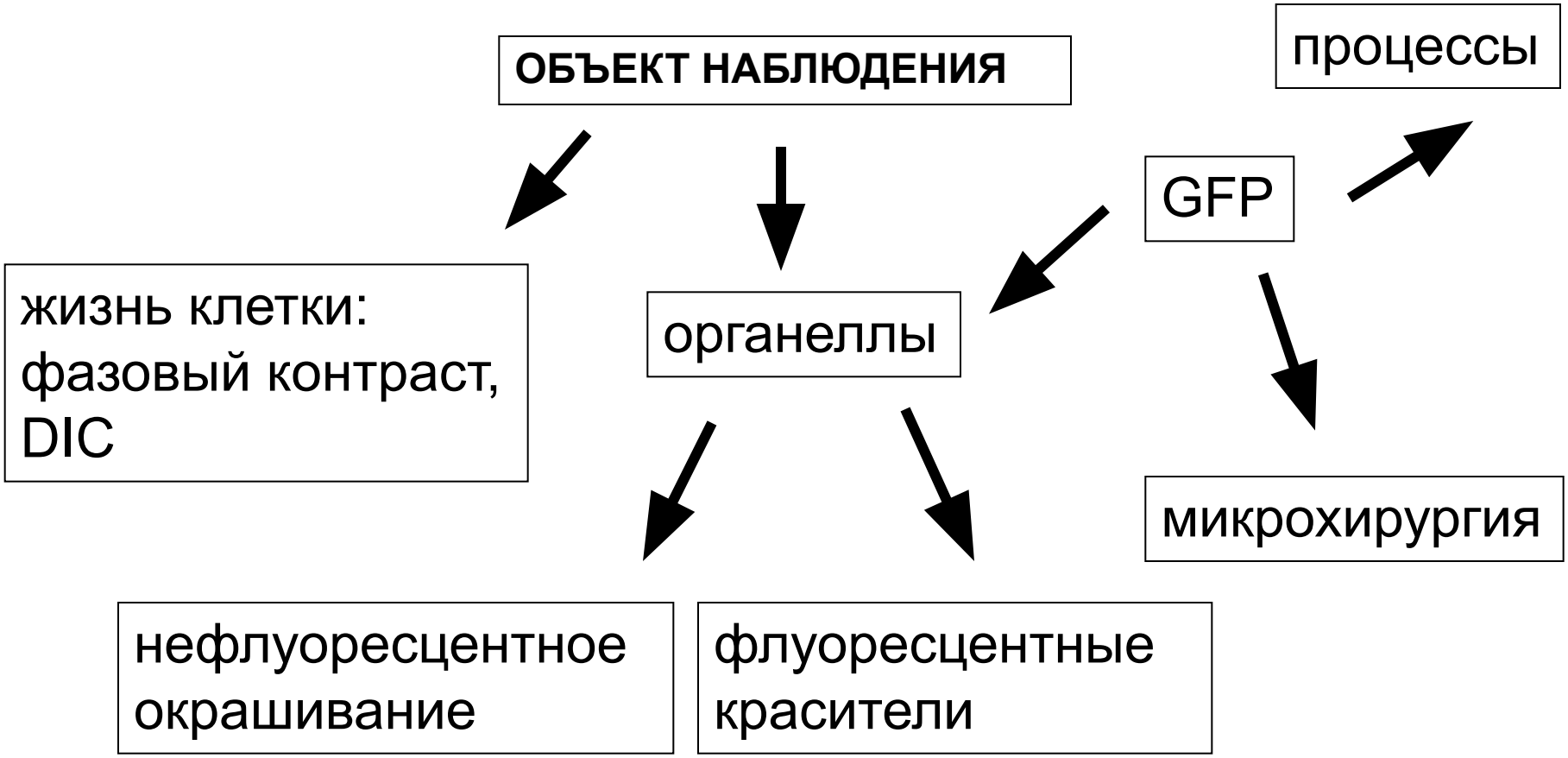
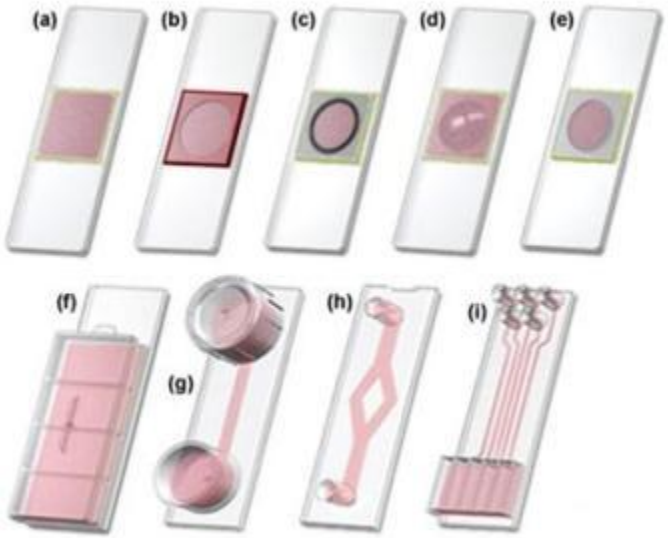
МЕТОДЫ ПРИЖИЗНЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

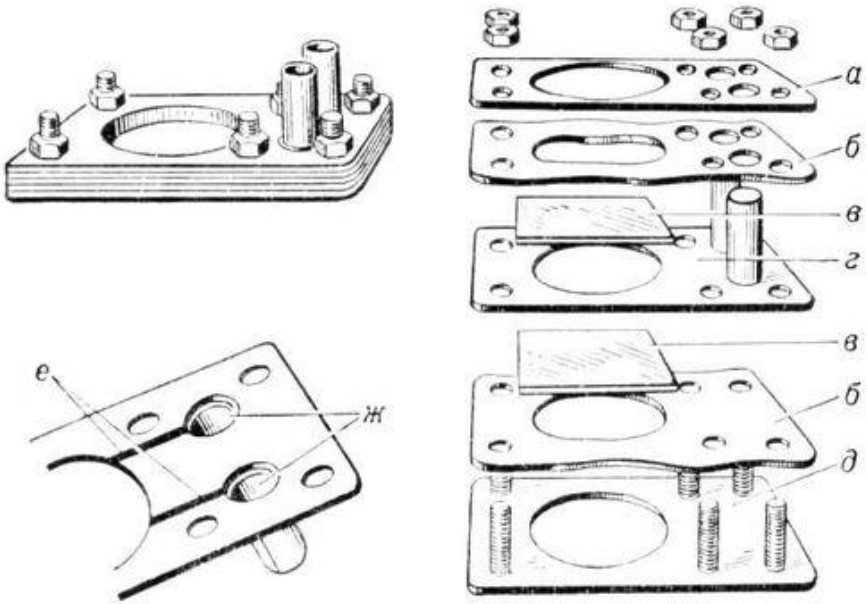

ОБЪЕКТ НАБЛЮДЕНИЯ
процессы
GFP
жизнь клетки:
фазовый контраст,
DIC
органеллы
микрохирургия
нефлуоресцентное
окрашивание
флуоресцентные
красители

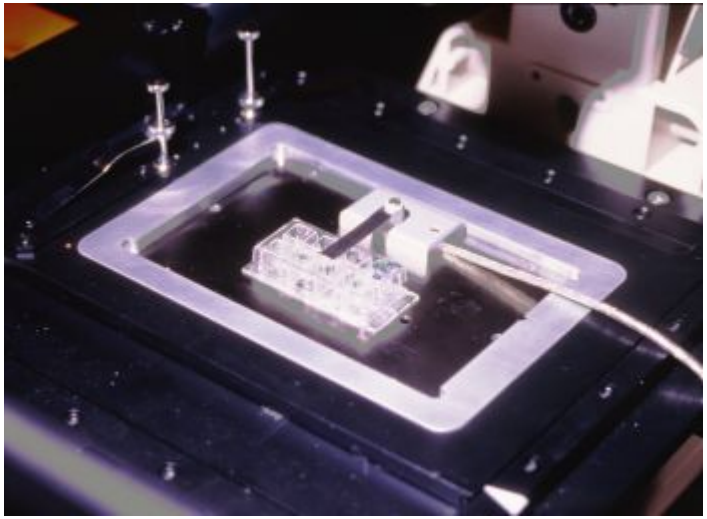
Параметры окружающей среды для линий клеток млекопитающих

Параметр	Оптимальный диапазон	Замечания
Температура	28-37°C	Контролируйте при помощи нагревателей камеры для образцов, используйте встроенные проточные нагреватели, обогреватели объектива, устройства контроля внешних условий
Оксигенация	Изменяемая	Регулярно заливайте или меняйте среду Используйте камеры большого объема
Влажность	97-100%	Закрытая (герметичная) камера Кондиционируемая камера с искусственным климатом Система автоматического заполнения для открытых камер
pH	7,0-7,7	Используйте буферную среду HEPES Регулярно заливайте или меняйте среду Не используйте феноловый красный индикатор
Осмолярность	260-320 mosM	Не допускайте испарения Закрытая (герметичная) камера Кондиционируемая камера с искусственным климатом
Атмосфера	5% CO_2	Для воздушной закрытой (герметичной) камеры используйте буферную среду HEPES Камера с контролируемой атмосферой
Буфер для среды	Бикарбонат или синтетические биологические буферы	Избегайте фототоксичности Закрытые и открытые камеры Камера с контролируемой атмосферой

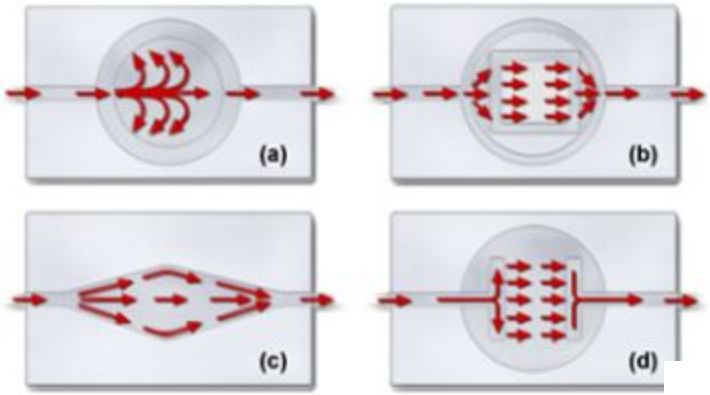
Камеры для прижизненных исследований

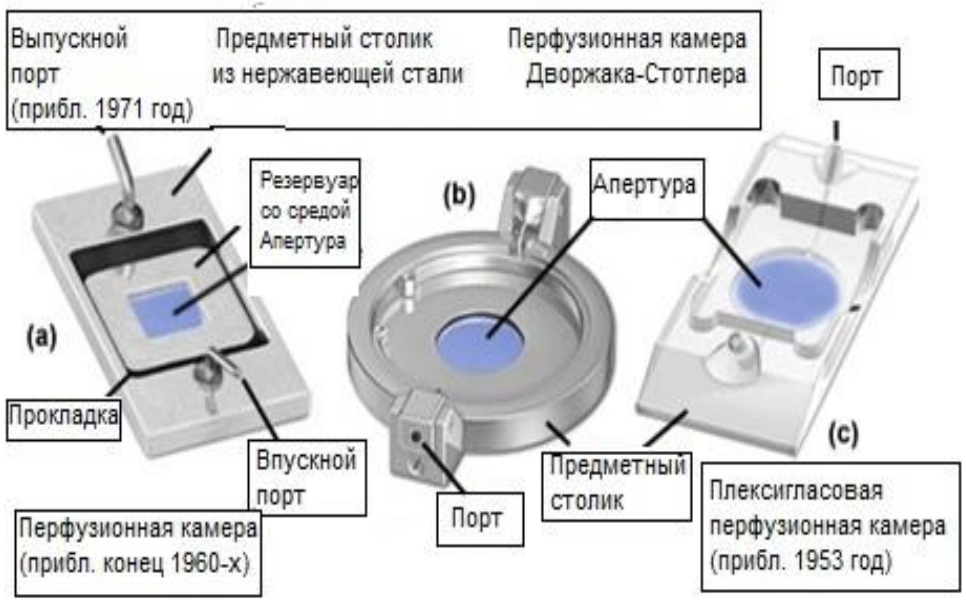


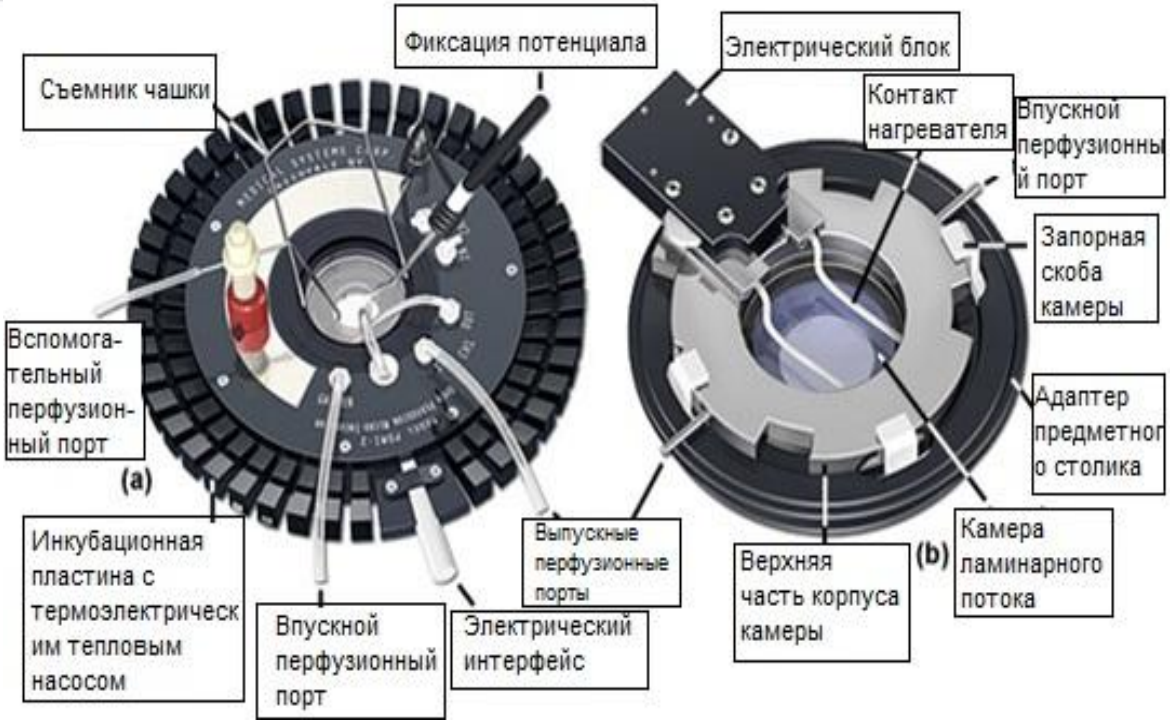




Перфузионные камеры





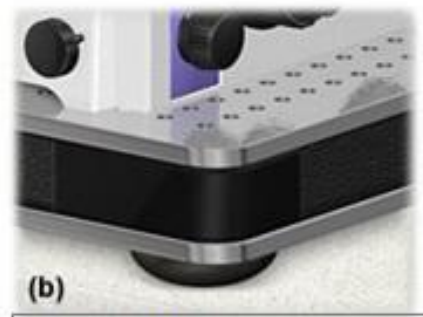


Манжета с металлической фольгой и застежкой "липучка"

Медный змеевик водяной рубашки

Нагреватель с замкнутым контуром пропорционального регулирования

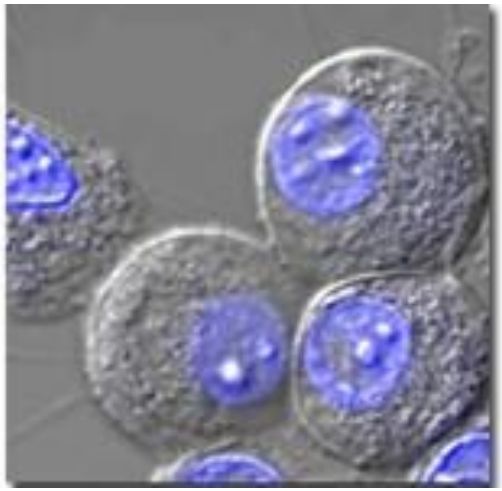
Неопреновые демпфирующие подушки



Демпфирующие подушки из сорботана

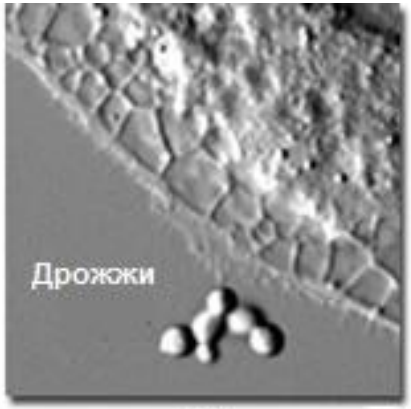
Виброизолирующий стол

Фототоксичность



Контаминация

(a)



(b)

(c)

ОКРАШИВАНИЕ ОРГАНЕЛЛ

Функциональное окрашивание органелл

- Митохондрии → Родамин123
- Аппарат Гольджи → Церамид
- Лизосомы, эндосомы → pH
- ЭПР → $DiOC_6(3)$

ОКРАШИВАНИЕ МИТОХОНДРИЙ

ПОТЕНЦИАЛ-ЗАВИСИМЫЕ КРАСИТЕЛИ

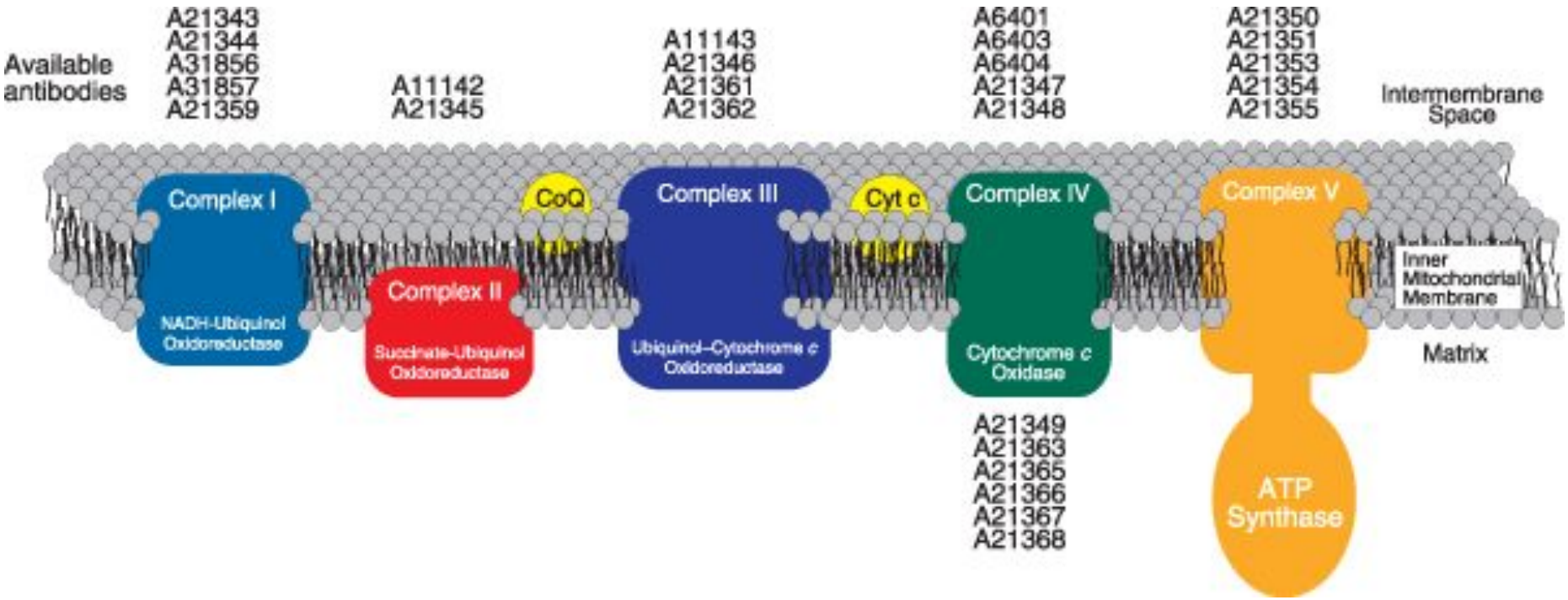
Родамин 123
Митотрекеры
JC1

АНТИТЕЛА

ВСЕ МИТОХОНДРИИ

Нанил акридин оранжевый

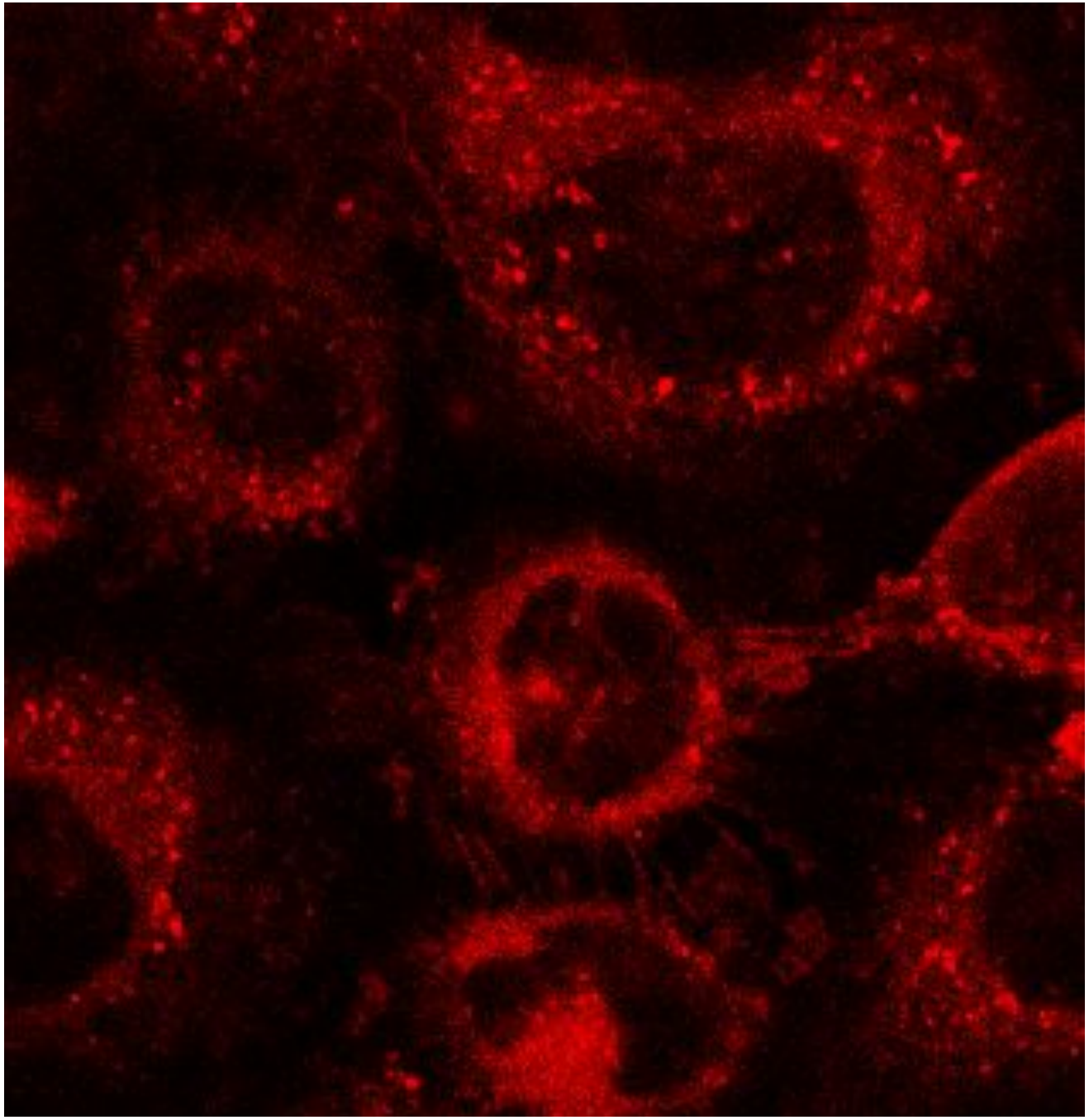
Основные компоненты цепи переноса электронов и имеющиеся в продаже антитела к этим белкам (2016).

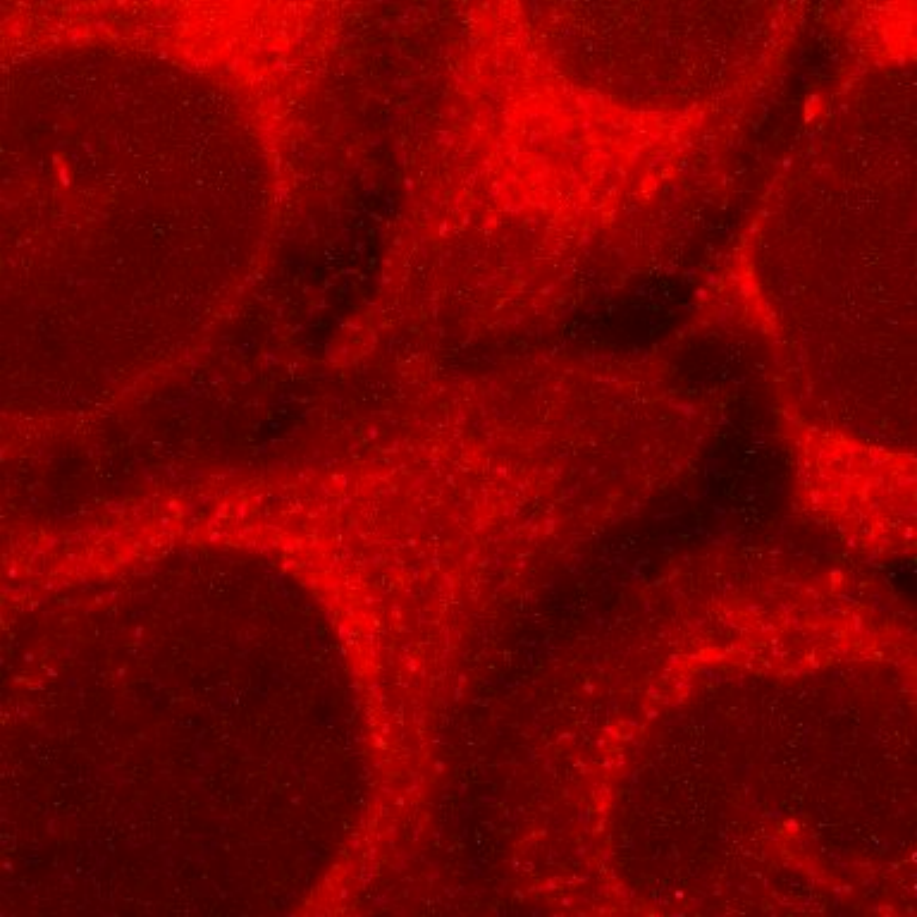


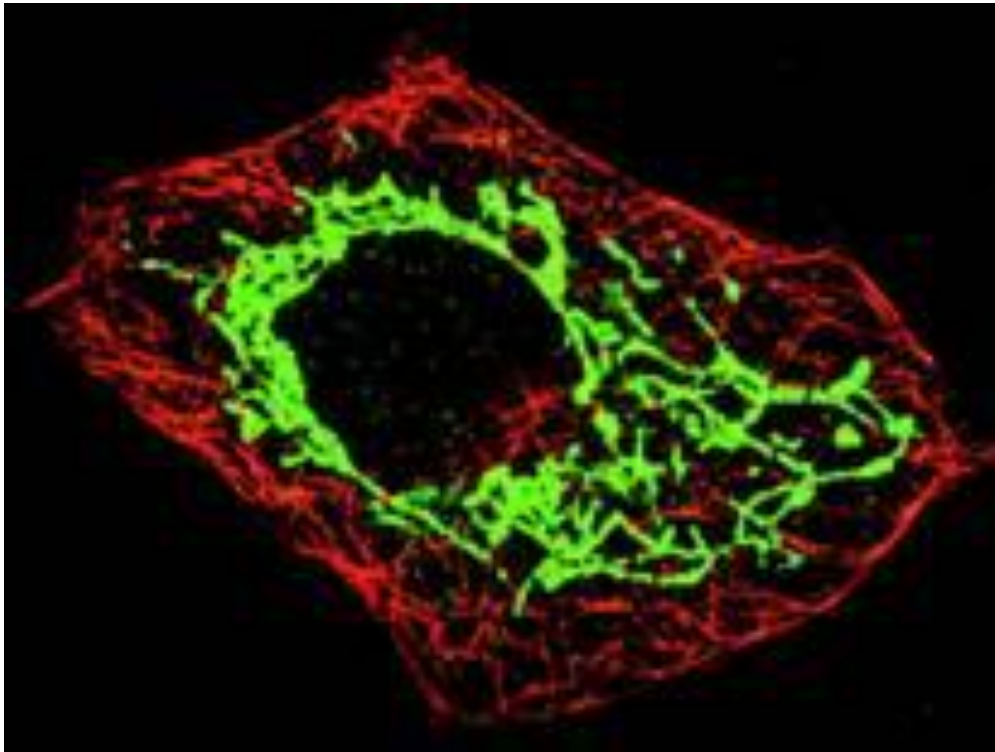
Потенциал-зависимые красители.

Родамин 123.

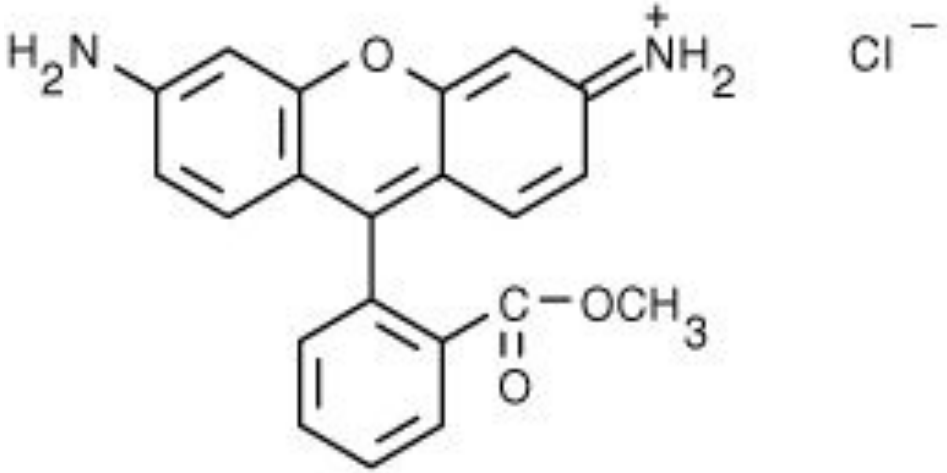
1. *Прижизненно 10 минут*
2. *Не токсичен. При длительном воздействии (более суток) может вызывать гибель трансформированных клеток.*
3. *Специфическое окрашивание. Потенциалзависимое окрашивание. Липофильный.*
4. *Флуоресцеиновый фильтр – желто-зеленые, тетраметилродаминовый фильтр – красные.*
5. *Окрашивает различные типы клеток*
6. *Можно использовать в проточной цитофлоуриметрии.*
7. *Используется для исследования: апоптоза, внутриклеточного транспорта, метаболической активности, множественной лекарственной устойчивости*
8. *Не сохраняется при фиксации*



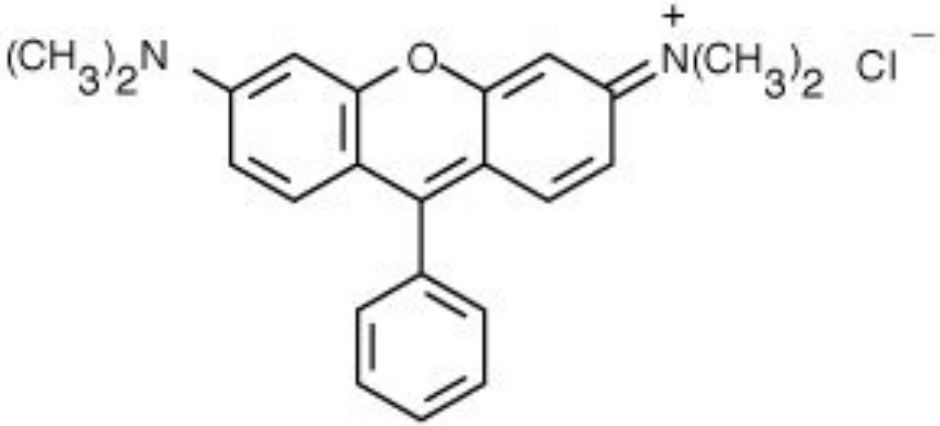




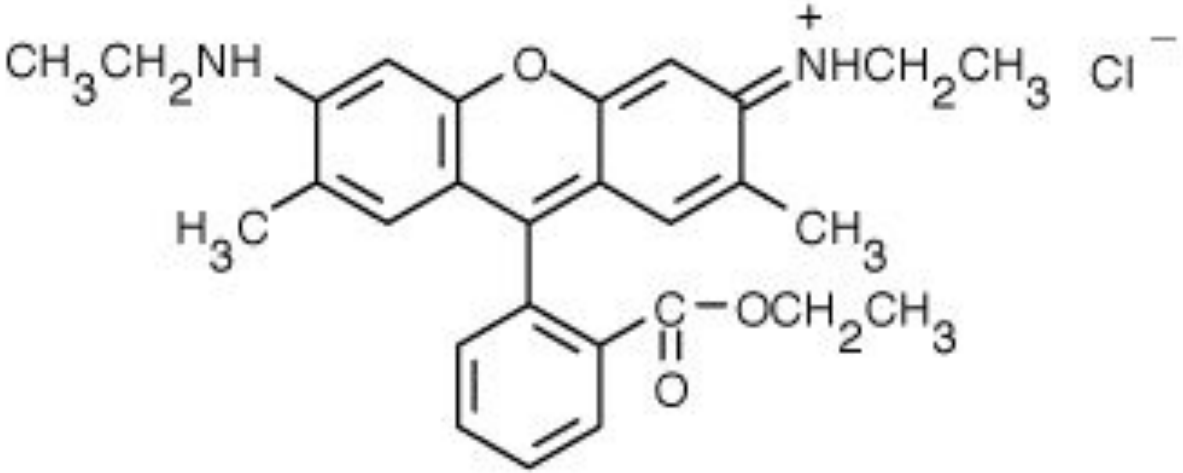
Родамин 123.



Тетраметилрозамин хлорид (розамин)



Родамин 6G хлорид.



Производные родамина 123

Тетраметилрозамин (флуоресцеиновый фильтр),

Родамин 6G (максимум абсорбции между тетрамелирозамином и родамином 123) ,

Родамин B.

TMRM, TMRE -Эфиры производных родамина – **метиловый или этиловый**. **TMRM, TMRE** в низких концентрациях окрашивают **митохондрии**, в высоких концентрациях окрашивают так же и **ЭПР**.

TMRE является лучшим, по сравнению с родамином 123 флуоресцентным красителем для исследования динамики и количественных исследований *in situ* т.к. он быстрее и обратимее накапливается в живой клетке.
TMRM и TMRE используются для измерения митохондриальной деполяризации связанной с выходом Ca^{2+} и съемок изменения митохондриального потенциала.

Восстановленные производные родаминов и розаминов.

1

Дигидророданины
дегидротетраметилрозамины

перекись водорода

окисление

флуоресценция

Дигидророданин 123

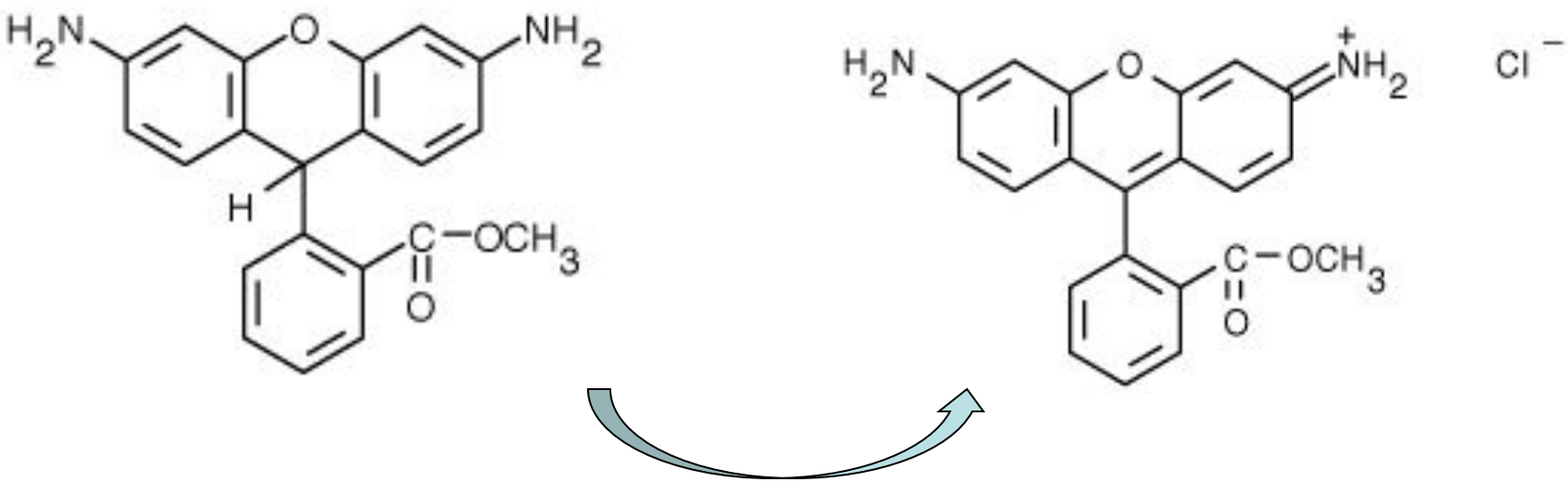
Пероксидаза
Железо
Цитохром С

окисление

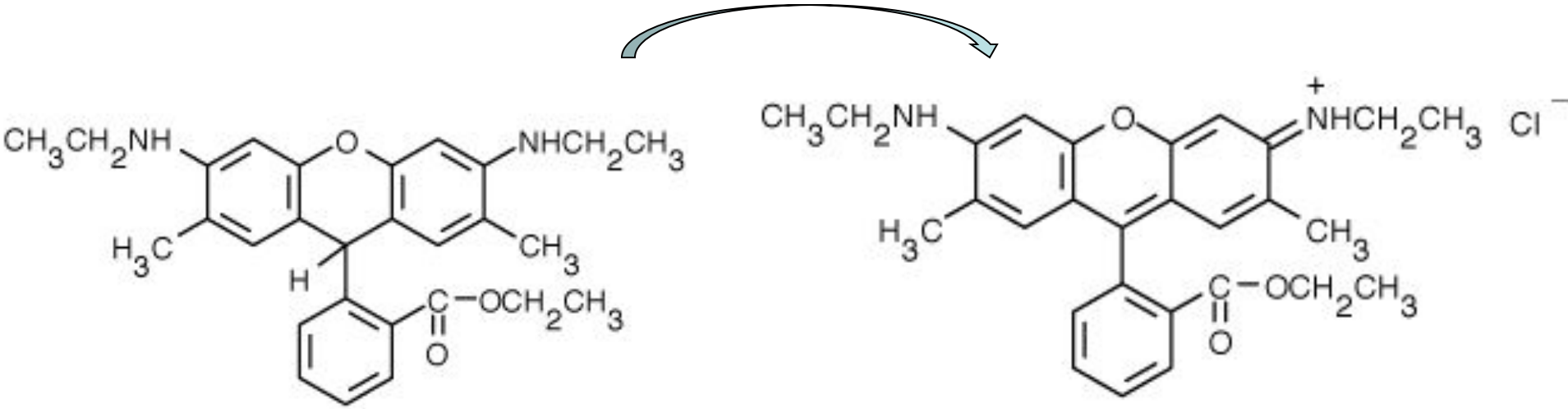
родамин 123.

мониторинга промежуточных
активных форм кислорода.

дигидрородамин 123



дигидрородамин 6G.



Производные родаминов и розаминов.

2

rhod-2 AM

Ca^{2+}

восстановление

Ацетоксиметиловый эфир дигидрородамина (acetoxymethyl (AM) ester of dihydrorhod-2)

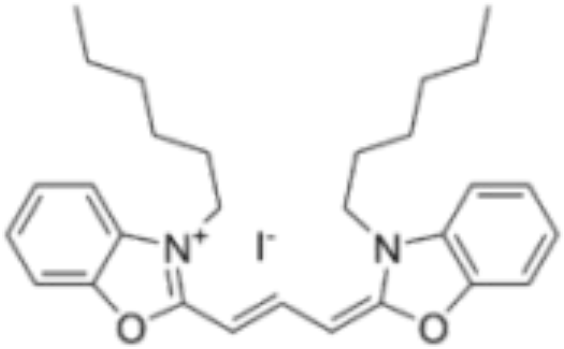
измерения коллебания уровня Ca^{2+} в митохондриях

3

Хлорометильные производные востановленных розаминов – митотрекеры (MitoTracker Orange CM-H_2TMRos,MitoTracker Red CM-H_2XRos). Сохраняют окраску после фиксации.

Карбоцианины. $DiOC_6$

Окрашивают митохондрии в живых клетках в низких концентрациях (~20 nM, 0.5 μM or ~0.1 μg/mL); спектр флуоресцеина
Окрашивают ЭПР при использовании высоких концентраций
(~5–50 μM or ~1–10 μg/mL).



