Lumiprobe
Life science solutions

Окрашивание живых клеток с помощью митохондриальных красителей LumiTracker® Mito

LumiTracker® Mito представляют собой катионные, проникающие в клетки красители с тиол-реационноспособным 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	555	578	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 пермеабилизации 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 защищеннном от света. Мы рекомендуем использовать растворы восстановленного розамина сразу после их приготовления.

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

- 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 лиофилизированного 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 пермеабилизировать, 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.

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

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. Визуализиируйте 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 °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. 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 стрекла, покрытые поли-L-лизином.

Фиксация и пермеабилизация 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, приготовленнго на буфере или среде.
4. Промойте клетки несколько раз буфером.
5. *Опционально*. Если клетки необходимо пермеабилизировать, 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 пермеабилизировать, инкубируя в ледяном ацетоне в течение 5 мин, а затем промыв в PBS. Пермеабилизацию ацетоном также можно использовать для улучшения соотношения сигнала/фон.

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