

Окрашивание живых клеток с помощью митохондриальных красителей LumiTracker® Mito

LumiTracker® Mito представляют собой катионные, проникающие в клетки красители с тиол-реакционноспособным хлорметильным фрагментом, активно используемые для мечения митохондрий в живых клетках. Красители LumiTracker® Mito способны пассивно диффундировать через плазматическую мембрану и избирательно накапливаться в активных митохондриях в зависимости от мембранного потенциала в них. Красители LumiTracker® Mito различаются по спектральным характеристикам и их устойчивости к фиксации. Эти свойства обобщены в следующей Таблице.

Краситель	Кат. номер	MW	Возбуждение (нм)*	Эмиссия (нм)*	Состояние окисления	Устойчивость к фиксации
Розаминовые						
LumiTracker® Mito Orange CMTMRos	2252-x	427.38	555	578	Окисленная	Да
LumiTracker® Mito Orange CM-H2TMRos	4367-x	392.93			Восстановленная	Да
LumiTracker® Mito Red CMXRos	2251-x	531.53	581	600	Окисленная	Да
Карбоцианиновые						
LumiTracker® Mito Green FM	3527-x	671.88	491	513	-	Нет
LumiTracker® Mito Red FM	3170-x	724.00	590	643	-	Нет

Красители LumiTracker® Mito предназначены для окрашивания живых клеток. Тем не менее, маркеры на основе розамина сохраняются в митохондриях после фиксации и пермеабилзации клеток и совместимы с последующими окрашиваниями методами иммуноцитохимии или гибридизации *in situ*. Хотя окрашивание митохондрий может быть получено с помощью красителей LumiTracker® Mito на фиксированных клетках, соотношение сигнал/шум обычно при этом не является оптимальным. При необходимости мечения митохондрий в фиксированных клетках, мы рекомендуем использовать антитела против OxPhos.

Прежде чем начать

- Красители LumiTracker® Mito с восстановленным розамином чувствительны к окислению, особенно в растворе, и должны храниться под аргоном или азотом при температуре ниже -20 °C, в месте защищенном от света. Мы рекомендуем использовать растворы восстановленного розамина сразу после их приготовления.

- Обычно используемая концентрация красителя для окрашивания клеток составляет 25–500 нМ. Рабочее разведение зависит от типа и плотности клеток и должно быть определено экспериментально.
- Красители LumiTracker® Mito с восстановленным розамином обычно загружаются в клетки в концентрациях, в три-пять раз превышающих концентрации других маркеров LumiTracker® Mito.
- Оптимальная плотность клеток и продолжительность окрашивания могут различаться в зависимости от типа клеток. Протокол окрашивания должен быть оптимизирован в предварительных экспериментах для достижения наилучших результатов.

Приготовление стокового раствора

1. Перед открытием каждый флакон должен быть нагрет до комнатной температуры.
2. Растворите необходимое количество лиофилизованного красителя LumiTracker® Mito в безводном [диметилсульфоксиде](#) для получения 1 мМ стокового раствора.
3. Тщательно перемешайте содержимое пробирки до полного растворения красителя.
4. Храните стоковый раствор в небольших аликвотах при температуре -20 °C или -80 °C в темноте. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания.

Приготовление окрашивающего раствора

- Разбавьте 1 мМ стоковый раствор LumiTracker® Mito до конечной рабочей концентрации в соответствующем буфере или культуральной среде.

Важно! Восстановленные формы LumiTracker® Mito восприимчивы к потенциальным оксидазам в сыворотке. Мы не рекомендуем использовать полную среду с этими зондами.

- Обычно используемая концентрация красителя для окрашивания клеток составляет 25–500 нМ. Рабочее разведение зависит от типа клеток, их плотности и применения. Если клетки после окрашивания необходимо зафиксировать и пермеабелизовать, используйте рабочую концентрацию 100–500 нМ.
- Для красителя LumiTracker® Mito Green FM используйте концентрацию 20–200 нМ. При высоких концентрациях этот краситель может окрашивать другие клеточные структуры.

Важно! Старайтесь использовать минимальную концентрацию красителя, чтобы снизить потенциальные артефакты и митохондриальную токсичность от его избыточной загрузки.

Окрашивание клеток

Окрашивание адгезивных клеток

1. Культивируйте клетки на стерильных покровных стеклах. Адгезионные культуры клеток можно окрашивать непосредственно на покровном стекле.
2. Удалите культуральную среду и добавьте предварительно нагретый до 37 °C окрашивающий раствор.

3. Инкубируйте клетки в темноте в течение 15–45 мин в условиях, необходимых для данного типа клеток.
4. Замените окрашивающий раствор на свежую предварительно нагретую среду или буфер.
5. Визуализируйте клетки с помощью флуоресцентного микроскопа или флуоресцентного микропланшетного ридера.

Окрашивание суспензии клеток

1. Получите суспензию отдельных клеток.
2. Центрифугируйте клетки и аспирируйте супернатант.
3. Аккуратно ресуспендируйте клетки в предварительно нагретом до 37 °С окрашивающем растворе.
4. Инкубируйте клетки в темноте в течение 15–45 мин в условиях, необходимых для данного типа клеток.
5. Центрифугируйте клетки и аспирируйте супернатант.
6. Ресуспендируйте клетки в свежей предварительно нагретой среде или буфере.
7. Проанализируйте клетки с помощью проточного цитометра, флуоресцентного микроскопа или флуоресцентного микропланшетного ридера.
8. Для иммобилизации клеток используйте в процессе монтирования предметные или покровные стекла, покрытые поли-L-лизинном.

Фиксация и пермеабиллизация клеток после окрашивания

Эти шаги необязательны, но могут потребоваться для проведения последующей иммуноцитохимии или гибридизации *in situ*. Используйте протокол, описанный ниже, только для красителей на основе розамина. Сигнал от LumiTracker® Mito Green FM и LumiTracker® Mito Red FM плохо сохраняется после фиксации.

1. После окрашивания промойте клетки в свежем предварительно нагретом буфере или культуральной среде.
2. Осторожно аспирируйте буфер или среду.
3. Фиксируйте клетки в течение 15 мин свежим 2–4% раствором формальдегида, приготовленного на буфере или среде.
4. Промойте клетки несколько раз буфером.
5. *Опционально.* Если клетки необходимо пермеабиллизировать, инкубируйте фиксированные клетки в течение 10 мин в PBS, содержащем 0,2% Triton X-100, после этого промойте клетки PBS. В качестве альтернативы клетки можно пермеабиллизировать, инкубируя в ледяном ацетоне в течение 5 мин, а затем промыв в PBS. Пермеабиллизацию ацетоном также можно использовать для улучшения соотношения сигнала/фон.