ФОТОТОКСИЧЕН

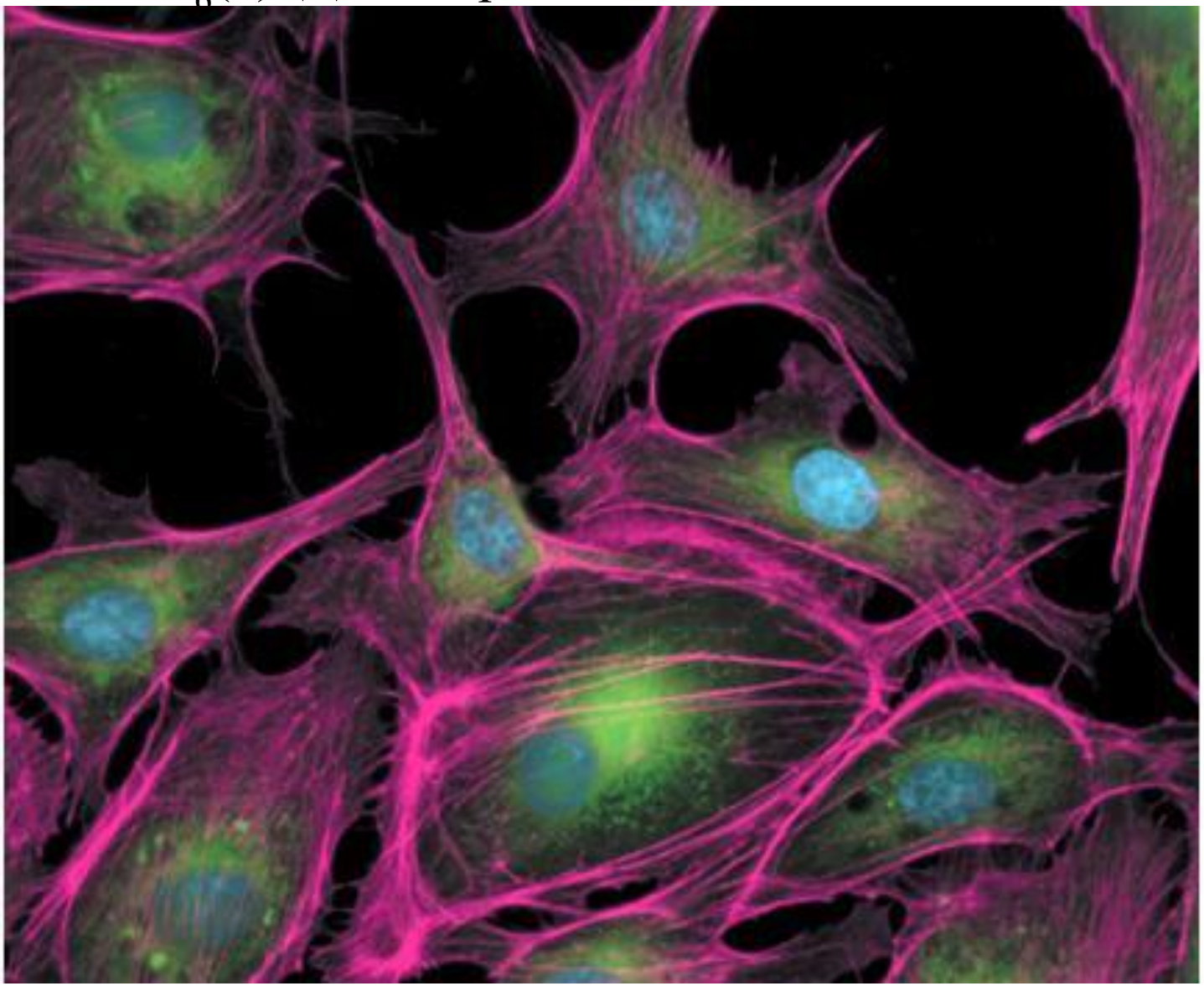
$DiOC_6(3)$ используют для демонстрации движения митохондрий вдоль МТ, исследования реорганизация ЭПР при оплодотворении яиц аскариды, для исследования прорастания сосудов в опухоли мышей, МЛУ, визуализация деталей морфологии в нейритах при болезни Альцгеймера Апоптоз

Используется в проточной цитофлоуриметрии $DiIC_1$ и $DiOC_2(3)$.

$DiOC_7(3)$– окрашивает митохондрий в растительных клетках.

Культура клеток эндотелия.

Окраска актина Alexa Fluor 633 phalloidin. Липофильные области клетки окрашены $DiOC_6(3)$. ДНК окрашено DAPI .



Стериловые красители (Styryl Dyes).

DASPMI (4-Di-1-ASP) и DASPEI .
Окраска слабо связана с мембранным потенциалом.

Окрашивание митохондрий в мутантах дрожжей
Долговременной исследование митохондрий в нервных клетках
Исследование метаболизма *Pneumocystis carinii*

Nonyl Acridine Orange

Окрашивание митохондрий не зависит от мембранного потенциала. Связывается с кардиолипином. Токсичен в высоких концентрациях. Используется в проточной цитофлуориметрии.
Нонил акридиновый оранжевый остается в митохондриях HeLa до 10 дней – удобно исследовать слияние клеток .

Carboxy SNARF-1 pH Indicator

Исследование внутримитохондриального pH. Окрашивание 10 μM 5-(and 6-)carboxy SNARF-1, acetoxymethyl ester, acetate 4 часа при КОМНАТНОЙ температуре.

CoroNa Red Chloride

Na^+ - индикатор. Показана ко-локализация с MitoTracker Green FM. Накапливается спонтанно.

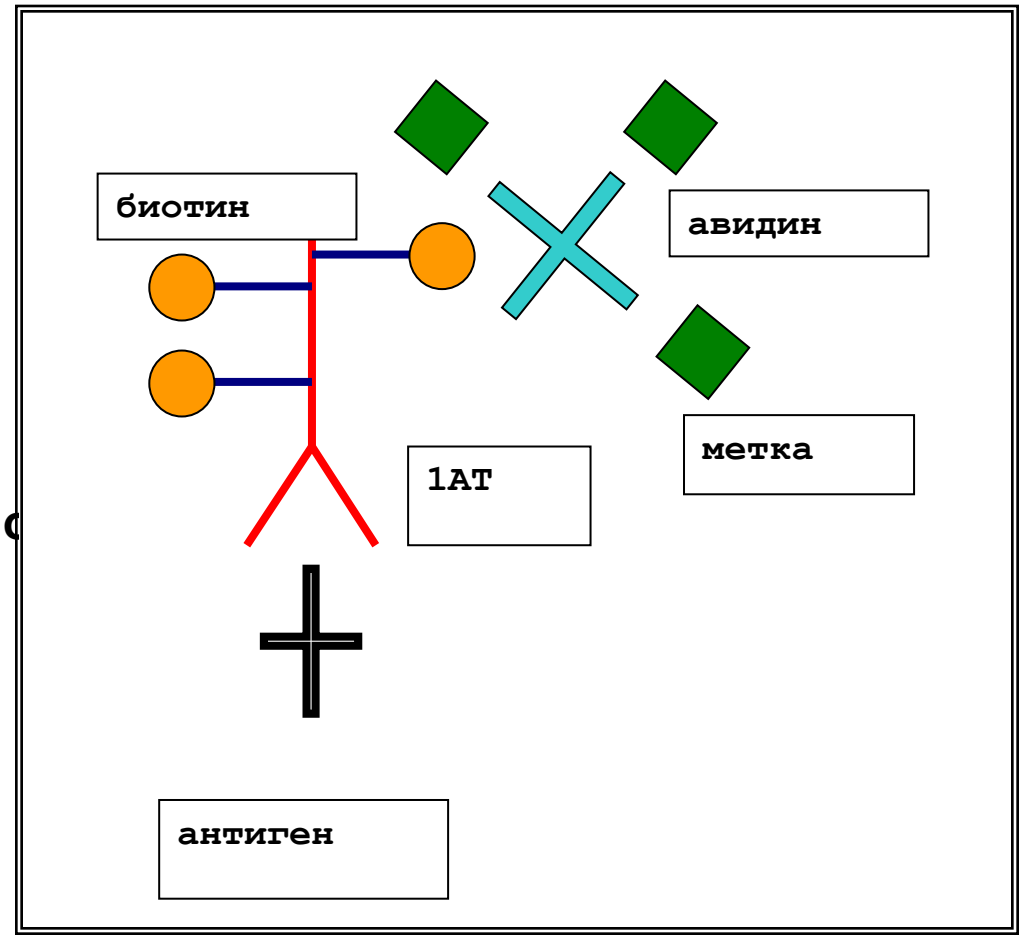
Lucigenin

Хемилюминисцентная проба люцигенин аккомулируется в митохондиях альвеолярных макрофагов. Используют высокие концентрации (~100 μM). В низких концентрациях отмечено подавление свечения при стимуляции генерации супероксида в митохондриях.

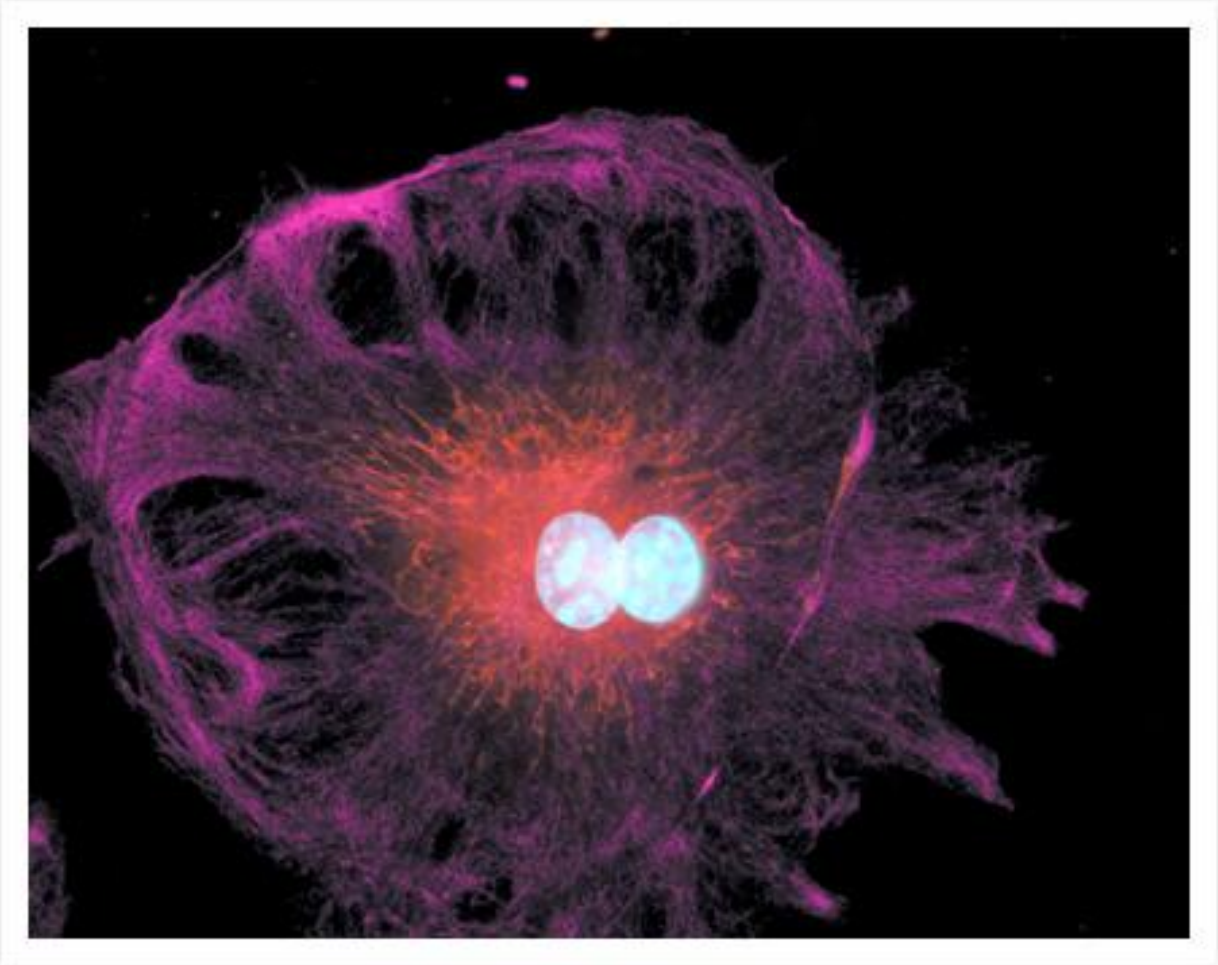
Окрашивание митохондрий с помощью конъюгации биотина с авидином.

биотин карбоксилаза

Митохондрии могут быть прижизненно окрашены производными авидина или стрептавидина.
Окрашивание и фиксированно материала

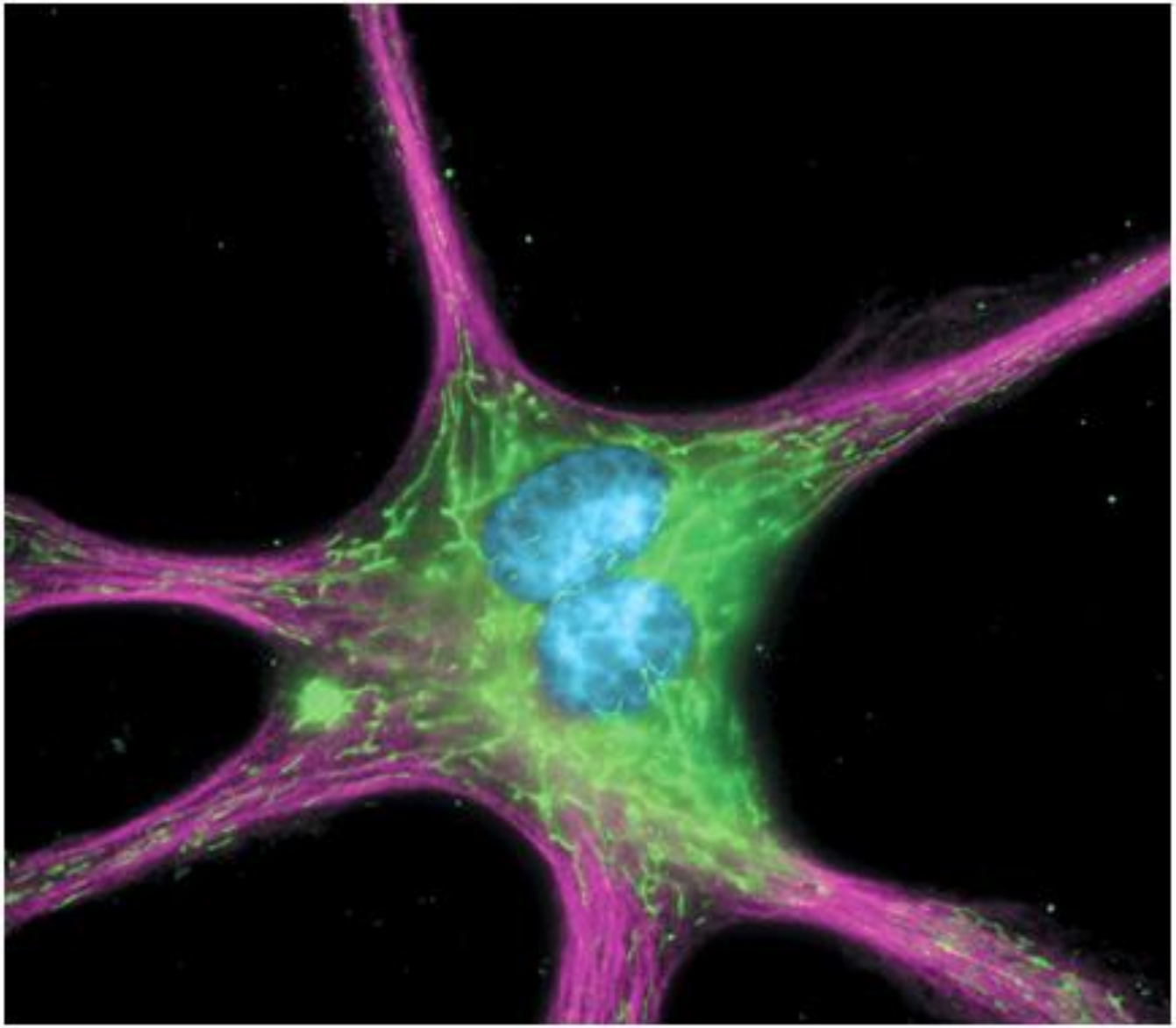


Эндотелий легочной артерии. Промежуточные филаменты (антидесмин АТ) и эндогенный биотин в митохондриях связан со стрептавидином, конъюгированным с Alexa Fluor 546



АТ к альфа-тубулину и стрептавидин , конъюгированный с Alexa Fluor 488

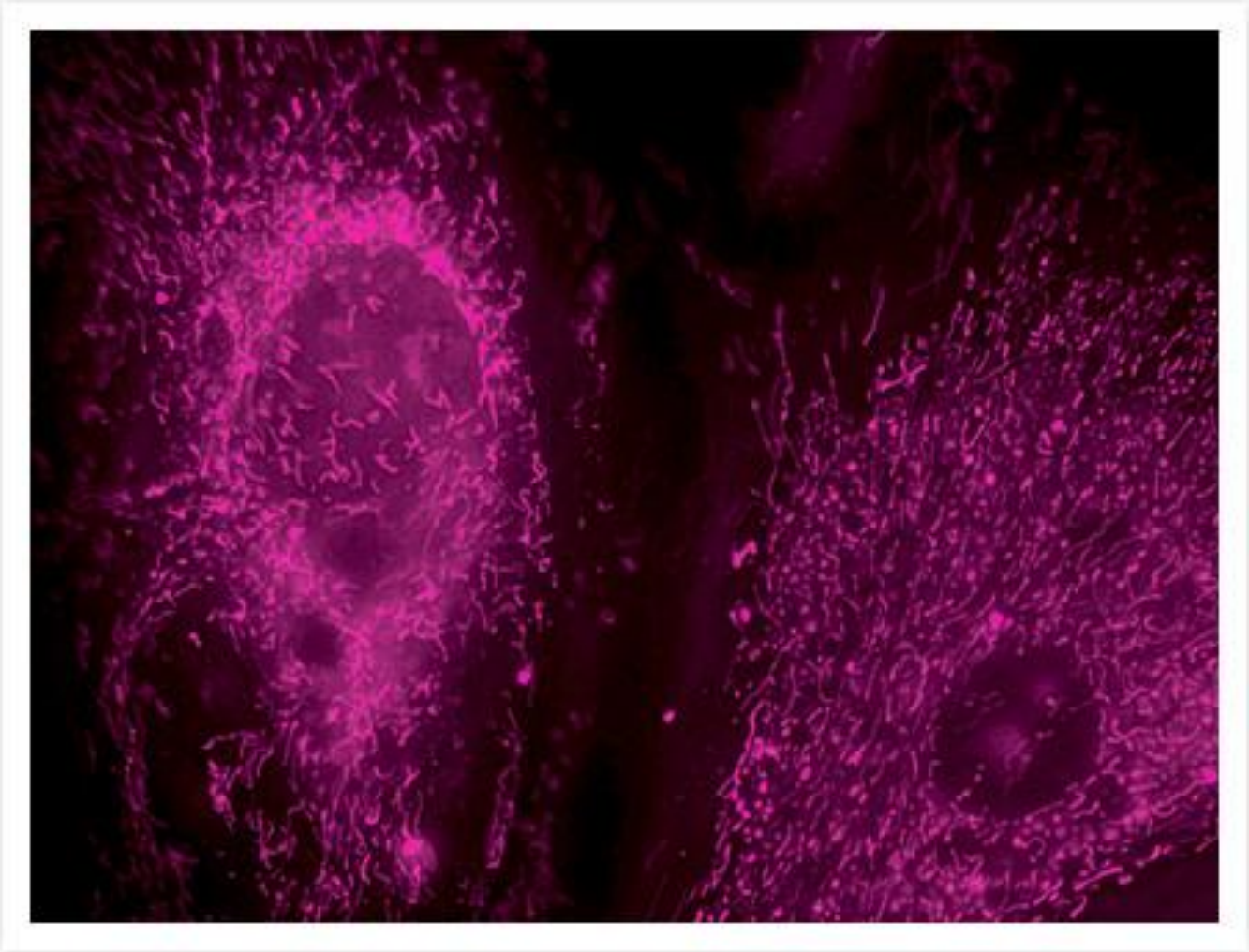
α



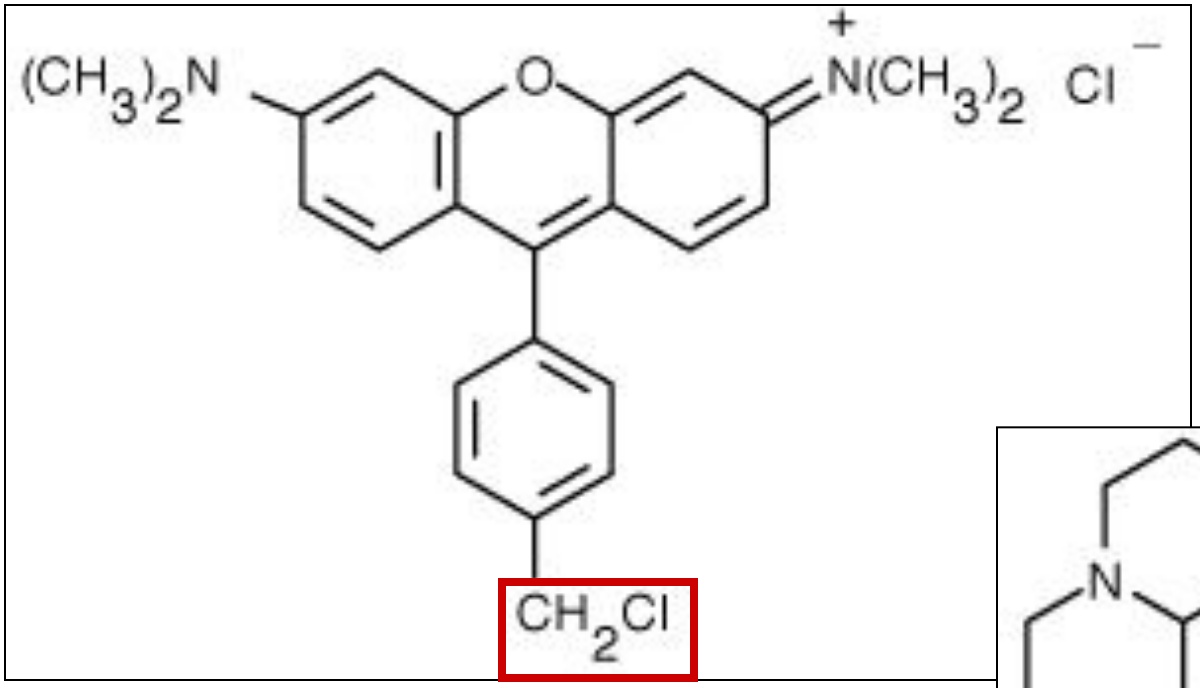
Митотрекеры

MitoTracker and MitoFluor

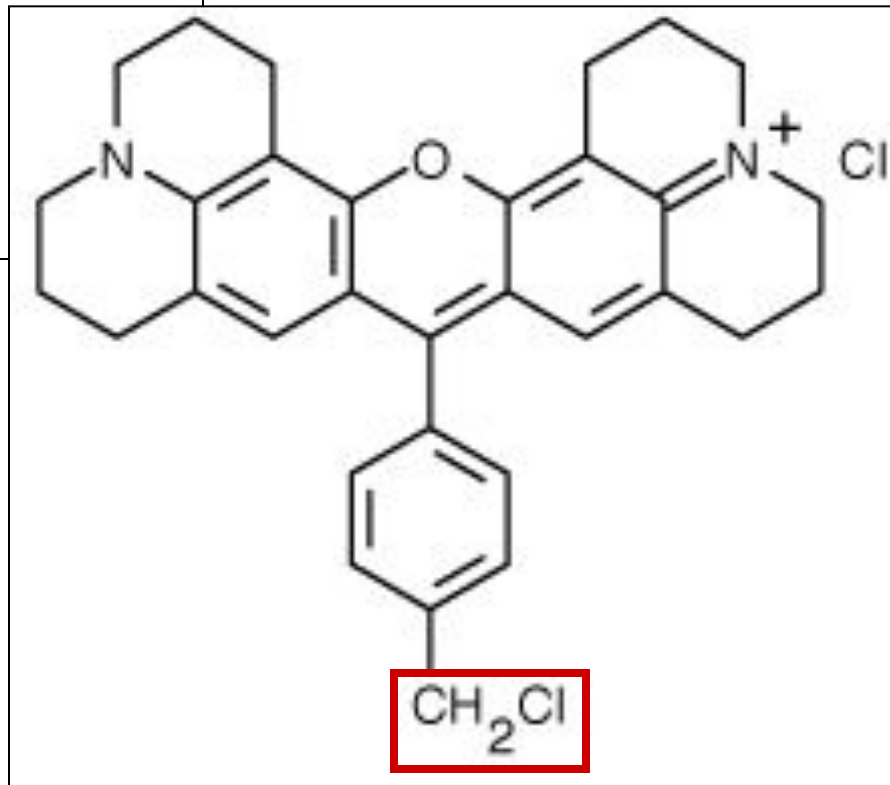
Митохондрии в клетках эндотелия легочной артерии быка, окраска MitoTracker Deep Red 633

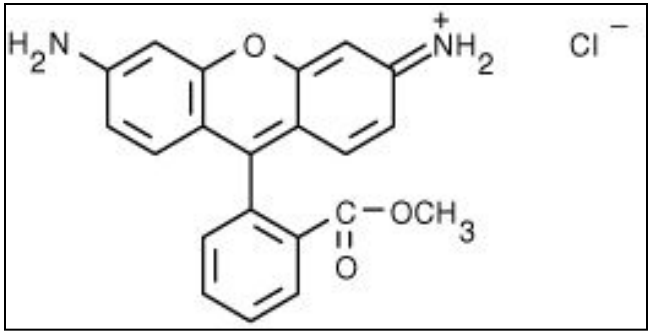


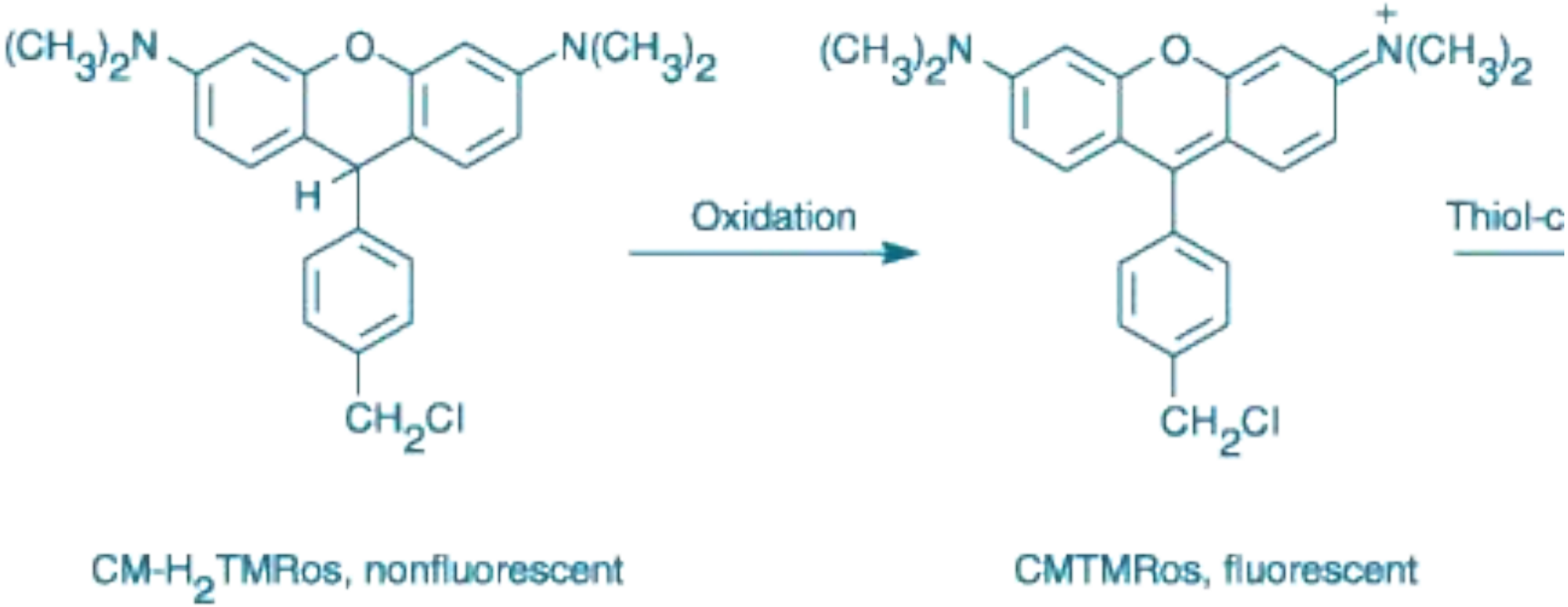
MitoTracker Orange CMTMRos.



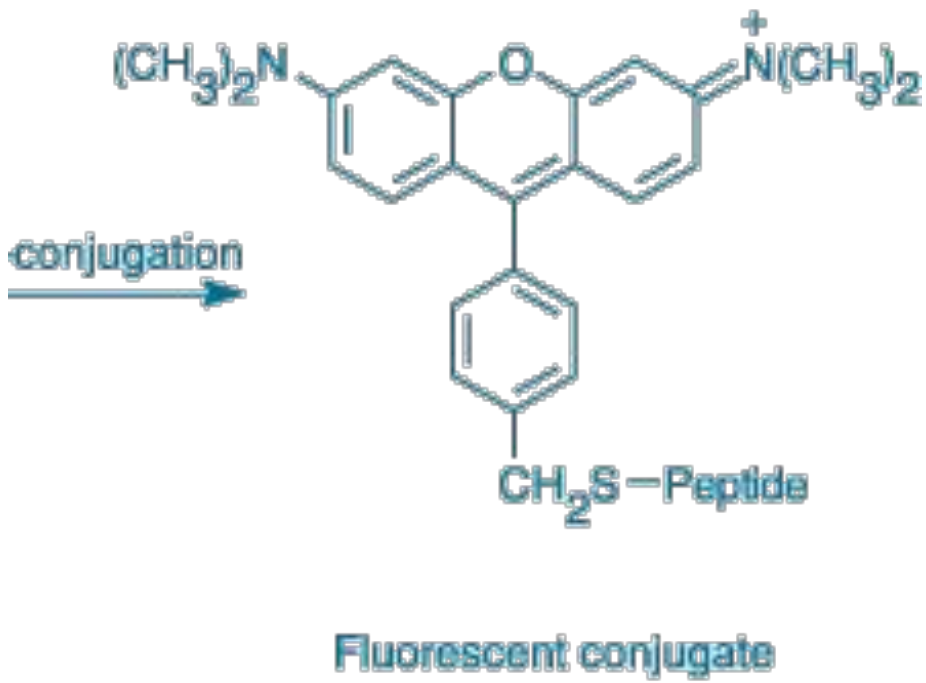
MitoTracker Red CMXRos.







MitoTracker Orange
CM-H_2TMRos



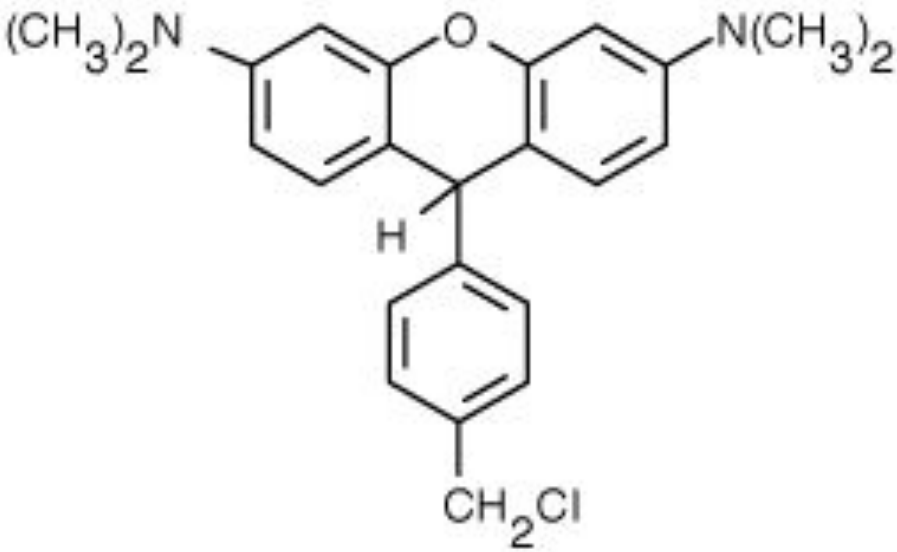
Родамин 123	Митотрекеры и митофлуары
Легко вымывается из клетки	Прочное связывание
Потеря окраски при фиксации	Некоторые пробы сохраняют окраску при фиксации (возможность двойного окрашивания)
Спектр флуоресцеина	Разные спектры
Микромолярные концентрации	Наномолярные концентрации
Окрашиваются только работающие митохондрии	Некоторые пробы окрашивают не зависимо от потенциала
Динамика, МЛУ	-

MitoTracker® and MitoFluor™ Mitochondrion-Selective Probes

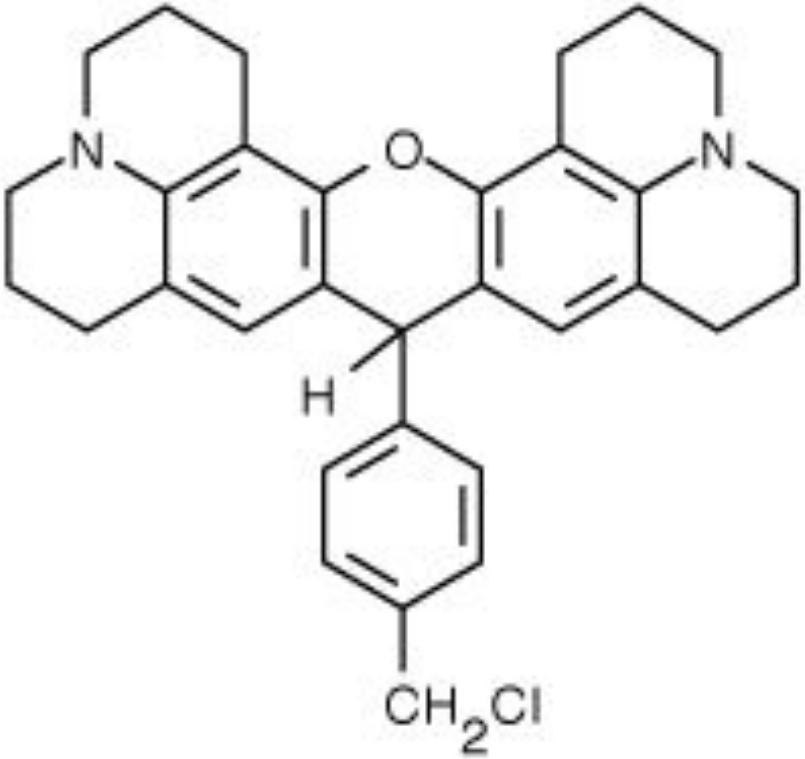
Product	Catalog Number	Ex (nm) *	Em (nm) *	Fixable?
MitoTracker® Green FM	M7514 †	490	516	No
MitoTracker® Orange CMTMRos	M7510	554	576	Yes
MitoTracker® Orange CM-H_2TMRos	M7511 ‡	554	576	Yes
MitoTracker® Red CMXRos	M7512	579	599	Yes
MitoTracker® Red CM-H_2XRos	M7513 ‡	579	599	Yes
MitoTracker® Red 580	M22425	581	644	Yes
MitoTracker® Deep Red 633	M22426	644	665	Yes
MitoFluor™ Green	M7502 †	490	516	No
MitoFluor™ Red 589	M22424	588	622	No
MitoFluor™ Red 594	M22422	598	630	No

* Fluorescence excitation and emission maxima determined in methanol; values may vary somewhat in cellular environments.
† Nonfluorescent in aqueous solution. ‡ Nonfluorescent until oxidized.

MitoTracker Orange CM-H_2TMRos.

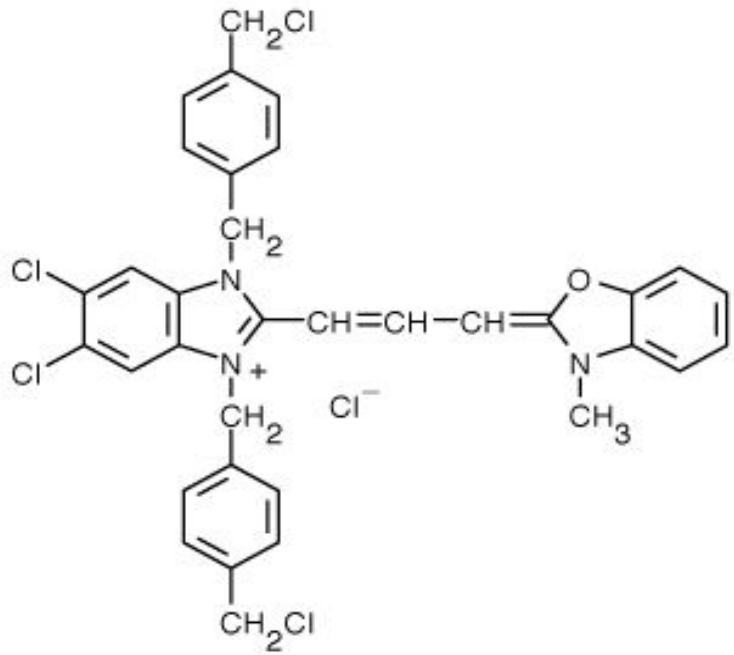


MitoTracker Red CM-H_2XRos.



MitoTracker Green FM.

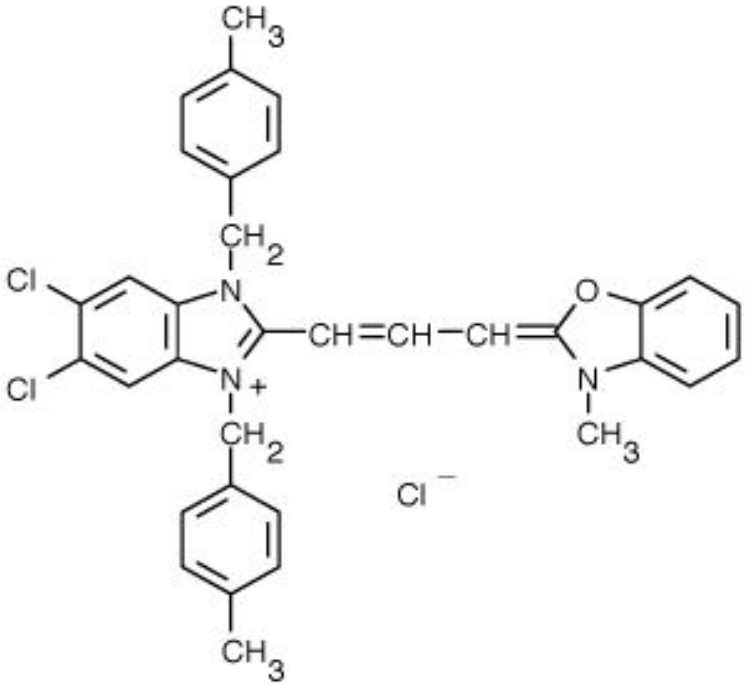
+Более фотостабилен, чем родамин 123,
+не требует отмывки,
- вымывается при фиксации

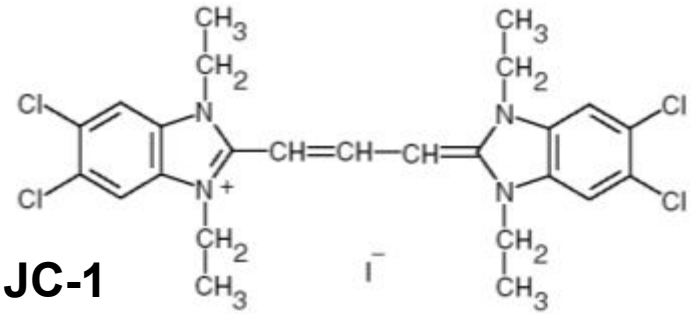


MitoFluor Green.

-вымывается при фиксации,

MitoFluarRed 589 окрашивает клетки независимо от потенциала





JC-1

MitoTracker® and MitoFluor™ Mitochondrion-Selective Probes

Table 1. Contents and storage information.

Material	Amount	Storage	Stability
MitoTracker® probes	20 vials each containing 50 µg lyophilized solid	• ≤–20°C * • Desiccate • Protect from light • Avoid freeze-thaw cycles	When in solid form stored as directed, product is stable at least 6 months.
Reduced rosamine MitoTracker® probes (M7511, M7513)	20 vials each containing 50 µg lyophilized solid	• ≤–20°C * • Store under argon or nitrogen • Desiccate • Protect from light • Avoid freeze-thaw cycles	
MitoFluor™ dyes	1 mg	• ≤–20°C * • Desiccate • Protect from light • Avoid freeze-thaw cycles	

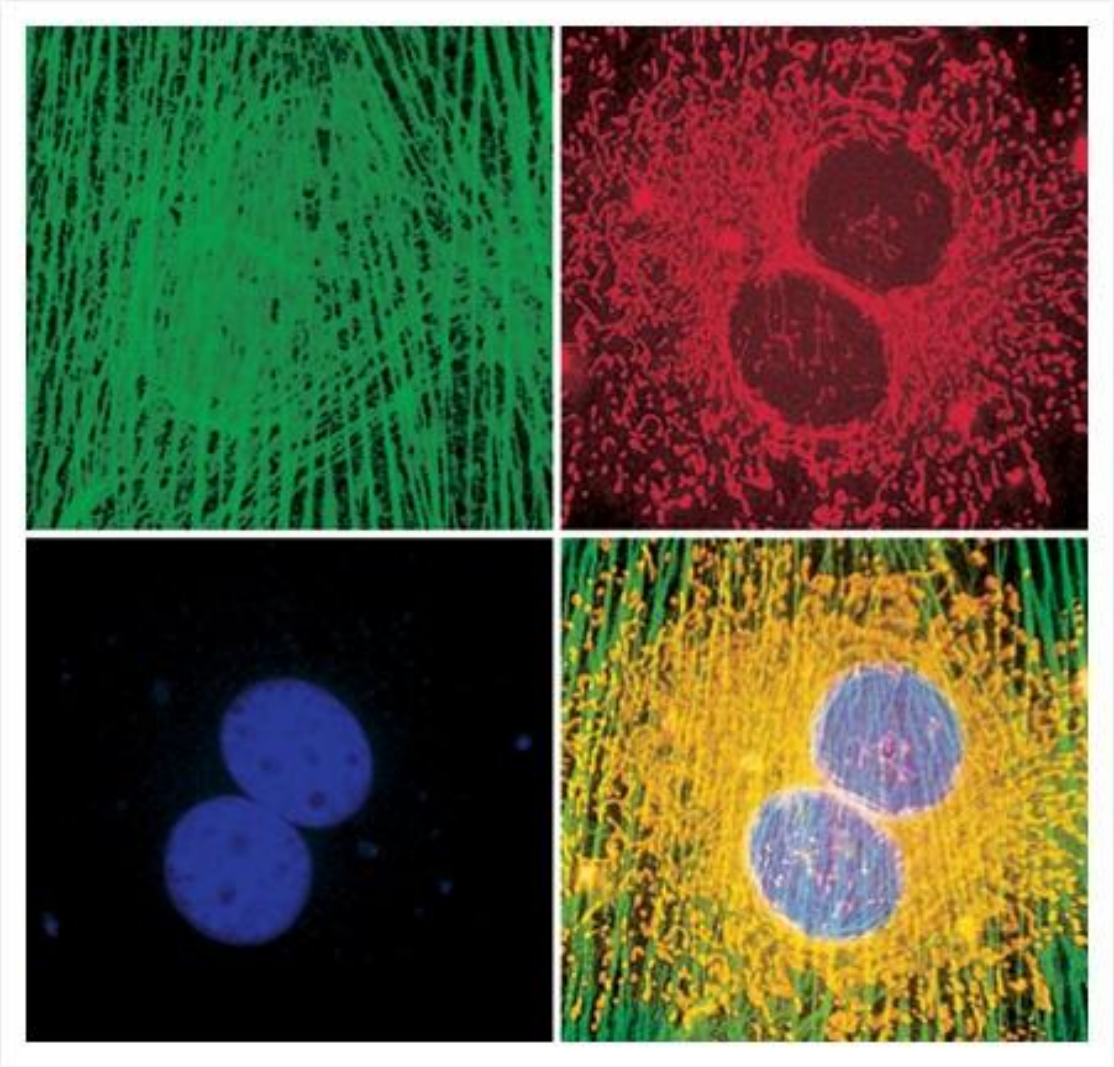
* Before opening a vial, allow the product to warm to room temperature.

