

Окрашивание живых клеток индикатором перекисного окисления липидов **BDP® 581/591 C11**

BDP® 581/591 C11 представляет собой липофильный ратиометрический зонд на основе бордипиррометена, предназначенный для мониторинга окислительного стресса в живых клетках. Благодаря жирнокислотному хвосту (C11) зонд эффективно встраивается в клеточные мембраны, где избирательно реагирует с липидными гидропероксидами и активными формами кислорода.

Окисление полиеновой цепи красителя приводит к сдвигу максимума его флуоресценции из красной области спектра (~594 нм) в зеленую (~510 нм). Это позволяет проводить количественный ратиометрический анализ, не зависящий от концентрации зонда, интенсивности возбуждающего света и эффективности окрашивания.

BDP® 581/591 C11 подходит для долговременной визуализации клеток и кинетических исследований, и может быть использован для изучения ферроптоза и гибели клеток, анализа окислительного стресса, вызванного УФ-излучением, токсинами, гипоксией и др., скрининга антиоксидантных соединений, а также оценки целостности мембран в метаболических исследованиях.

Протокол

Приготовление растворов

- **Стоковый раствор:** Растворите BDP® 581/591 C11 в [безводном ДМСО](#), получив сток с концентрацией 1–10 мМ. Приготовленный сток необходимо разлить на аликвоты и хранить в темноте при -20°C или -80°C. Избегайте повторного замораживания-оттаивания.
- **Рабочий раствор:** Непосредственно перед применением разведите стоковый раствор подходящим буфером (бессывороточной средой, HBSS или PBS) до концентрации 1–10 мкМ. Подбирайте рабочую концентрацию опытным путём, готовьте раствор свежим для каждого эксперимента.

Окрашивание суспензии клеток

1. **Суспензионные клетки:** Центрифугируйте клетки при 1000 *g* в течение 3–5 минут при 4°C. Удалите супернатант и дважды промойте PBS по 5 минут.
2. **Адгезированные клетки:** Дважды промойте клетки PBS, снимите их трипсином и после диссоциации центрифугируйте при 1000 *g* в течение 3–5 минут.
3. Ресуспандируйте клеточный осадок в 1 мл рабочего раствора BDP® 581/591 C11.
4. Инкубируйте при 37°C в защищённом от света месте 5–30 минут. Длительность инкубации варьирует для разных клеточных линий; определите оптимальное время эмпирическим путём.
5. По окончании окрашивания центрифугируйте клетки при 1000 *g* в течение 5 минут, удалите супернатант и два-три раза отмойте клетки PBS по 5 минут каждая отмывка.

- Ресуспенсируйте окрашенные клетки в предварительно подогретой бессывороточной среде или PBS и сразу анализируйте с помощью флуоресцентного микроскопа либо проточного цитометра.

Окрашивание адгезированных клеток

- Вырастите адгезивные клетки на стерильных покровных стёклах.
- Извлеките стекло из культуральной среды, аккуратно удалите излишек жидкости и поместите стекло во влажную камеру.
- Нанесите 100 мкл рабочего раствора красителя на один край стекла и плавно покачайте, чтобы раствор равномерно растёкся по всей поверхности и покрыл все клетки.
- Инкубируйте при 37°C в темноте 5–30 минут. Оптимальную продолжительность инкубации подбирают экспериментально для каждого типа клеток.
- После окрашивания удалите красящий раствор и промойте стекло 2–3 раза предварительно подогретой культуральной средой и сразу приступайте к анализу с помощью флуоресцентного микроскопа либо проточного цитометра.

Анализ клеток

Детекцию сигнала необходимо производить сразу после окрашивания, используя следующие профили возбуждения/эмиссии для восстановленного (неокисленного) и окисленного состояний:

- Восстановленное состояние:** Возбуждение 565–581 нм | Эмиссия 585–591 нм (красный канал)
- Окисленное состояние:** Возбуждение 460–495 нм | Эмиссия 510–550 нм (зеленый канал)

Флуоресцентная микроскопия: Визуализация выполняется с использованием наборов фильтров для Texas Red (красный канал) и FITC/GFP (зеленый канал). Уровень перекисного окисления липидов количественно оценивается по отношению интенсивности зеленой и красной флуоресценции.

Проточная цитометрия: Анализ проводится с использованием лазера с длиной волны возбуждения 488 нм. Измеряется зеленая эмиссия в канале FITC (например, 530/30 нм) и красная эмиссия в канале PE/ECD (например, 585/42 нм или 610/20 нм) для расчета сдвига.

Важно! Флуоресцентные метки подвержены фотообесцвечиванию. Чтобы замедлить гашение сигнала, максимально ограничивайте воздействие света на всех этапах.