

Окрашивание клеток красителем Lucifer Yellow CN

Lucifer Yellow CN — высокочувствительный флуоресцентный краситель, широко применяемый в нейробиологии, цитологии и молекулярной биологии для трекинга клеток, изучения межклеточных взаимодействий и визуализации нейронов.

Lucifer Yellow CN подходит для мечения как живых, так и фиксированных препаратов методами микроинъекции, ионтофореза и электропорации^[1]. Благодаря наличию карбогидрогидной группы (CN) в составе, краситель сохраняется в клетках после фиксации альдегидами (например, параформальдегидом или глутаральдегидом), что делает его совместимым с большинством протоколов иммуногисто- и цитохимии.

Lucifer Yellow CN имеет высокий квантовый выход и устойчив к фотообесцвечиванию, благодаря чему идеально подходит для конфокальной и флуоресцентной микроскопии. Краситель также обладает свойством фотоконверсии и может быть использован для визуализации меченых клеточных структур методами светлоструйной и электронной микроскопии^[2].

Прежде чем начать

- Поскольку Lucifer Yellow CN имеет два отрицательных заряда, он не проникает через интактные мембраны живых клеток, поэтому основными способами введения красителя в клетки являются микроинъекция, ионтофорез и электропорация.
- Несмотря на то, что Lucifer Yellow CN является гидрофильным соединением, некоторые клетки способны поглощать его путем эндоцитоза и могут быть помечены таким образом.
- Lucifer Yellow CN не подходит для долгосрочного трекинга в живых клетках из-за постепенного вымывания красителя.
- Для одновременного мечения с другими флуорофорами (например, DAPI) убедитесь в отсутствии спектрального перекрытия.

Приготовление рабочего раствора

1. Растворите Lucifer Yellow CN в дистиллированной воде, 0,5–1 M LiCl или культуральной среде до концентрации 0,2–5%. Выбор растворителя и концентрации красителя зависят от используемого метода загрузки. Приведенные концентрации Lucifer Yellow CN могут быть использованы в качестве отправных, точная концентрация красителя определяется опытным путем.
2. Отфильтруйте полученный раствор через 0,22 мкм сито для удаления нерастворенных частиц.
3. Храните раствор при 4°C в защищенном от света месте не более 1 месяца.
4. Неиспользованный раствор также можно хранить при -20°C или -80°C в защищенном от света месте. Избегайте повторного замораживания и размораживания.

Загрузка красителя микроинъекцией

1. Заполните микроинъекционную иглу 1–5% раствором Lucifer Yellow CH в бидистиллированной воде. Точная концентрация красителя определяется опытным путем.
2. Поместите клетки или срез ткани на предметный столик флуоресцентного микроскопа, оснащенного микроманипулятором.
3. Введите краситель в целевую клетку под контролем микроскопа.
4. Инкубируйте 10–15 мин при комнатной температуре.
5. После инъекции промойте образец, чтобы удалить избыток не включившегося красителя.
6. Визуализируйте окрашенные клетки с помощью флуоресцентного микроскопа с соответствующим набором фильтров (максимум возбуждения при ~ 430 нм, максимум испускания при ~ 540 нм).

Загрузка красителя ионтофорезом

1. Приготовьте рабочий 1–2% раствор красителя Lucifer Yellow CH в 0,5–1 М LiCl. Для ионтофоретической инъекции предпочтительнее использовать этот растворитель, поскольку он увеличивает подвижность красителя. Точная концентрация красителя определяется опытным путем.
2. Заполните стеклянный микроэлектрод рабочим раствором Lucifer Yellow CH.
3. Поместите клетки или срез ткани на предметный столик флуоресцентного микроскопа, оснащенного микроманипулятором.
4. Используйте микроманипулятор для введения микроэлектрода в нужную клетку под визуальным контролем.
5. Подайте отрицательный импульс тока (например, 0,2–0,5 нА в течение 5–15 мин) для загрузки отрицательно заряженного Lucifer Yellow CH в клетку.
6. После инъекции промойте образец, чтобы удалить избыток не включившегося красителя.
7. Визуализируйте окрашенные клетки с помощью флуоресцентного микроскопа с соответствующим набором фильтров (максимум возбуждения при ~ 430 нм, максимум испускания при ~ 540 нм).