Approximate Fluorescence Excitation and Emission, in nm: See Table 2.

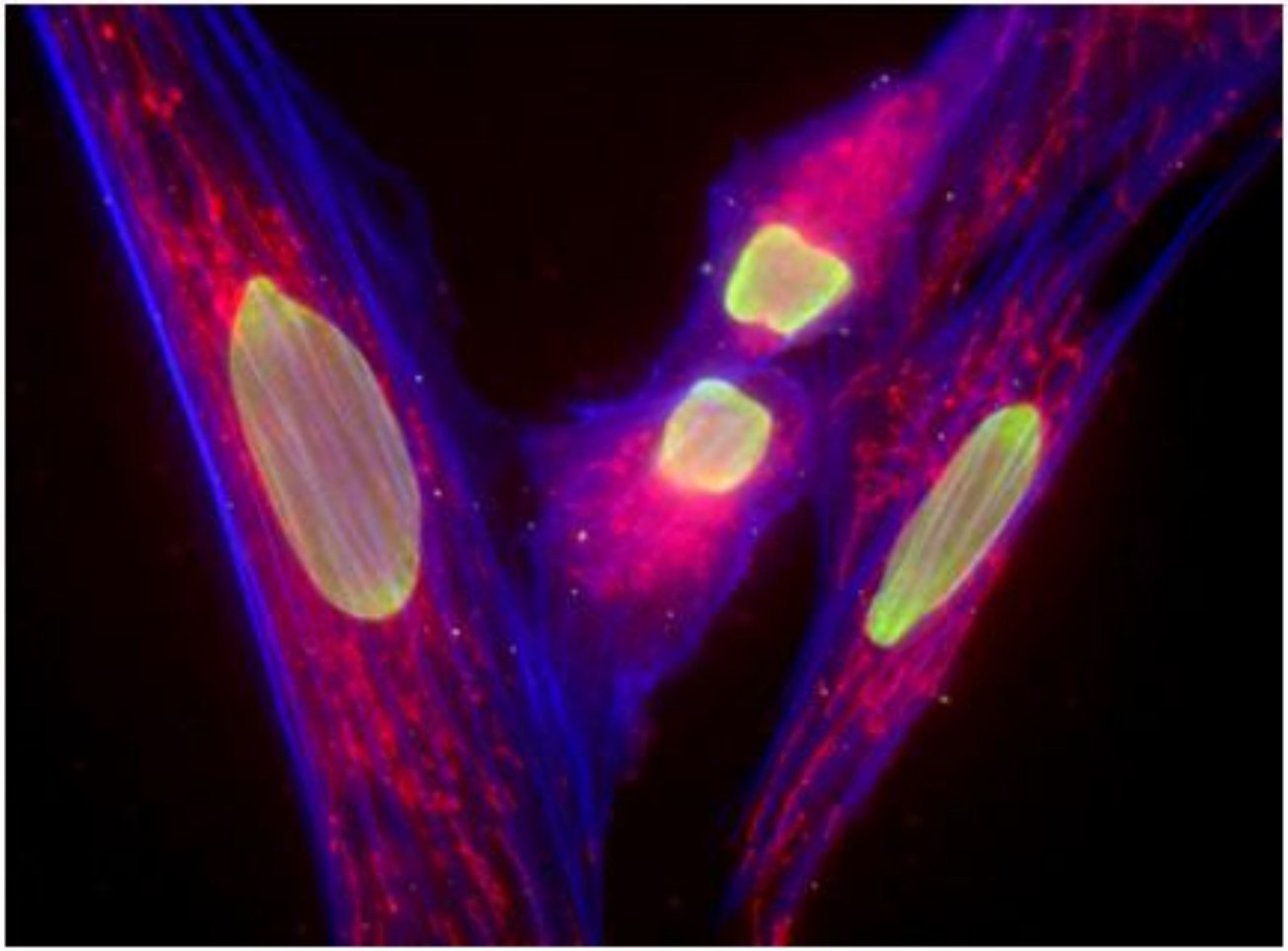
Kit Contents

- **MitoTracker CMXRos dye (MW = 532, Component A)**, 50 µg
- **Hoechst 33342 dye (Component B)**, 3 vials, each containing 400 µ L at 1.0 mM in water
- **Dimethylsulfoxide (DMSO) (Component C)**, 500 µ L

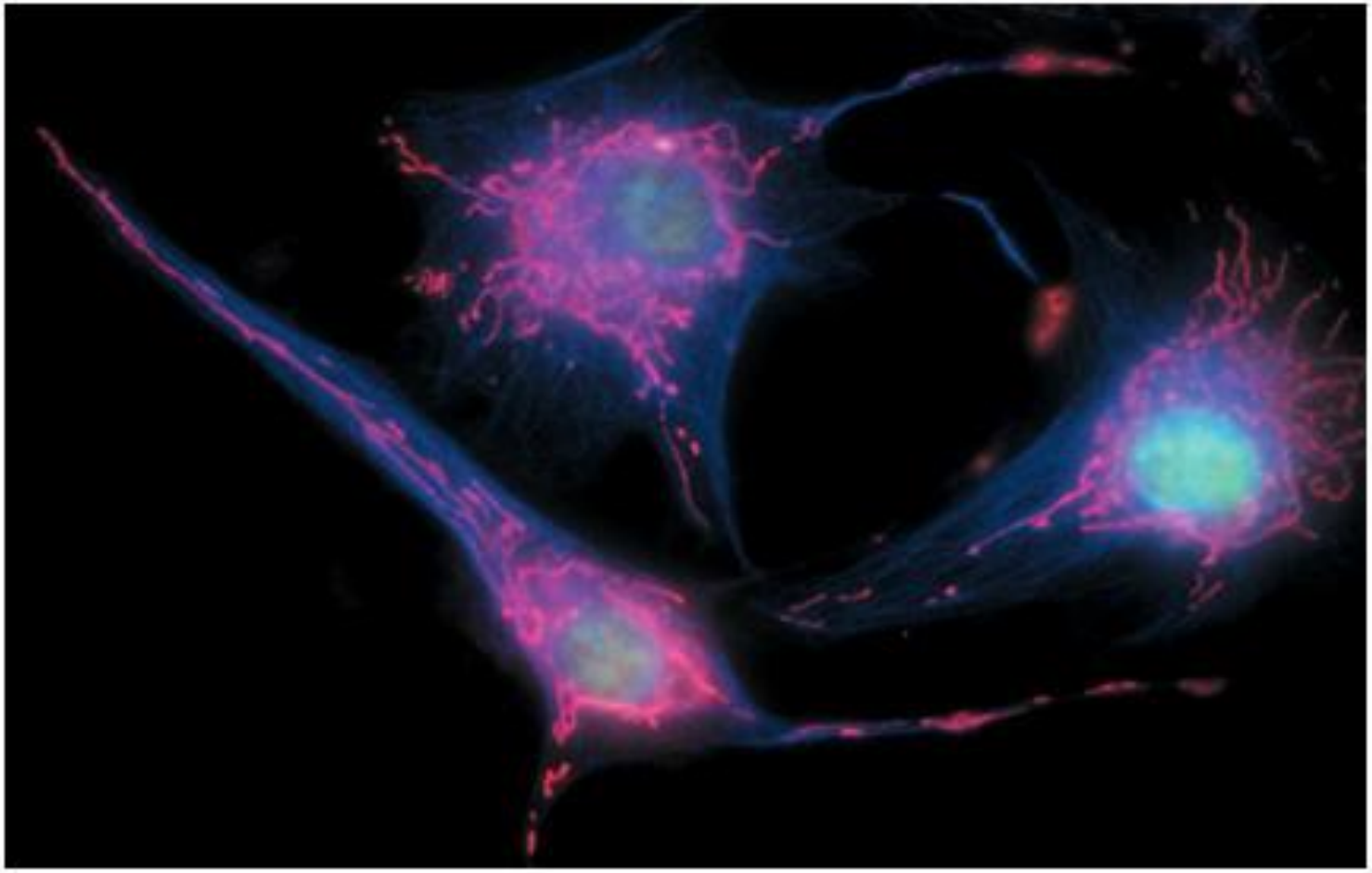
Фибробласты мыши . Окраска MitoTracker Red CMXRos, затем фиксация формалином и окрашивание фаллоидином и DAPI



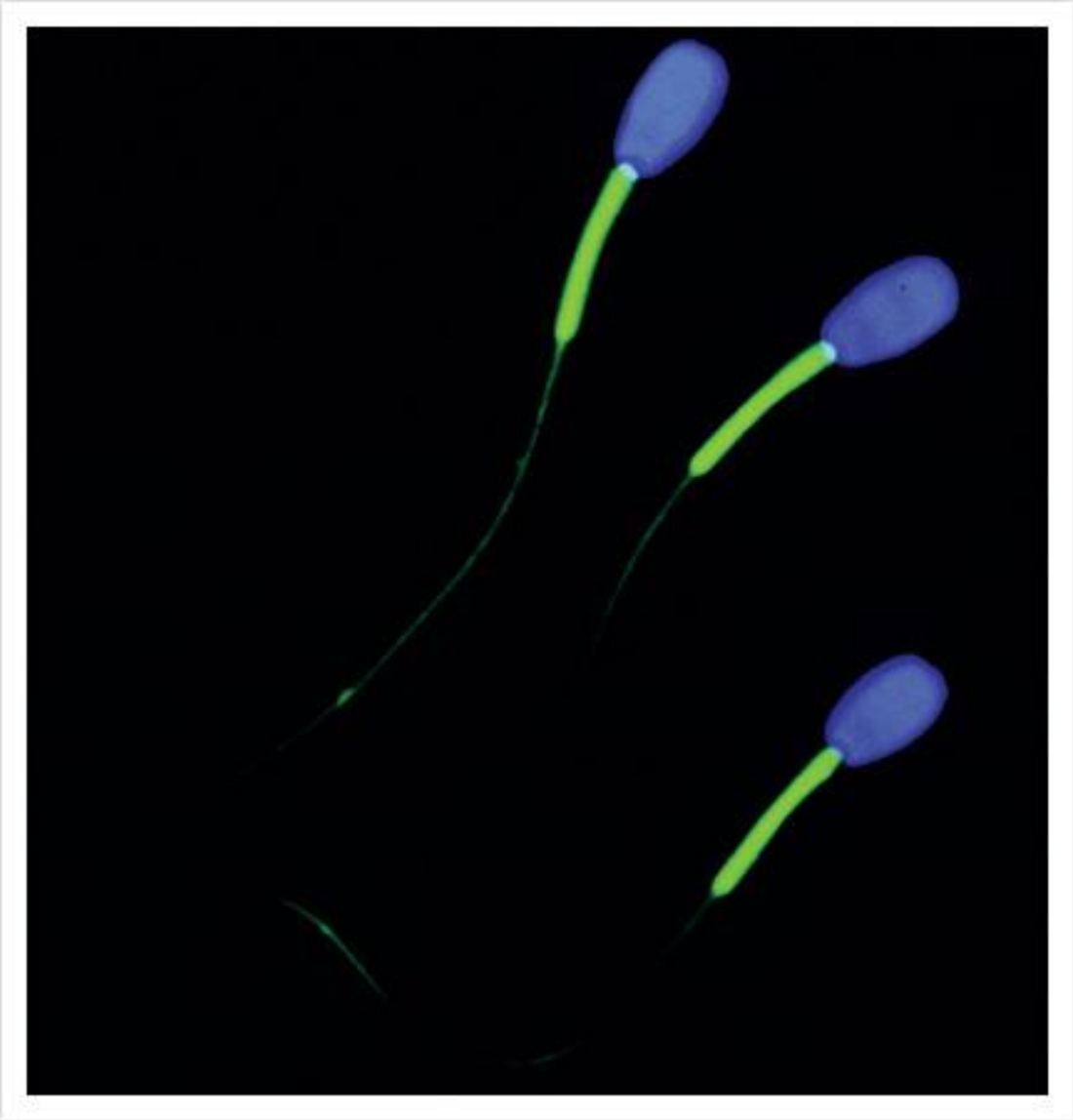
Muntjac fibroblasts. Актин окрашен биотин-фаллоидином и стрептавидином, конъюгированным Alexa Fluor 350. Митохондрии окрашены MitoTracker Red CMXRos. Ядро окрашено антителами к фосфорелированным гистонам, вторые антитела - Alexa Fluor 500 goat anti–mouse IgG.



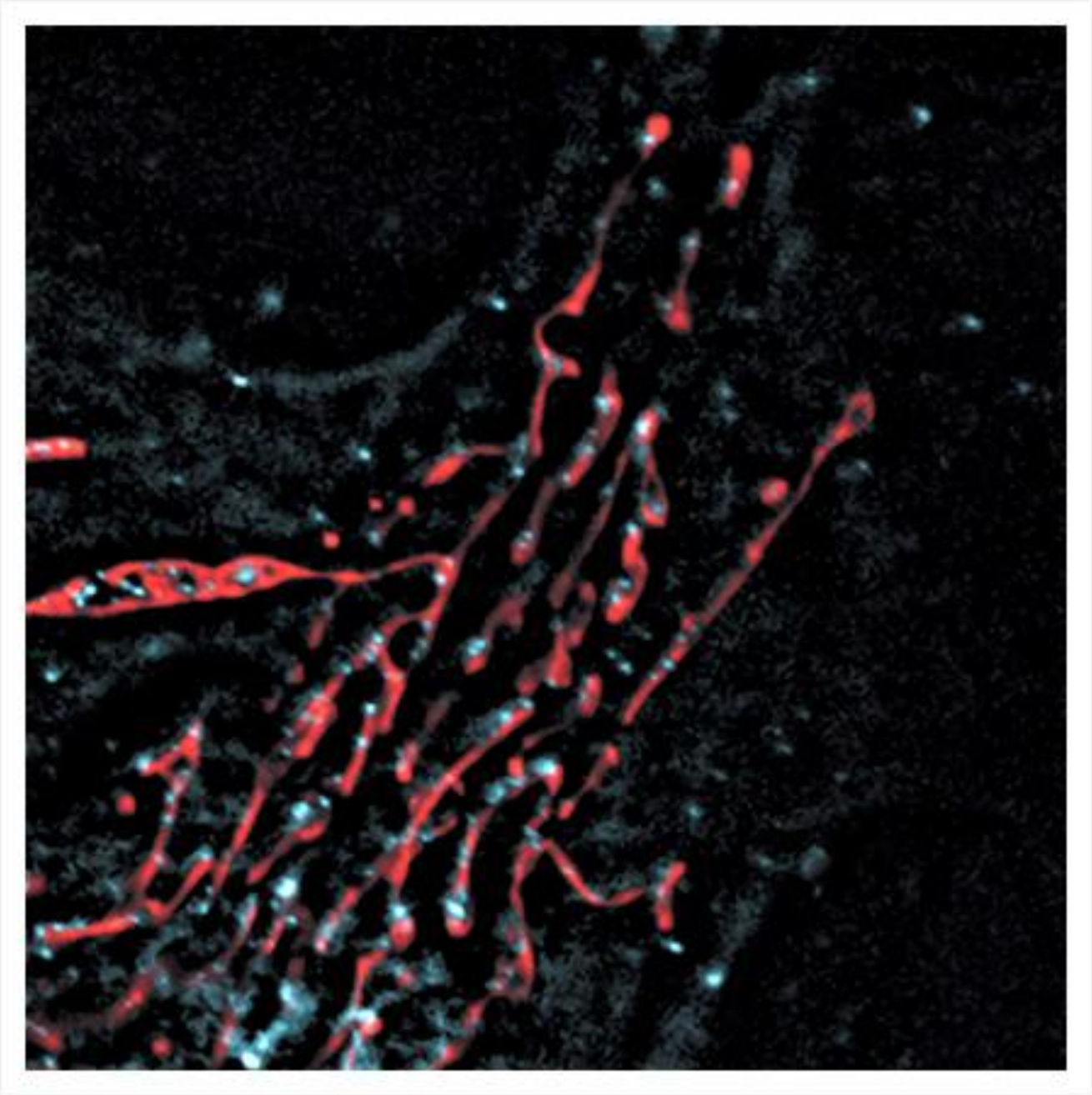
Культура клеток эндотелия, окраска MitoTracker Red CMXRos. Затем клетки фиксировали формалином, ДНК окрашено SYTO 16 green-fluorescent nucleic acid stain. МТ окрашены антителами к альфа-тубулину.



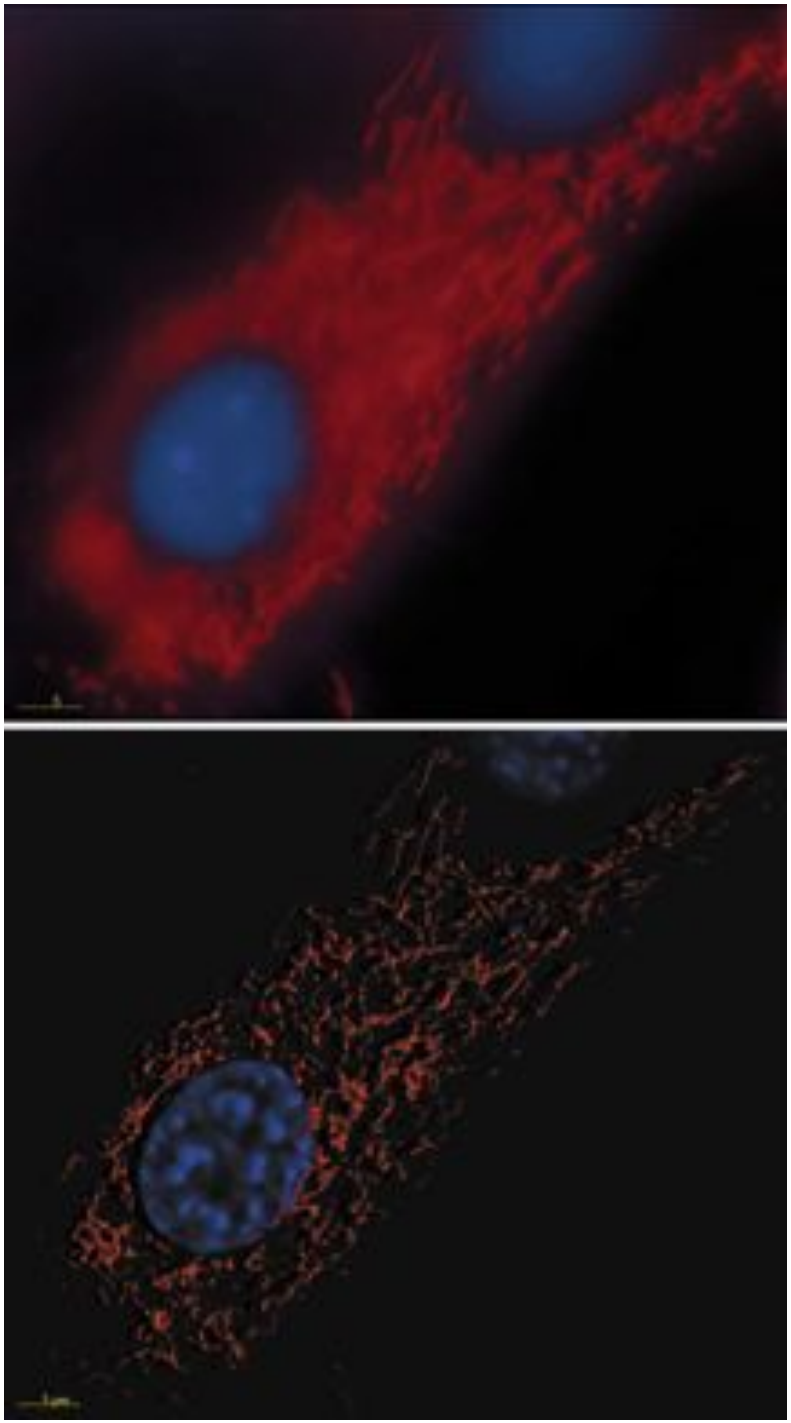
Сперматозоиды быка, окраска MitoTracker Green FM и Hoechst 33342



DAPI и MitoTracker Red . Фиксация 4% формалином.

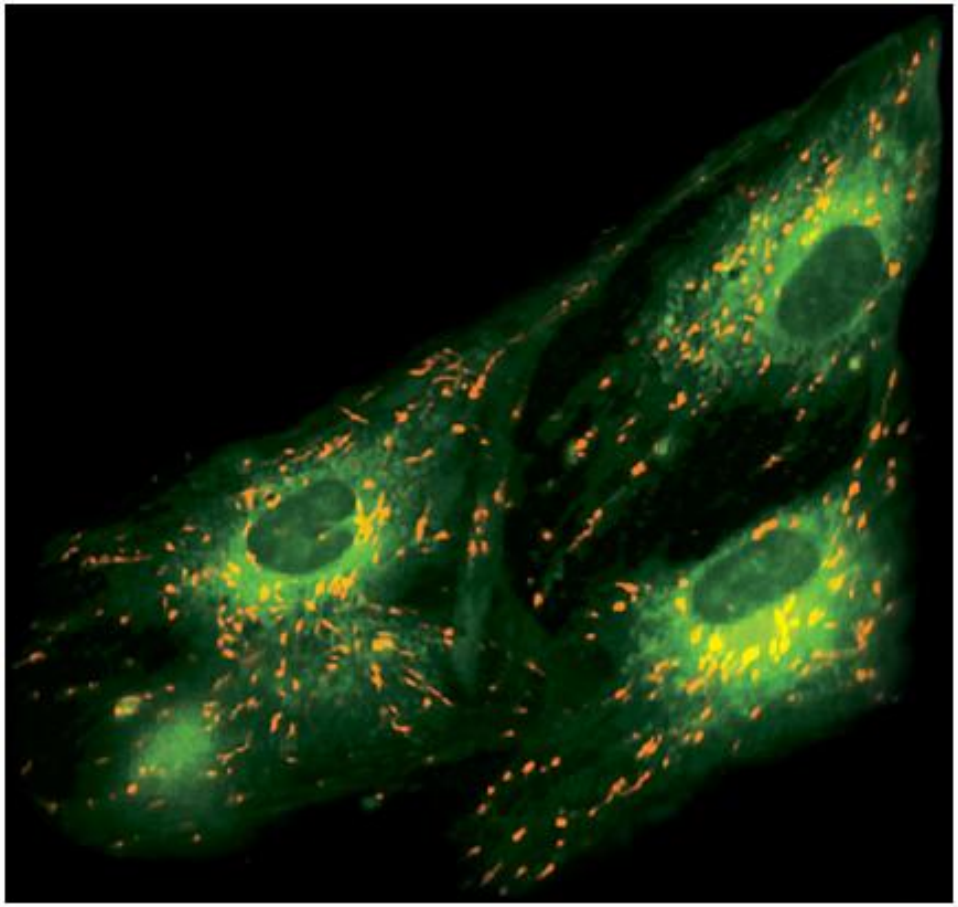


Клетки культуры эндотелия. Окраска MitoTracker Red 580 и DAPI после фиксации. Деконволюция.



JC-1

Культура преадипоцитов, окрашенных JC-1 (5 μM, 30 минут, 37°C). Клетки обработали протонофором 50 nM FCCP.



JC-1 катионный карбоцианин, аккумулируется в митохондриях. Краситель существует как мономер в низких концентрациях и светится как флуоресцеин.
В высоких концентрациях краситель формирует J-агрегаты, максимум эмиссии 590 nm. Чувствительный маркер потенциала.

JC-1; $CBIC_2(3)$

5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide

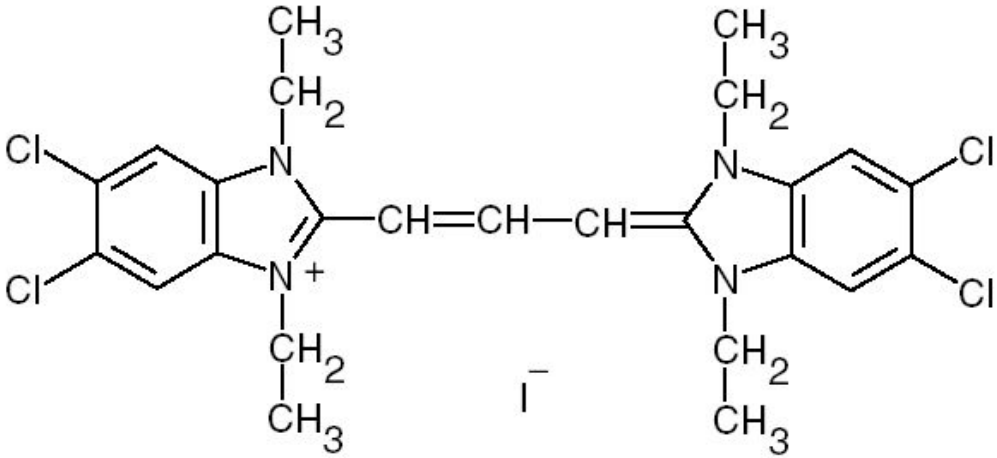
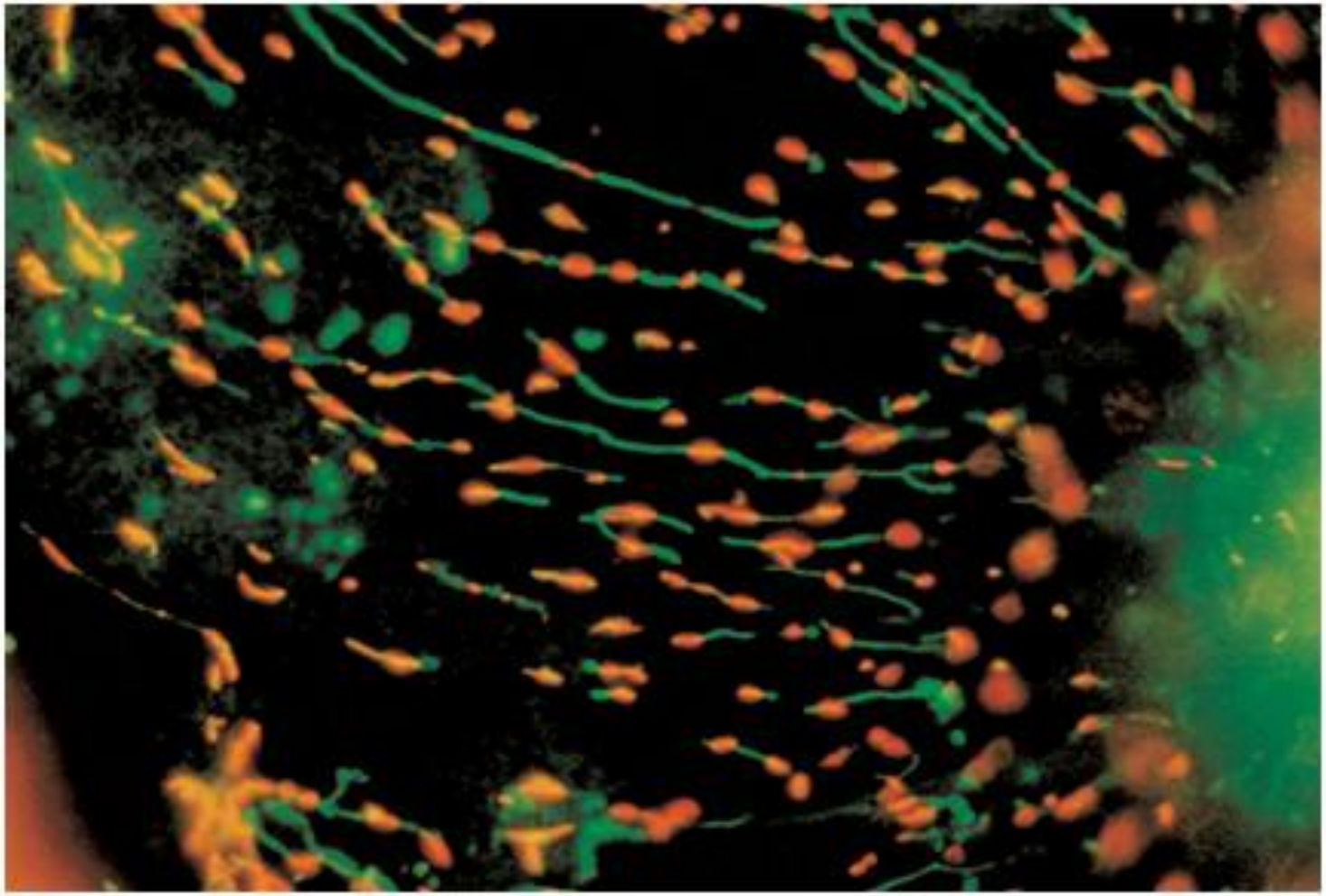


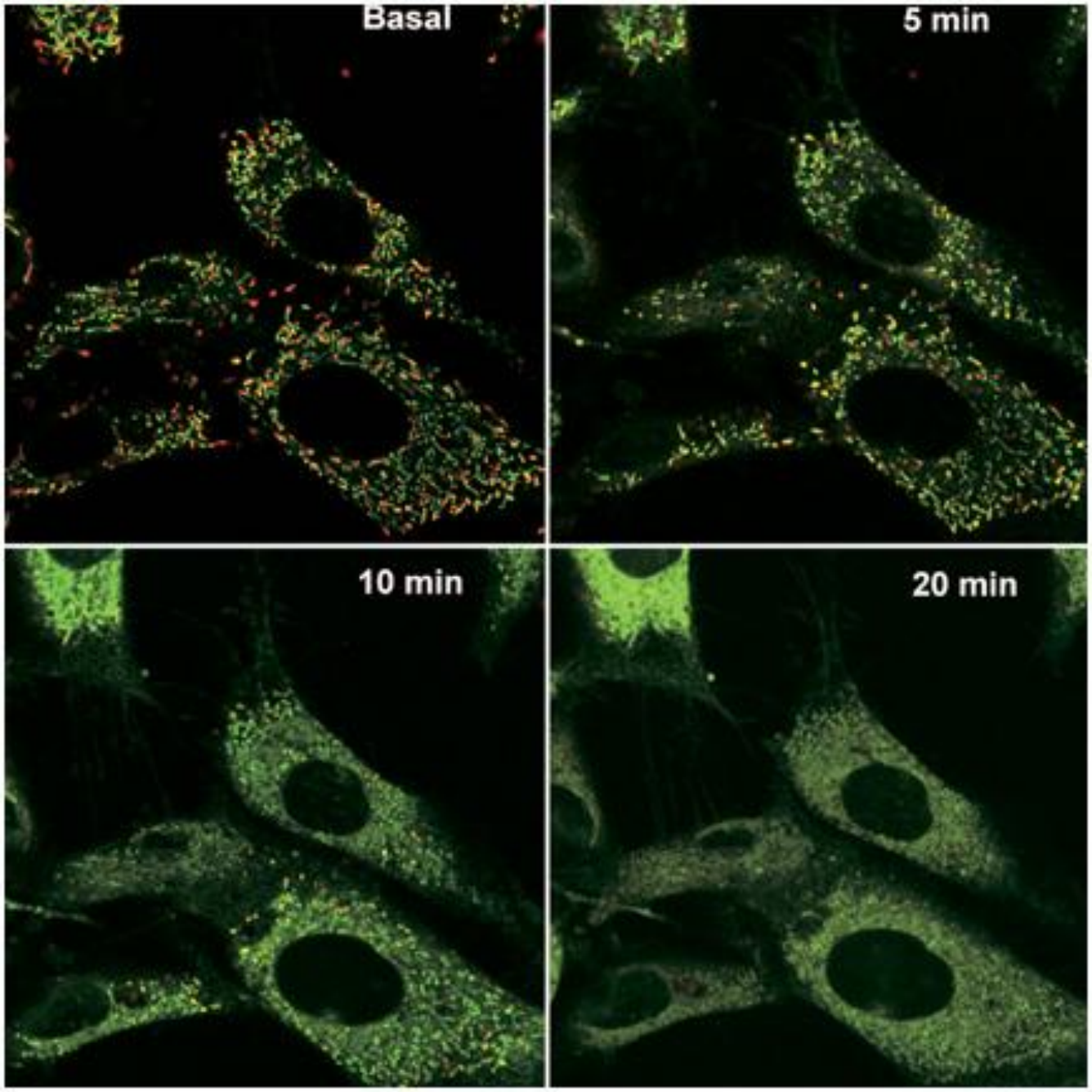
Table 3. Optical filters for fluorescence microscope imaging of JC-1.

Species Detected	Excitation	Dichroic	Emission
Monomer alone	485 ± 11 nm	505 nm	530 ± 15 nm
J-aggregate alone	535 ± 17.5 nm	570 nm	590 ± 17.5 nm
Monomer and J-aggregate, simultaneous	475 ± 20 nm	505 nm	≥510 nm
Monomer and J-aggregate, simultaneous	485 ± 11 nm	505 nm	530 ± 15 AND ≥590 nm

Фибробласты CCL64, окрашенные JC-1.



Фибробласты NIH 3T3, окраска JC-1, воздействие H_2O_2 .



Окрашивание кислого везикулярного компартмента.

Наиболее часто используемые окрашивания:

1. DAMP – сам не светится, нужны АТ

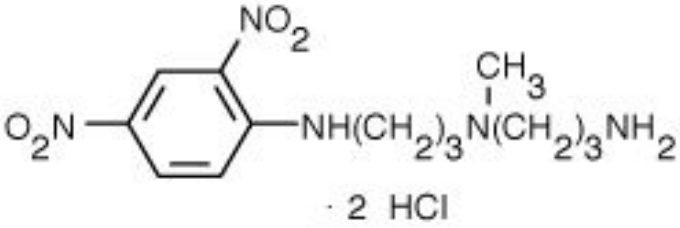
2. Акридиновый оранжевый

3. Нейтральный красный

4. LysoTracker – быстрое окрашивание, стабильность окрашивания, разные цвета, 50 нМ, обычно сохраняется при фиксации. Разные лизотрекеры окрашивают лизосомы с разным pH.

– накапливаясь в лизосомах повышают pH, т.е. Инкубация должна быть до 5 минут.

D1552
N-(3-((2,4-dinitrophenyl)amino) propyl)-*N*-(3-aminopropyl)methy lamine, dihydrochloride (DAMP).



Окрашивание кислого везикулярного компартмента.

Нейтральный красный – накапливается в лизосомах, можно использовать и для определения числа погибших и выживших клеток.

Данзил кадаверин (dansyl cadaverine). Связывается специфически с аутофагическими вакуолями, и, потом, с лизосомами. Не аккомулируется в ранних и поздних эндосомах. ???????

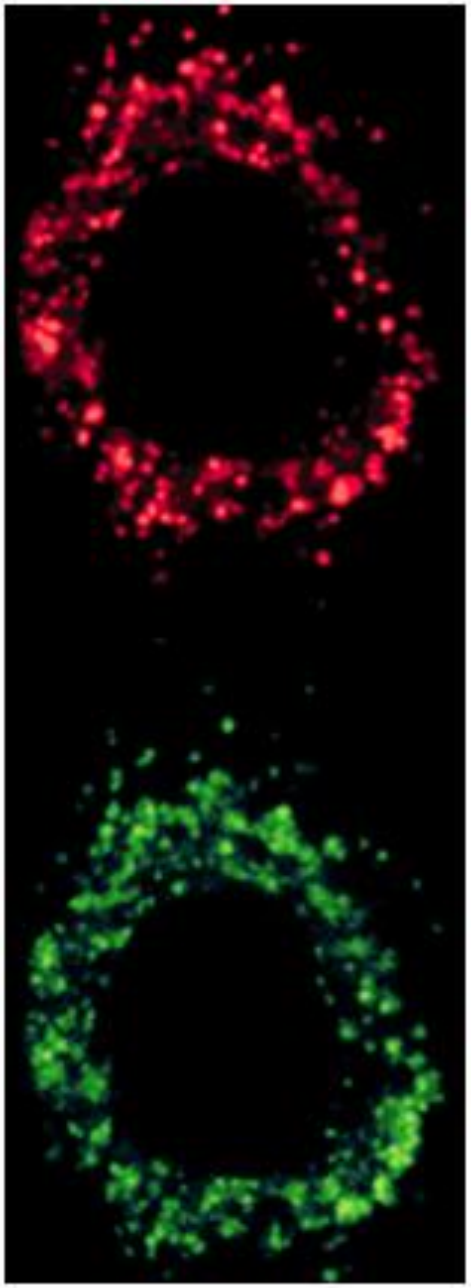
Акридиновый оранжевый – окрашивает так же ДНК и РНК .

Фибробласты крысы, окраска LysoTracker Yellow HCK-123 и LysoTracker Red DND-99.

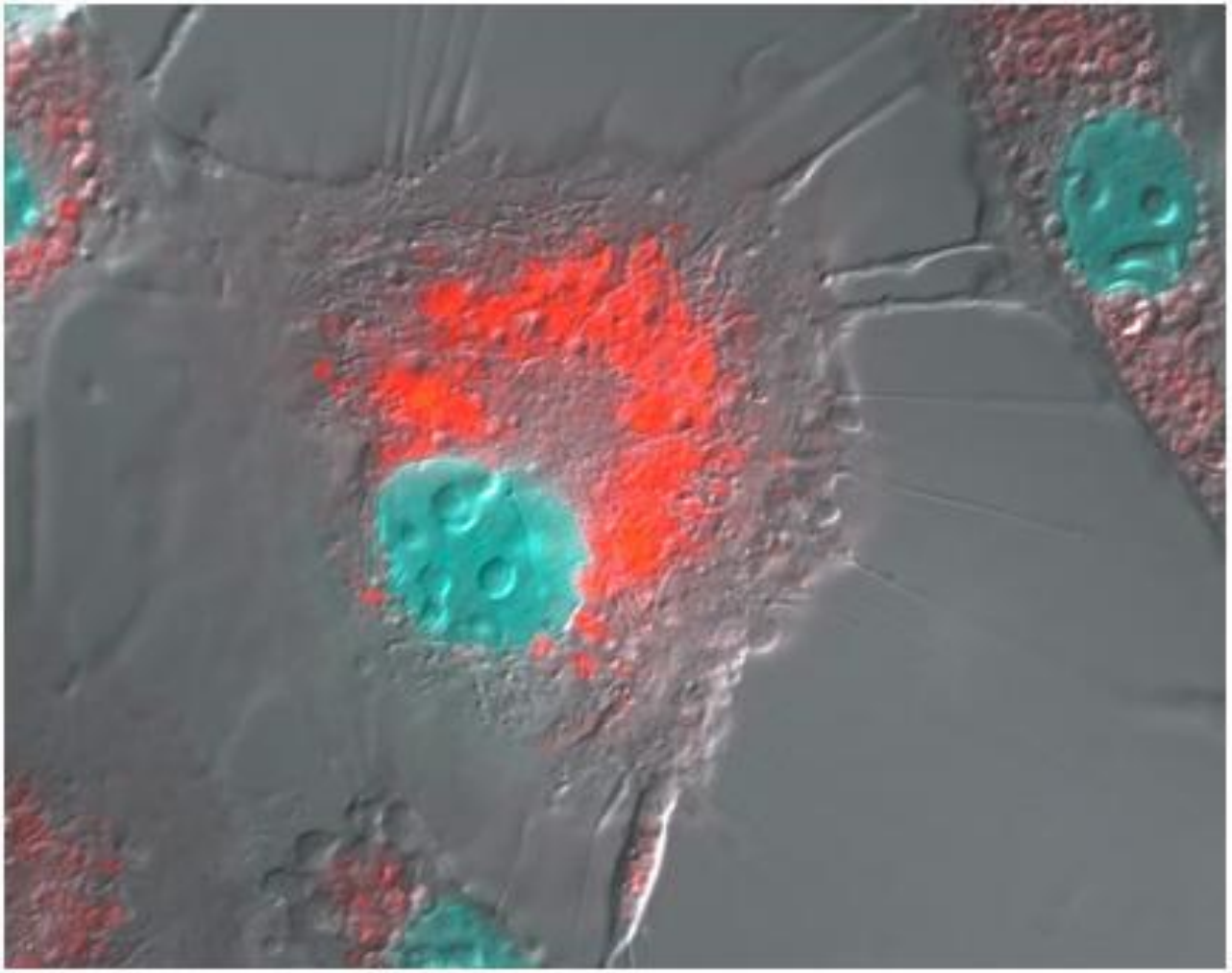
Table 2. Summary of our LysoTracker® and LysoSensor™ probes.

Cat #	Probe	Abs * (nm)	Em * (nm)	pK_a
L7525	LysoTracker® Blue DND-22	373	422	NA
L12490	LysoTracker® Blue-White DPX	380	†	NA
L7526	LysoTracker® Green DND-26	504	511	NA
L12491	LysoTracker® Yellow-HCK-123	465	535	NA
L7528	LysoTracker® Red DND-99	577	590	NA
L7533	LysoSensor™ Blue DND-167	373	425	5.1
L7535	LysoSensor™ Green DND-189	443	505	5.2
L7534	LysoSensor™ Green DND-153	442	505	7.5
L7545	LysoSensor™ Yellow/Blue DND-160	329, 384 ‡	440, 540 ‡	4.2
L22460	LysoSensor™ Yellow/Blue dextran	335, 381 ‡	452, 521 ‡	3.9

* Absorption (Abs) and fluorescence emission (Em) maxima, determined in aqueous buffer or methanol; values may vary somewhat in cellular environments. † Emission is extremely sensitive to environment; stained lysosomes appear blue-white, although the emission maximum in methanol is 576 nm. ‡ Dual-absorption and dual-emission maxima, sensitive to pH (see Figure 1).



Культура клеток эндотелия. Окраска LysoTracker Red DND-99, a BODIPY derivative, and Hoechst 33342



LysoTracker® and LysoSensor™ Probes

Table 1. Contents and storage information.

