Israel
Phone: +972-(0)4-374-0377
Email: il@lumiprobe.com

Lumiprobe Co., Ltd.
10H-11, Shenmao Commercial Center
No. 59 Xinwen Rd., Meiling Community
Lianhua Street, Futian District
Shenzhen, China
Phone: +86-1471431-6277
Email: cn@lumiprobe.com

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 пермеабилизируйте клетки при необходимости.
3. Разбавьте раствор LUCS® 5 до концентрации 5–20 мкМ в 1× PBS или другом буфере, не содержащем азидов, непосредственно перед использованием.
4. Добавьте раствор LUCS® 5 к образцам и инкубируйте 5–30 мин при комнатной температуре в темноте.
5. Промойте образцы один раз в 1× PBS.

   (Опционально) Клетки также можно анализировать без промывания, но это может увеличить фон от несвязанного красителя.
6. Для флуоресцентной микроскопии поместите клетки под покровное стекло, используя заключающую среду.
7. Для визуализации рекомендуется использовать 715LP или более длинноволновый фильтр. Краситель также хорошо детектируется в фильтрах, обычно используемых для детекции AF 647 (например, 660/20 или 692/40 нм).

Окрашивание живых клеток для анализа содержания ДНК методом проточной цитометрии

1. Получите суспензионную культуру клеток.
2. Ресуспендируйте клетки в концентрации $0{,}5\times10^6$ клеток/мл или меньше в 20 мкМ растворе LUCS® 5, приготовленном на полной культуральной среде или другом буфере, не содержащем азидов.
3. Инкубируйте клетки при 37°C в течение 5–15 мин в темноте.
4. Осадите клетки центрифугированием при 400 g в течение 3–4 мин при комнатной температуре и аспирируйте окрашивающий раствор LUCS® 5.
5. Ресуспендируйте клетки в 1× DPBS, после чего сразу приступайте к анализу методом проточной цитометрии. Клетки также можно анализировать без промывания, однако, это может снизить разрешение гистограммы содержания ДНК.
6. Анализируйте клетки на цитометре, оснащенном красным лазером 633 нм. При анализе клеточного цикла, детекция в канале AF 700 с фильтрами 680LP или 715LP может помочь в разрешении эмиссионных пиков.

   (Опционально) LUCS® 5 также можно детектировать на проточном цитометре с использованием синего лазера с длиной волны 488 нм.

Lumiprobe Corporation
115 Airport Dr Suite 160
Westminster, Maryland 21157
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

Lumiprobe Limited
Suite 12, 3/F, Great Eagle Centre
23 Harbour Road, Wan Chai
Hong Kong
Mob.: +852-5929-0488 (from HK)
Phone: +86-147-14316277 (from China)
Email: hk@lumiprobe.com

Lumiprobe LTD
2 Tuvim St.
3223562, Haifa
Israel
Phone: +972-(0)4-374-0377
Email: il@lumiprobe.com

Lumiprobe Co., Ltd.
10H-11, Shenmao Commercial Center
No. 59 Xinwen Rd., Meiling Community
Lianhua Street, Futian District
Shenzhen, China
Phone: +86-1471431-6277
Email: cn@lumiprobe.com

Окрашивание фиксированных клеток для анализа содержания ДНК методом проточной цитометрии

1. Получите суспензионную культуру клеток.
2. Зафиксируйте клетки на льду 70–80% ледяным этанолом в течение 30 мин.
3. Промойте клетки один раз 1× DPBS.
4. Разбавьте раствор LUCS® 5 до концентрации 20 мкМ в 1× DPBS или другом буфере, не содержащем азидов, непосредственно перед использованием.
5. Окрашивайте клетки в концентрации $0{,}5\times10^6$ клеток/мл или меньше в течение 5–15 мин при комнатной температуре в темноте.
6. Никакой дополнительной промывки клеток перед анализом не требуется.
7. Анализируйте клетки на цитометре, оснащенном красным лазером 633 нм. При анализе клеточного цикла, детекция в канале AF 700 с фильтрами 680LP или 715LP может помочь в разрешении эмиссионных пиков.

   (Опционально) LUCS® 5 также можно детектировать на проточном цитометре с использованием синего лазера с длиной волны 488 нм.

Спектральные свойства:

Возбуждение:

- Максимумы при 603 нм и 646 нм;
- Оптимальная линия 647 нм;
- Также можно использовать линии 488, 514, 568 и 633 нм;
- Двухфотонное возбуждение при 1047 нм.

Эмиссия (зависит от прибора):

- Максимумы при 681 нм (свободный краситель)/697 нм (в комплексе с дцДНК);
- Обнаружение от 665 нм до ближнего инфракрасного диапазона (NIR);
- Эмиссионные фильтры 695L, 715LP или 780 LP.

DRAQ5™ является зарегистрированной торговой маркой BioStatus Ltd.

Lumiprobe Corporation
115 Airport Dr Suite 160
Westminster, Maryland 21157
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

Lumiprobe Limited
Suite 12, 3/F, Great Eagle Centre
23 Harbour Road, Wan Chai
Hong Kong
Mob.: +852-5929-0488 (from HK)
Phone: +86-147-14316277 (from China)
Email: hk@lumiprobe.com

Lumiprobe LTD
2 Tuvim St.
3223562, Haifa
Israel
Phone: +972-(0)4-374-0377
Email: il@lumiprobe.com

Lumiprobe Co., Ltd.
10H-11, Shenmao Commercial Center
No. 59 Xinwen Rd., Meiling Community
Lianhua Street, Futian District
Shenzhen, China
Phone: +86-1471431-6277
Email: cn@lumiprobe.com