

## 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
<b>Розаминовые</b>						
LumiTracker® Mito Orange CMTMRos	2252-x	427.38	555	578	Окисленная	Да
LumiTracker® Mito Orange CM-H2TMRos	4367-x	392.93	555	578	Восстановленная	Да
LumiTracker® Mito Red CMXRos	2251-x	531.53	581	600	Окисленная	Да
<b>Карбоцианиновые</b>						
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 пермеабиллизировать, 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 адгезированных 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 ресуспенсируйте клетки в предварительно нагретом до 37 °C 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. Ресуспенсируйте 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 пермеабилзация 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.

#### **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](mailto:order@lumiprobe.com)

#### **Lumiprobe GmbH**

Feodor-Lynen-Strasse 23  
30625 Hannover  
Germany  
Phone: +49 511 16596811  
Fax: +49 511 16596815  
Email: [de@lumiprobe.com](mailto:de@lumiprobe.com)

#### **Lumiprobe RUS Ltd**

Kotsyubinsky street, 4  
121351 Moscow  
Russian Federation  
Phone: +7 800 775 3271  
Email: [ru@lumiprobe.com](mailto: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](mailto:hk@lumiprobe.com)

#### **Lumiprobe LTD**

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