Material	Amount	Concentration	Storage	Stability
LysoTracker® and LysoSensor™ dyes	20 vials, each containing 50 µL	1 mM stock solution in high-quality, anhydrous DMSO	• ≤–20°C • Desiccate • Protect from light • Avoid freeze-thaw cycles • Do not store in a frost-free freezer • Store in single-use aliquots, if possible	When stored as directed, products are stable for at least 6 months *
LysoSensor™ Yellow/Blue dextran	5 mg, lyophilized solid	NA	• ≤–20°C • Desiccate • Protect from light	When stored as directed, product is stable at least 1 year

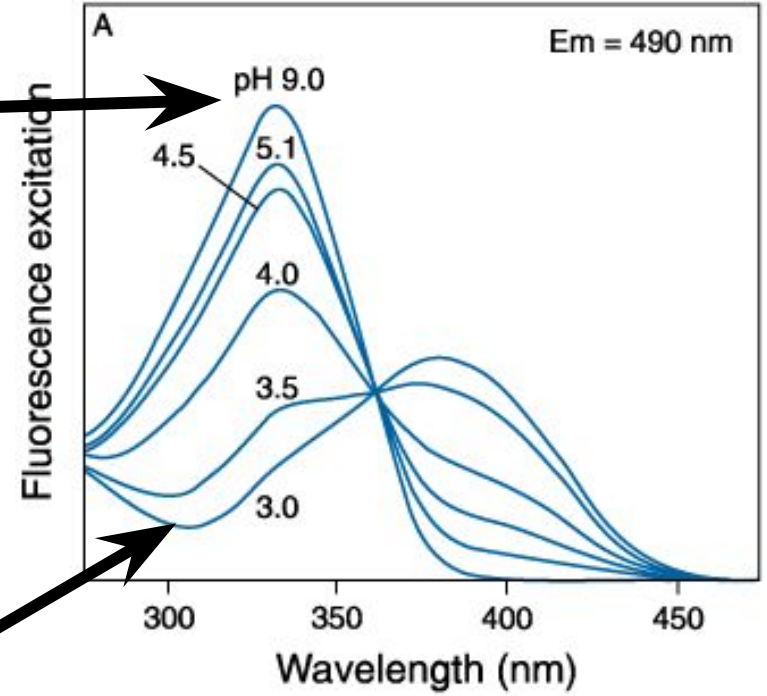
* If refreezing after use, be sure to seal the vial tightly.

Approximate Fluorescence Excitation and Emission, in nm: See Table 2.

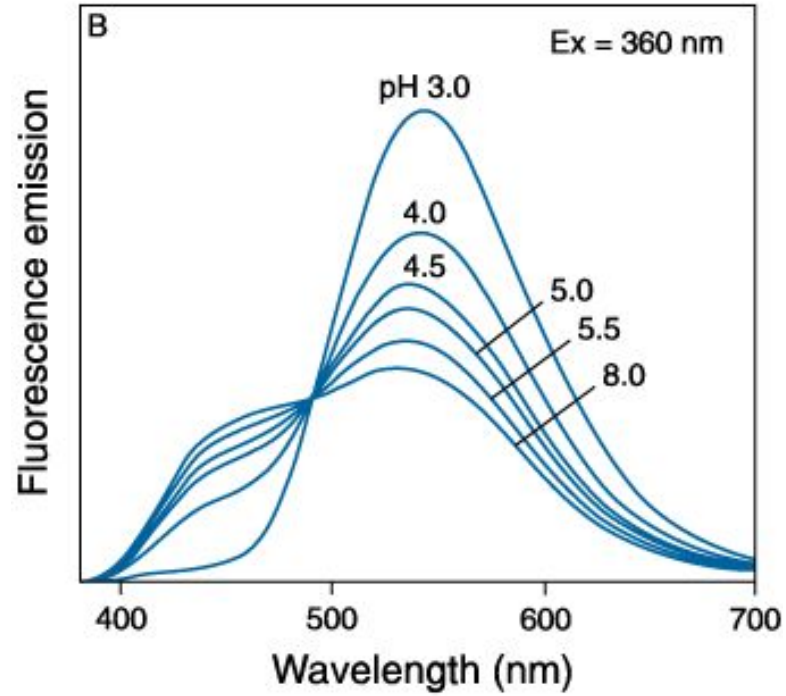
ранние эндосомы

Спектральный ответ LysoSensor Yellow/Blue DND-160 зависит от pH везикулы.
A) возбуждение
B) эмиссия.

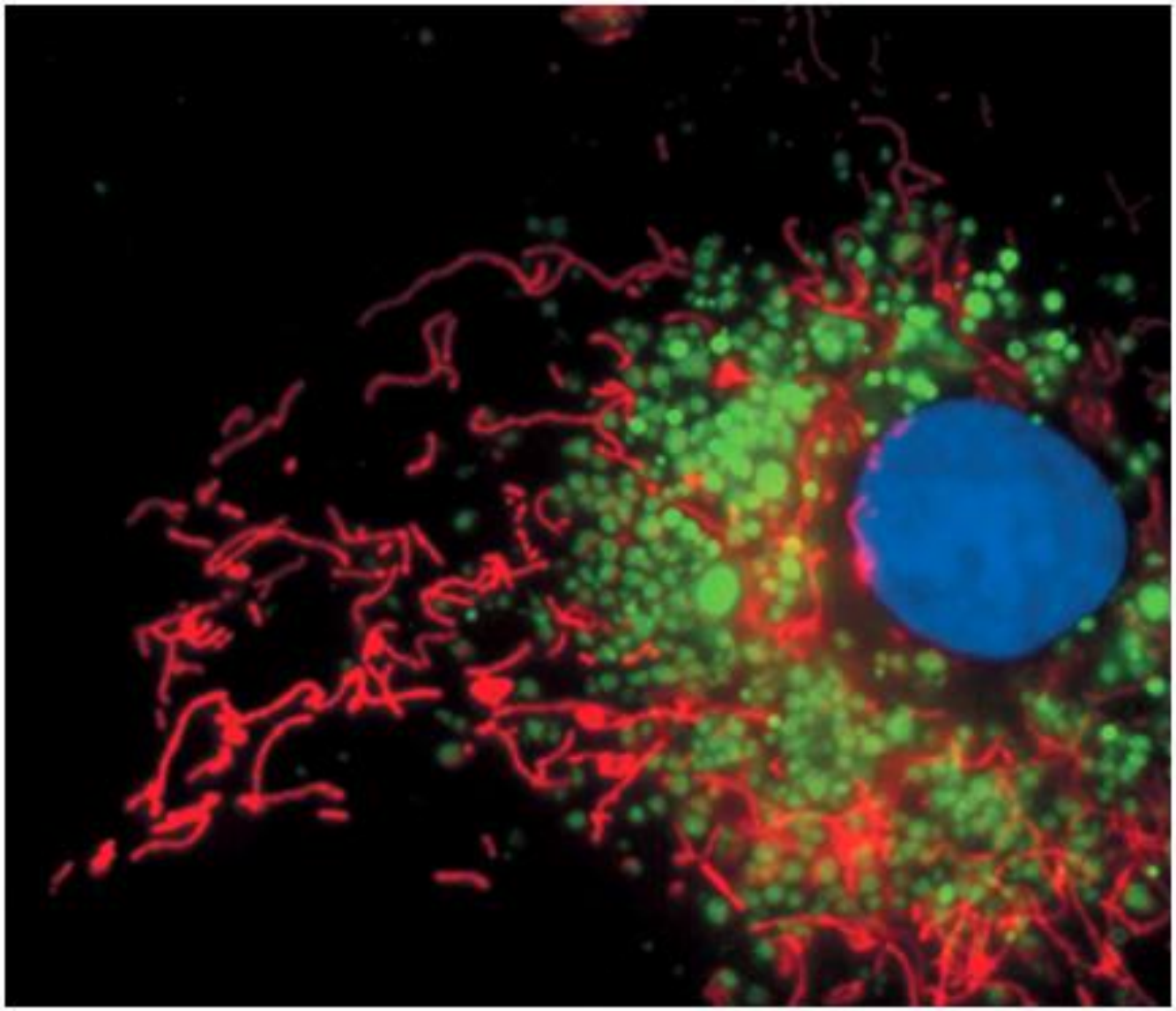
эндолизосомы



декстран



Клетки культуры эндотелия. MitoFluor Far Red 680, LysoTracker Green DND-26 и Hoechst 33342.



Клетки культуры эндотелия. Окраска 50 nM LysoTracker Red DND-99 и 75 nM MitoTracker Green FM (M7514) at 37°C for 30 minutes.
Фиксация 3% глютаровым альдегидом 30 минут.
Деконволюция.

Окрашивание ЭПР

Карбоцианины DiOC,

Производные родамина

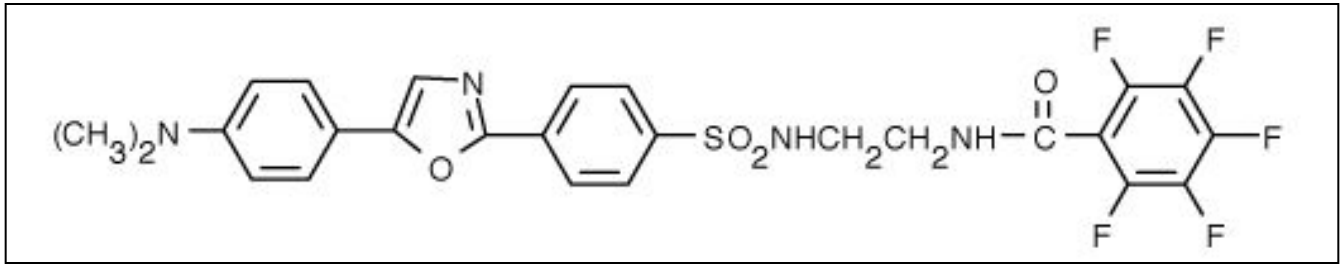
ER-Tracker

Высокие концентрации 50 μM

Table 1. Spectral characteristics of ER-Tracker™ dyes.

Dye	Ex/Em *	Filter
ER-Tracker™ Blue-White DPX dye	374/430–640 †	DAPI or UV longpass
ER-Tracker™ Green dye	504/511	FITC
ER-Tracker™ Red dye	587/615	TRITC

* Excitation (Ex) and emission (Em) maxima, in nm, measured in methanol.
† Dapoxyl™ dyes have highly environment-sensitive fluorescence, resulting in variable peak emission values.



ER-Tracker Blue-White DPX.

ER-Tracker™ Dyes for Live-Cell Endoplasmic Reticulum Labeling

ER-Tracker™ Blue-White DPX
ER-Tracker™ Green (glibenclamide BODIPY® FL)
ER-Tracker™ Red (glibenclamide BODIPY® TR)

Quick Facts

Storage upon receipt:

- ≤–20°C
- Avoid freeze-thaw cycles
- Protect from light

Ex/Em:

- 374/430–640 nm (ER-Tracker™ Blue-White DPX dye)
- 504/511 nm (ER-Tracker™ Green dye)
- 587/615 nm (ER-Tracker™ Red dye)

Introduction

ER-Tracker™ dyes are cell-permeant, live-cell stains that are highly selective for the endoplasmic reticulum (ER). These dyes rarely stain mitochondria, unlike the conventional ER stain $DiOC_6(3)$, and staining at low concentrations does not appear to be toxic to cells. When cells are stained using the optimized protocol provided, staining patterns are partially retained after treatment with formaldehyde.

ER-Tracker™ Blue-White DPX (E12353) is a member of our Dapoxyl™ (DPX) dye family. DPX dyes have long emission wavelengths, high extinction coefficients, high quantum yields, and large Stokes shifts,[1] and are environment-sensitive probes—with increasing solvent polarity, the fluorescence maxima shift to longer wavelengths and the quantum yield decreases.

ER-Tracker™ Green and ER-Tracker™ Red dyes are the drug conjugates glibenclamide BODIPY® FL and glibenclamide BODIPY® TR, respectively. Glibenclamide (glyburide), a drug taken daily by millions of diabetic patients to correct hyperglycemia, has been used to investigate pancreatic β-cell activity and insulin secretion [2,3] and to study myocardial cell function and heart arrhythmia.[4,5] Glibenclamide binds to the sulphonylurea receptors of ATP-sensitive K^+ channels,[6] which are prominent on ER; the pharmacological activity of glibenclamide could potentially affect ER function. Variable expression of sulphonylurea receptors in some specialized cell types may result in non-ER labeling.

Materials

Contents

ER-Tracker™ Blue-White DPX dye (MW = 580.53) is packaged as a set of 20 separate vials, each containing 50 µL of a 1 mM stock solution in high-quality, anhydrous dimethylsulfoxide (DMSO). ER-Tracker™ Green dye (MW = 783.1) and ER-Tracker™ Red dye (MW = 915.23) are each provided as 100 µg of lyophilized material.

Storage and Handling

Upon receipt, these products should be stored with desiccant at ≤–20°C. AVOID REPEATED FREEZING AND THAWING; AVOID STORING THESE PRODUCTS IN A FROST-FREE FREEZER. When stored properly, these reagents are stable for at least six months.

Note: DMSO stock solutions should be handled with particular caution as DMSO is known to facilitate the entry of organic molecules into tissues. Dispose of these reagents in compliance with all pertaining local regulations.

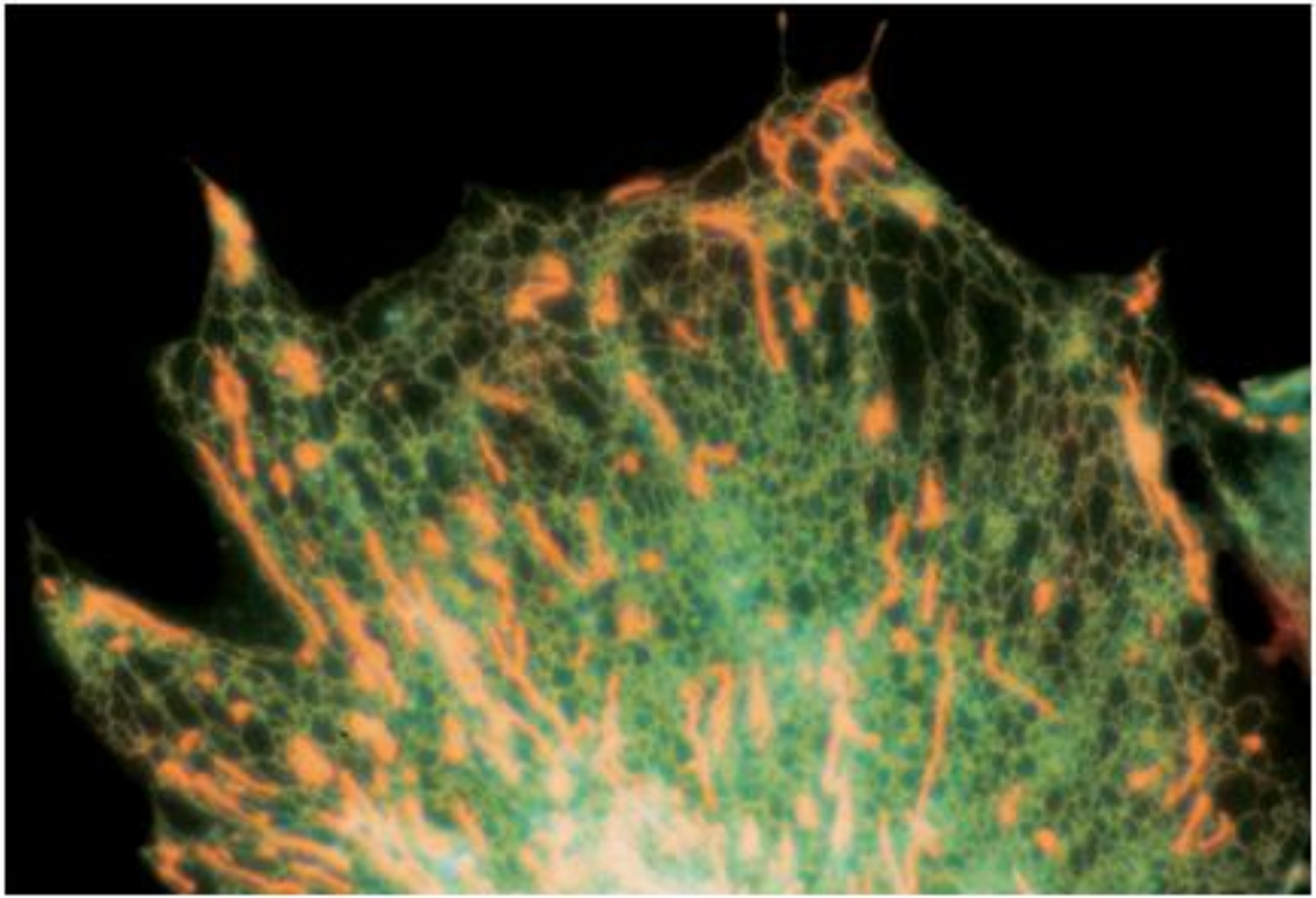
Materials Required but not Provided

High-quality, anhydrous DMSO (for ER-Tracker™ Green and ER-Tracker™ Red dyes)

Spectral Characteristics

Spectral properties of the ER-Tracker™ dyes are listed in Table 1.

ER-Tracker Blue-White DPX и MitoTracker Red CM-H_2XRos .



Окрашивание аппарата Гольджи

ЦЕРАМИД И ЕГО АНАЛОГИ.

NBD C_6-ceramide
NBD C_6-Sphingomyelin
BODIPY FL C_5-ceramide

– флуоресцииновый фильтр,селективное окрашивание АГ.
– липиды мембран

Figure 1. BODIPY FL– and NBD-labeled ceramide analogs.

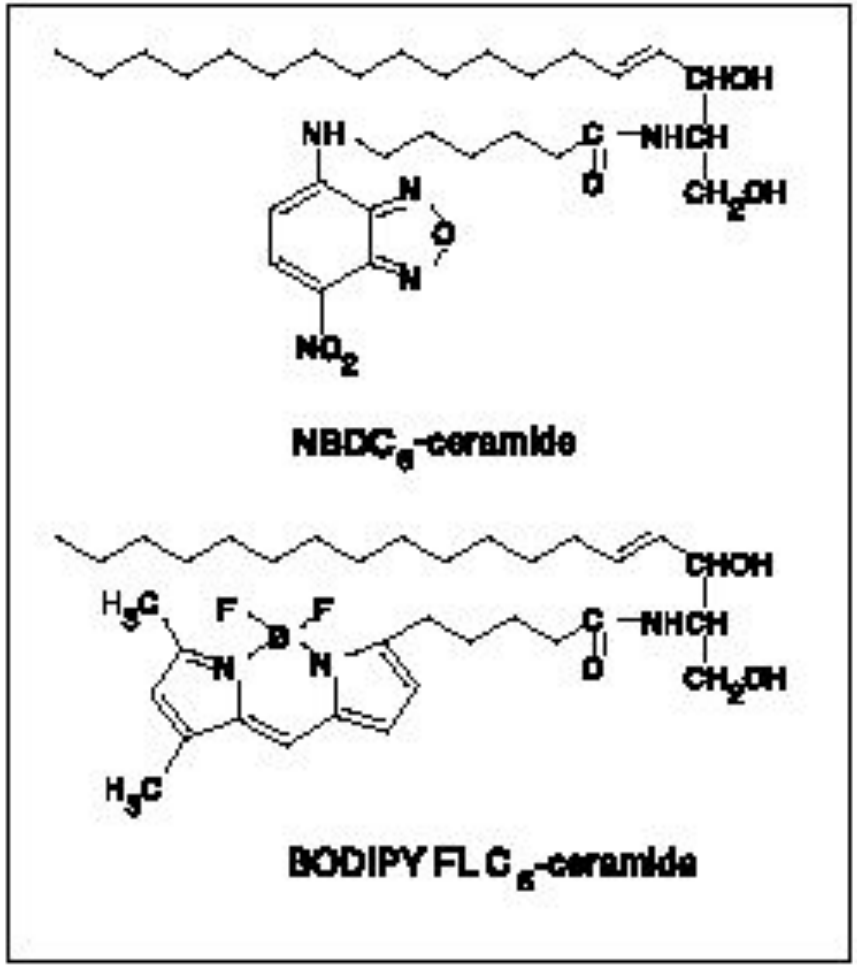


Table 1. Spectral characteristics of NBD-, BODIPY FL– and BODIPY TR–labeled sphingolipids.

Label	Abs *	Em *
BODIPY FL	505	511 †
BODIPY TR	589	617
NBD	466	536

* Absorption and fluorescence emission maxima, in nm, determined in methanol. Values in labeled cells are similar. † BODIPY FL-labeled sphingolipids also emit red fluorescence (~620 nm) in cells.

NBD- and BODIPY Dye–Labeled Sphingolipids

Introduction

Fluorescent sphingolipids are versatile probes of lipid trafficking in living cells.[1,2] In addition, ceramide analogs produce selective staining of the Golgi complex for visualization by fluorescence microscopy. Molecular Probes' fluorescently labeled analogs of ceramides, sphingomyelins and glycosylceramides are prepared from D-*erythro*-sphingosine and therefore have the same stereochemical conformation as natural biologically active sphingolipids. Applications of these fluorescent lipid probes include:

Ceramides

- Fluorescent structural marker for Golgi Complex[3,4]
- Outlining cellular boundaries to allow observation of morphogenetic movements by confocal microscopy[5]
- Tracing lipid metabolism and trafficking in living cells[6-8]
- Measuring rates of lipid synthesis by Schwann cells[9]

Sphingomyelins

- Tracing lipid endocytosis pathways by fluorescence microscopy[7,10,11]
- Analysis of acid sphingomyelinase expression by flow cytometry[12]

Glycosylceramides

- Cellular-level identification of lysosomal lipid storage disorder phentotypes[13,14]
- Visualization of lipid domains associated with T cell antigen receptor activation[15]

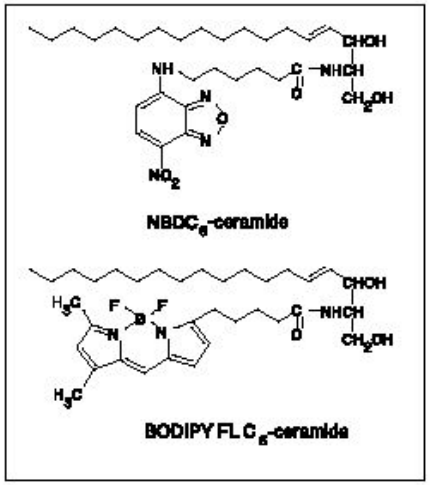
The BODIPY FL and NBD fluorophores incorporated in Molecular Probes' fluorescent sphingolipids (Figure 1) have significantly different spectroscopic properties. The BODIPY FL fluorophore produces greater fluorescence output than NBD due to its higher molar absorptivity and fluorescence quantum yield.[16] The BODIPY FL fluorophore is also more photostable than NBD. The photostability of NBD is sensitive to the presence of cholesterol, resulting in weak labeling of the Golgi complex in cholesterol-deficient cells.[17] The most practically important spectroscopic property of the BODIPY FL fluorophore is an aggregation-dependent shift from green- to red-fluorescence emission due to intermolecular excimer formation. Consequently, structures that accumulate large amounts of BODIPY FL–labeled sphingolipids, such as the Golgi complex[3] or the lysosomes of sphingolipid storage disease fibroblasts,[7,13] exhibit red fluorescent staining that is clearly distinct from low-abundance green fluorescent staining. The BODIPY TR fluorophore exhibits red fluorescence (~617 nm) in its normal monomeric state; aggregation-dependent emission shifts corresponding to those of the BODIPY FL fluorophore have not yet been detected.

The transport and metabolism of labeled sphingolipids is somewhat dependent on the attached fluorophore.[6] In some cases, significant differences have been observed in the metabolic products derived from homologous BODIPY FL– and NBD-labeled sphingolipids.[3,18] NBD-labeled sphingolipids have higher rates of transfer through aqueous phases than their BODIPY FL–labeled counterparts.[19] Analysis of lipid incorporation and recycling by quantitative removal of labeled lipids from the plasma membrane outer surface ("back-exchange") is more readily accomplished using NBD-labeled sphingolipids.[2]

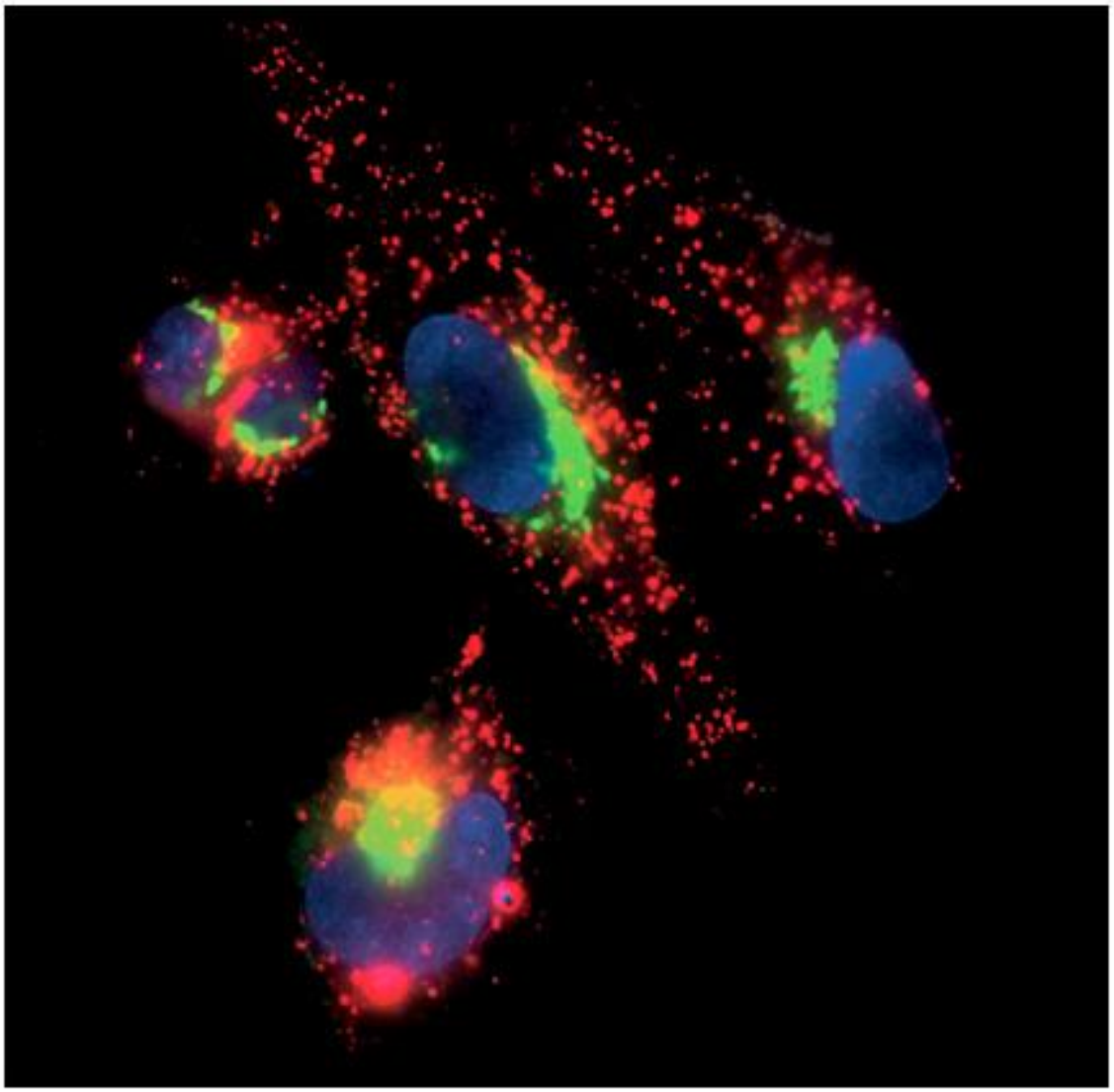
Storage and Handling

With the exception of BODIPY FL C_{12}-sphingomyelin, all fluorescent sphingolipids are supplied in solid form and should be stored at –20°C, desiccated and protected from light. Ceramide analogs can be dissolved in DMSO or chloroform at concentrations of at least 1 mM. Sphingomyelins and glycosylceramides can be dissolved in DMSO or ethanol to the same extent. Delivery in the form of bovine serum albumin (BSA) complexes is recommended for labeling cells (see *Experimental Protocols*). BODIPY FL C_5-ceramide, NBD C_6-ceramide and BODIPY TR C_5 ceramide are also available as ready-made BSA complexes (B-22650, N-22651, B-34400). Additional BSA-complexed sphingolipids include BODIPY FL C_5-ganglioside (B-34401) and BODIPY FL C_5-lactosylceramide (B-34402). These complexes are supplied in lyophilized form and should be stored at –20°C, desiccated and protected from light. Procedures for reconstitution of the lyophilized BSA complexes are described in the *Experimental Protocols*. BODIPY FL C_{12}-sphingomyelin is supplied as a 1 mg/mL solution in DMSO which should be stored at –20°C, desiccated and protected from light.

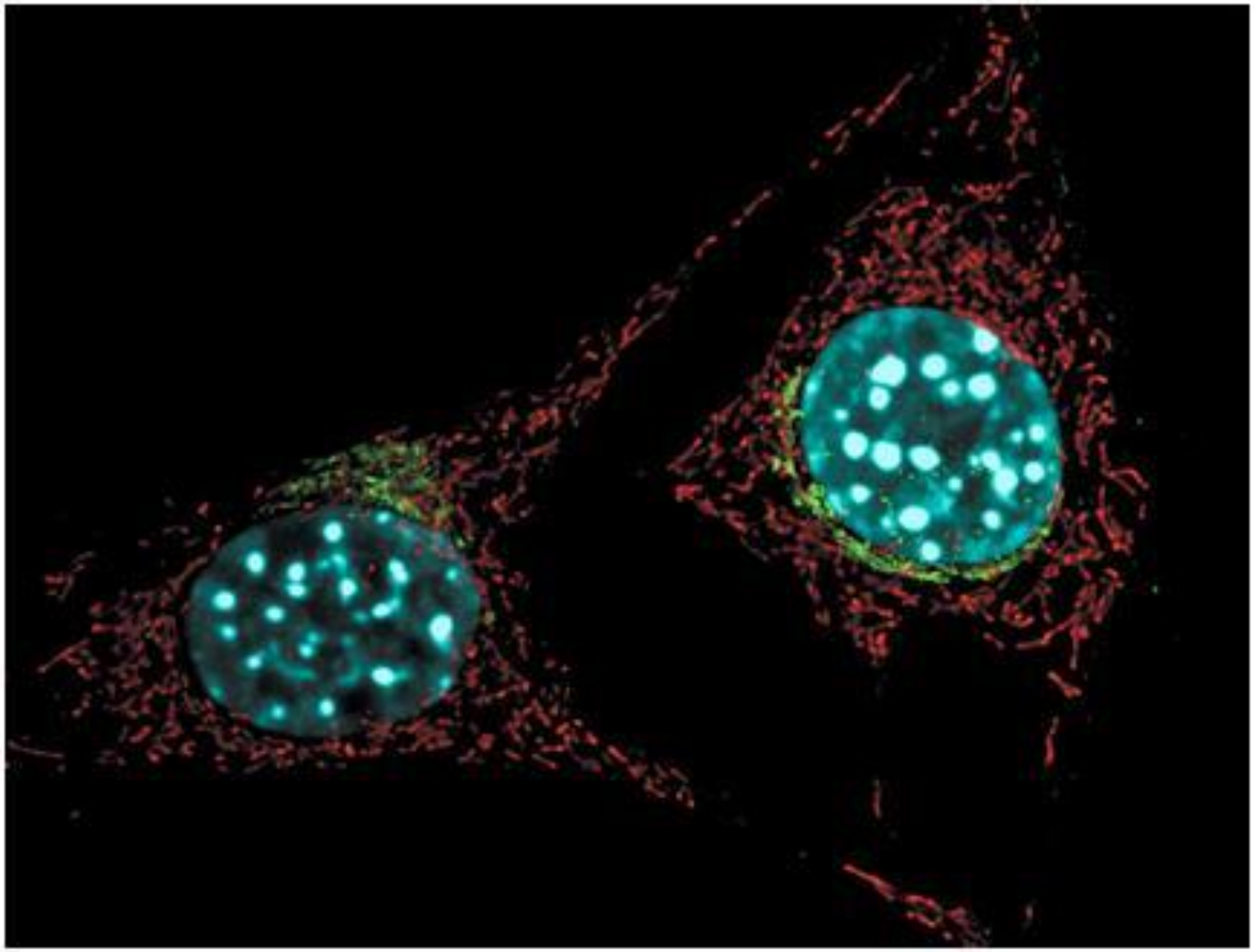
Figure 1. BODIPY FL– and NBD-labeled ceramide analogs.



MDCK, окраска BODIPY FL C_5-ceramide, LysoTracker Red DND-99, и Hoechst 33258



Прижизненное окрашивание клеток NIH 3T3 на митохондрии, аппарат Гольджи и ДНК. Митохондрии окрашены MitoTracker Red 580, аппарат Гольджи окрашен церамидом, ДНК окрашено Hoechst 33342. Деконволюция.



Ядерные красители

Hoechst 33258, Hoechst 33342 and DAPI

Окрашивание нуклеиновых кислот используется в анализе клеточного цикла Hoechst 33258, Hoechst 33342 (при связывании с ДНК усиление флуоресценции) и DAPI (связывается с АТ последовательностями нуклеотидов в ДНК). *Hoechst 33342* более быстро проникает в клетки используется для определения количества ДНК в живых клетках без фиксации.

Ethidium Bromide и его аналоги

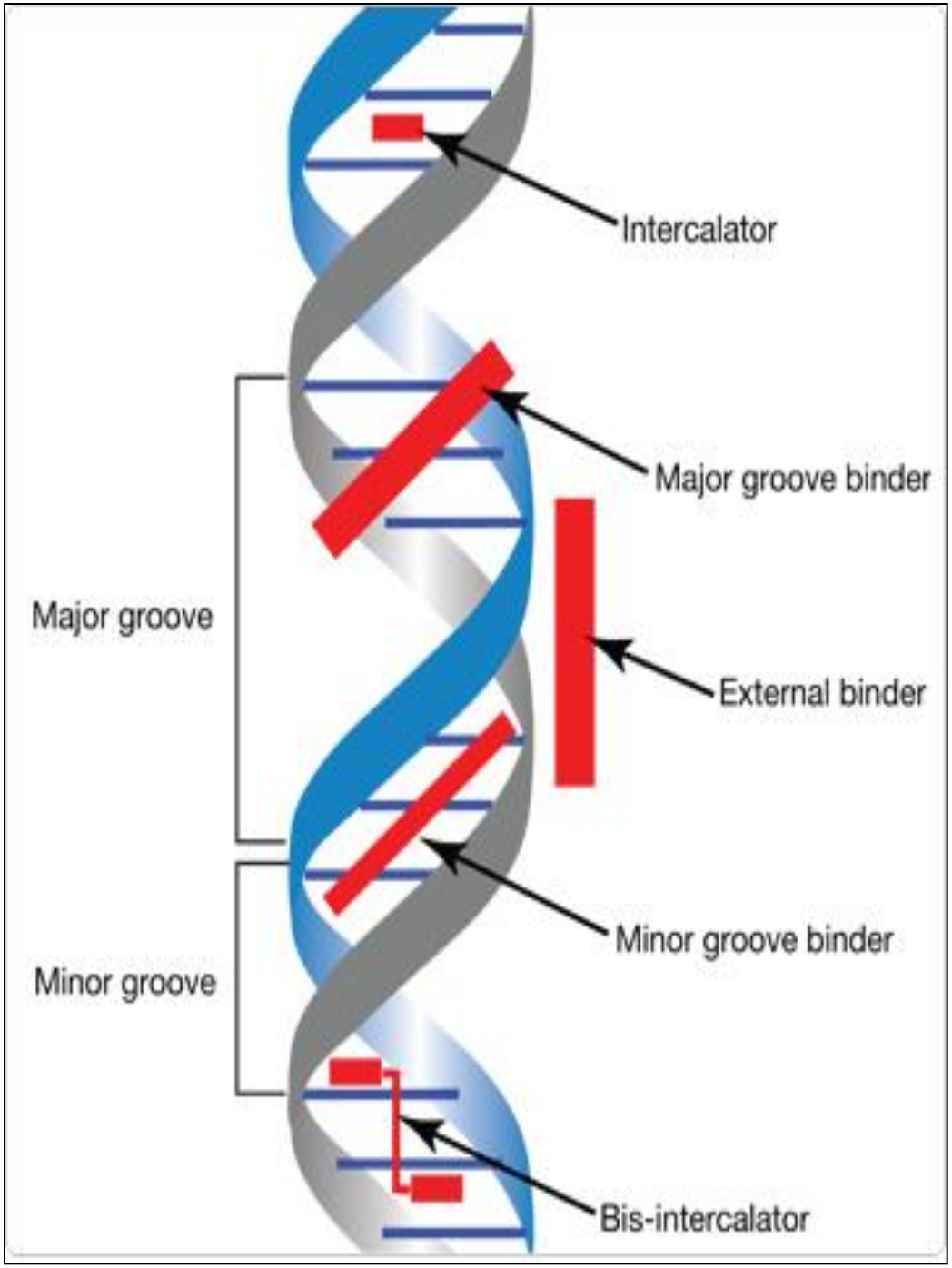
Этидиум бромид, этидиум гомодимер –1, пропидиум иодид и гексидиум иодид, интеркаляция между нуклеотидами. Красная флуоресценция. Не специфичны для ДНК. Поэтому используют РНК-азу при определения плоидности клеток.

Acridine Orange

Акридиновый оранжевый – зеленая флуоресценция при связывании с ДНК (двойная цепь) и красная флуоресценция при связывании с РНК (одиночная цепь).

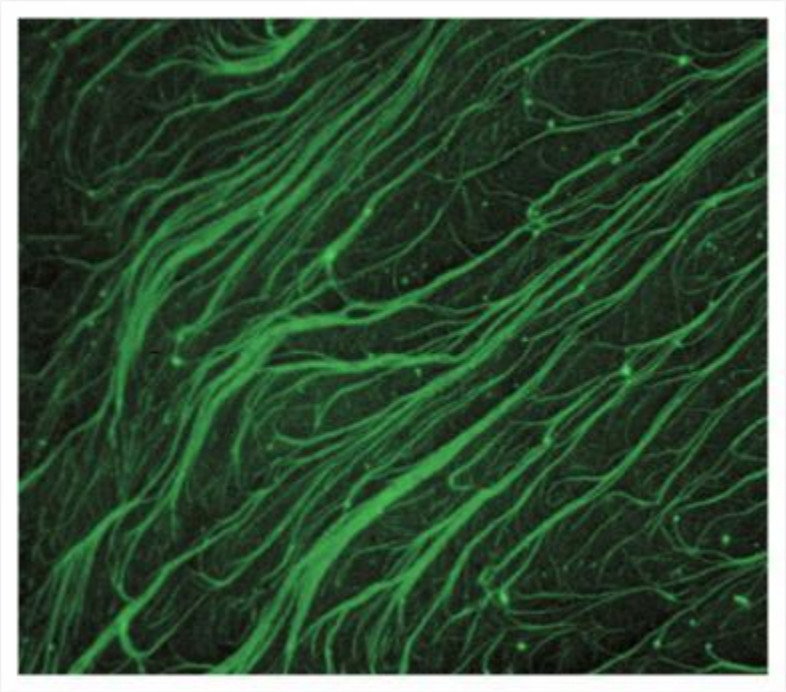
SYTO

SYTOX

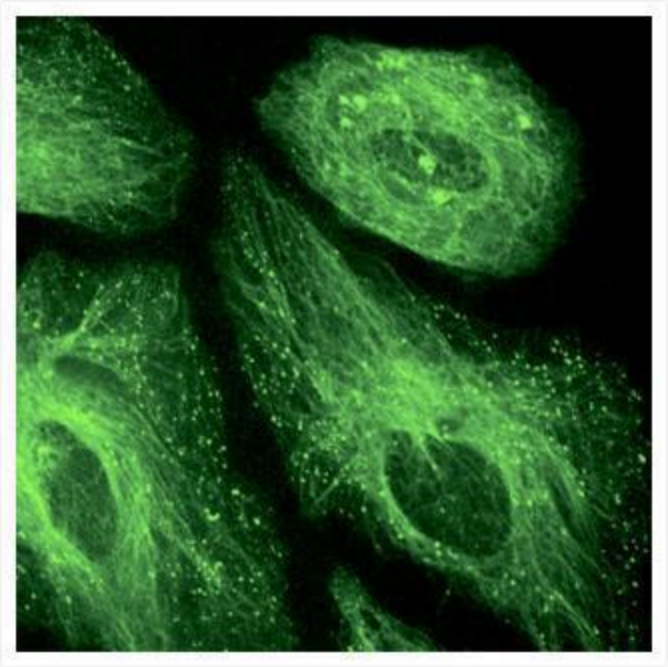


- **Intercalating dyes, such as ethidium bromide and propidium iodide**
- **Minor-groove binders, such as DAPI and the Hoechst dyes**
- **Other nucleic acid stains, including acridine orange, 7-AAD, LDS 751 and hydroxystilbamidine**

Окрашивание цитоскелета: микротрубочки



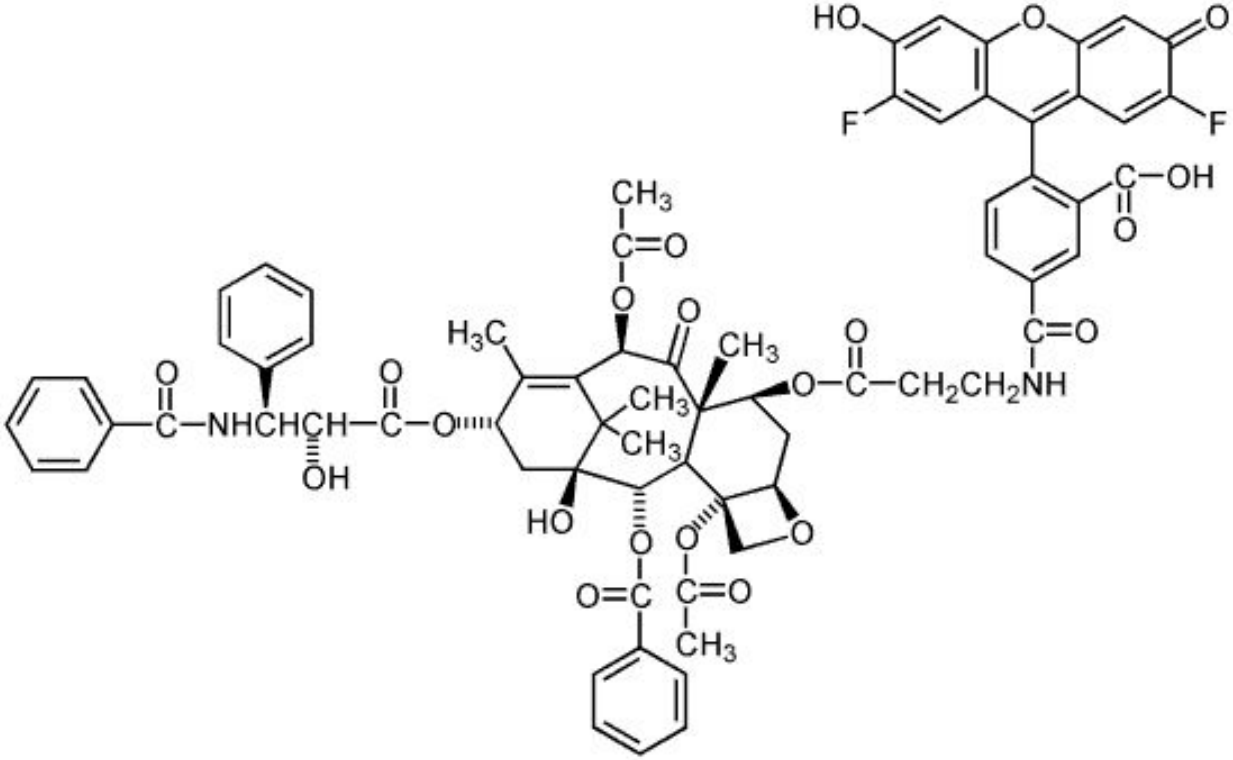
Oregon Green 514 tubulin



Oregon Green 488 paclitaxel

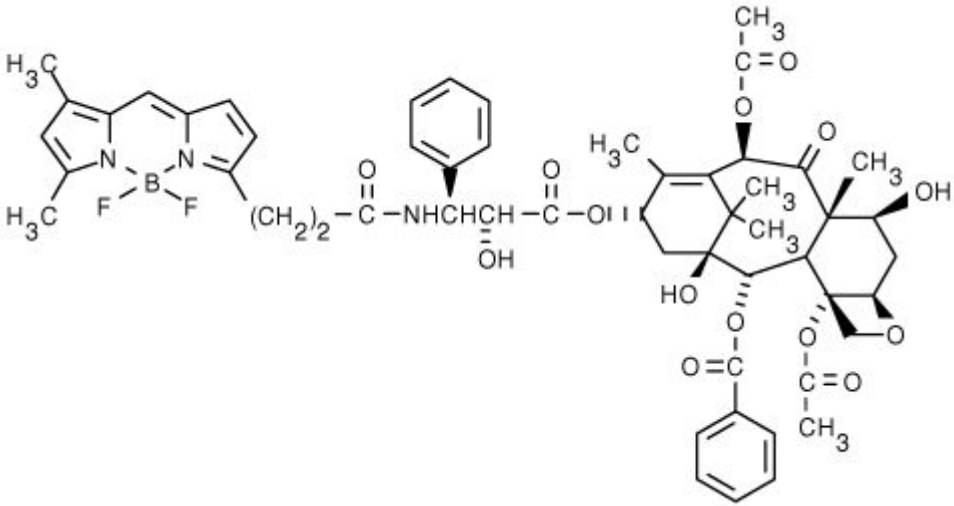
Viable HeLa cells were incubated with the conjugate for one hour, followed by several washes with phosphate-buffered saline containing 2% bovine serum albumin. The image was acquired using a confocal laser-scanning microscope and a filter set appropriate for fluorescein.

