

Окрашивание клеточных мембран красителями MemBlaze®

MemBlaze® — новое поколение липофильных флуорогенных зондов, разработанных для избирательного окрашивания плазматических мембран живых и фиксированных клеток. В водной среде они формируют самотушащиеся нефлуоресцентные наночастицы. При встраивании в липидный бислой мембраны эти агрегаты разрушаются, позволяя зонду начать ярко светиться (т. н. флуорогенный «turn-on» эффект).

Благодаря низкой проницаемости через мембрану MemBlaze® остаются локализованными в плазматической мембране и не накапливаются в цитоплазме, обеспечивая четкую и стабильную визуализацию клеточной морфологии.

Красители MemBlaze® обеспечивают яркую и контрастную визуализацию границ клеток, отличаются высокой фотостабильностью и интенсивной флуоресценцией. Они нетоксичны для клеток в концентрациях до 1 мкМ. Все это делает их идеальными маркерами для длительной прижизненной визуализации и экспериментов с тайм-лапс съемкой.

Прежде чем начать

- Все инкубации с MemBlaze® следует проводить в темноте или при минимальном освещении.
- Красители обладают высокой гидрофобностью, поэтому рабочие растворы лучше готовить в стеклянных пробирках. Ни в коем случае не используйте пробирки с гидрофобным покрытием!
- Наличие сыворотки в среде снижает эффективность окрашивания. По возможности используйте бессывороточные среды. Если удаление сыворотки невозможно, увеличьте концентрацию зонда.
- Двухвалентные катионы (Ca^{2+} , Mg^{2+}) могут способствовать осаждению красителя, поэтому рекомендуется использовать буферы без их содержания.
- Разбавленный в водной среде рабочий раствор необходимо использовать сразу после приготовления.
- Красители подходят для окрашивания клеток, фиксированных 4% параформальдегидом (ПФА), однако максимальная интенсивность сигнала достигается при окрашивании живых клеток и их последующей фиксации.
- Метанол, ацетон и другие органические растворители экстрагируют липиды и поэтому снижают эффективность окрашивания мембран.
- ПФА частично пермеабиллизует мембрану, поэтому при окрашивании фиксированных клеток можно наблюдать некоторую интернализацию зонда.
- Длительная инкубация живых клеток с зондом, либо выращивание клеток после окрашивания будет сопровождаться интернализацией красителя за счет нормального клеточного метаболизма.
- Для краткосрочного имиджинга (до 90 минут) предпочтительнее использовать MemBlaze® 488 и MemBlaze® 560. Для более длительного (несколько часов) имиджинга версии с дополнительными бензольными кольцами — использовать MemBlaze® 560 и MemBlaze® 640 предпочтительнее, поскольку дольше сохраняются в мембране.

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

1. Приготовление стоковых растворов

20 мкМ MemBlaze® (для клеточных культур):

1. Добавьте 100 мкл [DMSO](#) в пробирку с **2 нмоль** лиофилизированного красителя.
Добавьте 500 мкл [DMSO](#) в пробирку с **10 нмоль** лиофилизированного красителя.
2. Перемешайте на вортексе в течение 1 минуты.
3. Неиспользованный раствор можно разделить на аликвоты и хранить при -20°C до 3 месяцев. Перед открытием замороженной пробирки дайте ей согреться до комнатной температуры. Избегайте повторных циклов заморозки/разморозки

200 мкМ MemBlaze® (для тканей или небольших организмов):

1. Добавьте 10 мкл [DMSO](#) в пробирку с **2 нмоль** лиофилизированного красителя.
Добавьте 50 мкл [DMSO](#) в пробирку с **10 нмоль** лиофилизированного красителя.
2. Перемешайте на вортексе в течение 1 минуты.
3. Неиспользованный раствор можно разделить на аликвоты и хранить при -20°C до 3 месяцев. Перед открытием замороженной пробирки дайте ей согреться до комнатной температуры. Избегайте повторных циклов заморозки/разморозки

1% Tween® 20

1. Добавьте 5 мкл Tween® 20 к 495 мкл деионизированной воды.
2. Открутите на вортексе в течение 1 минуты.

2. Приготовление рабочих растворов

Важно! Используйте только пробирки **без** гидрофобного покрытия, либо стеклянные пробирки. Рабочие растворы необходимо использовать сразу после приготовления.

Ниже приведены рекомендуемые концентрации рабочих растворов для разных применений. Точные концентрации зависят от типа клеток/ткани и дизайна эксперимента и должны подбираться опытным путем.

Тип образца	Эпифлуоресцентная микроскопия	Конфокальная микроскопия
Живые клетки	100 нМ	20 нМ
Фиксированные клетки	100 нМ	20 нМ
Ткань или небольшие организмы	2 мкМ	2 мкМ

Буфер для окрашивания

1. Рабочий раствор красителя готовится на бессывороточной среде, HBSS или PBS, содержащих 0,005% Tween® 20.
2. Для приготовления 1 мл буфера для окрашивания добавьте 5 мкл 1% Tween® 20 к 995 мкл среды, HBSS или PBS.
3. Перемешайте на вортексе.

