Färbung lebender Zellen mit endoplasmatischem Retikulum-selektiven Farbstoffen LumiTracker ER Green und LumiTracker ER Red

LumiTracker ER Green und LumiTracker ER Red sind zellpermeable, hochselektive Farbstoffe für das endoplasmatische Retikulum (ER), die für die Bildgebung lebender Zellen verwendet werden können. Beide ER-Farbstoffe sind Derivate von BDP-Farbstoffen, gekoppelt mit Glibenclamid (Glyburide). Glibenclamid bindet an die Sulfonylharnstoff (SUR)-Rezeptoren der ATP-sensitiven Kaliumkanäle (K_{ATP}), die auf dem endoplasmatischen Retikulum prominent sind.

Die Färbung bleibt nach Fixierung mit Formaldehyd teilweise erhalten. LumiTracker ER Green und LumiTracker ER Red eignen sich nicht zur Färbung von Zellen nach der Fixierung.

Hinweis: Die pharmakologische Aktivität von Glibenclamid könnte möglicherweise die ER-Funktion beeinflussen. Die variable Expression von Sulfonylharnstoffrezeptoren in einigen spezialisierten Zelltypen kann zu einer Nicht-ER-Markierung führen.

Vorbereitung der Lösungen

1.1 Vorbereitung der Stammlösungen

- Lösen Sie 50 µg LumiTracker ER Green in 64 µL DMSO, um eine Stammlösung von 1 mM zu erhalten.
- Lösen Sie 50 µg LumiTracker ER Red in 55 µL DMSO, um eine Stammlösung von 1 mM zu erhalten.

Hinweis: Stammlösungen bei -20 °C oder -80 °C vor Licht geschützt aufbewahren. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen vermeiden.

1.2 Vorbereitung der Arbeitslösung

Verdünnen Sie die Stammlösung des LumiTracker ER-Farbstoffs in Hank's Balanced Salt Solution mit Calcium und Magnesium (HBSS/Ca/Mg), um die Arbeitslösung zu erhalten. Verwenden Sie eine Konzentration von 100 nM bis 1 µM. Die Verdünnung des LumiTracker ER-Farbstoffs hängt vom Zelltyp und der Dichte ab und sollte experimentell festgelegt werden.

Zellfärbung

2.1 Färbung von Suspensionszellen

1. Zentrifugieren Sie die Zellsuspension bei 1000 *g* für 3-5 Minuten; verwerfen Sie den Überstand.
2. Waschen Sie die Zellen zweimal mit vorgewärmtem HBSS, jeweils 5 Minuten bei 37 °C.
3. Die empfohlene Zelldichte beträgt 1×10^6 Zellen/mL.
4. Fügen Sie dem Röhrchen 1 mL vorgewärmte LumiTracker ER-Arbeitslösung hinzu und inkubieren Sie die Zellen 15-30 Minuten bei 37 °C und 5% CO_2.
5. Zentrifugieren Sie die Zellen bei 400 *g* für 3-4 Minuten bei Raumtemperatur; verwerfen Sie den Überstand.

Lumiprobe Corporation
201 International Circle, Suite 135
Hunt Valley, Maryland 21030
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

6. Waschen Sie die gefärbten Zellen zweimal mit Medium.
7. Resuspendieren Sie die Zellen in serumfreiem Zellkulturmedium oder PBS.
8. nalysieren Sie die Zellen mittels Durchflusszytometrie.
9. Für die Fluoreszenzmikroskopie übertragen Sie einen Tropfen der gefärbten Zellsuspension auf ein Objektträger. Bedecken Sie die Zellen mit einem Deckglas.

2.2 Färbung von Adhärenzzellen

1. Züchten Sie die Zellen auf einem sterilen Deckglas.
2. Adhärenzzellen können direkt auf dem Deckglas gefärbt werden.
3. Aspirieren Sie das Medium vom Deckglas.
4. Spülen Sie die Zellen mit vorgewärmtem HBSS bei 37 °C.
5. Fügen Sie 100 µL vorgewärmte LumiTracker ER-Arbeitslösung hinzu und schütteln Sie sie vorsichtig, um die Zellen vollständig zu bedecken. Inkubieren Sie die Zellen 15-30 Minuten bei 37 °C und 5% CO_2.
6. Waschen Sie die gefärbten Zellen zweimal mit Medium.
7. Für die Durchflusszytometrie müssen die Zellen vor der Färbung resuspendiert werden.
8. Für die Fluoreszenzmikroskopie kehren Sie das Deckglas mit den gefärbten Zellen auf den Objektträger um, um sie zwischen Objektträger und Deckglas zu platzieren.

Zellfixierung

1. Wenn gefärbte Zellen fixiert werden sollen, verwenden Sie eine Inkubation in 4% Formaldehyd für 2 Minuten bei 4 °C.
2. Waschen Sie fixierte Zellen zweimal in PBS, jeweils 5 Minuten.
3. Montieren Sie die Zellen unter einem Deckglas mit einem Montagemedium.

Lumiprobe Corporation
201 International Circle, Suite 135
Hunt Valey, Maryland 21030
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