

Мониторинг жирных кислот в живых клетках с использованием флуоресцентных аналогов жирных кислот BDP® C12

BDP® FL C12 и BDP® 558/568 C12 — флуоресцентные аналоги лауриновой кислоты, предназначенные для изучения липидного метаболизма в живых клетках.

После проникновения в клетки BDP® C12 зонды метаболизируются аналогично природным длинноцепочечным жирным кислотам и включаются в различные классы липидов, включая триглицериды, фосфолипиды и эфиры холестерина. Вначале они локализуются в пероксисомах (в течение 5–10 минут), а затем накапливаются в липидных тельцах (примерно через 15 минут).

Зонды BDP® C12 могут использоваться для визуализации поглощения, внутриклеточного транспорта и накопления жирных кислот в живых клетках методом флуоресцентной микроскопии^[1–3]. После фиксации клеток они сохраняются в клеточных органеллах, что позволяет сочетать их использование с иммунофлуоресцентным окрашиванием.

Перед началом работы

- Данный протокол является общим руководством. Оптимальные условия (например, концентрация зонда, время инкубации и плотность клеток) следует подбирать экспериментально в зависимости от используемого типа клеток и условий эксперимента.
- Локализация зонда в клеточных структурах (пероксисомах, липидных тельцах и др.) зависит от времени инкубации и концентрации зонда, которые необходимо определять экспериментально.
- При окрашивании пероксисом оптимальное время инкубации составляет 10 минут. Более длительная инкубация (30 минут и более) может приводить к перераспределению красителя на другие клеточные мембраны (например, липидные капли)^[2].
- Для исследования транспорта жирных кислот клетки можно инкубировать с красителями BDP® C12 в течение нескольких часов (16 часов и более)^[4].
- Для более специфичного окрашивания пероксисом используйте низкие концентрации красителей BDP® C12 (1 мкМ). Более высокие концентрации приводят к насыщению способности пероксисом связывать краситель, вследствие чего он начинает окрашивать другие клеточные мембраны^[2].
- Показано, что красители BDP® C12 окрашивают пероксисомы животных клеток, однако не подходят для работы с растительными клетками (в частности, не окрашивают пероксисомы *Arabidopsis thaliana*)^[2].
- Для окрашивания липидных капель используйте более высокие концентрации красителей BDP® C12 (до 5 мкМ)^[5] либо увеличьте время инкубации более чем 10 минут. Следует учитывать, что высокие концентрации зондов вызывают увеличение фоновой флуоресценции без улучшения специфического сигнала.
- Флуоресцентные красители подвержены фотообесцвечиванию. Для минимизации потери флуоресценции ограничьте воздействие света на всех этапах окрашивания, промывки и получения изображений.

Приготовление растворов

Стоковый раствор

- Приготовьте стоковый раствор концентрацией 1–10 мМ, растворив BDP® C12 в безводном ДМСО. Для расчета необходимого количества красителя и растворителя воспользуйтесь нашим [интерактивным калькулятором](#).
- Разделите раствор на аликвоты и храните при -20°C или -80°C в защищенном от света месте. Избегайте повторных циклов замораживания и размораживания.

Рабочий раствор

- Непосредственно перед использованием разведите исходный раствор подходящим буфером (например, PBS) или культуральной средой до конечной концентрации 1–2 мкМ.
- Оптимальная рабочая концентрация может потребовать корректировки в зависимости от используемой клеточной линии, исследуемой клеточной структуры и требований эксперимента.

Важно! Рабочий раствор необходимо готовить непосредственно в день проведения эксперимента. Не замораживайте и не используйте его повторно.

Окрашивание адгезионных клеток

1. Высейте клетки на культуральные чашки со стеклянным дном диаметром 14 мм и культивируйте до достижения 70–80% конфлюэнтности.
2. Аккуратно промойте клетки дважды предварительно подогретым PBS. Этот этап можно пропустить, если рабочий раствор готовится непосредственно в культуральной среде.
3. Добавьте 100 мкл рабочего раствора 1–2 мкМ на каждое стекло и инкубируйте 10–20 минут или несколько часов при 37°C.
4. Удалите раствор красителя и дважды промойте клетки теплым PBS или культуральной средой.
5. Добавьте свежий PBS и проведите флуоресцентную микроскопию или анализ методом проточной цитометрии.

Окрашивание суспензионных клеток

1. Соберите 1×10^6 клеток и дважды промойте их предварительно подогретым PBS.
2. Ресуспандируйте клеточный осадок в 1 мл рабочего раствора 1–2 мкМ. Инкубируйте 10–20 минут или несколько часов при 37°C, защищая образцы от света.
3. После инкубации дважды промойте клетки PBS, центрифугируя при $1000 \times g$ в течение 3 минут.
4. Ресуспандируйте клеточный осадок в PBS для последующей флуоресцентной микроскопии или анализа методом проточной цитометрии.

Ссылки

[1] PLOS ONE. 2016, 11, 4, e0153522; [2] Nat. Commun. 2024, 15, 1, 4314; [3] Curr. Protoc. 2022, 2, 12, e626; [4] Dev. Cell. 2015, 32, 6, 678–692; [5] STAR Protoc. 2024, 5, 3, 103236.

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