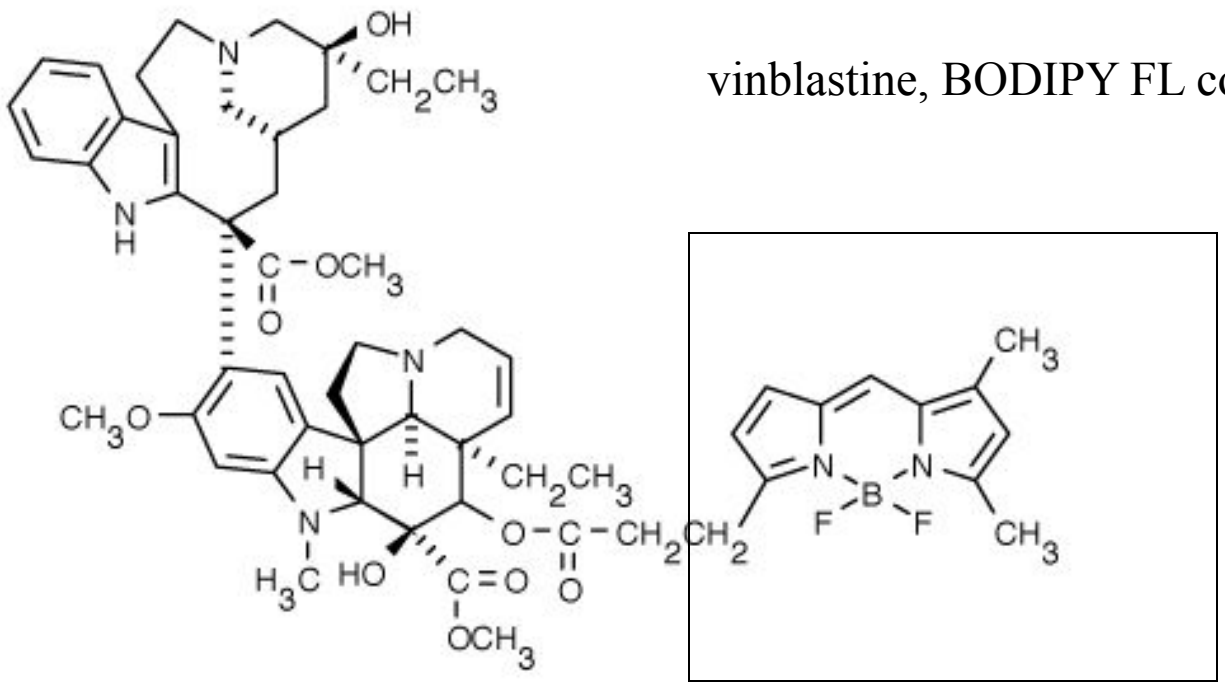
paclitaxel, Oregon Green 488 conjugate



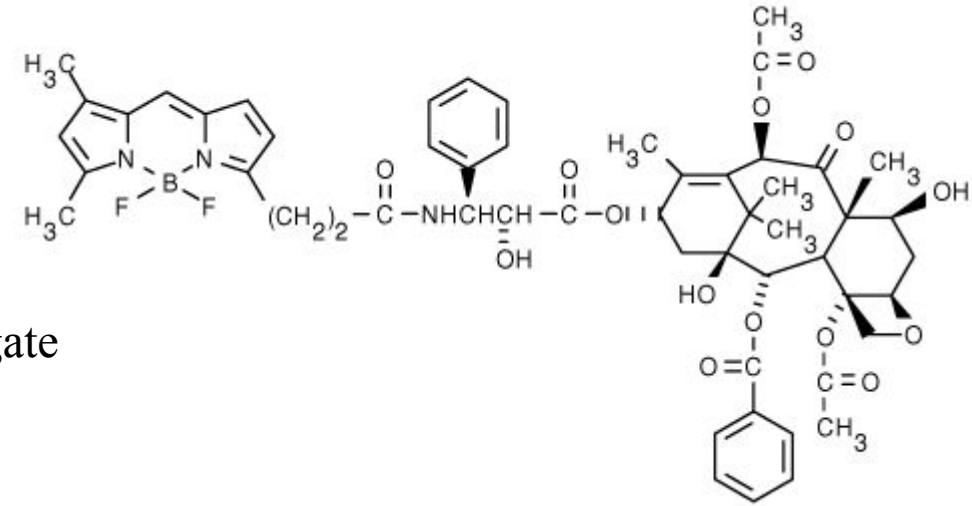
TubulinTracker Green

paclitaxel, BODIPY FL conjugate





vinblastine, BODIPY FL conjugate



paclitaxel, BODIPY FL conjugate

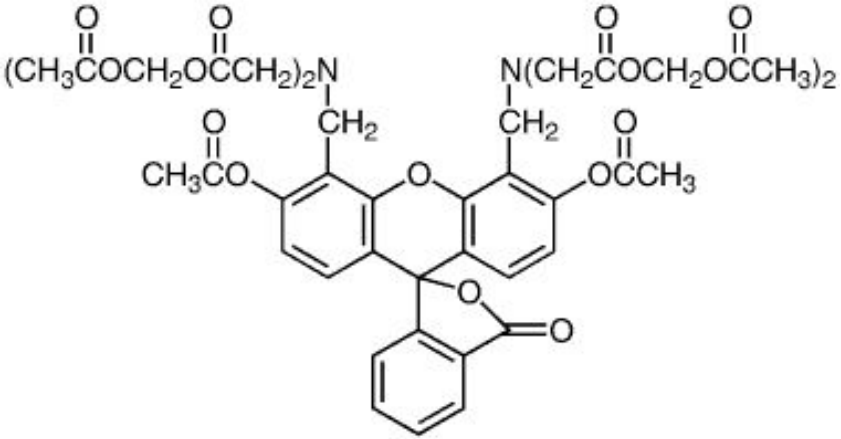
Выживаемость клеток

Viability/Cytotoxicity Kit

1. Кальцеин CellTrace calcein green AM
Эстераза
CellTrace Calceins: Calcein AM, Calcein Blue AM and Calcein Red-Orange AM

2. MTT
Сукцинатдегидрогеназа
формазан

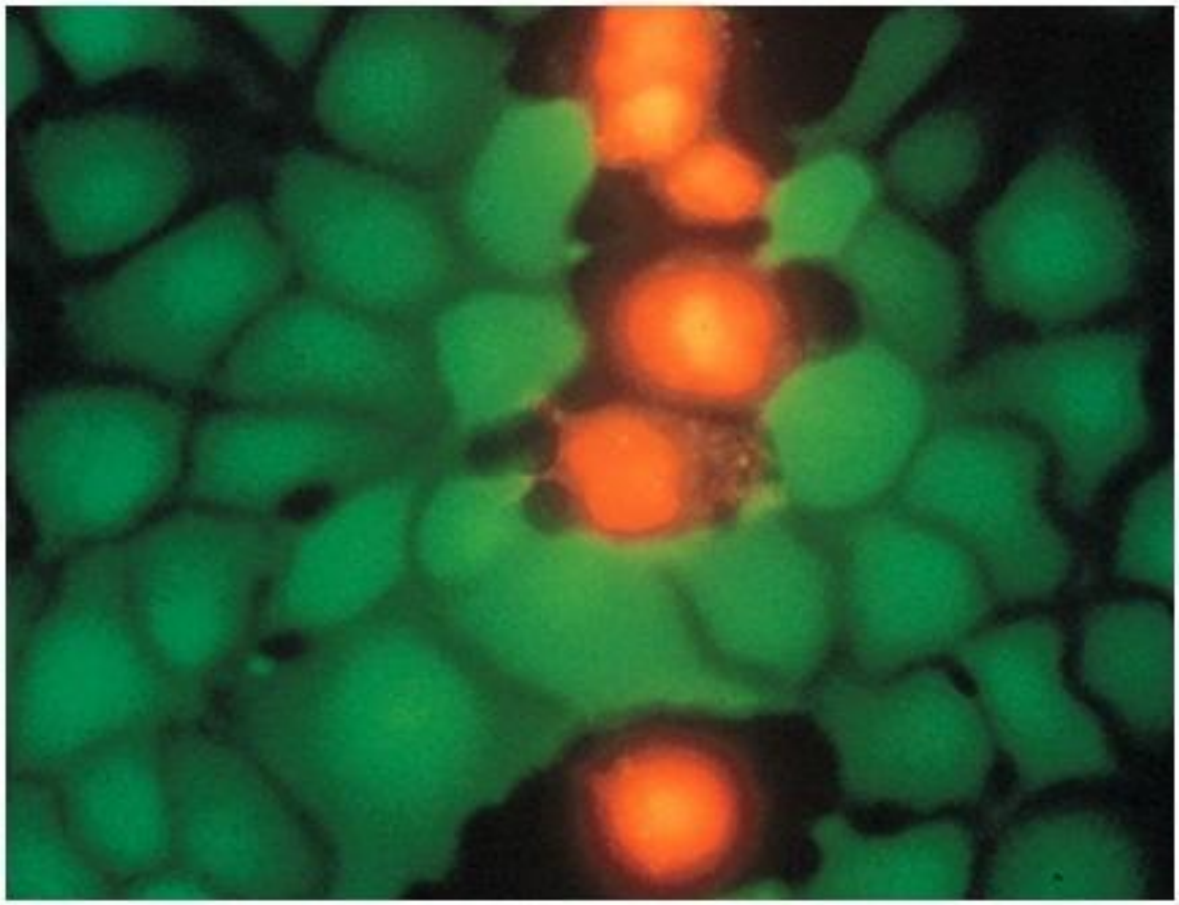
3. Ethidium and Propidium Dyes



5. CellTracker Green CMFDA

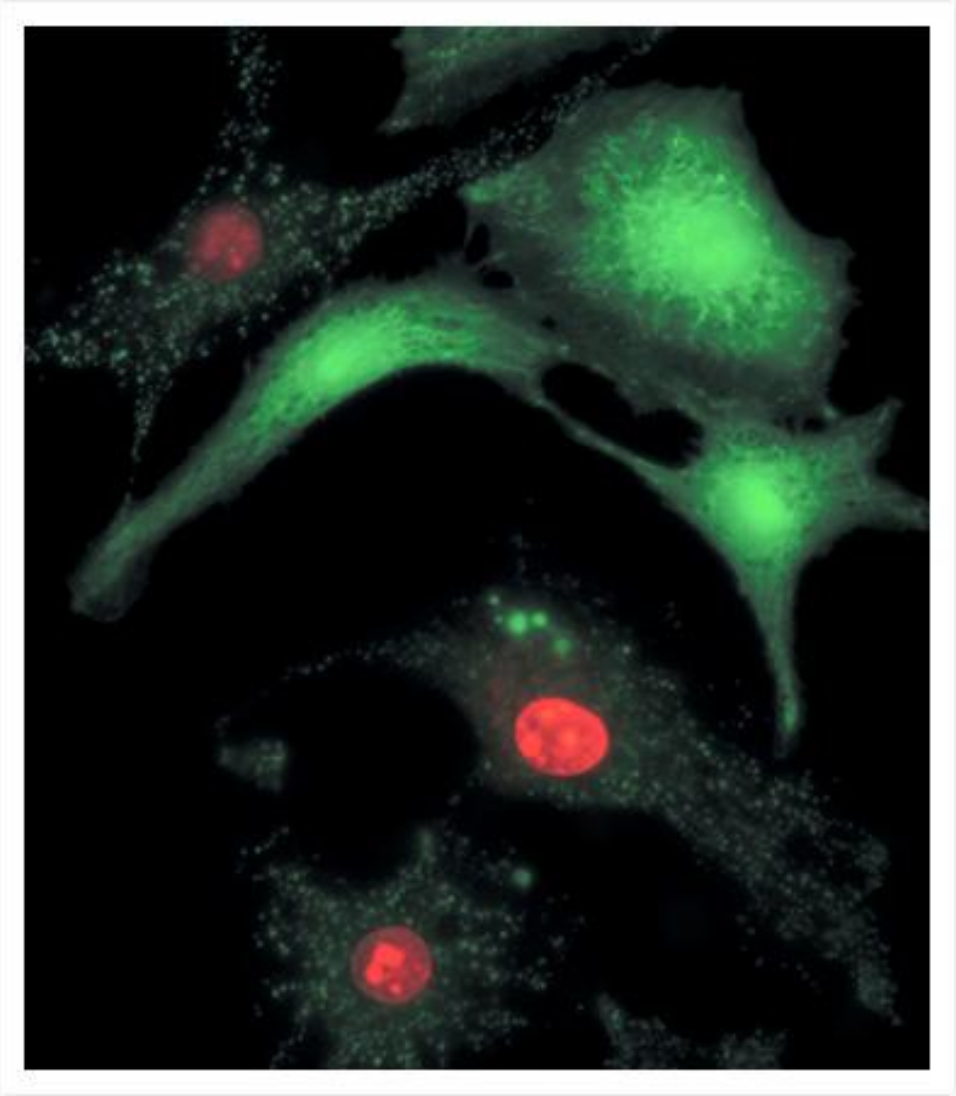
Остается в живых клетках в течении длительного времени – несколько поколений.
Используют при трансплантации.

Живые и погибшие клетки PtK2, окрашенные ethidium homodimer-1 и кальцеином (субстрат эстеразы).

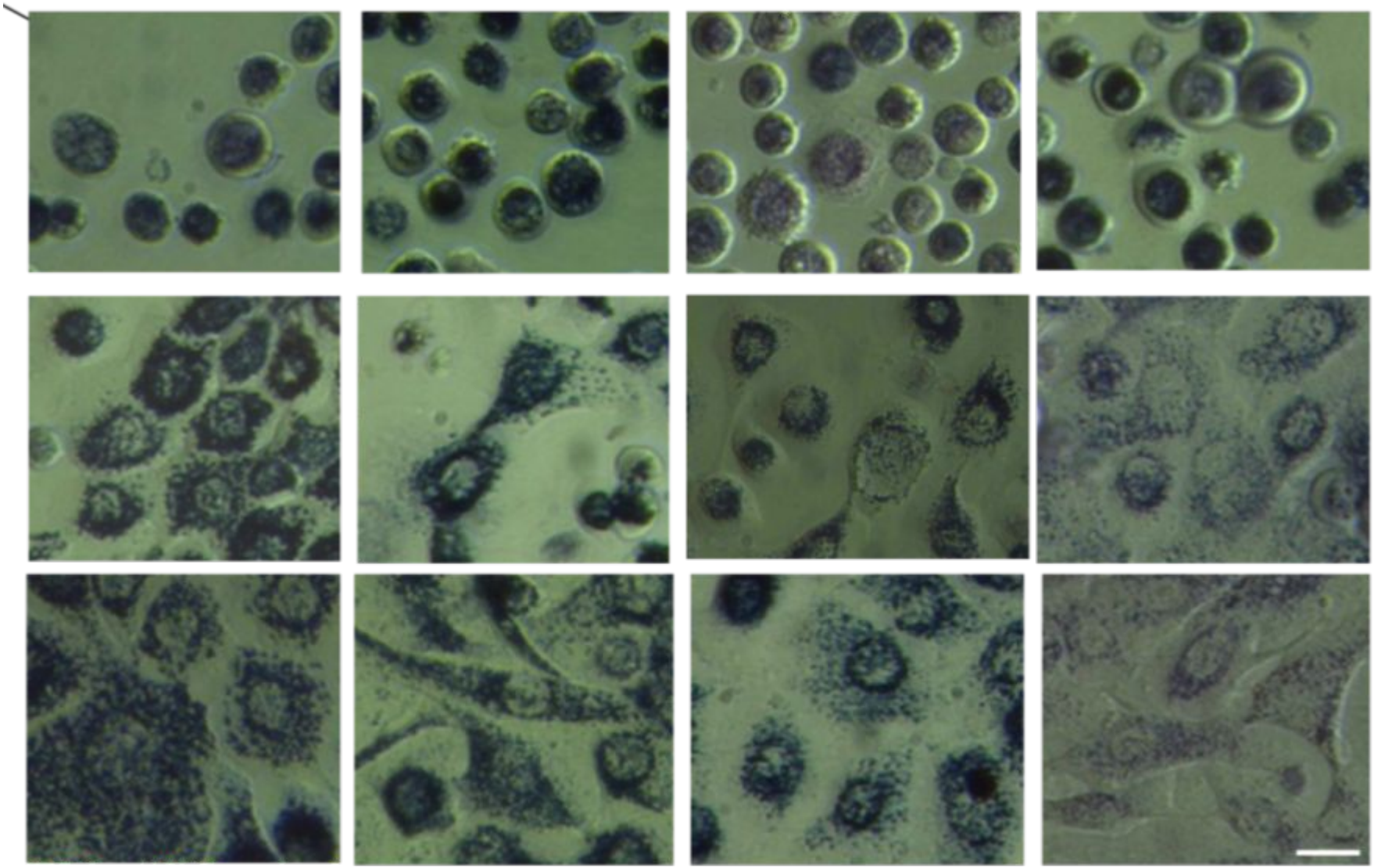


Клетки культуры эндотелия, воздействие этанолом.

Кальцеин и этидиум бромид



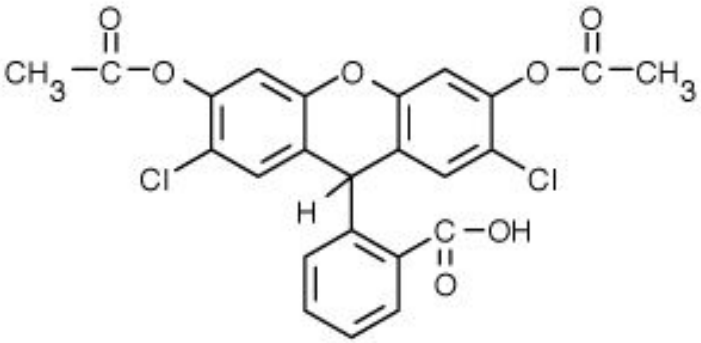
Формазан в кератиноцитах человека

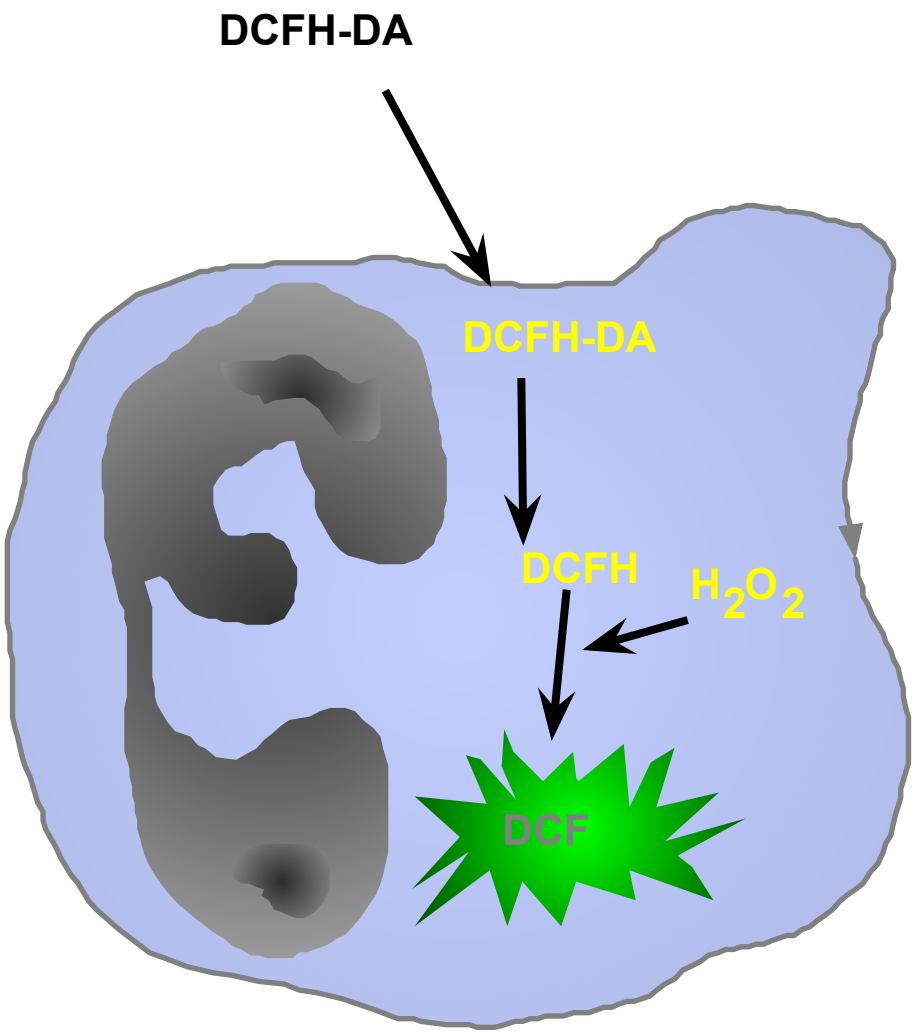


ROS – активные формы кислорода

Дигидро - родамин
Дигидро - флуоресцеин

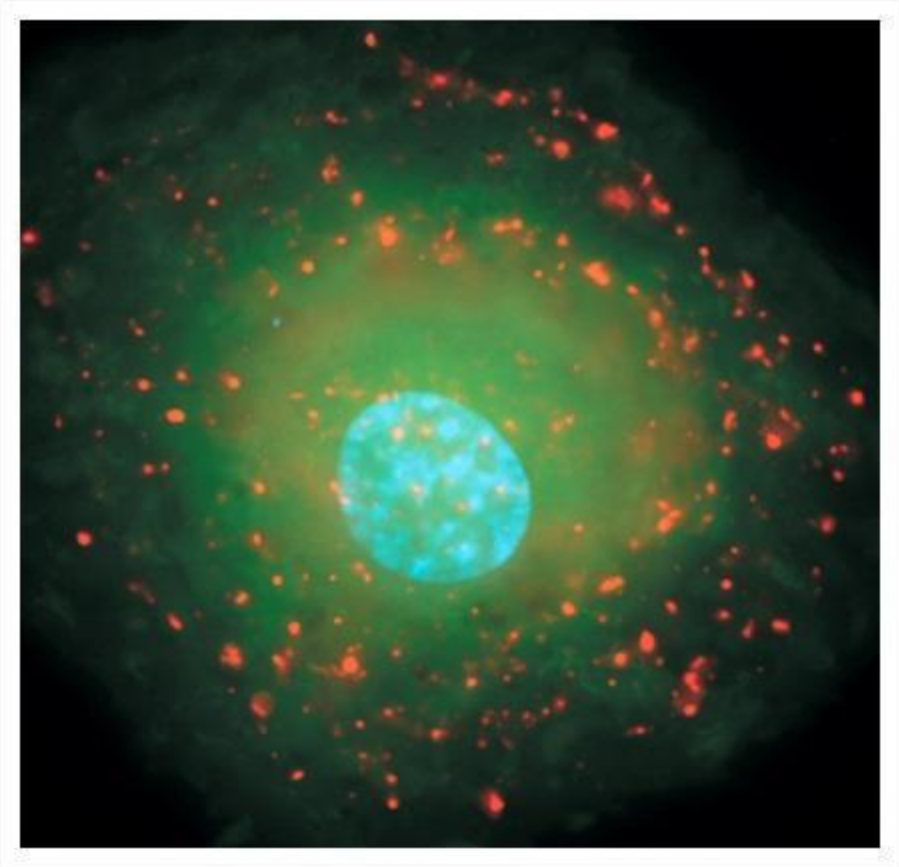
2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (2',7'-dichlorofluorescin diacetate; H_2DCFDA).





Reactive Oxygen Species	Detection Reagents
Hydrogen peroxide H_2O_2	•Carboxy-H_2DCFDA (C400) [1–3] •CM-H_2DCFDA (C6827) [4,5] •Dihydrocalcein AM (D23805) •Dihydrorhodamine 123 (D632, D23806) [6] •Dihydrorhodamine 6G (D633) [7] •H_2DCFDA (D399) [8–11] •Lucigenin (L6868) [12,13] •Luminol (L8455) [14] RedoxSensor Red CC-1 (R14060) [15]
Hydroxyl radical * HO·	•3'-(*p*-Aminophenyl) fluorescein (APF, A36003) •3'-(*p*-Hydroxyphenyl) fluorescein (HPF, H36004) •CM-H_2DCFDA (C6827) [16] •Proxyl fluorescamine (C7924) [17] TEMPO-9-AC (A7923)
Hypochlorous acid HOCl	•Aminophenyl fluorescein (APF, A36003) •Dihydrorhodamine 123 (D632, D23806) [18] Luminol (L8455) [19–21]
Superoxide anion	
Peroxyl radical, including both alkylperoxyl and hydroperoxyl [26] radicals (wherein R = H)	
Peroxynitrite anion	
Singlet oxygen	

Клетки культуры эндотелия.
Окраска на ROS –
6-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, di(acetoxymethyl ester)
FM 5-95 (ранние эндосомы)
Hoechst 33342 (ДНК)
Деконволюция



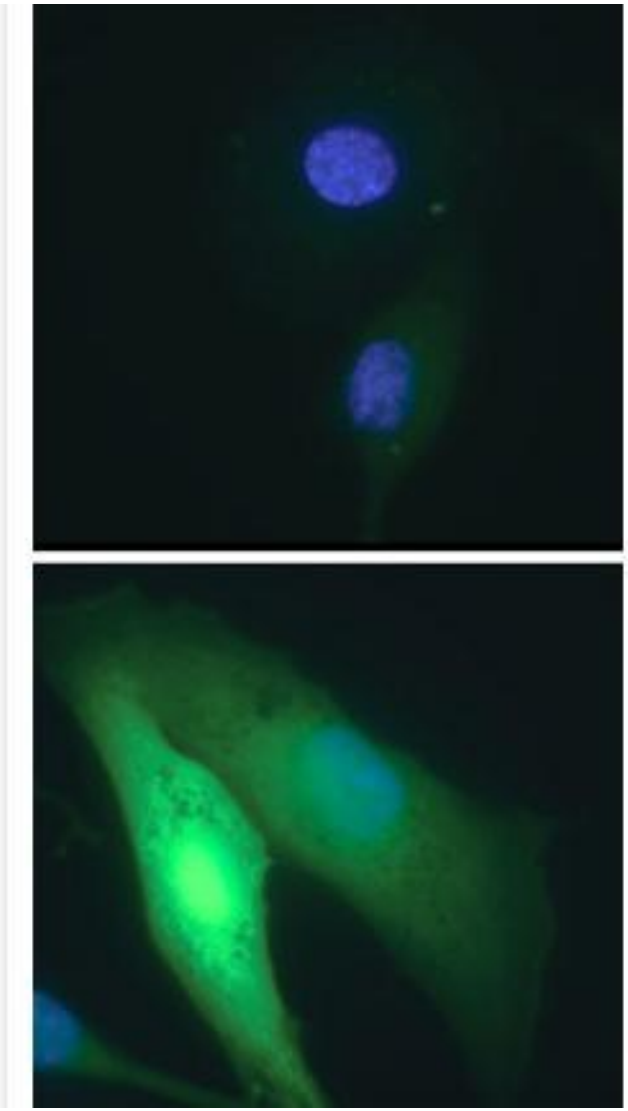
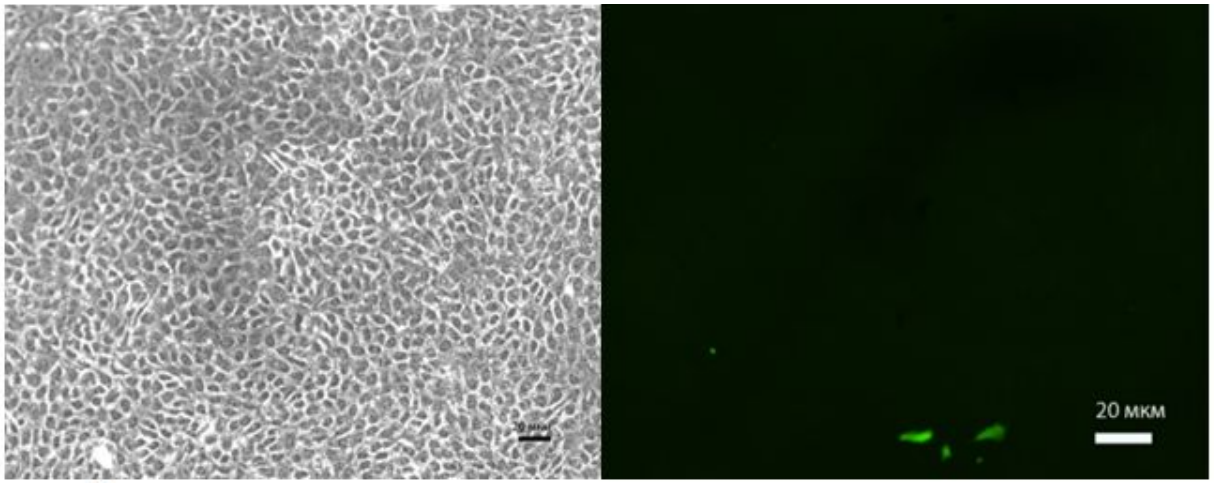


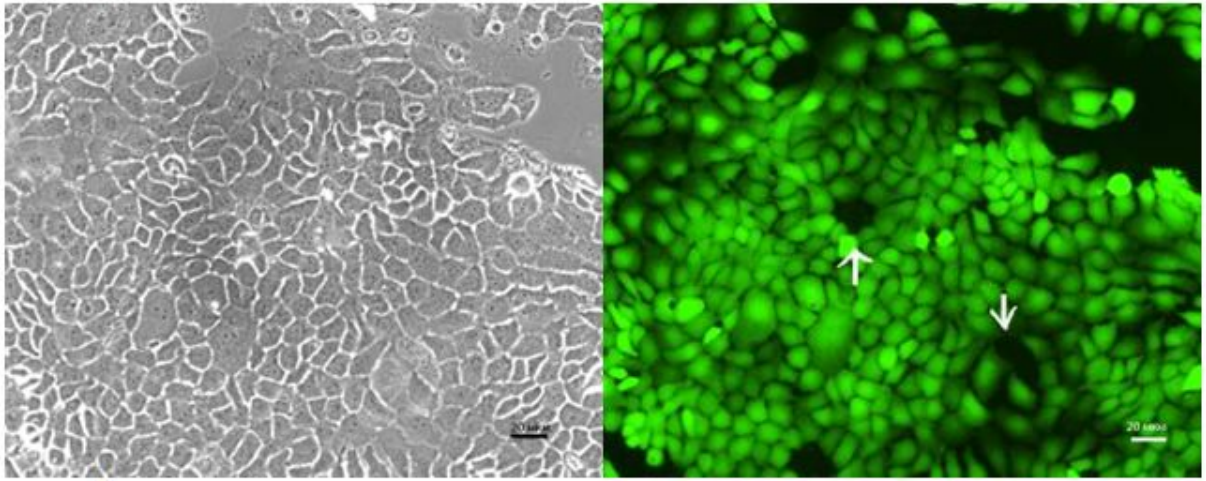
Image-iT LIVE Reactive Oxygen Species (ROS) Kit . Клетки эндотелия, индукция оксидативного стресса *tert*-butyl hydroperoxide Окрашивание carboxy-H2DCFDA.



¶

Рис.1· Клетки· *культуры· А431,·* ***не· подвергались· УФ· облучению,*** *·инкубация· в· среде,· содержащей· дигидрофлюоресцин· –· 30· минут.· Прижизненные· наблюдения.· Увеличение· х10.· Слева· —· фазовый· контраст,· справа· —· окрашивание· дигидрофлюоресцином.·* Большая·часть·клеток·не·флюоресцируют,·апоптотическая·гибель·не·регистрируется.·¶

¶

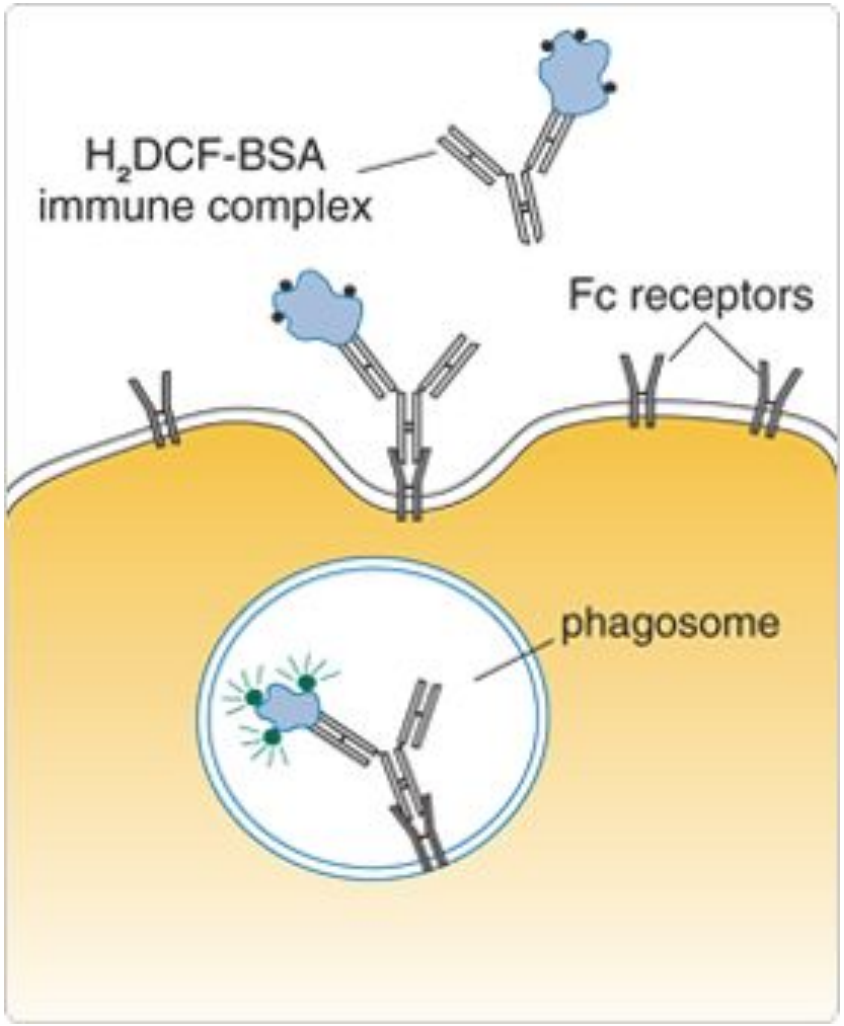


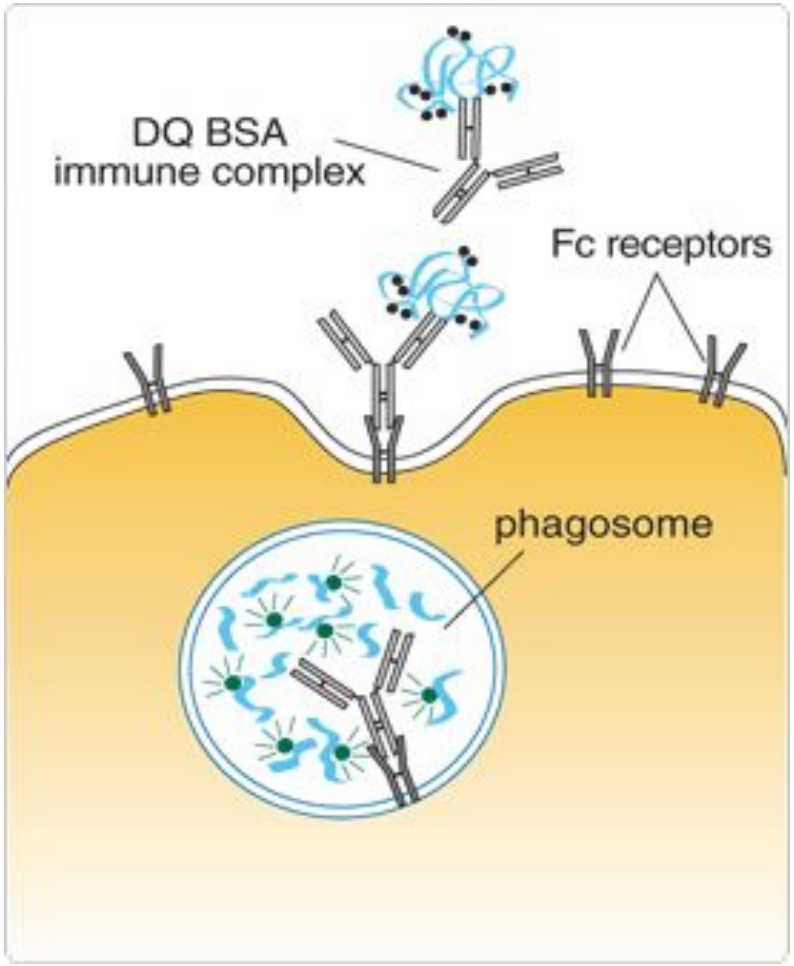
¶

Рис.2· · Клетки· культуры· А431,· УФ· облучение· в· течение· 30· минут,· далее· инкубация· в· среде,· содержащей· дигидрофлюоресцин· –· 30· минут.· Прижизненные· наблюдения.· Увеличение· х10.· Слева· —· фазовый· контраст,· справа· —· окрашивание· дигидрофлюоресцином.· Значительная· доля· клеток· флюоресцирует,· значит· в· них· содержится· перекись· водорода· (переводит· нефлюоресцирующую· форму· дегидрофлюоресциина· в· флюоресцирующую).· Встречаются· одиночные· неокрашенные· клетки·(указаны·стрелкой).·Накопление·в·клетках·перикиси·водорода·может·индуцировать· апптотическую·гибель.·¶

Зворыкина 2012

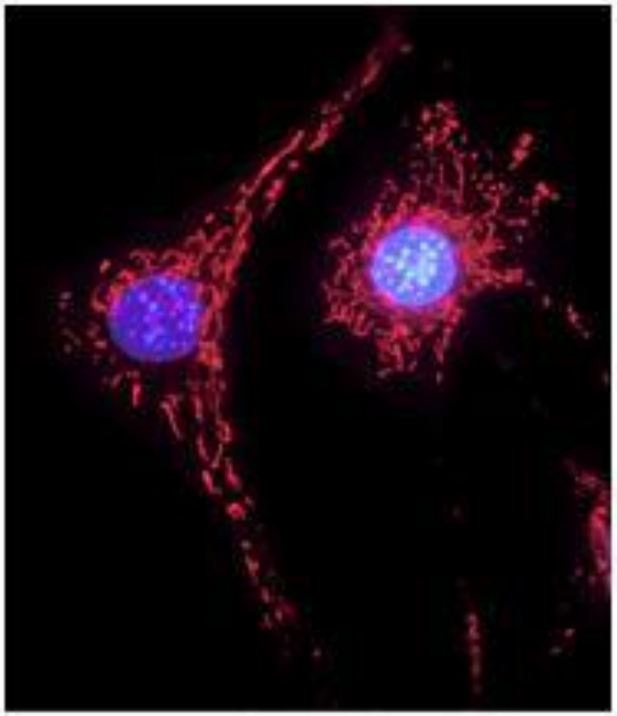
Фагоцитоз, макрофаги

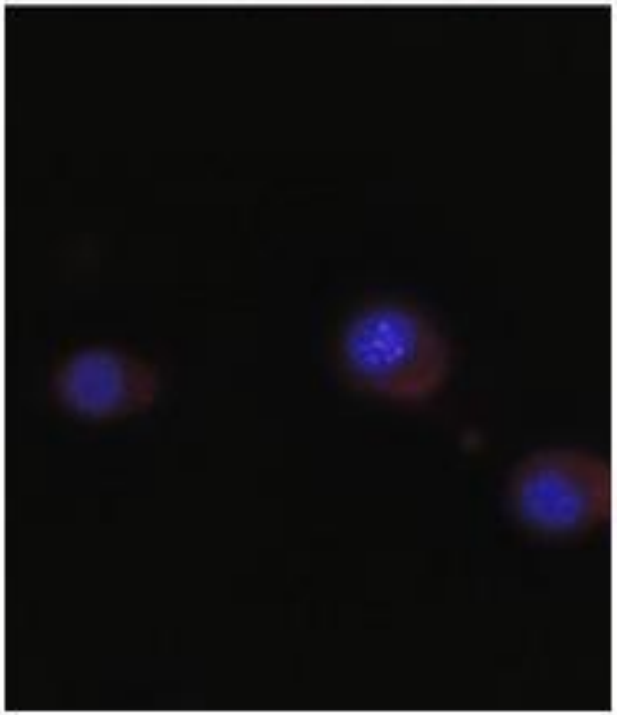




Супероксид, окрашивание
MitoSOX Red superoxide indicator

Клетки 3T3 были обработаны FeTCPP.