Загрузка красителя электропорацией

1. Приготовьте 0,2–0,5% рабочий раствор Lucifer Yellow CH в культуральной среде без кальция.
2. Промойте клетки свежей культуральной средой без кальция, избегая их подсушивания.
3. Перенесите клетки в камеру для электропорации.
4. Добавьте к клеткам 400 мкл рабочего раствора Lucifer Yellow CH.
5. Подайте электрический импульс с помощью устройства для электропорации в соответствии с инструкцией производителя.
6. Немедленно замените раствор красителя предварительно нагретой средой без кальция, содержащей 10%

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

диализованной сыворотки. Это поможет закрыть поры, образовавшиеся во время электропорации.

7. Инкубируйте клетки в течение 3–5 мин в инкубаторе для закрытия пор и переноса красителя через щелевые контакты.
8. Промойте клетки свежей средой для удаления невключенного красителя.
9. Визуализируйте окрашенные клетки с помощью флуоресцентного микроскопа с соответствующим набором фильтров (максимум возбуждения при ~ 430 нм, максимум испускания при ~ 540 нм).

Фотоконверсия

Lucifer Yellow CN позволяет визуализировать меченые клеточные структуры методами светлорольной и электронной микроскопии, благодаря образованию стабильного оптически и электронно-плотного осадка после фотоокисления интенсивным синим светом в присутствии раствора диаминобензидина (DAB) ^[2].

1. Инкубируйте образец в блокирующем буфере (50 мМ глицина, 5 мМ KCN и 5 мМ аминотриазола) в течение 15 мин для снижения неспецифической фоновой реакции производных диаминобензидина. Тщательно отмойте после инкубации.
2. Добавьте к образцу отфильтрованный 0,1–0,2% раствор диаминобензидина и инкубируйте в течение 10–20 мин при комнатной температуре.
3. Поместите образец под микроскоп, оснащенный источником света. Осветите целевую область интенсивным синим светом (например, ксеноновой лампой мощностью 150 Вт). Для возбуждения Lucifer Yellow CN используйте набор фильтров FITC.
(Опционально) Постоянный поток чистого кислорода через раствор во время фотоокисления значительно усиливает реакцию.
4. Прекратите освещение образца, когда в меченых клетках появится светло-коричневое окрашивание, указывающее на образование видимого осадка (обычно около 10 мин).
5. Промойте клетки буфером для удаления несвязавшихся реагентов.
6. Визуализируйте окрашенные клетки с помощью светлорольного или электронного микроскопа.

Фиксация и пермеабилзация

1. Для светлорольной, флуоресцентной и конфокальной микроскопии зафиксируйте окрашенные образцы 4% параформальдегидом в течение 10–20 мин при комнатной температуре или 4°C.
2. Промойте клетки PBS, затем проведите пермеабилзацию 0,1–0,5% раствором Triton X-100 в PBS в течение 5–10 мин. После этого образцы можно окрашивать стандартными протоколами для иммуноцит- и гистохимии.
3. Для детекции Lucifer Yellow CN методом электронной микроскопии зафиксируйте образцы последовательно 2,5% глутаральдегидом и 1% OsO₄ на 0,1М какодильном буфере (pH 7,5) в течение 1 и 3 ч, соответственно. После этого образцы могут быть процессированы стандартным образом для электронной микроскопии.

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

Возможные проблемы и их решение

Слабое окрашивание:

- Увеличьте концентрацию вводимого Lucifer Yellow CH.
- Увеличьте объем красителя, вводимого методом микроинъекции.
- Увеличьте время введения красителя методами ионтофореза или электропорации.
- Усиьте окрашивание с помощью иммунохимии с антителами, специфичными к Lucifer Yellow.

Слабое мечение отростков:

- Убедитесь, что концентрация Lucifer Yellow CH не слишком высокая. Избыточная концентрация красителя может приводить к его агрегации и снижению диффузии.
- Проверьте параметры электропорации или микроинъекции, чтобы обеспечить эффективную доставку красителя.
- Увеличьте время диффузии красителя перед фиксацией.
- Оптимизируйте этапы фиксации и пермеабилзации, чтобы избежать тушения флуоресценции или блокирования проникновения красителя в отростки.

Ссылки

[1] J. Cell. Mol. Med. 2012, 16, 1, 22-31; [2] Science. 1982, 217, 953–955.

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