

Окрашивание клеточных мембран липофильными карбоцианиновыми красителями

Липофильные карбоцианиновые (DiI, DiO, DiD, DiR и др.) и диалкиламиностириловые (DiA) красители – флуорогенные мембранные зонды, обладающие слабой флуоресценцией в водной среде, и интенсивной при встраивании красителя в липидный бислой клеточных мембран за счет длинных углеводородных «хвостов». После встраивания в мембрану красители способны латерально диффундировать в ней, обеспечивая ее полное и равномерное прокрашивание.

Карбоцианиновыми красителями можно окрашивать как живые, так и фиксированные клетки. Мечение сохраняется живыми клетками в культуре в течение недель. Сразу после окрашивания метка преимущественно локализуется плазматической мембране, однако через несколько часов культивирования, меченые мембраны интернализируются во внутриклеточные везикулы, из-за чего окрашивание становится преимущественно внутриклеточным.

Разные цианиновые флуорофоры в ядрах липофильных красителей семейства DiI обеспечивают их флуоресценцию в различных диапазонах (от зеленого до ближнего инфракрасного) и позволяют использовать их для многоцветного анализа клеток.

Благодаря минимальной токсичности и отсутствию переноса метки между клетками, данные красители активно используются в исследованиях, изучающих слияние клеток, интернализацию мембран, клеточную адгезию и миграцию.

1. Приготовление стоковых растворов

- Большинство липофильных цианиновых красителей растворимы в ДМСО, ДМФА или этаноле. Для окрашивания клеточных мембран рекомендуется использовать стоковые растворы в этаноле или ДМСО в концентрации 1–2 мМ (~1–2 мг/мл).
- Растворение красителя занимает обычно не менее часа с периодическим встряхиванием на вортексе. Чтобы ускорить этот процесс, можно использовать нагревание до 55°C.
- Для DiI и Neuro-DiO в качестве растворителя можно использовать растительное масло. Обычно готовят сток в концентрации 1–2 мМ с нагреванием до 55°C и ультразвуковой обработкой в течение 30 минут и более.
- DiO обладает высокой гидрофобностью и для приготовления его стока предпочтительнее использовать ДМФА, однако, если условия эксперимента это не позволяют, можно использовать ДМСО и этанол:
 - 2 мМ (1.76 мг/мл) в ДМФА с нагреванием до 55°C и встряхиванием на вортексе;
 - 1 мМ (0.88 мг/мл) в ДМСО с нагреванием до 55°C и встряхиванием на вортексе;
 - 2 мМ в смеси ДМСО:EtOH 1:1 (сначала добавьте ДМСО к красителю, перемешайте, затем добавьте равный объем этанола, нагрейте до 55°C с периодическим встряхиванием на вортексе).
- Хранение стоковых растворов: при 4°C в темном месте до 12 месяцев. Во время хранения в стоковом растворе красителя могут появиться кристаллы. При их появлении нагрейте раствор до 55°C или обработайте ультразвуком до полного растворения кристаллов.
- Растворы красителей в растительном масле необходимо хранить при комнатной температуре, без доступа света.

Замораживать не рекомендуется.

2. Приготовление рабочих растворов

- Конечная концентрация рабочего раствора должна быть определена эмпирически для разных типов клеток и/или экспериментальных условий.
- Разбавьте стоковый раствор в подходящем буфере, например, в бессывороточной культуральной среде, HBSS или PBS для получения рабочей концентрации 1–10 мкМ. Хорошо перемешайте полученный раствор.

Важно! Сывороточные белки и липиды в среде могут связывать краситель и снижать его эффективную концентрацию. Двухвалентные катионы (Ca^{2+} , Mg^{2+}) могут способствовать осаждению красителя, поэтому рекомендуется использовать буферы без их содержания.

3. Окрашивание живых клеток в суспензии

1. Суспендируйте клетки в плотности 1×10^6 /мл в рабочем растворе красителя.
(Опционально) Стоковый раствор красителя можно добавить непосредственно к клеточной суспензии, после чего хорошо перемешать мягким пипетированием.
2. Инкубируйте 20 минут при 37°C. Оптимальное время инкубации для получения равномерного мечения варьирует в зависимости от типа клеток и определяется опытным путем.
3. Центрифугируйте при 1000–1500 об/мин в течение 5 минут.
4. Удалите супернатант и аккуратно ресуспендируйте клетки в предварительно подогретой (37°C) культуральной среде.
5. Повторите центрифугирование и промывку два раза.
6. Клетки можно визуализировать непосредственно в культуральной среде.