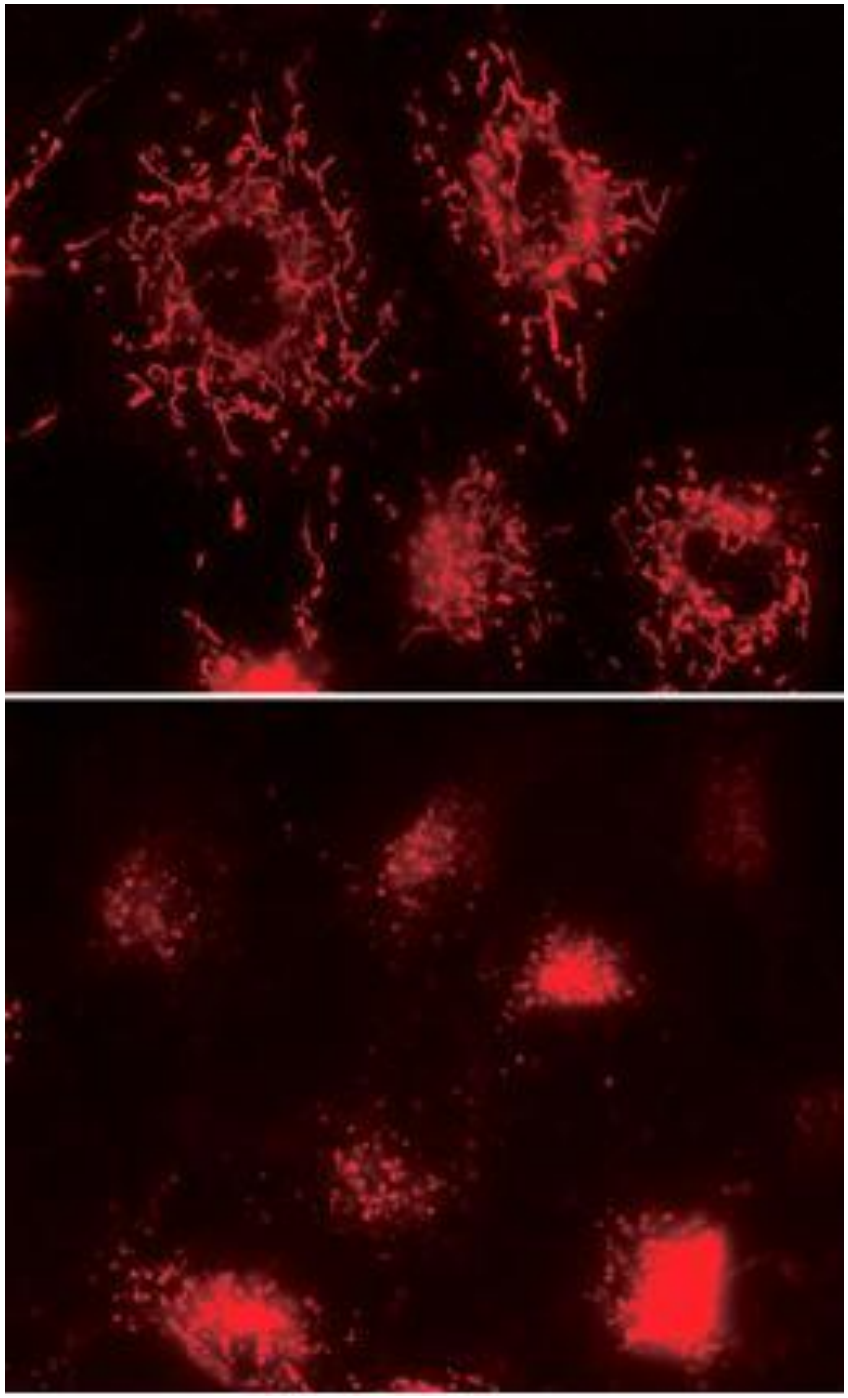
RedoxSensor Red CC-1.

RedoxSensor Red CC-1 Stain

RedoxSensor Red CC-1 stain (2,3,4,5,6-pentafluorotetramethyldihydrorosamine.
Пассивная диффузия в клетку, в цитозоле окисляется – красная флуоресценция (540/600 nm). Аккомулируется в митохондриях.
Может транспортироваться в лизосомы, где и окисляется – флуоресценция в лизосомах.

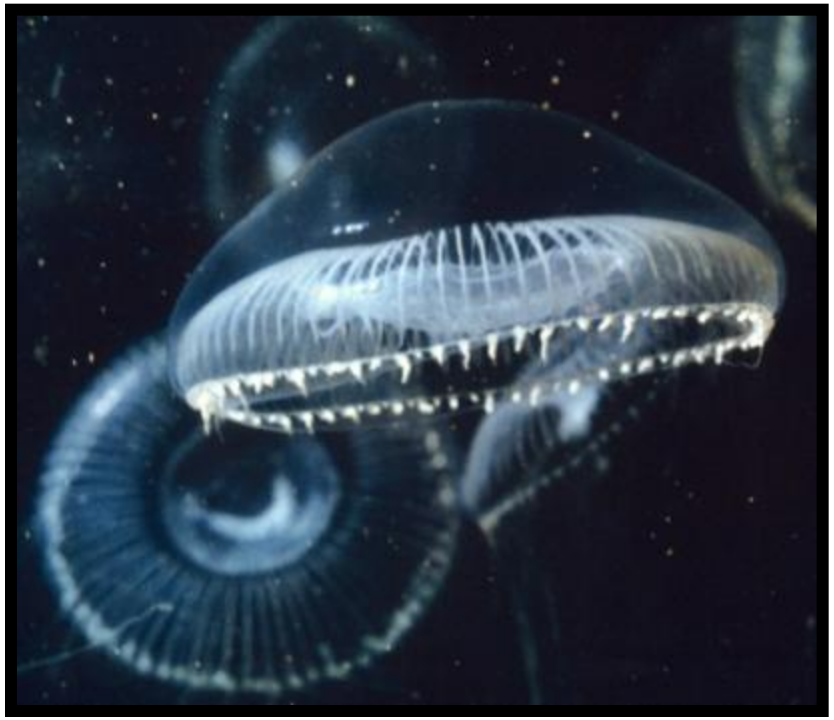
RedoxSensor Red CC-1 Разное распределение в клетке зависит от pH цитозоля – либо в лизосомы,
– либо в митохондрии.

в пролиферирующих клетках – в митохондрии, при контактном ингибировании – в лизосомах.



GFP

Green Fluorescent Protein (GFP) зеленый флуоресцентный белок
Обнаружен впервые у *Aequorea victoria (1761).*
Клонирован в 1992 году.
Сейчас широко используется во всех лабораториях мира .



Люминисценция

Биолюминисценция
(большинство морские виды): бактерии, динофлагелляты, радиолярии, грибы, многоножки, насекомые, улитки, ракообразные

Статическая

Генерация коротких вспышек (0,1-1 сек) в ответ на раздражение.

Биолюминисценция
около 30 вариантов

Симбиоз с бактериями

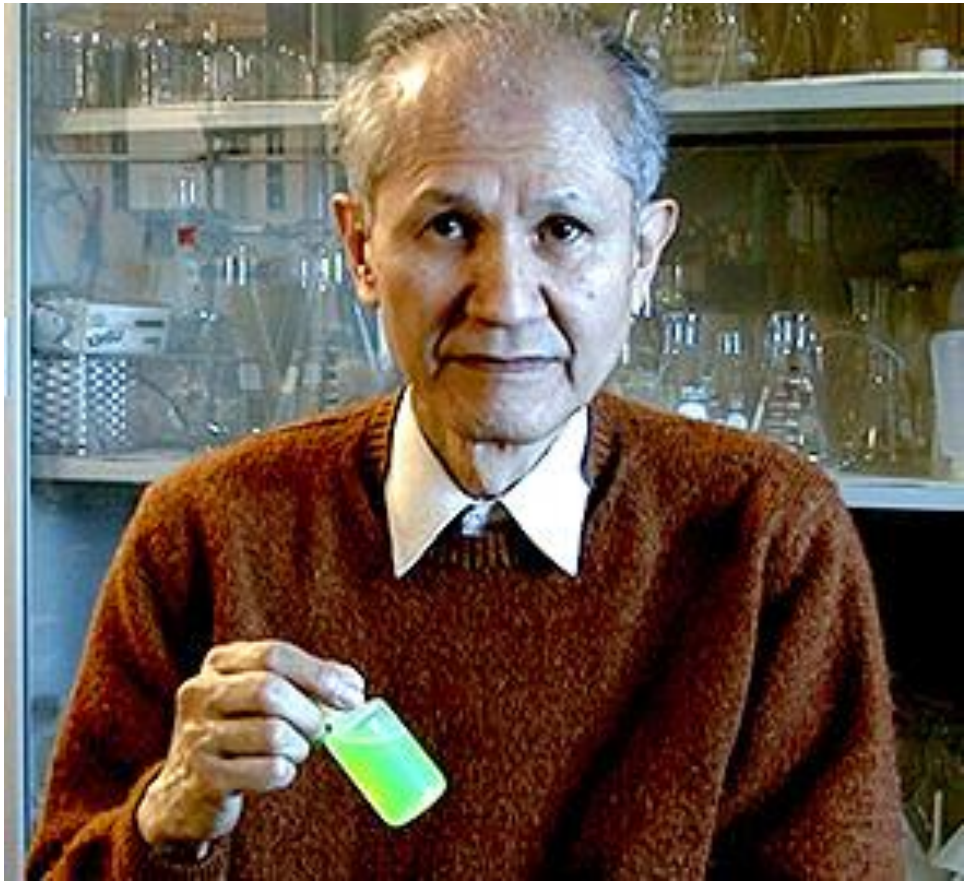
внутриклеточное

Секреторная
Смешивание веществ, световое облако

1. **Сигнал должен быть хорошо заметен (нет промежуточных стадий яркости)**
2. **Люминисценция должна быть связана с определенной ситуацией**

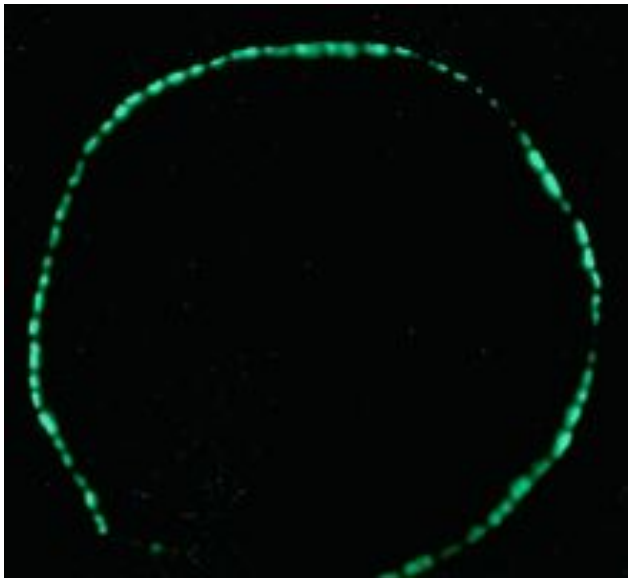
Эволюционное происхождение?

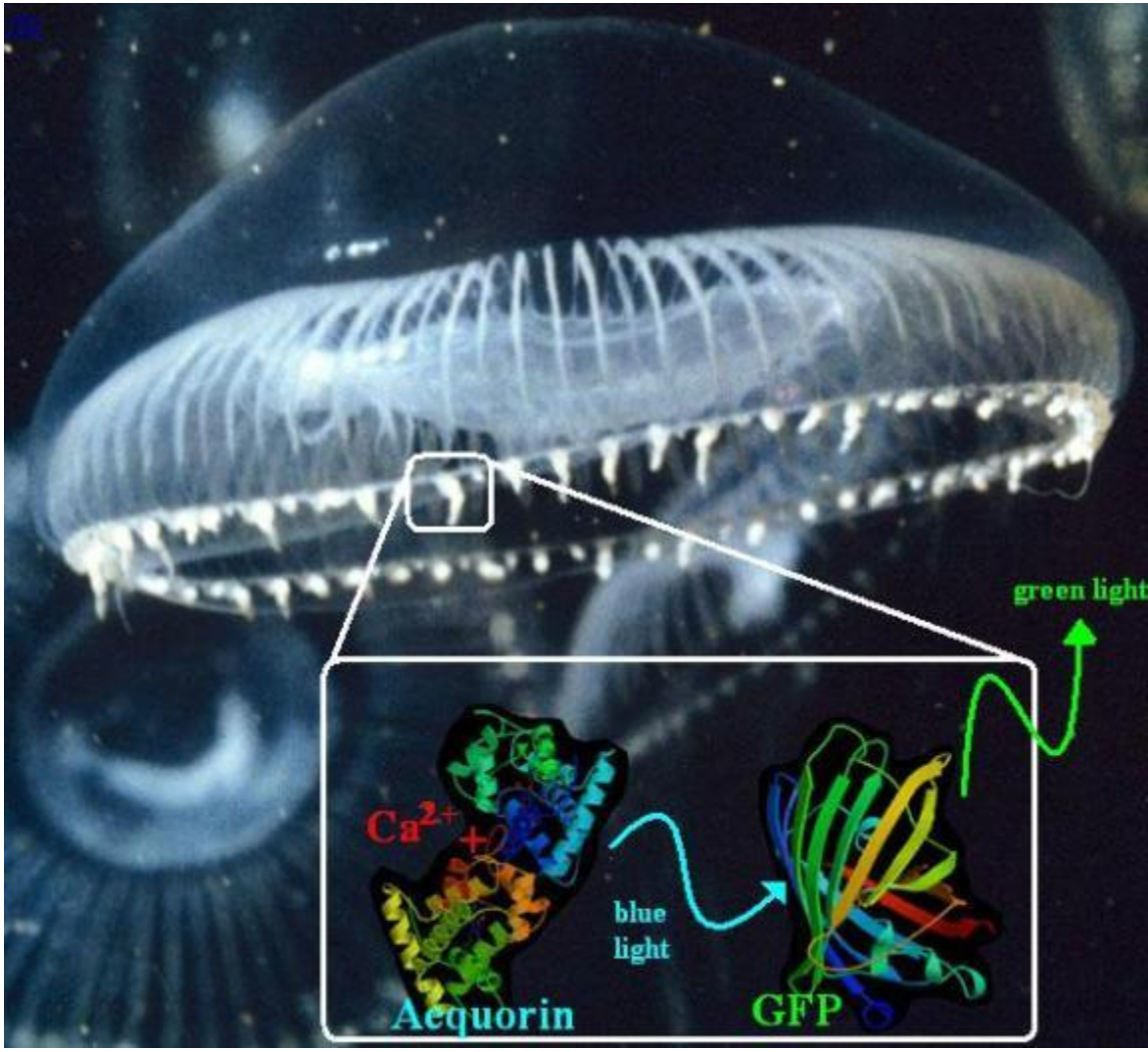
Osamu Shimomura



Осаму Шимомура и коллеги (1974 г)

Aequorea victoria





1885 ДЮБУА

Фермент **люцифераза**
– не термостойкий

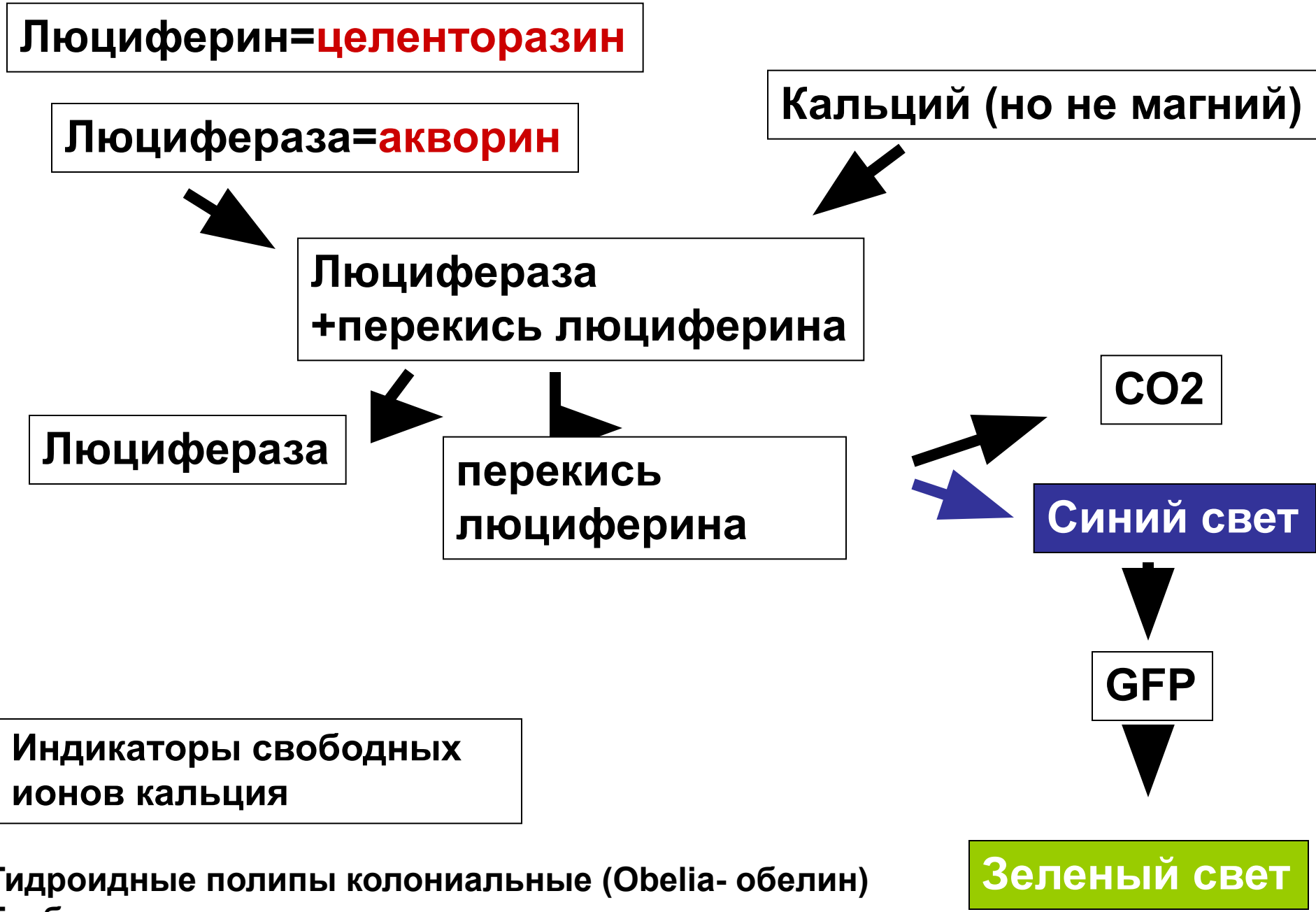
кислород + **кальций**

O, ROS

Термостойкий субстрат
люциферин

диоксетановая перекись

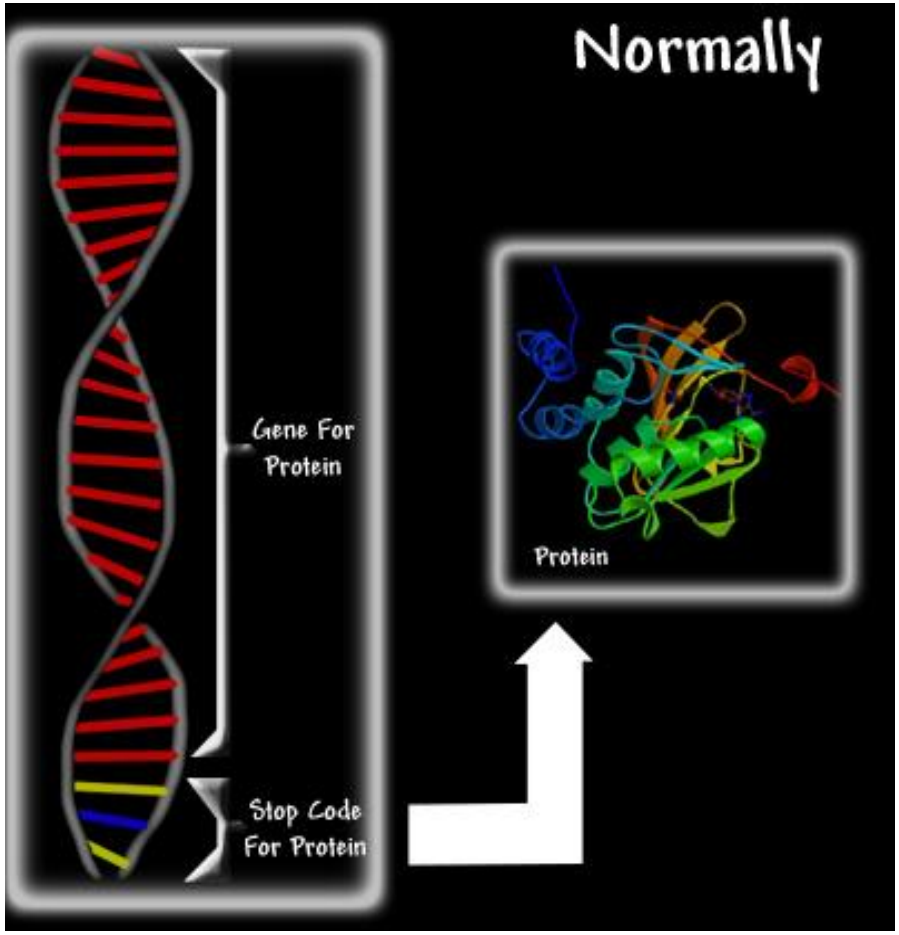
Индикаторы свободных ионов кальция

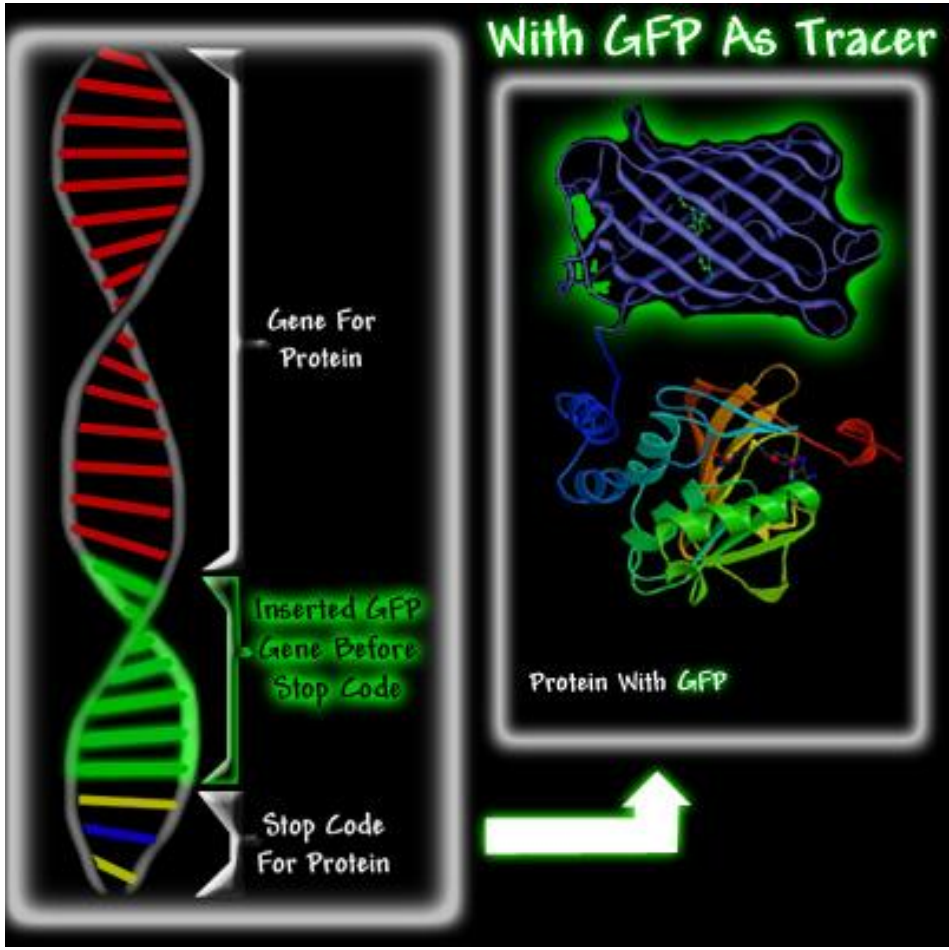


Индикаторы свободных ионов кальция

Гидроидные полипы колониальные (Obelia- обелин)
Гребневики
Радиолярии

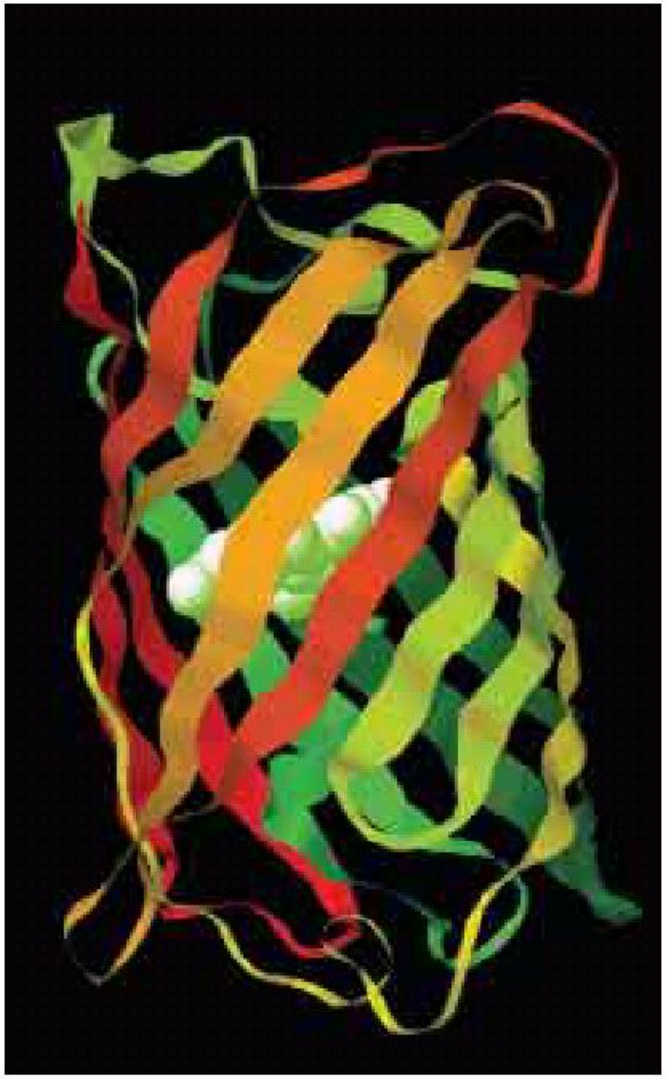
Douglas Prasher 1987г.

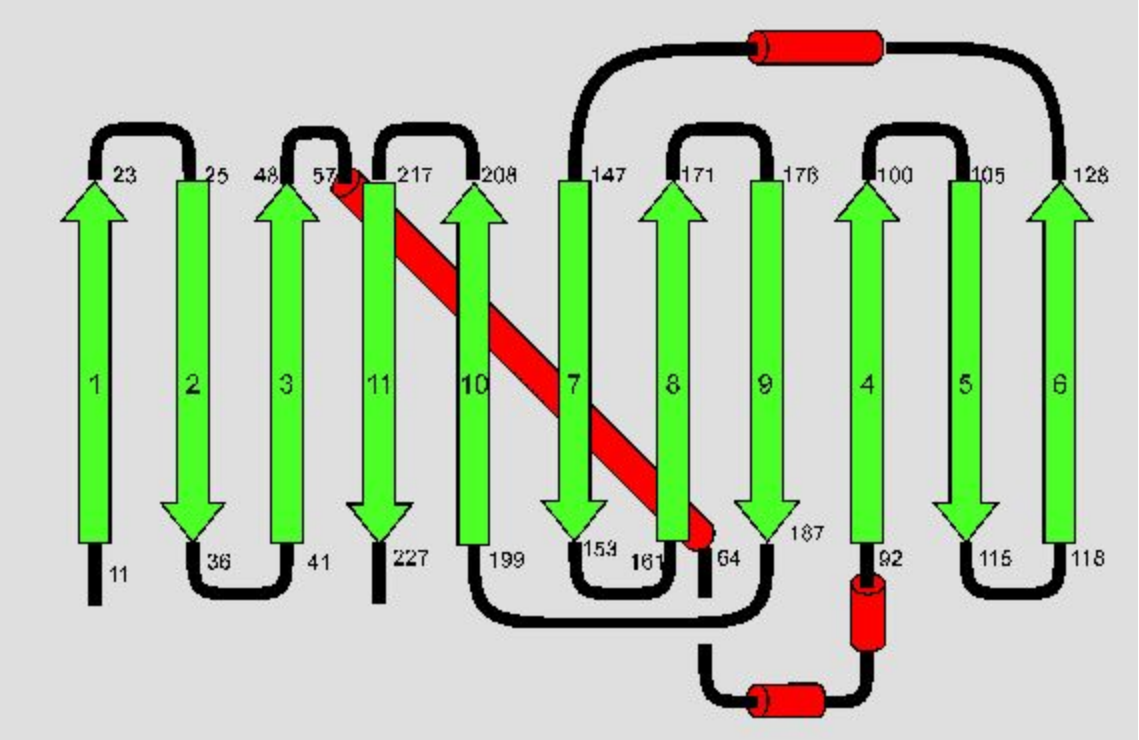




СТРУКТУРА

Кристаллическая структура GFP была описана в 1996 году. 11 Бетта-складки образуют бетта боченок альфа спираль проходят через центр. Хромофор располагается в середине боченка.

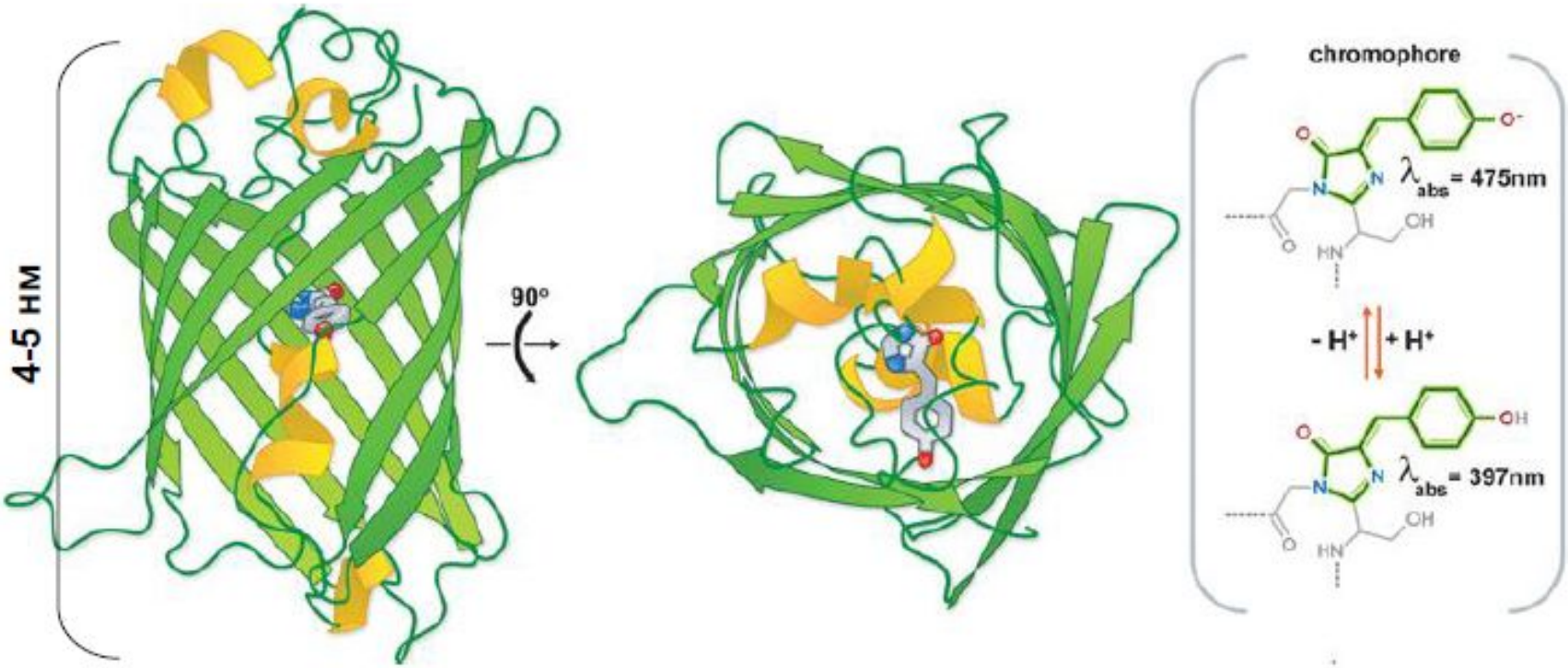




GFP- маркер синтеза белка и маркер активности гена

1. Флюоресценция при облучении УФ.
2. Маленькие размеры.
3. Линкеры
4. GFP флюоресциирует сам по себе. Люцифераза требует АТФ, магния и люциферина. 1992 г. *238 аминокислот.*

MSKGEELFTGVVPVLVELDGDVNGQKFSVSGEGEGDATYGKLTLNFIC
TTGKLPVPWPTLVTTFSYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQE
RTIFYKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKMEYN
YNSHNVYIMGDKPKNGIKVNFKIRHNIKDGSVQLADHYQQNTPIGDGPV
LLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMILLEFVTAARITHGMDELYK



11 β-слоев образуют бочонок с α-спиралью в середине (238 ак). Хромофор образуется внутри глобулы путем автокаталитической циклизации остова трех аминокислот (Ser_{65}-Tyr_{66}-Gly_{67})

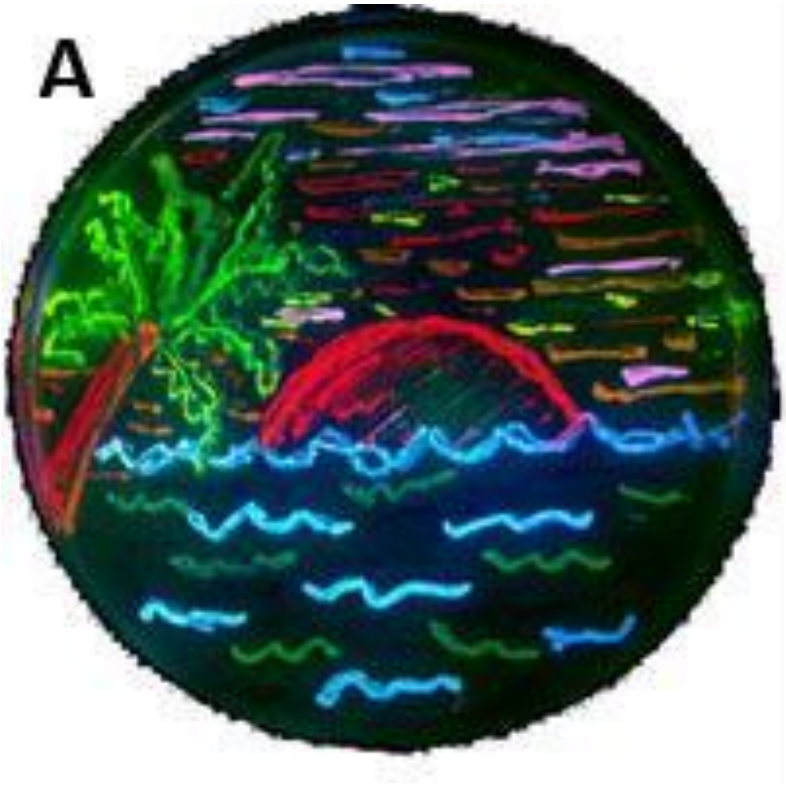
Ghia Euschirken

Prof. Martin Chalfie (from the Biological Sciences, Columbia University web-site)
1988 г. –1994 гг. , Вставил ген GFP после промотора (*C. Elegans)* .

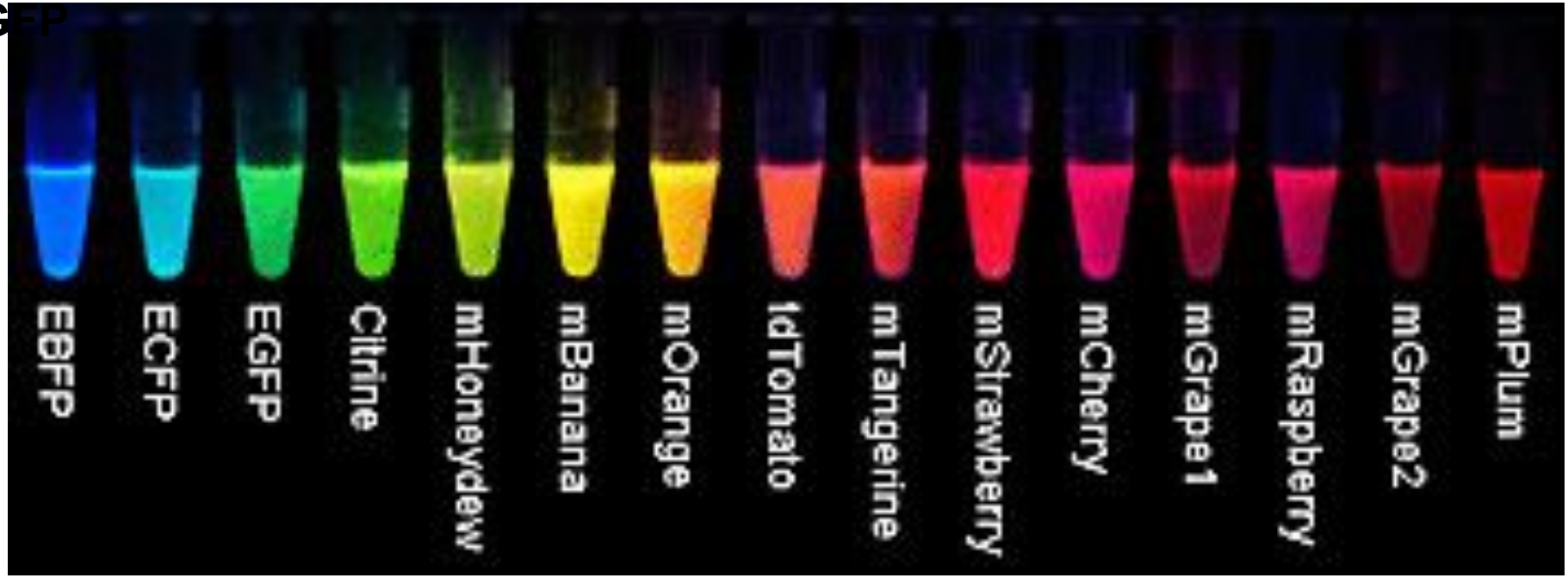
Экспрессия GFP в E. coli. 1994 Science.

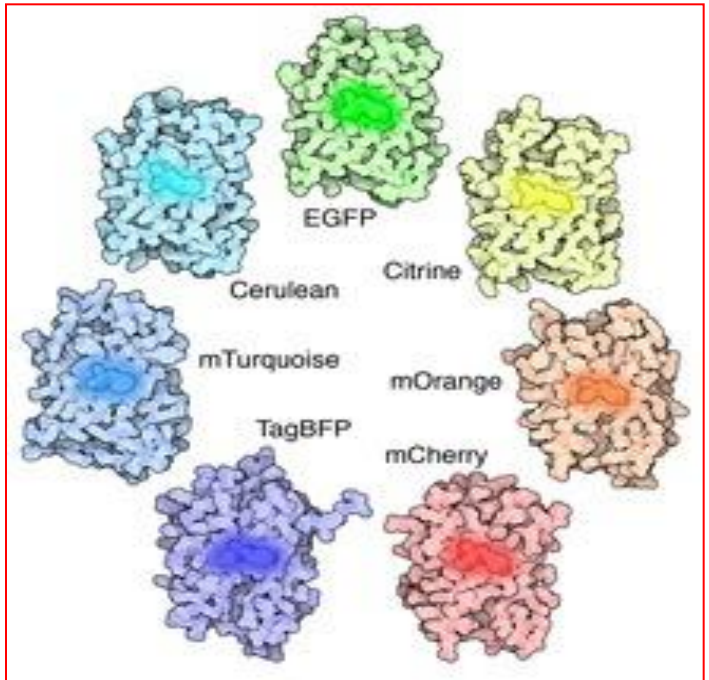
Roger Tsien

Коллонии бактерий с различными флуоресцентным и белками.

