

Визуализация внутриклеточного кальция с помощью красителей Fluo-4 AM и FluorCa-8 AM

Fluo-4 AM и FluorCa-8 AM — флуоресцентные индикаторы кальция в форме ацетоксиметилловых (AM) эфиров, способные проникать сквозь клеточные мембраны. После проникновения в живые клетки AM-группы расщепляются внутриклеточными эстеразами, в результате чего образуются флуоресцентные красители, непроникающие сквозь мембраны и удерживающиеся в цитоплазме. При связывании со свободными внутриклеточными ионами Ca^{2+} их зеленая флуоресценция значительно усиливается. Это позволяет в режиме реального времени отслеживать изменения концентрации внутриклеточного кальция с помощью флуоресцентной микроскопии, проточной цитометрии или планшетных флуоресцентных ридеров.

Перед началом работы

- Оптимальную концентрацию красителя и время инкубации следует определять эмпирически для каждого типа клеток.
- Fluo-4 AM и FluorCa-8 AM не связываются ковалентно с клеточными компонентами и могут активно выводиться из клетки транспортерами органических анионов. Поэтому визуализацию живых клеток необходимо проводить в течение одного или двух часов после загрузки индикатора.
- При необходимости индикаторы можно повторно загрузить в клетки.
- Fluo-4 AM и FluorCa-8 AM также могут быть зафиксированы *in situ* с использованием [EDC/EDAC](#) для последующего иммунофлуоресцентного окрашивания.

Приготовление стокового раствора

- Приготовьте стоковый раствор концентрацией 1–5 мМ, растворив Fluo-4 AM или FluorCa-8 AM в [DMSO для мечения](#).
- Разделите стоковый раствор на аликвоты и храните при -20°C , защищая от света. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания.

Приготовление загрузочного раствора

- Приготовьте рабочий раствор концентрацией 1–20 мкМ в HHBS или другом физиологическом буфере. Оптимальную концентрацию красителя необходимо определять эмпирически для каждого типа клеток. Для большинства клеток млекопитающих конечная концентрация красителя 1–5 мкМ позволяет получать оптимальные загрузку и интенсивность сигнала. Используйте минимальную концентрацию красителя, обеспечивающую флуоресценцию с достаточным отношением сигнал/шум.
- Во время загрузки используйте среду без сыворотки: сыворотка содержит эстеразы, которые могут гидролизовать AM-эфир до проникновения красителя в клетки.
- Для улучшения растворимости красителя и загрузки в клетки рекомендуется добавление 0,02% [Pluronic F-127](#) в загрузочный раствор.

- Если утечка красителя является проблемой, добавьте в буфер для загрузки ингибиторы транспорта органических анионов Probenecid (0,5–1 mM) или Sulfipyrazone (0,1–0,25 mM).

Важно: ингибиторы транспорта органических анионов могут быть токсичными для клеток и изменять функциональные свойства клеток путем ингибирования одних анионных транспортеров и активации других. Стоковые растворы Sulfipyrazone и Probenecid имеют щелочную реакцию; после их добавления необходимо скорректировать pH среды загрузочного раствора.

Загрузка красителя в клетки

1. Высеьте клетки и культивируйте до достижения необходимой конфлюэнтности.
2. Если исследуемые соединения несовместимы с сывороткой, замените культуральную среду на HHBS или другой буфер перед загрузкой красителя.
3. Замените среду/буфер достаточным количеством загрузочного раствора Fluo-4 AM или FluoCa-8 AM. Для адгезионных клеток убедитесь, что раствор красителя полностью покрывает клеточный монослой. Для суспензионных клеток поддерживайте мягкое перемешивание.
4. Инкубируйте клетки при комнатной температуре или при 37°C в течение 15–60 минут в темноте. Некоторые типы клеток дают более сильную флуоресценцию после 2-часовой инкубации. Понижение температуры инкубации уменьшает субклеточную компартментализацию красителя (характерная проблема загрузки AM-эфиров).
5. После загрузки замените раствор красителя свежим HHBS или буфером для визуализации для удаления внеклеточного красителя и завершения дезтерификации.
6. Инкубируйте в течение 30 минут в свежем буфере при 37°C в темноте для обеспечения полного гидролиза AM-эфира.
7. Замените буфер на свежий, содержащий Ca^{2+} (обычно 1–2 mM), либо на буфер без Ca^{2+} (если исследуются условия без Ca^{2+}).
8. (Опционально). При необходимости поддерживайте концентрацию 0,5–1 mM Probenecid или 0,1–0,25 mM Sulfipyrazone в буфере для визуализации на протяжении всего эксперимента для минимизации утечки красителя.

Измерение флуоресценции

1. Используйте флуоресцентный микроскоп или планшетный ридер с возбуждением при 488 нм и регистрацией эмиссии при 520 нм (или стандартный канал FITC). Получите time-lapse последовательности флуоресцентных изображений, используя постоянные параметры съемки.
2. Выделите области интереса (ROI), соответствующие отдельным клеткам, и измерьте среднюю интенсивность флуоресценции для каждой ROI в каждый момент времени.
3. Измерьте интенсивность флуоресценции в области изображения, не содержащей клеток, и вычитите этот фоновый сигнал из соответствующих значений клеточной флуоресценции.
4. Определите базовую флуоресценцию (F_0), усреднив интенсивность флуоресценции каждой клетки в период до стимуляции.

5. Рассчитайте относительное изменение флуоресценции для каждой временной точки с использованием следующего уравнения:

$$\Delta F / F_0 = \frac{F - F_0}{F_0}$$

где F — скорректированная на фон интенсивность флуоресценции в каждый момент времени, а F_0 — средняя базовая флуоресценция до стимуляции.

6. Постройте график $\Delta F / F_0$ как функцию времени для визуализации динамики внутриклеточного Ca^{2+} .

Проблемы и их устранение

Проблема	Решение
Низкая флуоресценция сигнала	• Увеличьте концентрацию красителя • Увеличьте время загрузки • Убедитесь в полном завершении дезтерификации (инкубация после промывки)
Высокий фон/утечка красителя	• Добавьте Probenesid для уменьшения выведения красителя, опосредованного транспортерами органических анионов
Неравномерная загрузка	• Избегайте чрезмерного перемешивания • Убедитесь, что клетки здоровы и равномерно распределены
Деградация AM-эфира	• Всегда готовьте свежий рабочий раствор непосредственно перед использованием • Выполните тест на деградацию, чтобы проверить, не произошел ли частичный гидролиз исходного раствора AM перед загрузкой клеток: 1. Разведите небольшое количество стокового раствора до концентрации 1 мкМ в буфере без Ca^{2+} 2. Измерьте флуоресценцию ($E_x \sim 490$ нм, $E_m \sim 515$ нм) — сигнал должен быть очень низким 3. Добавьте насыщающую концентрацию Ca^{2+} (например, ≥ 5 мкМ для Fluo-4 AM) и измерьте снова 4. Если после добавления Ca^{2+} флуоресценция резко увеличивается, AM-эфир уже частично гидролизован, и стоковый раствор следует утилизировать