

Мечение и долгосрочное отслеживание живых клеток с помощью красителей CytoTracer®

Красители CytoTracer® представляют собой проникающие в живые клетки флуоресцентные зонды, предназначенные для мечения и долгосрочного отслеживания живых клеток. После проникновения через плазматическую мембрану они превращаются в непроникающие сквозь мембраны тиолреактивные соединения, которые ковалентно связываются с внутриклеточными белками. Благодаря этому данные красители надежно удерживаются внутри клеток, передаются их потомкам при делении, но не переносятся в соседние клетки. При рекомендуемых рабочих концентрациях красители практически не оказывают цитотоксического действия в течение как минимум 72 часов.

Красители CytoTracer® различаются спектральными характеристиками. CMFDA и CMRA становятся флуоресцентными после гидролиза внутриклеточными эстеразами, тогда как CMAC, CMHC, BMQC, CM-BDP® и CMTPX обладают собственной флуоресценцией.

Перед началом работы

- Не используйте буферы, содержащие амины (например, Tris, глицин) или тиолы (например, β -меркаптоэтанол, DTT), поскольку они снижают эффективность мечения.
- Оптимальная рабочая концентрация зависит от типа клеток и продолжительности эксперимента:
 - 5–25 мкМ — для долгосрочных экспериментов (>3 суток) и быстро делящихся клеток;
 - 0,5–5 мкМ — для кратковременных экспериментов.
- Используйте минимальную эффективную концентрацию красителя.
- При длительных экспериментах (>72 часов) интенсивность флуоресценции постепенно снижается вследствие деления клеток. При необходимости выполните повторное окрашивание.
- Красители совместимы с фиксацией 4% параформальдегидом (PFA), но не подходят для фиксации метанолом или ацетоном, которые вызывают вымывание красителя. После фиксации клетки можно пермеабиллизовать мягкими детергентами для последующего иммуноокрашивания. Интенсивность флуоресценции может уменьшиться примерно на 20–30%.
- При работе с фиксированными образцами рекомендуется использовать antifade-закрывающие среды. Во время визуализации живых клеток используйте минимальную интенсивность возбуждения и время экспозиции для снижения фототоксичности и фотообесцвечивания.

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

Приготовление стоковых растворов

1. Перед вскрытием доведите флакон с красителем до комнатной температуры.
2. Растворите содержимое флакона в безводном ДМСО до концентрации 10 мМ.

Приготовление рабочих растворов

1. Разведите стоковый раствор в бессывороточной культуральной среде до конечной концентрации 1–10 мкМ (или другой, подобранной экспериментально).
2. Перед использованием прогрейте рабочий раствор до 37°C.

Важно! Во время окрашивания используйте только бессывороточную среду, поскольку белки сыворотки связывают краситель и уменьшают его проникновение в клетки. После завершения окрашивания клетки можно перевести в полную культуральную среду.

Окрашивание суспензионных клеток

1. Осадите клетки центрифугированием (5 минут при $200\text{--}300 \times g$) и удалите супернатант.
2. Ресуспандируйте клетки в предварительно прогретом рабочем растворе CytoTracer® в концентрации $1\text{--}5 \times 10^6$ клеток/мл.
3. Инкубируйте клетки 15–45 минут при 37°C и 5% CO₂. В большинстве случаев рекомендуется начинать с 30 минут.
4. Осадите клетки центрифугированием и удалите раствор красителя.
5. При необходимости однократно промойте клетки полной культуральной средой.
6. Ресуспандируйте клетки в свежей полной среде и перенесите в культуральные сосуды или на предметные стекла.
7. Выполните визуализацию с использованием соответствующего набора фильтров.

Окрашивание адгезионных клеток

1. Вырастите клетки на покровных стеклах или в культуральной посуде.
2. Замените культуральную среду предварительно прогретым рабочим раствором CytoTracer® (объем должен полностью покрывать покровные стекла).
3. Инкубируйте клетки 15–45 минут при 37°C.
4. Удалите раствор красителя и дважды промойте клетки свежей культуральной средой.
5. Добавьте полную культуральную среду и инкубируйте клетки не менее 30 минут. Для красителей CMFDA и CMRA этот этап необходим для завершения гидролиза эстеразами и образования флуоресцентного продукта.
6. После этого клетки готовы к микроскопии или дальнейшему культивированию.

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

Спектральные характеристики

Кат. №	Краситель	λ_{Ex} , нм	λ_{Em} , нм	Канал
4682-х	CMAC	345	465	Синий
4699-х	CM-BDP®	514	542	Зеленый
4276-х	CMTMR	540	565	Оранжевый

Проблемы и их устранение

Проблема	Возможная причина	Решение
Слабая или отсутствующая флуоресценция	Недостаточное накопление красителя; неполный гидролиз эстеразами (для CMFDA/CMRA)	Увеличьте концентрацию красителя или время инкубации; убедитесь, что инкубация проходит при 37°C; выдержите не менее 30 минут после окрашивания перед визуализацией.
Высокий фон или внеклеточное окрашивание	Недостаточная промывка; образование агрегатов красителя	После окрашивания выполните промывку средой с сывороткой; используйте свежеприготовленный рабочий раствор.
Цитотоксичность или изменение морфологии клеток	Слишком высокая концентрация красителя	Подберите меньшую концентрацию; используйте минимальную эффективную концентрацию; оцените жизнеспособность клеток (например, с помощью трипанового синего).
Краситель плохо сохраняется при делении клеток	Клетки делятся слишком быстро, краситель разбавляется	Используйте более высокую концентрацию (до 25 мкМ) для быстро делящихся клеток; при необходимости выполните повторное окрашивание.

Хранение

- **Лиофилизированный порошок:** хранить при температуре не выше -20°C в сухом месте, защищенном от света. Срок хранения — 1 год.
- **Стоковые растворы в ДМСО:** после растворения хранить при -20°C в одноразовых аликвотах. Избегать повторных циклов замораживания и размораживания. При отсутствии влаги стабильны более 6 месяцев.
- **Рабочие растворы:** готовить непосредственно в день использования в бессывороточной культуральной среде.