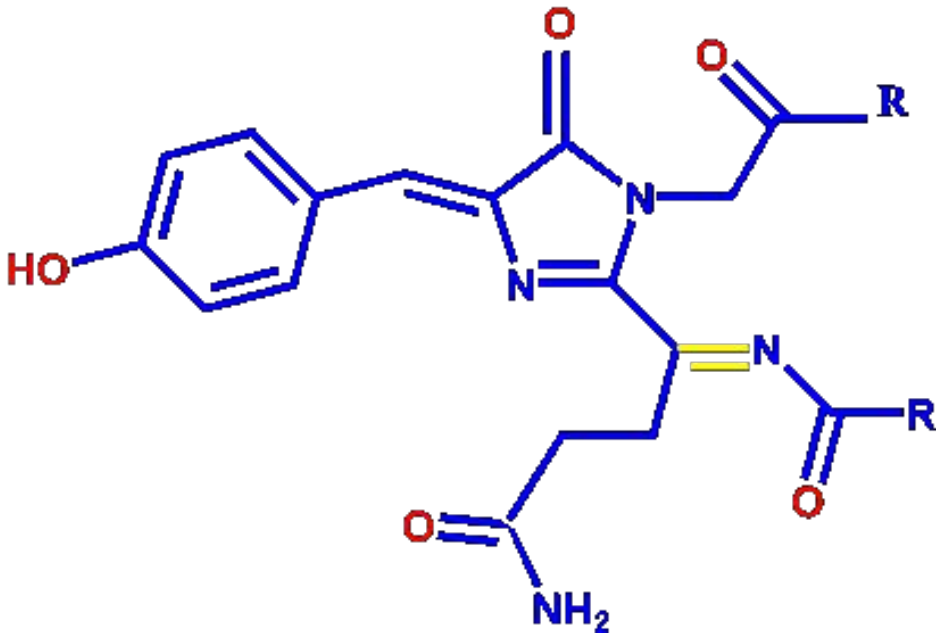


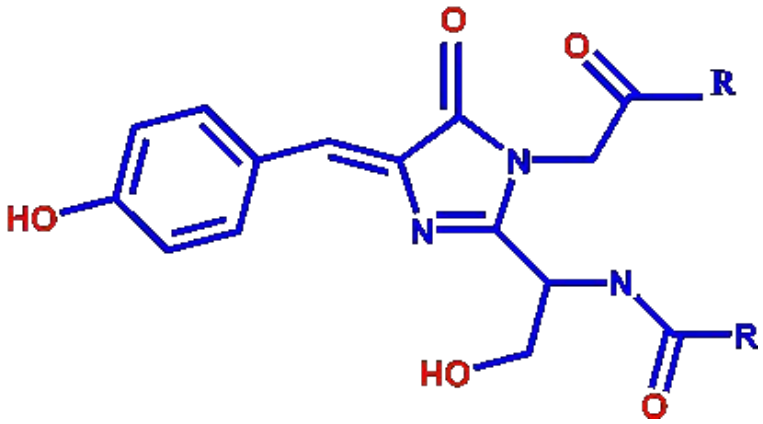
Производные GFP



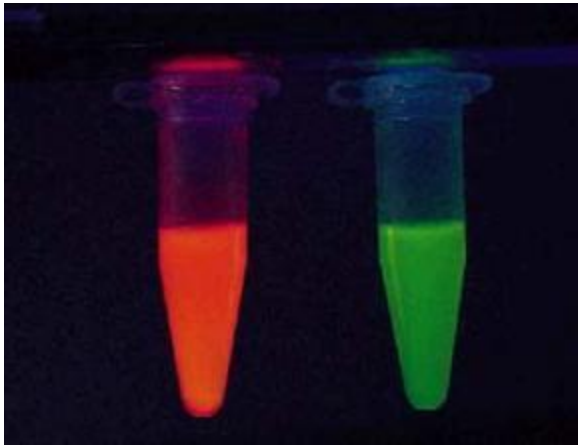


Отличие GFP от его красного аналога, DsRed, в том, что хроматофор DsRed имеет extra double bond.





Лаборатория Лукьянова С.А.



Институт биоорганической химии РАН

Разноцветные флуоресцентные белки

Окрашивание нескольких структур в клетке
Большинство описанных к тому времени белков были зелеными
Мутантные белки – очень близкие спектры – более голубой и более желтый
Флуоресценция кораллов.

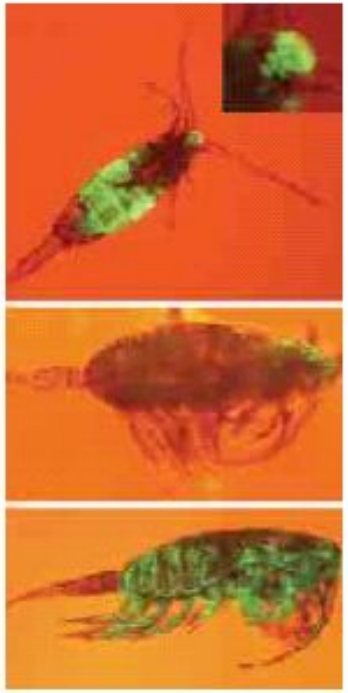
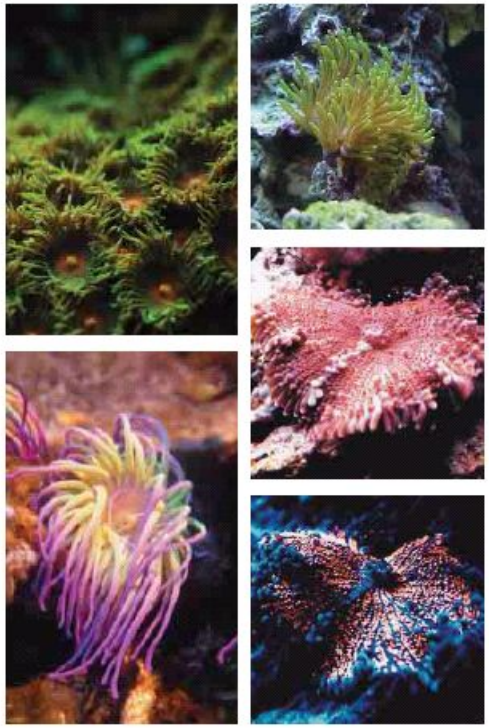
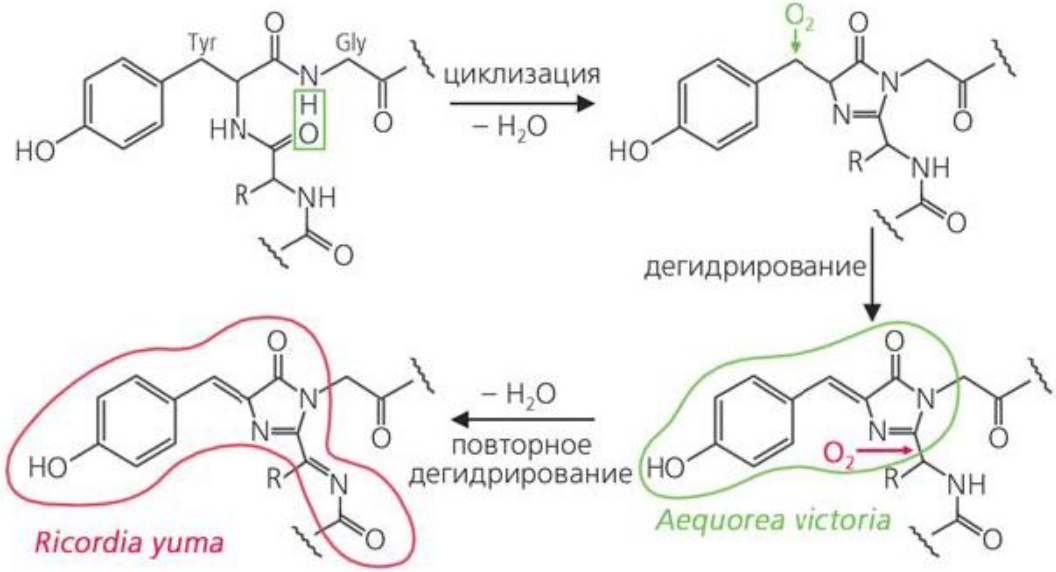
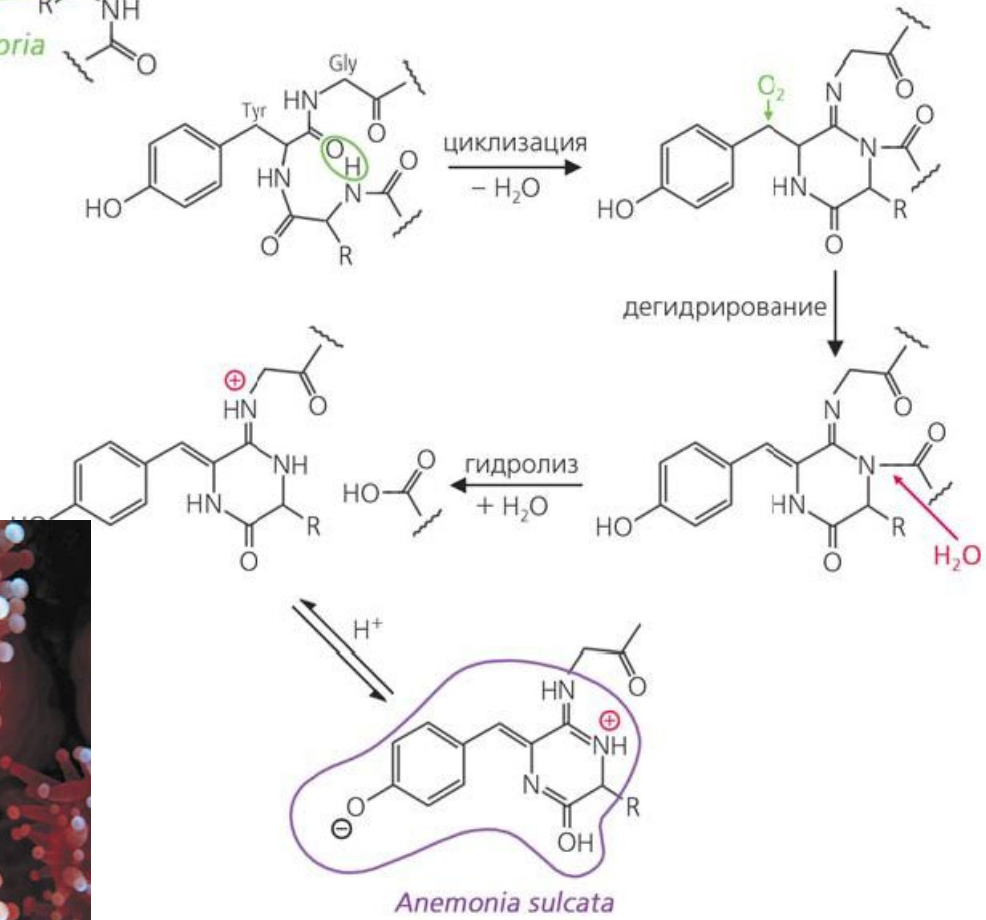


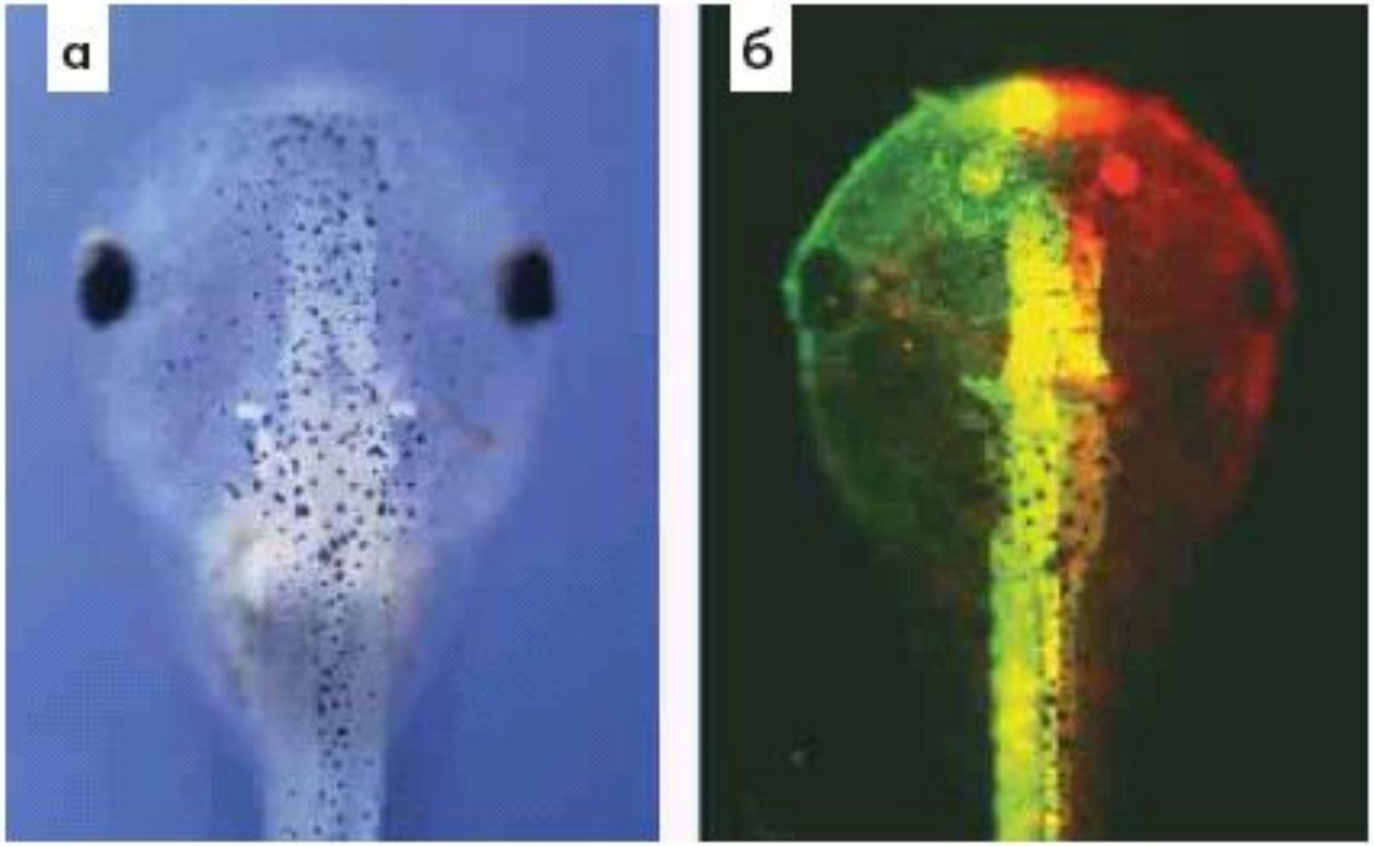
Рисунок 6. За флуоресценцию веслоногих рачков-копепод ответственны GFP-подобные белки.

Флуоресценция кораллов.

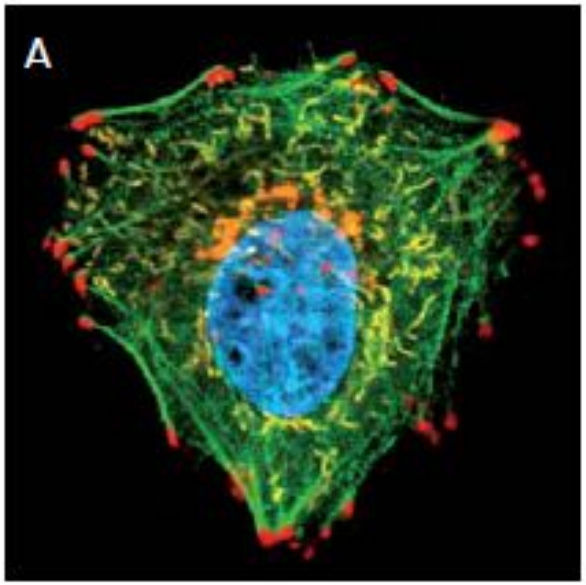


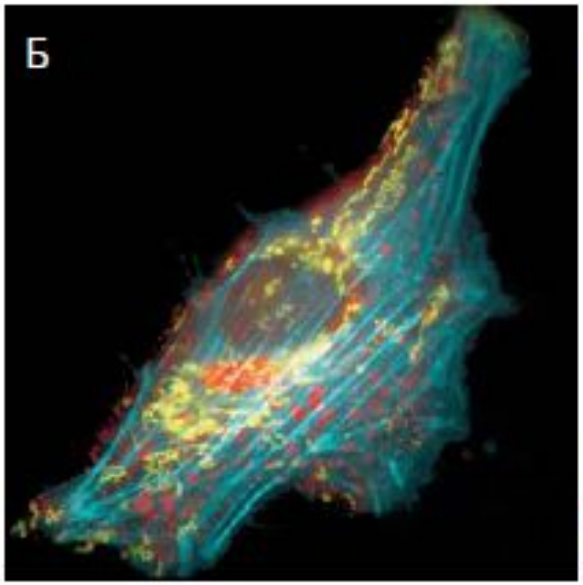

Tyr
Gly
циклизация
– H_2O
O_2
дегидрирование
– H_2O
повторное дегидрирование
O_2
Ricordia yuma
Aequorea victoria

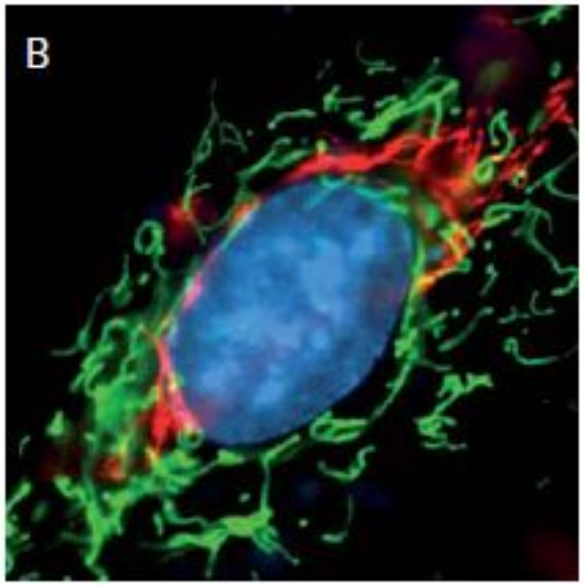

Gly
Tyr
циклизация
– H_2O
O_2
дегидрирование
гидролиз
+ H_2O
H_2O
H^+
Anemonia sulcata



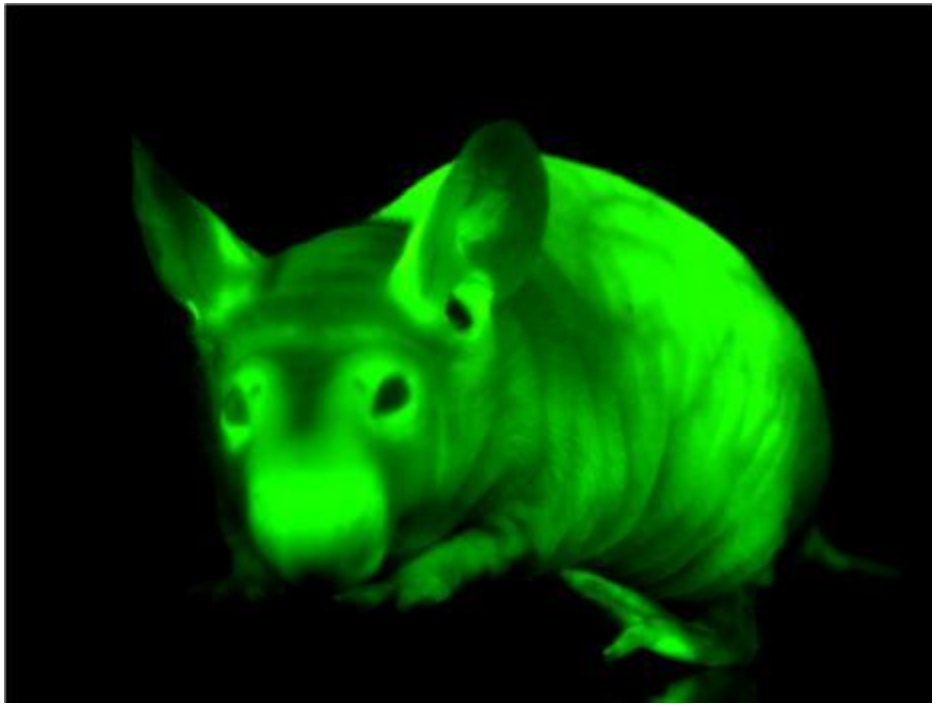
Головастик шпорцевой лягушки, экспрессирующий флуоресцентные белки из коралловых полипов.







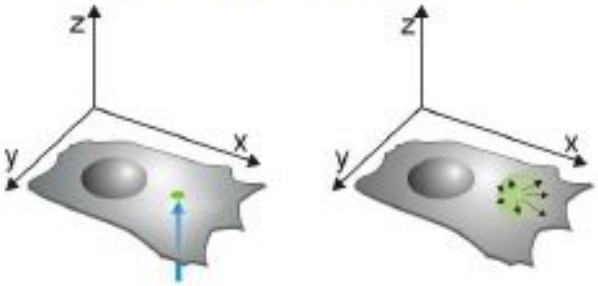
Мечение клеток и внутриклеточных структур с использованием флуоресцентных белков.
А - клетка HeLa, экспрессирующая флуоресцентно-меченые митохондрии (желтый, PhiYFP), аппарат Гольджи (оранжевый, TagRFP), гистон H2B (синий, TagBFP), бета-актин (зеленый, TagGFP2) и зиксин (красный, mKate2), Б - клетка HeLa, экспрессирующая флуоресцентно-меченые митохондрии (желтый, PhiYFP), актин (голубой, TagCFP) и клатрин (красный, mKate2), В - клетка REF3, окрашенная Hoechst (синий) и экспрессирующая флуоресцентно-меченые митохондрии (зеленый, TagGFP2) и цитокератин-14 (красный, TagRFP).



Мышь при освещении голубым светом, и та же мышь не освещенная. Актин-GFP.

Randy Prather, профессор репродуктивных биотехнологий в университете University of Missouri, Columbia,

Перемещение белков



M **Скорость и направление движения**

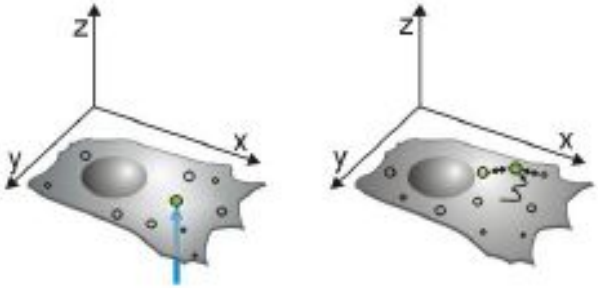
D **Коэффициент диффузии**

M **Выявление мобильных и стабильных фракций**

Ti **Обмен между компартментами**

R **Скорость обращения**

Перемещение органелл

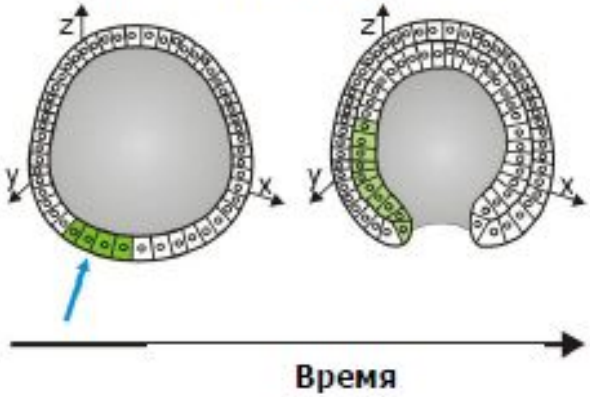


M **Скорость и направление движения**

R **Скорость обмена содержимого**

Fi **Деление и слияние**

Перемещение клеток



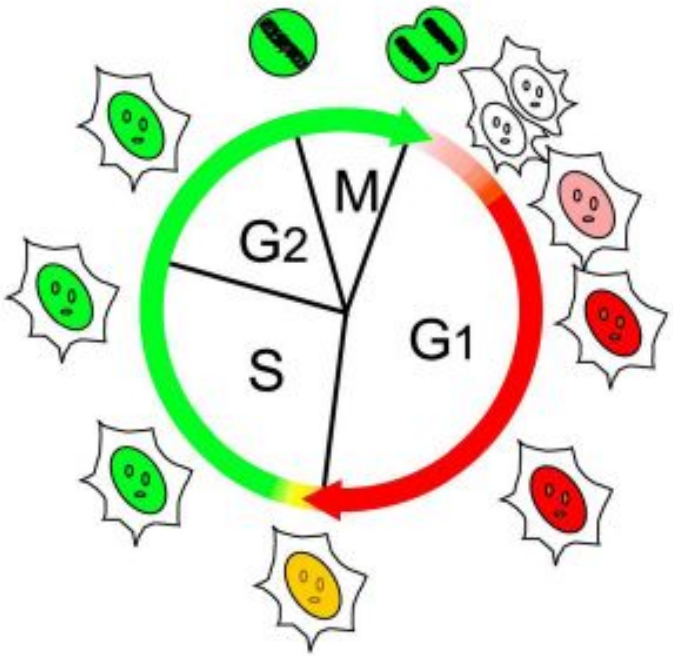
M **Скорость и направление движения**

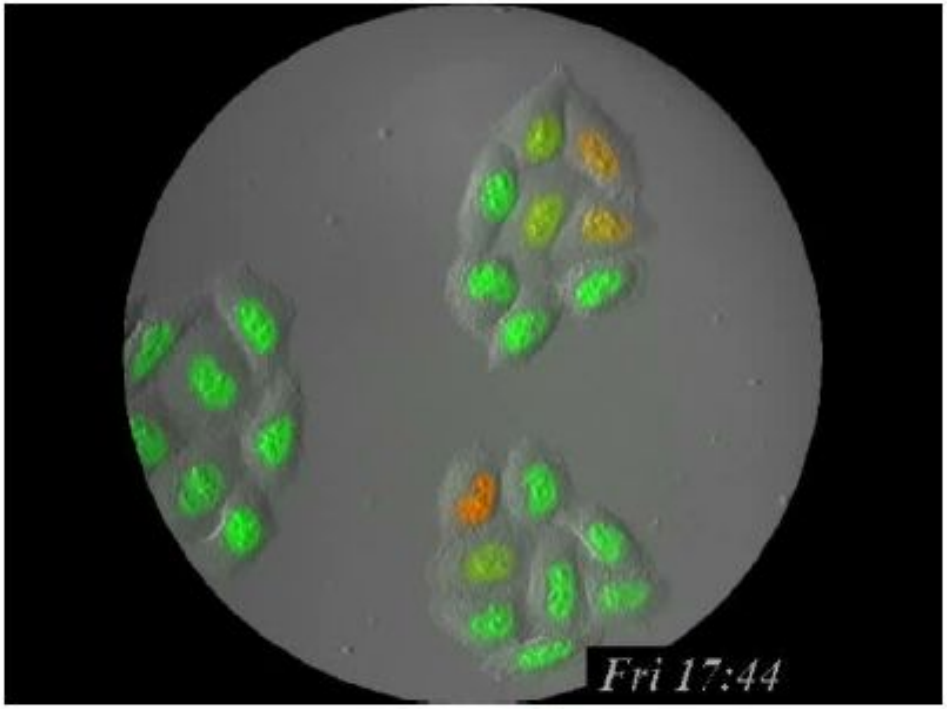
C **Локализация**

R **Частота делений**

S **Форма и объем**

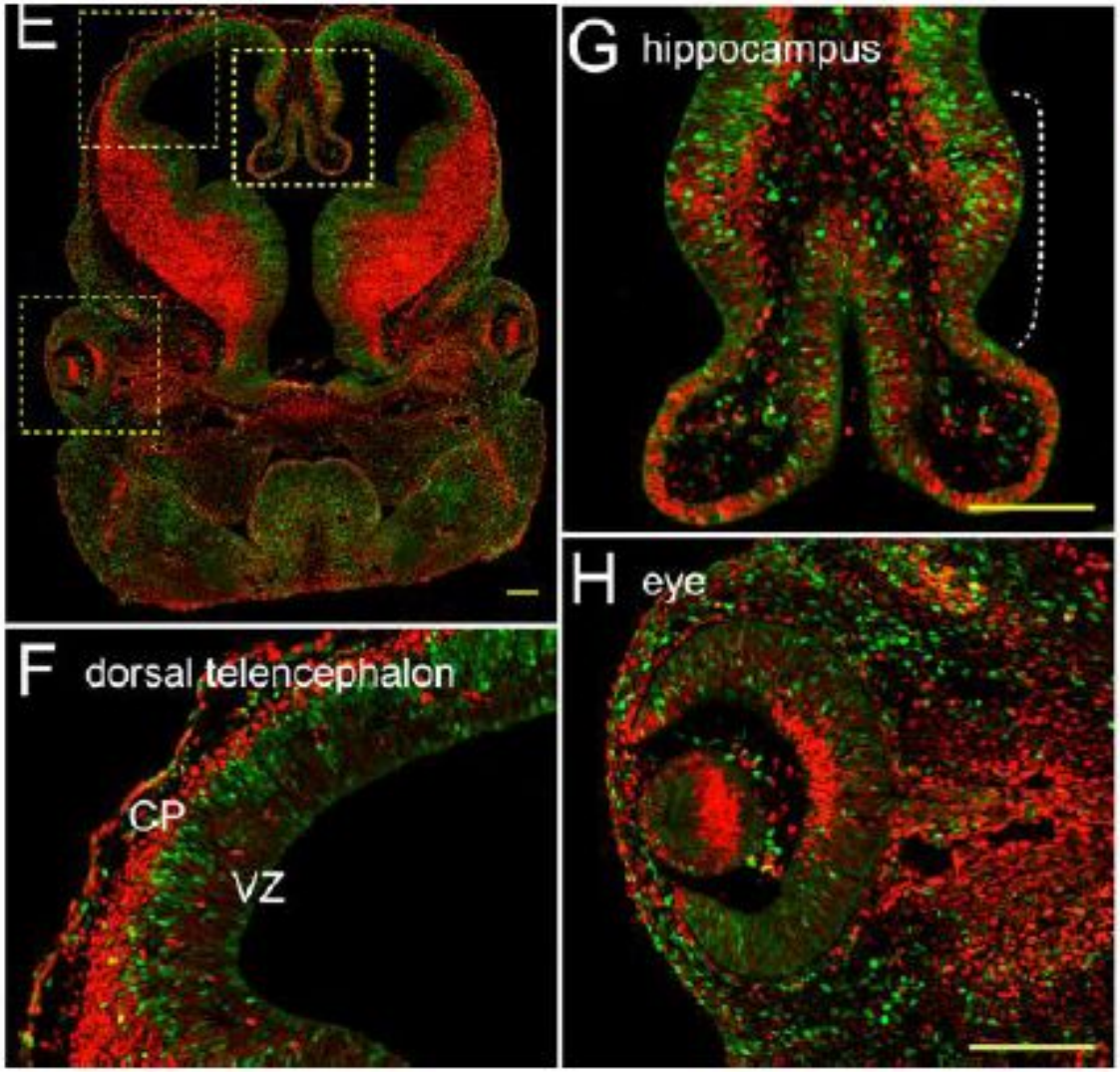
“Fucci”- индикатор клеточого цикла





Miyawaki lab, Cell 2008

Часы клеточного цикла в голове эмбриона мыши

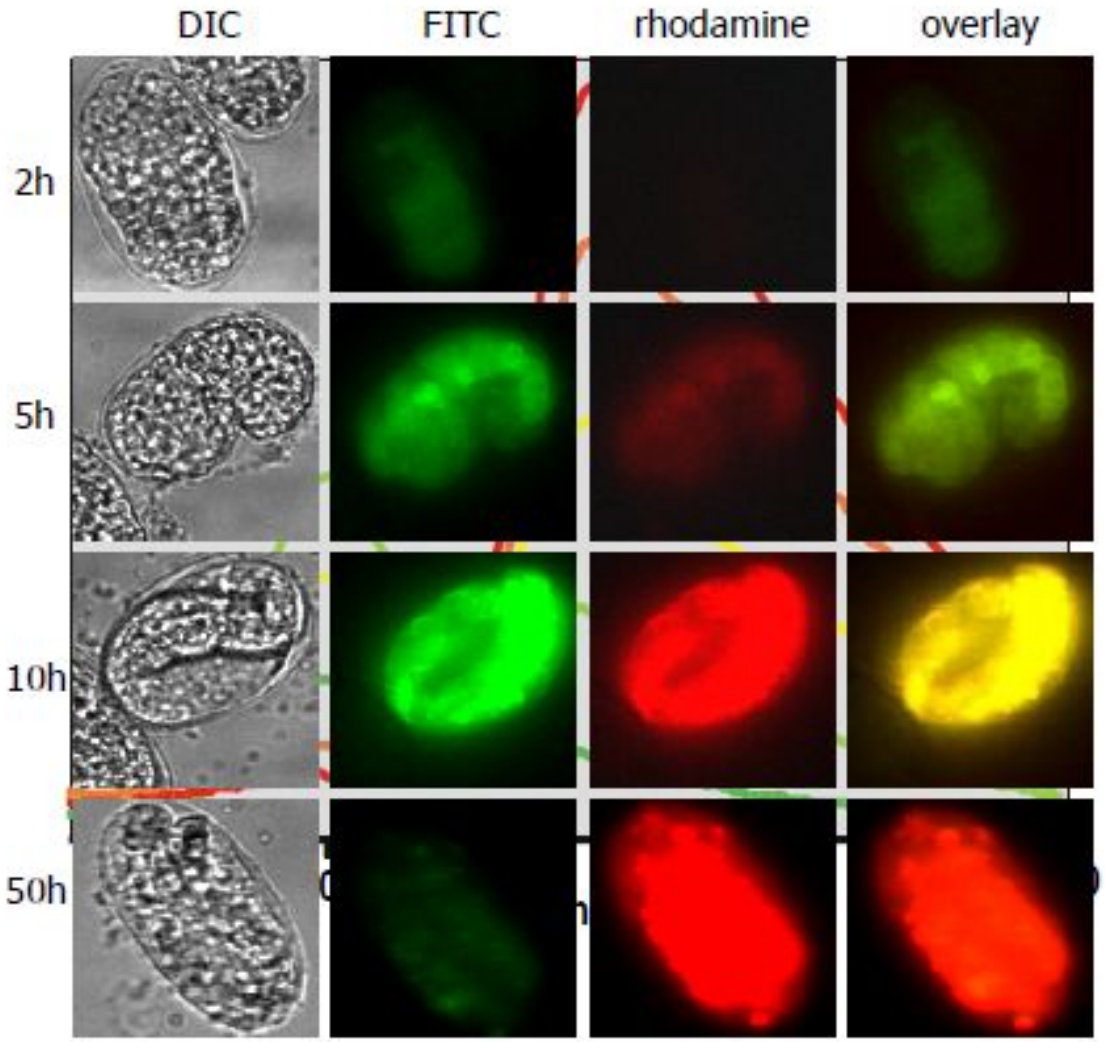


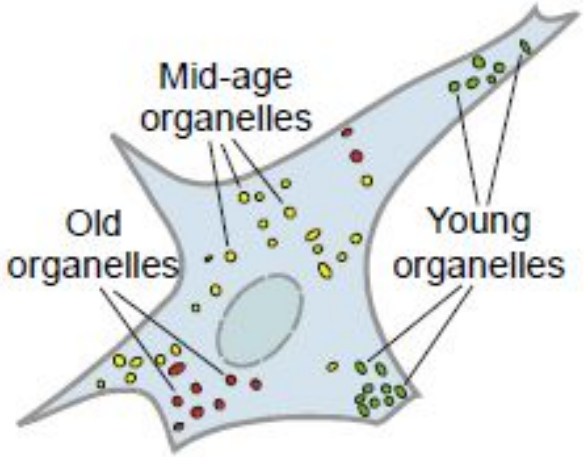
GFP — Cdt1, G_1 фаза

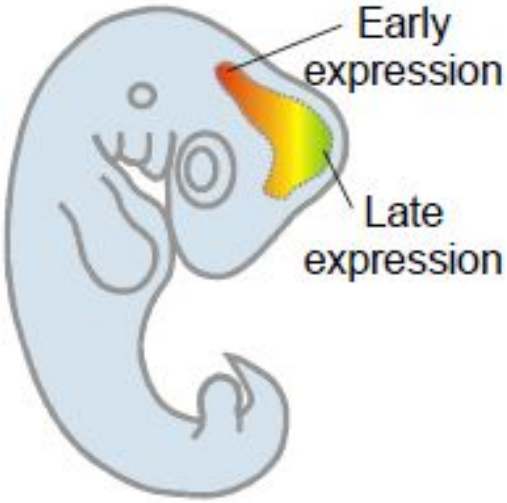
RFP — Geminin, $S/G_2/M$ фазы

Miyawaki A. Cell, 2008

Флуоресцентный таймер

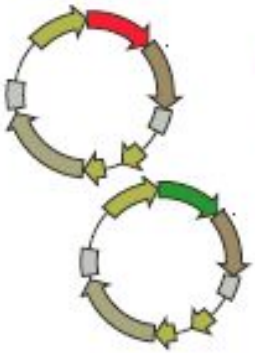




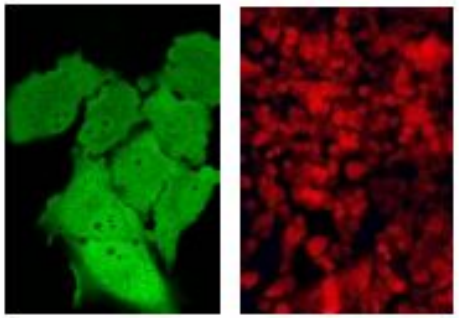


Terkikh et al., 2000; Verkhusha et al., 2004

Использование флуоресцентных белков для скрининга лекарственных препаратов



Получение флуоресцентных стабильных клеточных линий



Стабильно-трансфецированные опухолевые клетки

Прививание опухолей

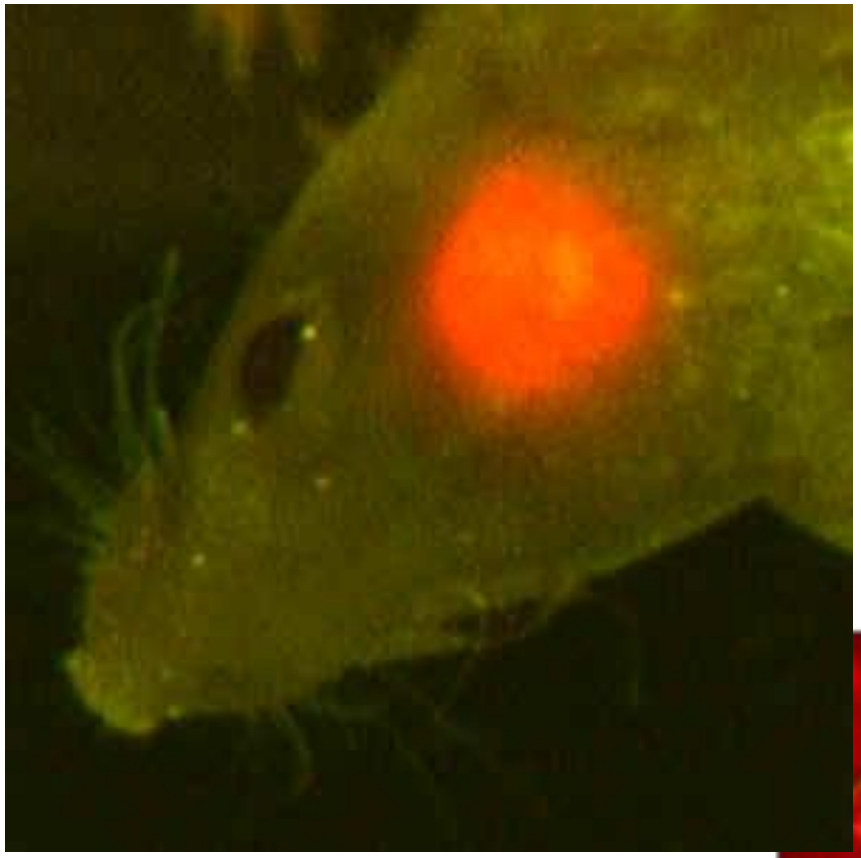
Визуализация опухолей

Терапия

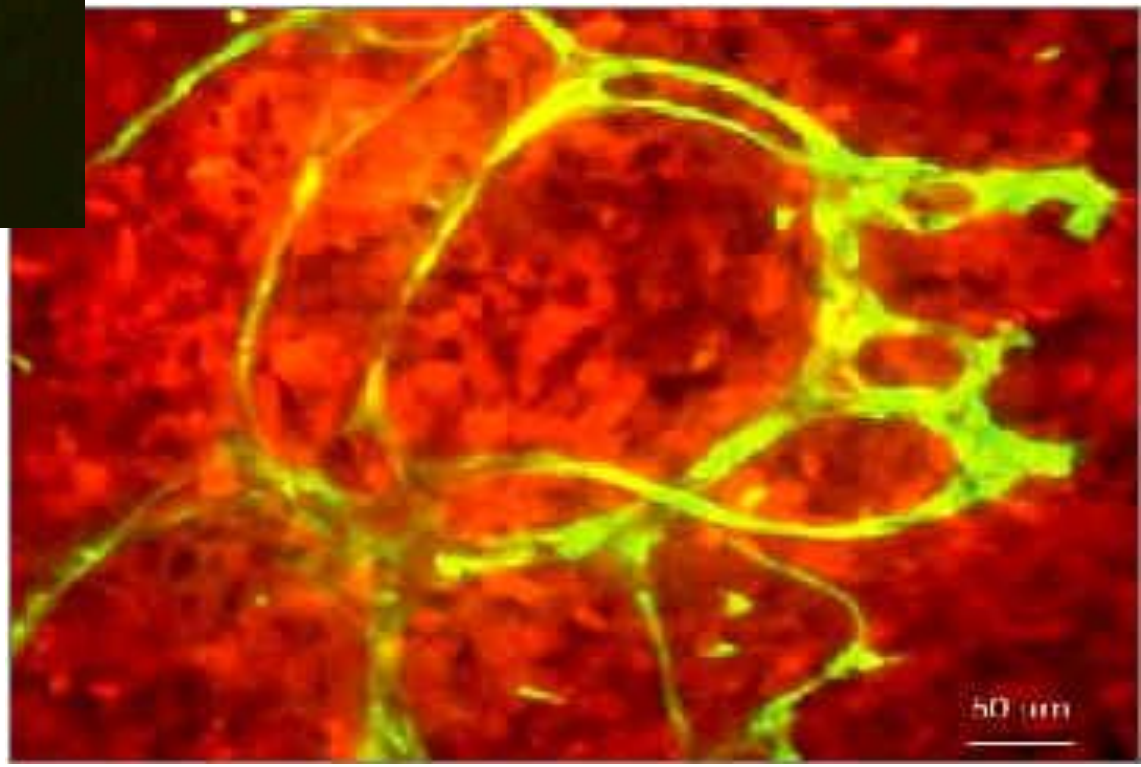
контроль

опыт

Отбор и проверка прототипов лекарственных препартов

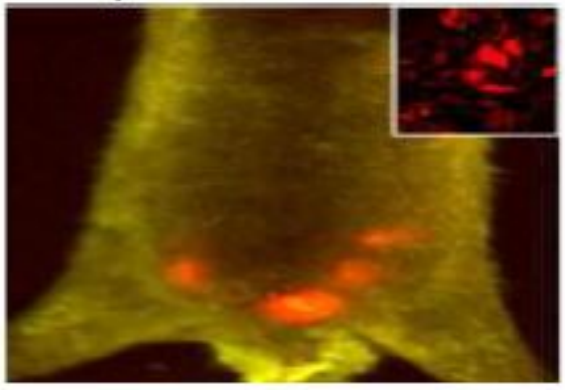


Опухолевые клетки человека, экспрессирующие DsRed можно подсадить в такую мышь .
Можно исследовать образование метастаз или ангиогенез в опухоли .