4. Окрашивание живых адгезированных клеток

1. Вырастите клетки на стерильных покровных стеклах.
2. Удалите культуральную среду.
3. Добавьте рабочего красящий раствор в объеме, достаточном, чтобы полностью покрыть клетки.
4. Инкубируйте клетки 20 минут при 37°C. Оптимальное время инкубации для получения равномерного мечения варьирует в зависимости от типа клеток и определяется опытным путем.
5. Удалите красящий раствор.
6. Промойте клетки добавлением свежей теплой культуральной среды и инкубацией при 37°C в течение 5 минут. Повторите эту промывку два раза.
7. Клетки можно визуализировать непосредственно в культуральной среде.

5. Фиксация живых клеток после окрашивания

- Клетки, окрашенные карбоцианиновыми красителями, рекомендуется фиксировать 2–4% параформальдегидом (ПФА).
- Фиксация метанолом, ацетоном или другими органическими растворителями экстрагирует липиды, что приводит к плохому окрашиванию клеток.
- Глутаральдегид не рекомендуется для фиксации клеток, поскольку даже низкие его концентрации (0,5%) могут усиливать аутофлуоресценцию и влиять на интерпретацию результатов последующего иммуноцитохимического анализа.

6. Окрашивание фиксированных клеток

1. Фиксируйте клетки ПФА.
2. Промойте клетки несколько раз PBS.
3. Замените буфер рабочим красящим раствором, приготовленным на PBS.
4. Инкубируйте 10 минут или дольше при комнатной температуре в темноте. Оптимальное время инкубации для получения равномерного мечения варьирует в зависимости от типа клеток и качества фиксации и определяется опытным путем.
5. Промойте клетки 3 раза PBS.
6. Визуализируйте клетки в PBS. Не используйте монтирующие среды, поскольку их компоненты могут вымывать краситель из мембран.

7. Комбинирование с иммуноцитохимическим окрашиванием

- Поскольку окрашивание липофильными красителями чувствительно к обработкам детергентами, рекомендуется сначала осуществить фиксацию, пермеабиллизацию и иммуноцитохимические процедуры, а затем – окрашивание липофильными красителями.
- Рекомендуется пермеабиллизировать клетки 0.1% Triton® X-100 в PBS в течение 10 минут при комнатной температуре. Данный метод лучше сохраняет окрашивание плазматической мембраны, чем пермеабиллизация дигитонином или сапонином.
- Не рекомендуется использовать детергенты в буферах для блокировки, разведения антител или отмывок.
- Если для иммуноцитохимии использование детергентов неизбежно, вместо обычных липофильных красителей лучше использовать хлорметилловое производное CM-Dil, которое при фиксации альдегидами ковалентно связывается с тиолсодержащими пептидами и белками, обеспечивая мечение, устойчивое к обработкам детергентами и органическими растворителями.

8. Заключение образцов для визуализации

- Не используйте монтирующую среду для заключения клеток, окрашенных карбоцианиновыми красителями. Глицерин или органические растворители в монтирующих средах вымывают их из мембран, приводя со временем к высокому фону и усилению внутриклеточного окрашивания.
- Для заключения клеток используйте PBS или другой водный буфер. Покровные стекла следует герметизировать с помощью герметика или лаком для ногтей. Окрашенные образцы могут храниться в PBS при 4°C в течение нескольких недель.
- Если требуется заключение клеток в специализированные среды или оптические просветлители, используйте CM-Dil с последующей фиксацией вместо обычных карбоцианиновых красителей.

9. Детекция

Микроскопия:

Выбор фильтровых наборов для DiD, DiO, Dil и DiR (и их производных) осуществляется в соответствии со спектральными свойствами красителей:

Краситель	Макс. возбуждения, нм	Макс. эмиссии, нм	Цвет канала
DiO	487	501	Зеленый
Neuro-DiO	497	514	Зеленый
RAPID DiO	487	501	Зеленый
DiA	492	607	Желто-зеленый
Dil	551	566	Оранжево-красный
RAPID Dil	551	565	Оранжево-красный
CM-Dil	556	571	Оранжево-красный
DiD	647	666	Дальне-красный
DiR	750	775	Ближний инфракрасный

Для одновременного обнаружения нескольких красителей доступны многополосные фильтровые наборы:

- Dil и DiO: Omega XF52, Chroma 51004
- Dil и DiD: Omega XF92, Chroma 51007
- Dil, DiO и DiD: Omega XF93, Chroma 61005

Проточная цитометрия:

Клетки, меченные DiO, Dil и DiD (и их производными), могут быть проанализированы с использованием стандартных каналов детекции проточного цитометра FL1, FL2 и FL3 соответственно.