Lumiprobe
Life science solutions

Измерение внутриклеточного pH с помощью pHiona Red AM

pHiona Red AM — проникающий в клетки флуоресцентный индикатор для измерения внутриклеточного pH (pHi) в живых клетках. Ацетоксиметильная (AM) эфирная форма легко проходит через интактные клеточные мембраны. Внутри клетки внутриклеточные эстеразы гидролизуют AM-группы, превращая зонд в заряженную форму, которая не проходит через клеточную мембрану и удерживается внутри клетки.

Флуоресценция pHiona Red зависит от pH и усиливается при закислении внутриклеточной среды. Это позволяет использовать зонд для мониторинга относительных изменений внутриклеточного pH. Абсолютные значения pHi можно определить по калибровочной кривой, полученной с использованием буферов с известным pH в сочетании с ионофорами нигерицином и валиномицином, которые обеспечивают уравновешивание внутриклеточного pH с pH калибровочного буфера.

Протокол может быть адаптирован для флуоресцентной микроскопии, проточной цитометрии, высокопроизводительного клеточного имиджинга и измерений на флуоресцентном микропланшетном ридере.

Перед началом работы

- pHiona Red AM предназначен для измерений в живых клетках.
- AM-эфиры чувствительны к влаге. По возможности используйте стоковые растворы в DMSO в сухих условиях.
- Защищайте краситель и рабочие растворы от света.
- Эффективность загрузки красителя может различаться между типами клеток. При необходимости оптимизируйте концентрацию и время инкубации.
- Во время измерений избегайте фосфатных буферов и бикарбонатных/CO_2-зависимых растворов, поскольку изменения внеклеточного pH могут влиять на воспроизводимость эксперимента. Для измерений вне CO_2-инкубатора предпочтительно использовать физиологический раствор, забуференный HEPES.
- Для количественных измерений калибровку следует проводить при той же температуре, с теми же оптическими настройками, типом клеток и экспериментальными условиями, что и измерение образцов.
- Нигерицин и валиномицин используются только для калибровки и не должны добавляться к экспериментальным образцам при измерении физиологических изменений внутриклеточного pH.

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

Материалы

Для измерения внутриклеточного pH

- pHiona Red AM
- Безводный DMSO
- Физиологический раствор, забуференный HEPES (pH 7,4), подходящий для работы с живыми клетками
- Полная культуральная среда
- Культивируемые клетки
- Подходящий флуоресцентный микроскоп, проточный цитометр или микропланшетный ридер

Для калибровки внутриклеточного pH

- Нигерицин
- Валиномицин
- Калибровочные буферы с известным pH, например:
  - pH 4,5
  - pH 5,5
  - pH 6,5
  - pH 7,5
- Безводный DMSO

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

Lumiprobe
Life science solutions

Окрашивание клеток с помощью pHiona Red AM

Приготовление рабочего раствора pHiona Red AM

1. Непосредственно перед окрашиванием разведите 5 mM стоковый раствор pHiona Red AM 1:1000 в физиологическом растворе, забуференном HEPES (pH 7,4) чтобы получить рабочий раствор с концентрацией 5 мкМ.
2. Готовьте только необходимое для эксперимента количество рабочего раствора и защищайте его от света.

Примечание: концентрация 5 мкМ рекомендуется в качестве исходной. Оптимальная концентрация красителя может зависеть от типа и плотности клеток, а также метода детекции и должна быть определена экспериментально.

Окрашивание клеток

1. Культивируйте клетки в подходящих экспериментальных условиях.
2. Удалите культуральную среду.
3. Однократно промойте клетки физиологическим раствором, забуференным HEPES, pH 7,4.
4. Добавьте достаточный объем 5 мкМ рабочего раствора pHiona Red AM, чтобы полностью покрыть клетки.
5. Инкубируйте 30 мин при 37°C, защищая от света.
6. Удалите раствор красителя.
7. Промойте клетки физиологическим раствором, забуференным HEPES, pH 7,4.
8. Добавьте свежий физиологический раствор, забуференный HEPES, и сразу приступайте к измерению флуоресценции.
9. При измерении динамических изменений внутриклеточного pH поддерживайте постоянную температуру и одинаковые условия регистрации в течение всего эксперимента.

Детекция флуоресценции

- Измеряйте флуоресценцию pHiona Red, используя настройки прибора, соответствующие спектрам возбуждения и эмиссии красителя.
- При сравнении образцов поддерживайте постоянными интенсивность возбуждения, время экспозиции, усиление детектора и другие параметры регистрации.
- Увеличение интенсивности флуоресценции соответствует снижению внутриклеточного pH, а уменьшение флуоресценции — повышению pH.
- Если требуется только сравнение относительных изменений внутриклеточного pH, калибровка не обязательна. Результаты можно выражать как относительную интенсивность флуоресценции или нормализованное изменение флуоресценции.

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

Lumiprobe
Life science solutions

Количественное определение внутриклеточного pH

Для определения абсолютных значений внутриклеточного pH постройте калибровочную кривую с использованием клеток, загруженных pHiona Red AM.

Приготовление стокового раствора ионофоров

1. Приготовьте отдельно 20 мМ стоковые растворы нигерицина и валиномицина в DMSO.
2. Смешайте равные объемы двух стоковых растворов. Полученная смесь будет содержать:
   - 10 мМ нигерицина
   - 10 мМ валиномицина
3. Разделите раствор на аликвоты и храните замороженным. Избегайте повторных циклов замораживания–размораживания.

Приготовление калибровочных растворов

1. Для каждого значения pH разведите смешанный стоковый раствор нигерицина/валиномицина 1:1000 в соответствующем калибровочном буфере.
2. Конечные концентрации должны составлять:
   - 10 мкМ нигерицина
   - 10 мкМ валиномицина
3. Приготовьте не менее трех калибровочных растворов, охватывающих ожидаемый диапазон внутриклеточного pH. Для более широкой калибровочной кривой можно использовать четыре точки: приблизительно pH 4,5; 5,5; 6,5 и 7,5.

Калибровка внутриклеточного pH

1. Загрузите клетки pHiona Red AM, как описано выше.
2. После окрашивания дважды промойте клетки физиологическим раствором, забуференным HEPES.
3. Замените раствор одним из калибровочных буферов, содержащим 10 мкМ нигерицина и 10 мкМ валиномицина.
4. Инкубируйте клетки не менее 5 мин при 37°C для уравновешивания внутриклеточного pH с pH калибровочного буфера.
5. Измерьте флуоресценцию, используя точно те же параметры регистрации, что и для экспериментальных образцов.
6. Повторите измерение с остальными калибровочными буферами.
7. Постройте график зависимости интенсивности флуоресценции от pH соответствующего калибровочного буфера.
8. Используйте полученную калибровочную кривую для пересчета интенсивности флуоресценции экспериментальных образцов в значения внутриклеточного pH.

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