Färbung des Golgi-Apparats mit BDP-markierten Ceramiden Vorbereitung der Lösungen

Ceramide sind Vorläufer von Sphingolipiden, die aus Sphingosin und einer Fettsäure verbunden durch eine Amidbindung bestehen. BDP-Ceramide sind synthetische fluoreszierende Lipide, Konjugate von BDP-Fluorophoren mit Sphingosin. Innerhalb der Zelle werden BDP-Ceramide in die Membranen des Golgi-Apparats eingebaut, weshalb diese Farbstoffe in der Zellbiologie zur Visualisierung des Golgi-Apparats in lebenden und fixierten Zellen mit Fluoreszenzmikroskopie weit verbreitet sind.

Vorbereitung von Lösungen

1.1 Stammlösungen

BDP FL Ceramid:

- Lösen Sie 50 µg BDP FL Ceramid in 87,2 µL DMSO auf, um eine Stammlösung von 1 mM zu erhalten.
- Lösen Sie 250 µg BDP FL Ceramid in 436 µL DMSO auf, um eine Stammlösung von 1 mM zu erhalten.

BDP TMR Ceramid:

- Lösen Sie 50 µg BDP TMR Ceramid in 73,6 µL DMSO auf, um eine Stammlösung von 1 mM zu erhalten.
- Lösen Sie 250 µg BDP TMR Ceramid in 368 µL DMSO auf, um eine Stammlösung von 1 mM zu erhalten.

BDP TR Ceramid:

- Lösen Sie 50 µg BDP TR Ceramid in 70,8 µL DMSO auf, um eine Stammlösung von 1 mM zu erhalten.
- Lösen Sie 250 µg BDP TR Ceramid in 354 µL DMSO auf, um eine Stammlösung von 1 mM zu erhalten.

Lagern Sie die Stammlösungen bei -20 °C oder -80 °C vor Licht geschützt. Vermeiden Sie wiederholte Gefrier-Tau-Zyklen.

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

1.2 Färbungslösung

1. Messen Sie 10 mL Hanks' gepufferte Kochsalzlösung mit 10 mM HEPES (HBSS/HEPES), pH 7,4, in ein 50 mL Kunststoffröhrchen. Andere serumfreie ausgewogene Kochsalzlösungen, wie z. B. PBS, sind ebenfalls für diesen Zweck geeignet. (Optional) Fügen Sie der Pufferlösung 1 mM Ca2+ und 0,5 mM Mg2+ hinzu, um zu verhindern, dass lebende Zellen sich abrunden und von Glasflächen ablösen.

   (Optional) Fügen Sie 1 mM Ca^{2+} und 0,5 mM Mg^{2+} zur Pufferlösung hinzu, um die Bildung lebender Zellen zu verhindern Aufrunden und vom Glas lösen.

2. Geben Sie 3,4 mg (0,34 mg/mL) entfettetes BSA in das Röhrchen mit Puffer.
3. Fügen Sie 200 µL der 1 mM Ceramid-Stammlösung hinzu, um eine Arbeitslösung von 5 µM Ceramid / 5 µM BSA zu erhalten. Die Verdünnung der Ceramide hängt vom Zelltyp und der Dichte ab und sollte experimentell bestimmt werden.

Die resultierende Ceramid/BSA-Komplexlösung kann in Kunststoffröhrchen bei -20 °C aufbewahrt werden.

Zellfärbung

2.1 Lebende Zellen

1. Zellen auf einem sterilen Deckglas wachsen lassen. Adhärente Zellen können direkt auf dem Deckglas gefärbt werden.
2. Das Medium vom Deckglas absaugen.
3. Zellen mit einem geeigneten Medium (wie HBSS/HEPES) abspülen.
4. Die Zellen 30 Minuten lang bei 4 °C in einer 5 µM Ceramid/BSA-Lösung inkubieren.
5. Die Zellen mehrmals mit dem eiskalten Medium abspülen.
6. Spülen Sie die Zellen viermal 30 Minuten lang bei Raumtemperatur in einer Lösung aus entfettetem BSA (0,34 mg/ml) in HBSS/HEPES.
7. Die Zellen weitere 30 Minuten lang bei 37 °C in frischem Medium inkubieren.
8. Die Zellen in frischem Medium abspülen.
9. *(Optional)* Gefärbte Zellen können für 2 Minuten bei 4 °C in 4% Formaldehyd fixiert werden. Fixierte Zellen zweimal mit PBS waschen.
10. Für die Fluoreszenzmikroskopie das Deckglas mit den gefärbten Zellen umdrehen und zwischen das Objektiv und das Deckglas legen.

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

2.2 Fixierte Zellen

1. Zellen 5 Minuten lang bei 4 °C in 4% Formaldehyd fixieren.
2. Fixierte Zellen zweimal jeweils 5 Minuten lang in PBS waschen.
3. Die Zellen 30 Minuten lang bei 4 °C in einer 5 µM Ceramid/BSA-Lösung in PBS inkubieren.
4. Spülen Sie die Zellen viermal 30 Minuten lang bei Raumtemperatur in einer Lösung aus entfettetem BSA (0,34 mg/ml) in PBS.
5. Die Zellen dreimal in PBS abspülen.
6. Für die Fluoreszenzmikroskopie die Zellen unter einem Deckglas mit einem Montagemedium montieren.

Spektrale Eigenschaften von BDP-markierten Ceramiden

	Absorbtions-maximum*	Emissions-maximum*
BDP FL	503 nm	509 nm**
BDP TMR	542 nm	574 nm
BDP TR	589 nm	616 nm

*Absorptions- und Fluoreszenzemaxima wurden in Methanol bestimmt. Werte in markierten Zellen sind ähnlich.

**BDP FL-markierte Ceramide emittieren auch rote Fluoreszenz (~620 nm) in Zellen.

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