20 нМ рабочий раствор

1. Для приготовления 1 мл рабочего раствора к 999 мкл буфера для окрашивания добавьте 1 мкл 20 мкМ MemBlaze®.
2. Тщательно перемешайте и сразу же используйте.

100 нМ рабочий раствор

1. Для приготовления 1 мл рабочего раствора к 995 мкл буфера для окрашивания добавьте 5 мкл 20 мкМ MemBlaze®.
2. Тщательно перемешайте и сразу же используйте.

2 мкМ рабочий раствор

1. Для приготовления 1 мл рабочего раствора к 980 мкл буфера для окрашивания добавьте 20 мкл 200 мкМ MemBlaze®.
2. Тщательно перемешайте и сразу же используйте.

3. Окрашивание живых клеток в суспензии

1. Центрифугируйте клетки при 1000–1500 об/мин в течение 5 минут.
2. Удалите супернатант и аккуратно ресуспендируйте клетки в предварительно подогретом (37°C) буфере для окрашивания.
3. Повторите центрифугирование и промывку два раза.
4. Суспендируйте клетки в плотности 1×10^6 /мл в **20 нМ** рабочем растворе красителя.
5. Инкубируйте 10 минут при комнатной температуре (инкубация при 37°C ускоряет эндоцитоз зонда).
6. Клетки можно визуализировать без предварительных отмывок.

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

4. Окрашивание живых адгезированных клеток

1. Вырастите клетки на покровных стеклах или в камере для визуализации.
2. Удалите культуральную среду.
3. Промойте клетки 3 раза предварительно подогретым (37°C) буфером для окрашивания.
4. Замените буфер **20 нМ** рабочим раствором красителя. Используйте объем, достаточный, чтобы полностью покрыть клетки.
5. Инкубируйте 10 минут при комнатной температуре (инкубация при 37°C ускоряет эндоцитоз зонда).
6. Клетки можно визуализировать без предварительных отмывок.

5. Фиксация живых клеток после окрашивания

- Наилучшие результаты достигаются при окрашивании живых клеток **ДО** фиксации.
- Клетки, окрашенные красителями MemBlaze®, рекомендуется фиксировать 2–4% ПФА.
- Фиксация метанолом, ацетоном или другими органическими растворителями экстрагирует липиды, приводя 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 **100 нМ** рабочим раствором.
4. Инкубируйте 10 минут при комнатной температуре в темноте.
5. Промойте клетки 3 раза PBS.
6. Визуализируйте клетки в PBS. Клетки можно заключать в монтирующие среды с незначительной потерей (около 10%) интенсивности сигнала.

7. Окрашивание свежей ткани

1. Свежевыделенную ткань промойте в PBS при 4°C.
2. Нарезьте на срезы толщиной 1 мм.
3. Поместите срезы в **2–5 мкМ** рабочий раствор MemBlaze®. Инкубируйте от 1 до 24 часов при 4°C (или 3 часа при комнатной температуре).

4. Промойте срезы PBS 3 раза при комнатной температуре.
5. Визуализируйте срезы в PBS. Клетки можно заключать в монтирующие среды с незначительной потерей (около 10%) интенсивности сигнала.

Важно! При окрашивании ткани мозга красителями MemBlaze® (особенно 560, 640) интенсивность сигнала в нейронах значительно ярче, чем в глиальных клетках. Это необходимо учитывать при планировании экспериментов.

8. Комбинирование с иммуоцитохимическим окрашиванием

1. Произведите окрашивание клеток красителем MemBlaze®.
2. Фиксируйте клетки 4% ПФА.
3. Пермеабелизируйте 0,1% Triton® X-100 в PBS в течение 5 минут при комнатной температуре. Данный метод лучше сохраняет окрашивание плазматической мембраны, чем пермеабелизация дигитонином или сапонином. Использовать более высокие концентрации Triton® X-100 не рекомендуется.
4. Выполните стандартный иммуоцитохимический протокол.
5. При необходимости заключите клетки с помощью монтирующей среды.

9. Детекция

Микроскопия:

Препараты, окрашенные MemBlaze® 488, 560 и 640 могут быть детектированы с помощью флуоресцентного микроскопа с использованием стандартного набора фильтров (FITC, TRITC, Cy5, соответственно). Для конфокальной и двухфотонной микроскопии подбор фильтров осуществляется опираясь на спектральные свойства красителей:

Краситель	Макс.возбуждения, нм	Макс.эмиссии, нм	Цвет канала
MemBlaze® 488	498	506	Зеленый
MemBlaze® 560	553	567	Оранжево-красный
MemBlaze® 640	648	669	Дальне-красный
MemBlaze® 700	684	710	Ближний инфракрасный

Проточная цитометрия:

Клетки, меченные MemBlaze® 488, 560 и 640, могут быть проанализированы с использованием стандартных каналов детекции проточного цитометра FL1, FL2 и FL3 соответственно.

Источники:

[1] Bioconjugate Chem. 2019, 30, 1, 192–199. [2] Cell Chem. Biol. 2019, 26, 4, 600–614.