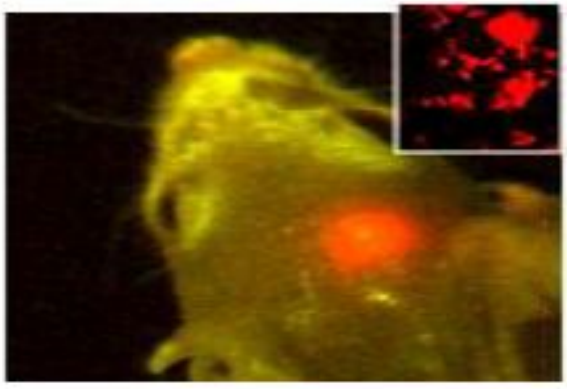


Мечение опухолевых клеток в мыши

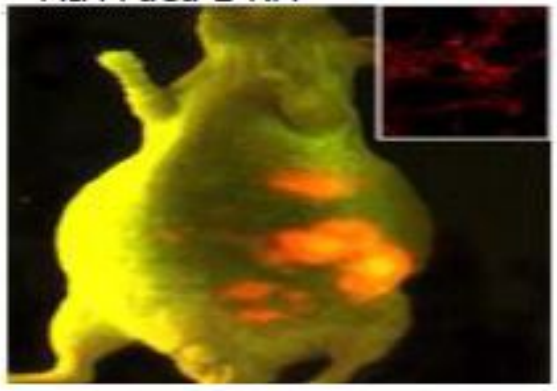
Рак простаты PC-3-RFP



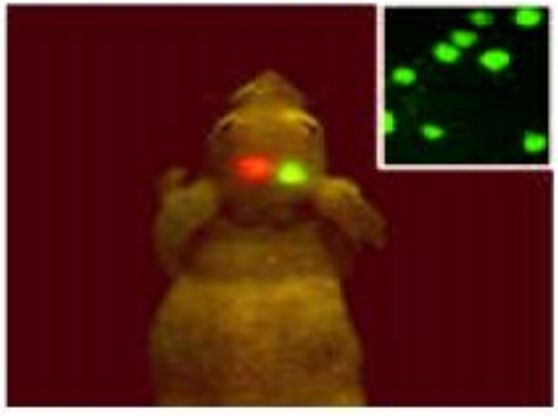
Глиома U87-RFP



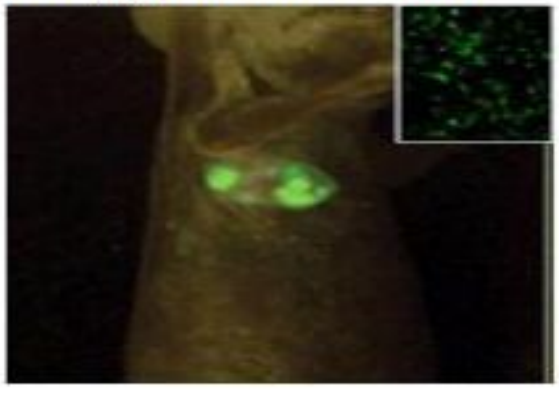
Рак поджелудочной железы MIA-PaCa-2-RFP



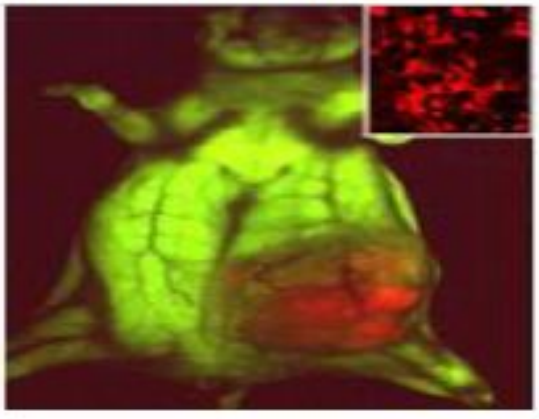
Глиома U87-RFP and GFP

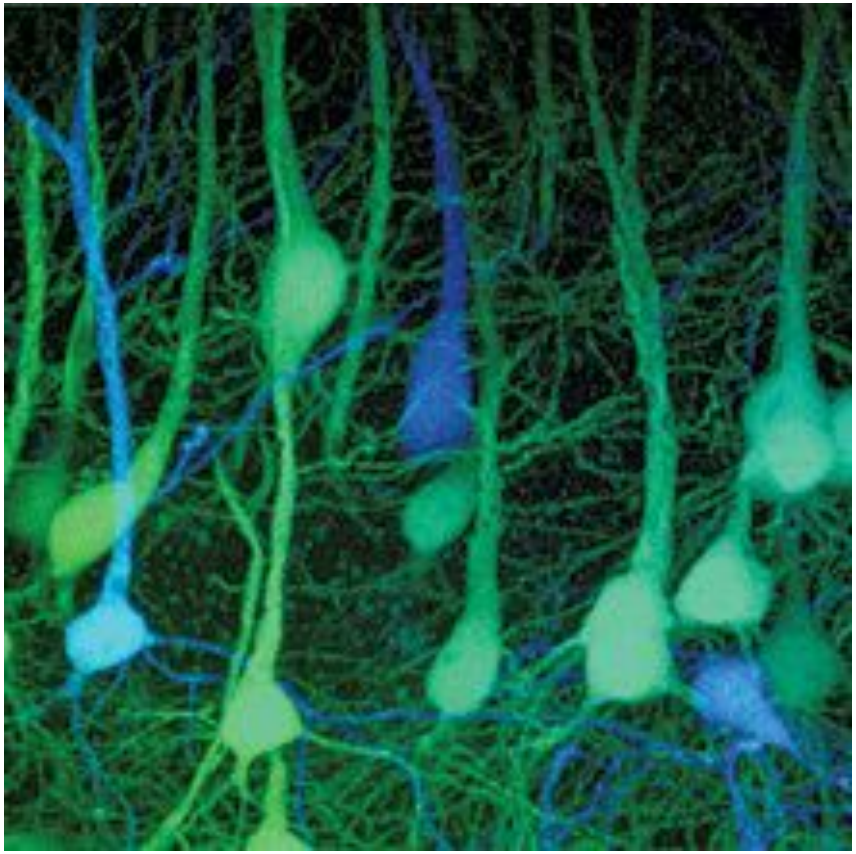


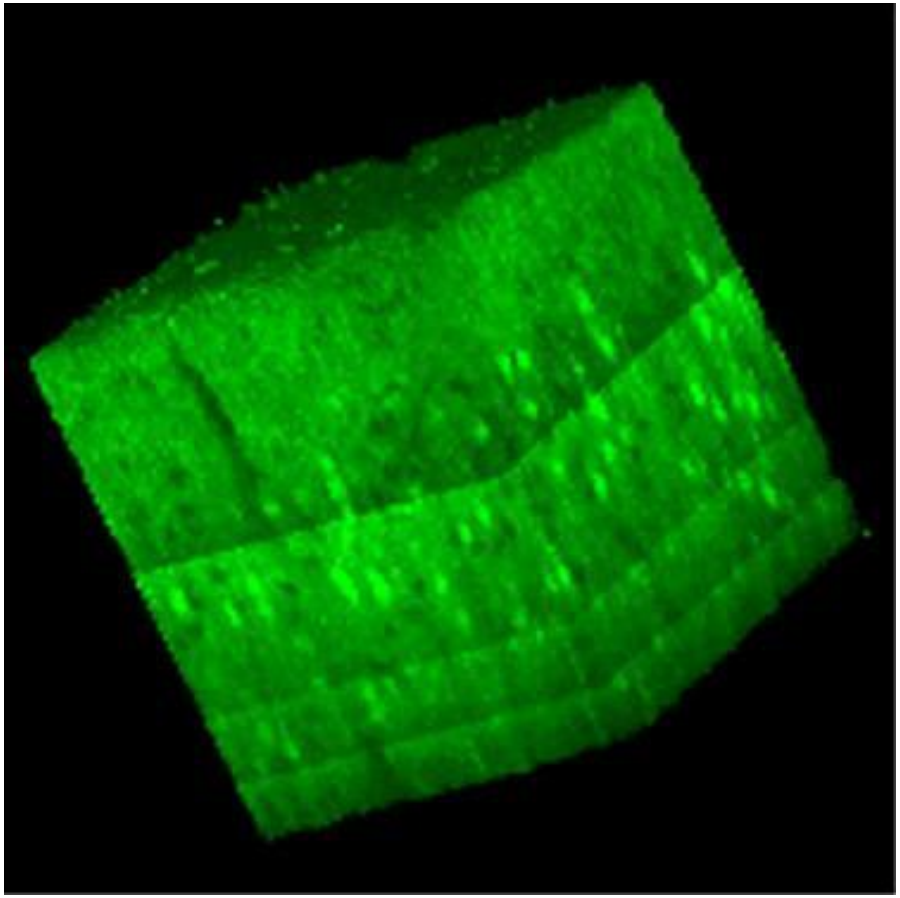
Рак груди MDA-MB-435-GFP



Рак кишечника HCT-116-RFP





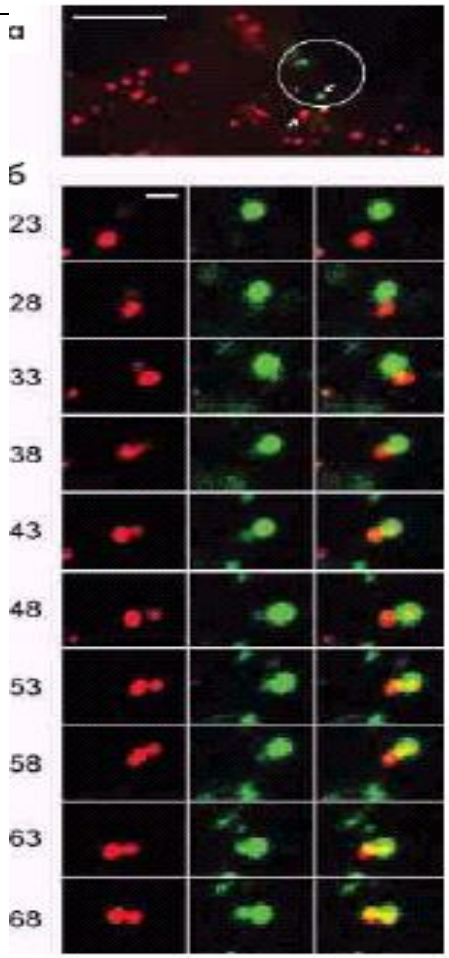


Малярия

1. Флуоресцентный таймер
Меняют цвет с течением времени

Исследование синтеза белков – сначала синтезируемый белок зеленый, белок сменит цвет на красный – клетка станет желтая. Когда синтез прекратится, будет постепенно краснеть.

2. Разжигающий красный белок. Дает малиновую окраску клетки, сам не флуоресциирует. Облучили – засветился. Разжигание обратимое и необратимое (до года)

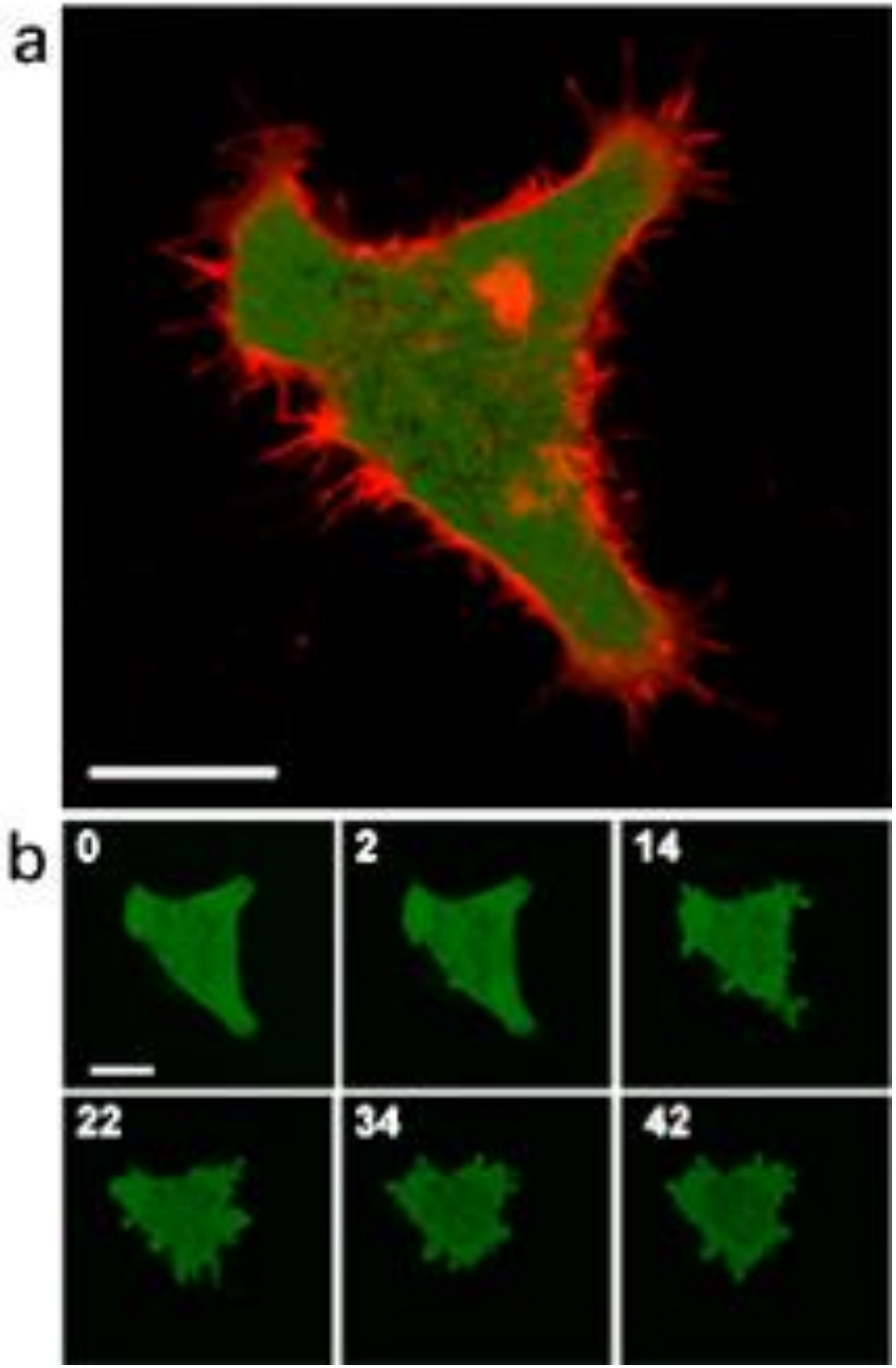


3. Фотопереключаемые производные
PS-GFP (голубой-зеленый)
Dendra (зеленый-красный)
Исследования перемещения клеток, органелл, белков. Обмен содержимым между эндосомами.

4. Излучение в инфракрасной области
iRFP...

5. Образование активных форм кислорода MiniSOG (mini Singlet Oxygen Generator)) KillerRed

Белок	Цвет	Максимум возбуждения/эмиссии (нм)
TagFPs, мономерные белки для FRET приложений и мечения белков		
TagBFP	синий	402 / 457
TagCFP	голубой	458 / 480
TagGFP2	зеленый	483 / 506
TagYFP	желтый	508 / 524
TagRFP	оранжево-красный	555 / 584
FusionRed	красный	580 / 608
mKate2	дальне-красный	588 / 633
TurboColors, димерные белки для мечения клеток и анализа активности промоторов		
TurboGFP	зеленый	482 / 502
TurboYFP	желтый	525 / 538
TurboRFP	красный	553 / 574
TurboFP602	красный	574 / 602
TurboFP635	дальне-красный	588 / 635
Флуоресцентные белки для визуализации клеток внутри целых организмов		
Katushka2S	дальне-красный	588 / 633
TurboFP650	ближне-инфракрасный	592 / 650
NirFP	ближне-инфракрасный	605 / 670
Фотоактивируемые белки		
PS-CFP2		
до активации	голубой	400 / 468
после активации	зеленый	490 / 511
PA-TagRFP		
до активации	нет	/
после активации	красный	562 / 595
KFP-Red		
до активации	нет	580 / 600
после активации	красный	574 / 602

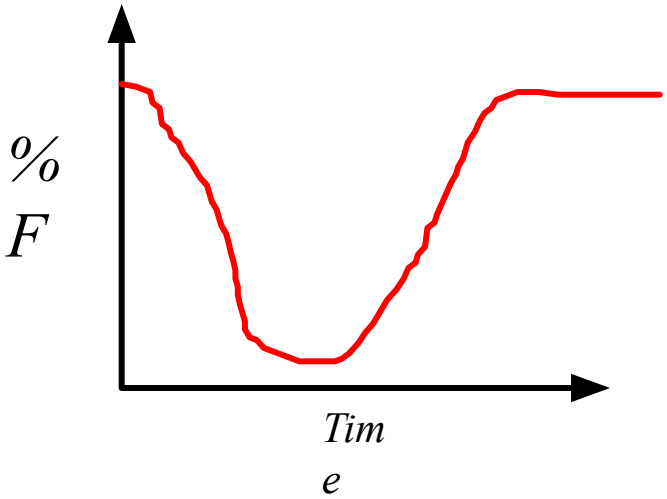


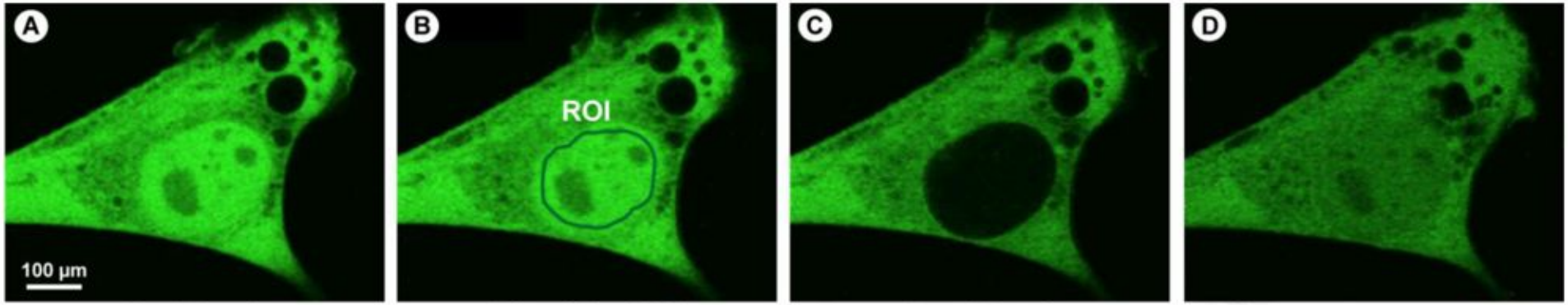
4. Использование KillerRed для индукции гибели клетки при облучении ее светом.

Направленная инактивация клетки или белка.
Инактивация единичной клетки в эмбриогенезе

FRAP

Fluorescence recovery after photobleaching





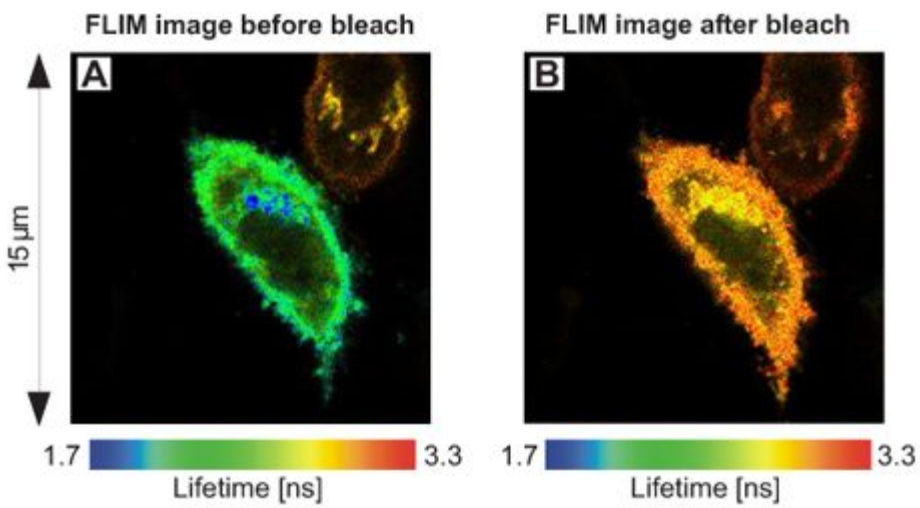
Pre-bleach | Bleaching ROI | Post-bleach | Fluorescence recovery

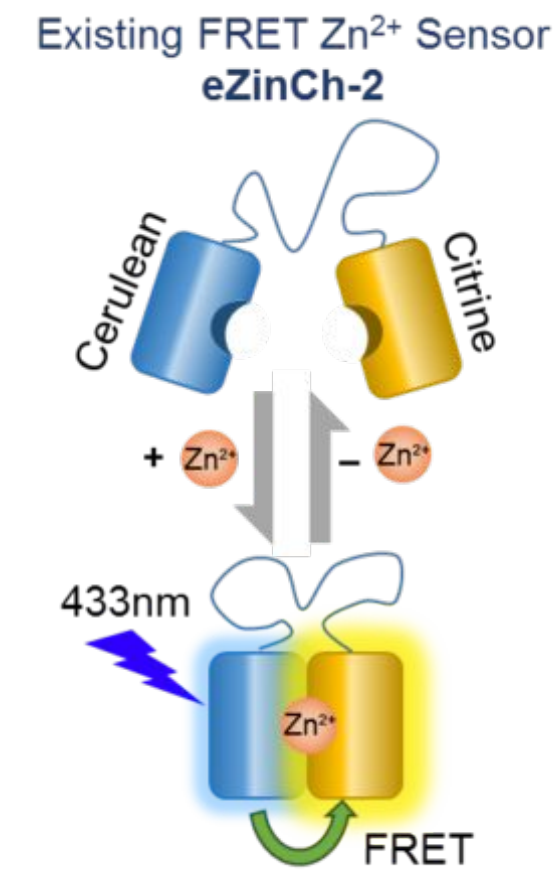
FRET

fluorescence resonance energy transfer

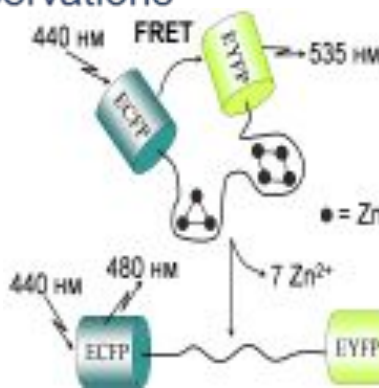
ИНДУКТИВНО-РЕЗОНАНСНЫЙ (ФЕРСТЕРОВСКИЙ) ПЕРЕНОС ЭНЕРГИИ

10-50A





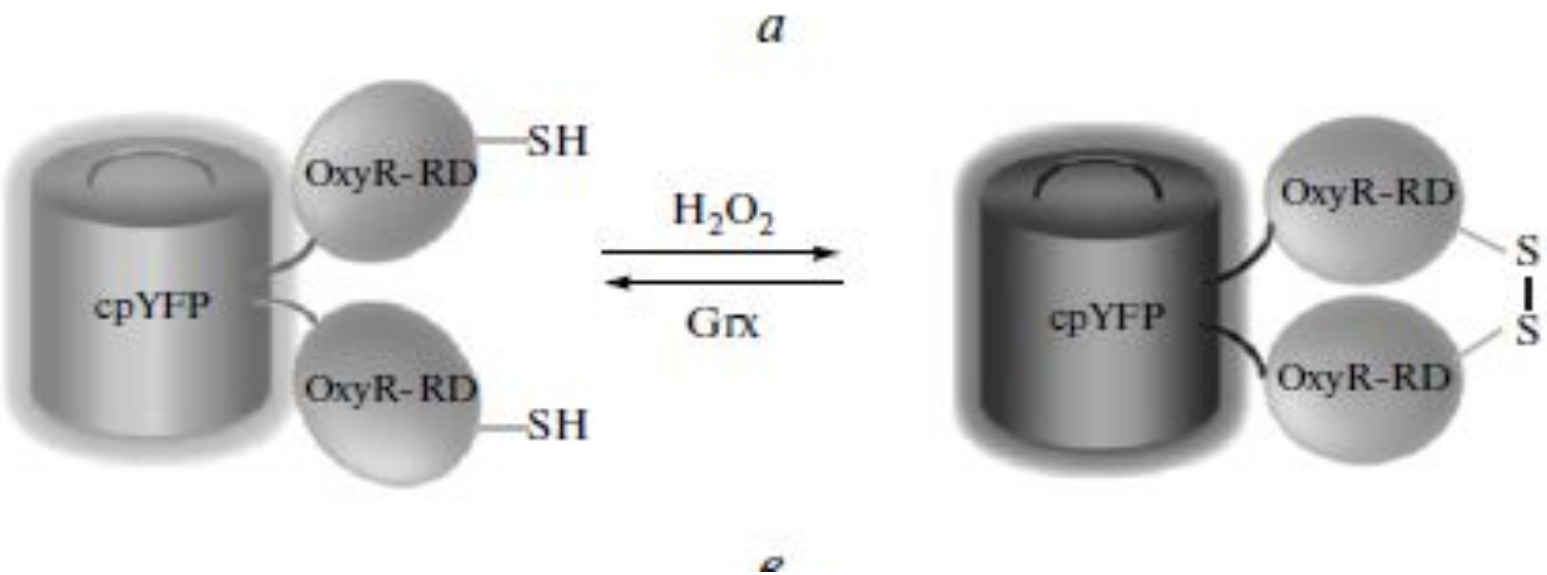
- Photobleaching problems
- No long term observations

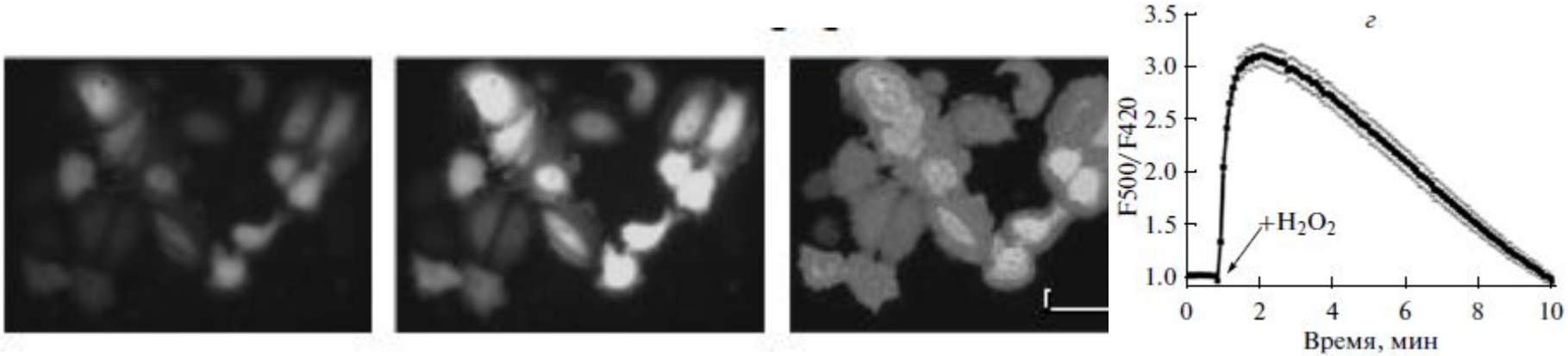


pH сенсоры **Cl-сенсоры**

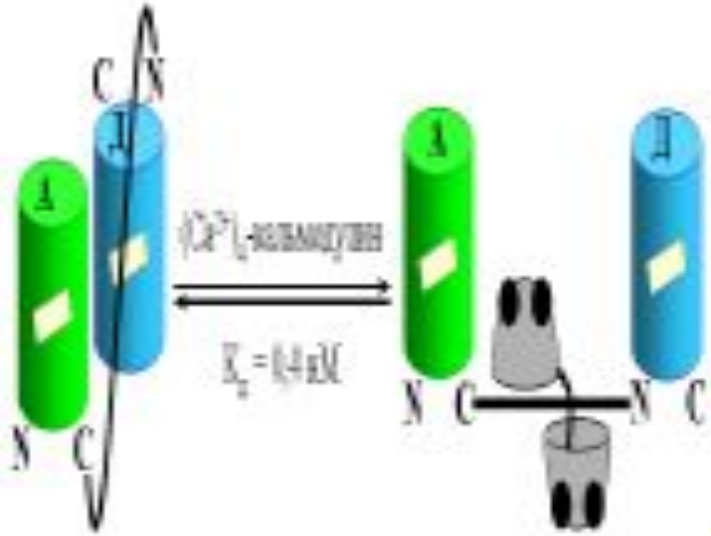
1) не требуется проникновение эфиров и гидролиз низкомолекулярных красителей. Можно измерять pH с малым фоновым сигналом и без вытекания индикатора из клеток в ходе экспериментов даже при 37 °C; отсутствует токсичность, связанная с применением химических индикаторов, и опасность повреждения, обусловленная инвазивным способом их введения.
2) GFP можно направить в определенные ткани, различные типы клеток (используя специфичные промоторы), органеллы или в конкретные клеточные домены путем слияния с сигналом внутриклеточной локализации. Это позволяет измерять pH в специфических внутриклеточных участках.
3) С помощью мутагенеза можно изменять такие свойства индикатора, как pKa и динамический диапазон.

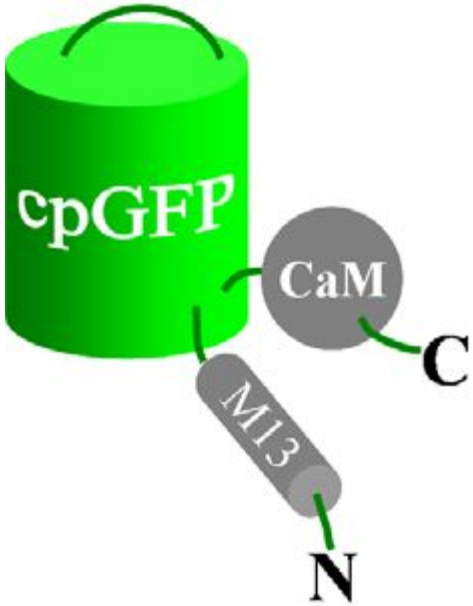
pH Сенсор


а
OxyR-RD
SH
cpYFP
OxyR-RD
SH
H_2O_2
Grx
OxyR-RD
S
S
cpYFP
OxyR-RD


г
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
F500/F420
$+H_2O_2$
0
2
4
6
8
10
Время, мин

Сенсоры: кальций, цинк, медь….





Thermo fisher INVITITROGEN Organelle Lights™ Intracellular Targeted Fluorescent Proteins

Бакуловирус. Вирус насекомых. Наиболее известный Autographa californica,

1. **Высокая эффективность трансфекции в разных типах клеток, включая стволовые.**
2. **Слабый цитотоксический эффект.**
3. **Вирус не опасен для млекопитающих.**
4. **Одновременная трансфекция разными генами.**
5. **Хорошо размножающийся вирус (высокий титр).**

Evrogen, BacMam

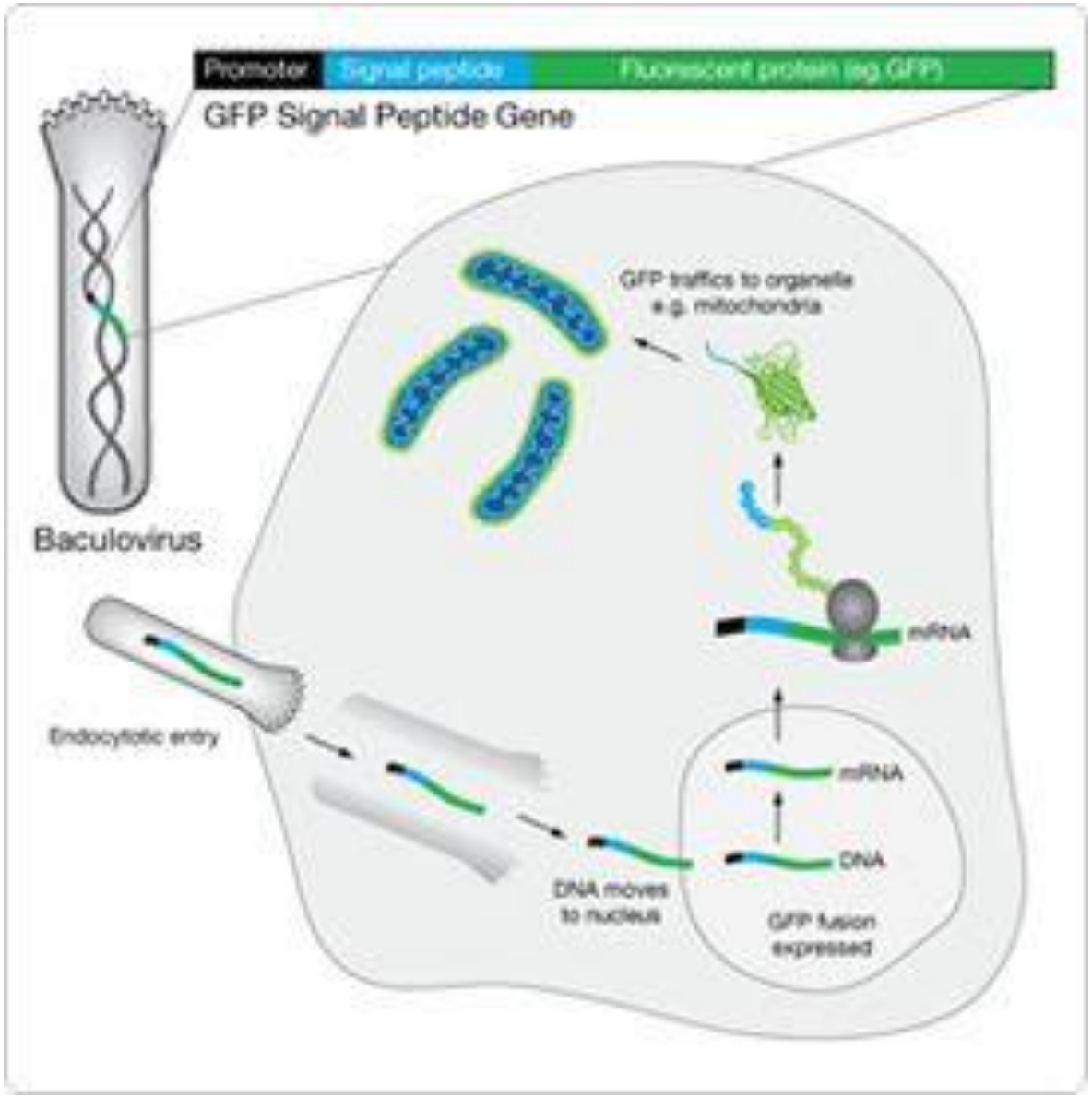

Promoter
Signal peptide
Fluorescent protein (eg GFP)
GFP Signal Peptide Gene
Baculovirus
GFP traffics to organelle
e.g. mitochondria
mRNA
Endocytotic entry
mRNA
DNA
DNA moves
to nucleus
GFP fusion
expressed

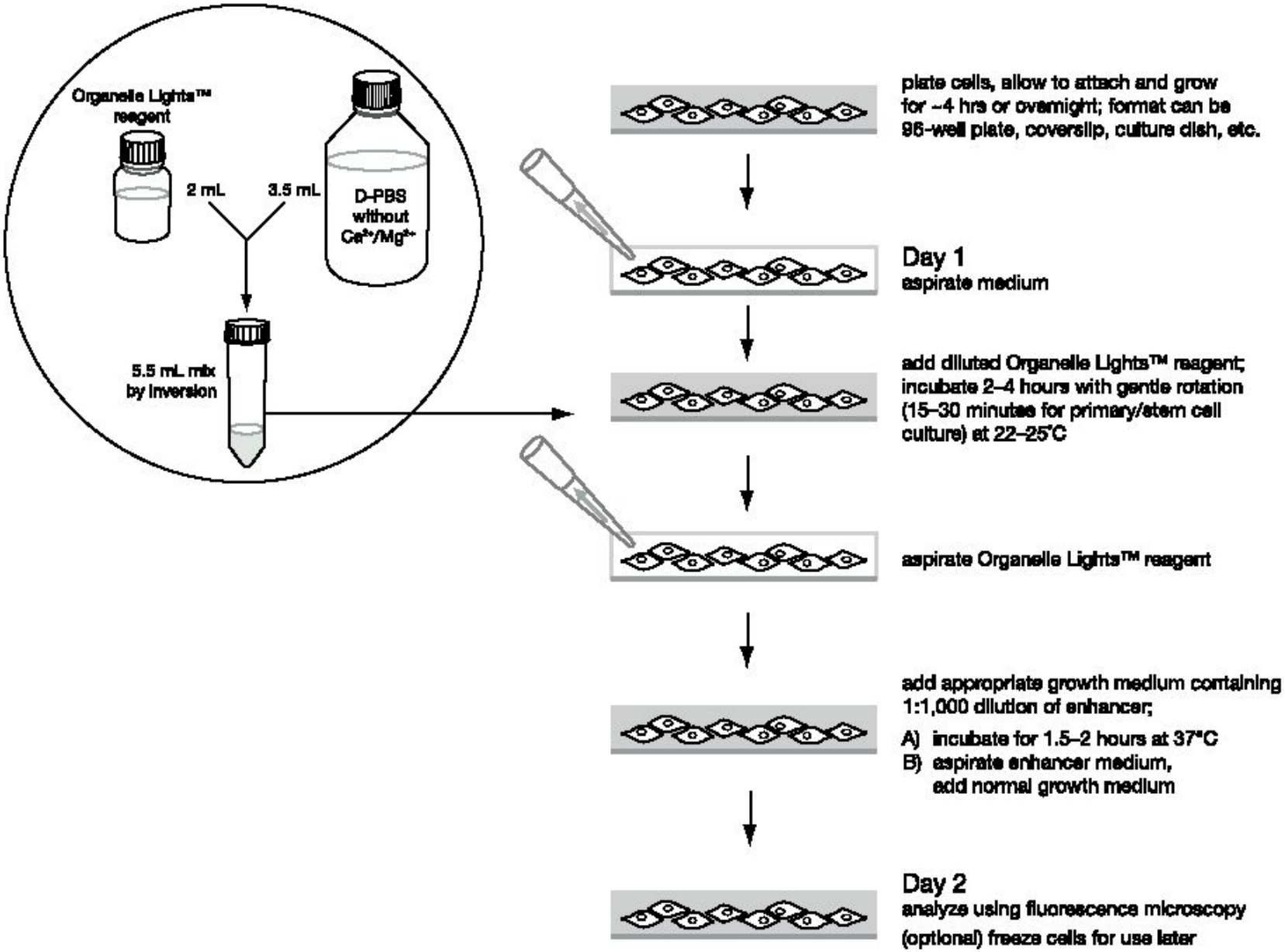
Table 1. Contents and storage information.

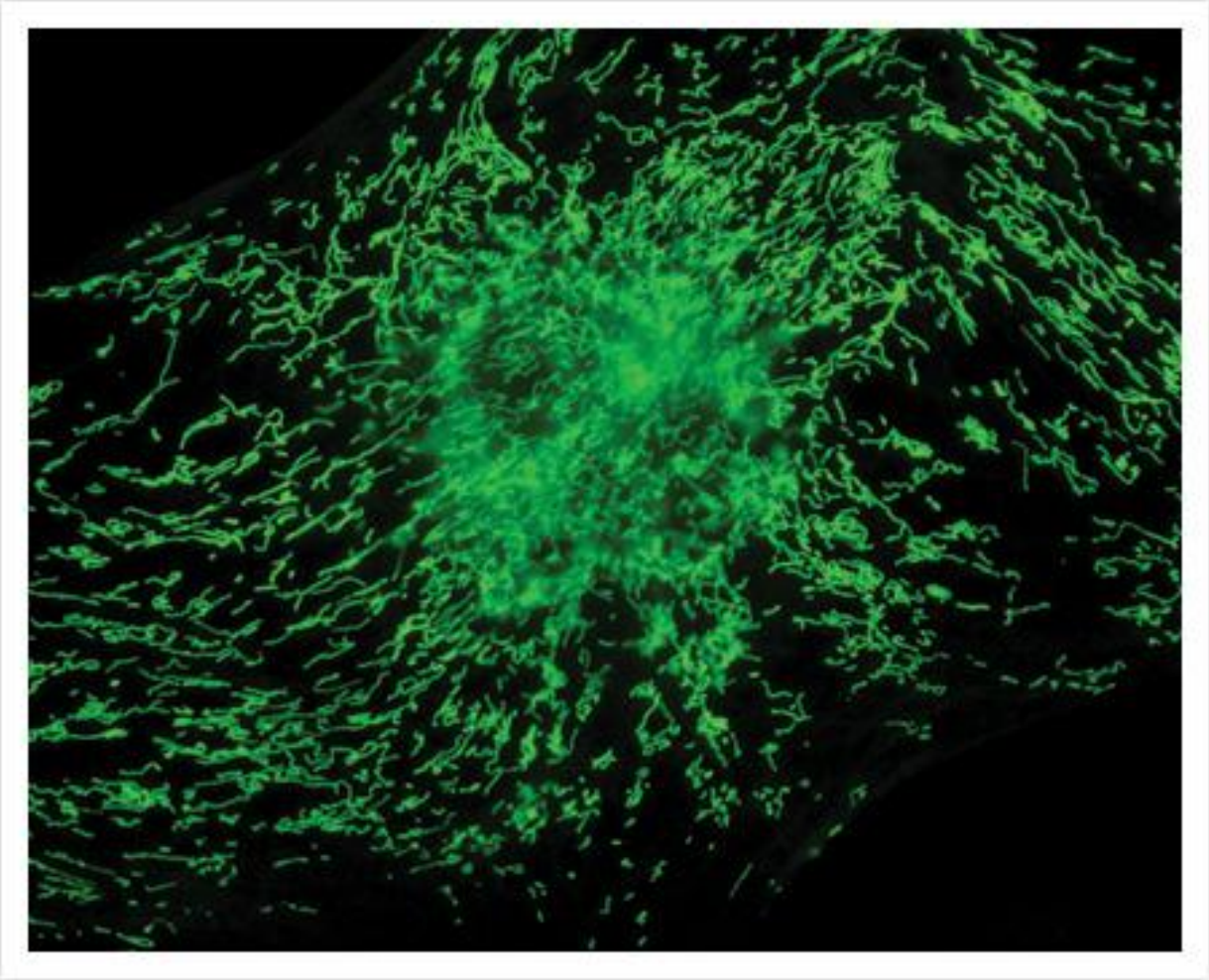
Material	Amount	Storage	Stability
Organelle Lights™ reagent* (Component A)	5 mL	• 2–6°C • Desiccate • Protect from light • DO NOT FREEZE	If stored correctly kit is stable for 6 months.
Organelle Lights™ enhancer (Component B)	ND		
Dimethylsulfoxide (DMSO, Component C)	120 µL		

***Approximate fluorescence excitation/emission maxima (nm):** 435/485 for CFP; 485/520 for GFP, 500/535 for YFP, (CFP, GFP, and YFP can all be seen through a FITC filter) 550/580 for OFP (Cy3® or TRITC filters are acceptable). ND = Not disclosed.

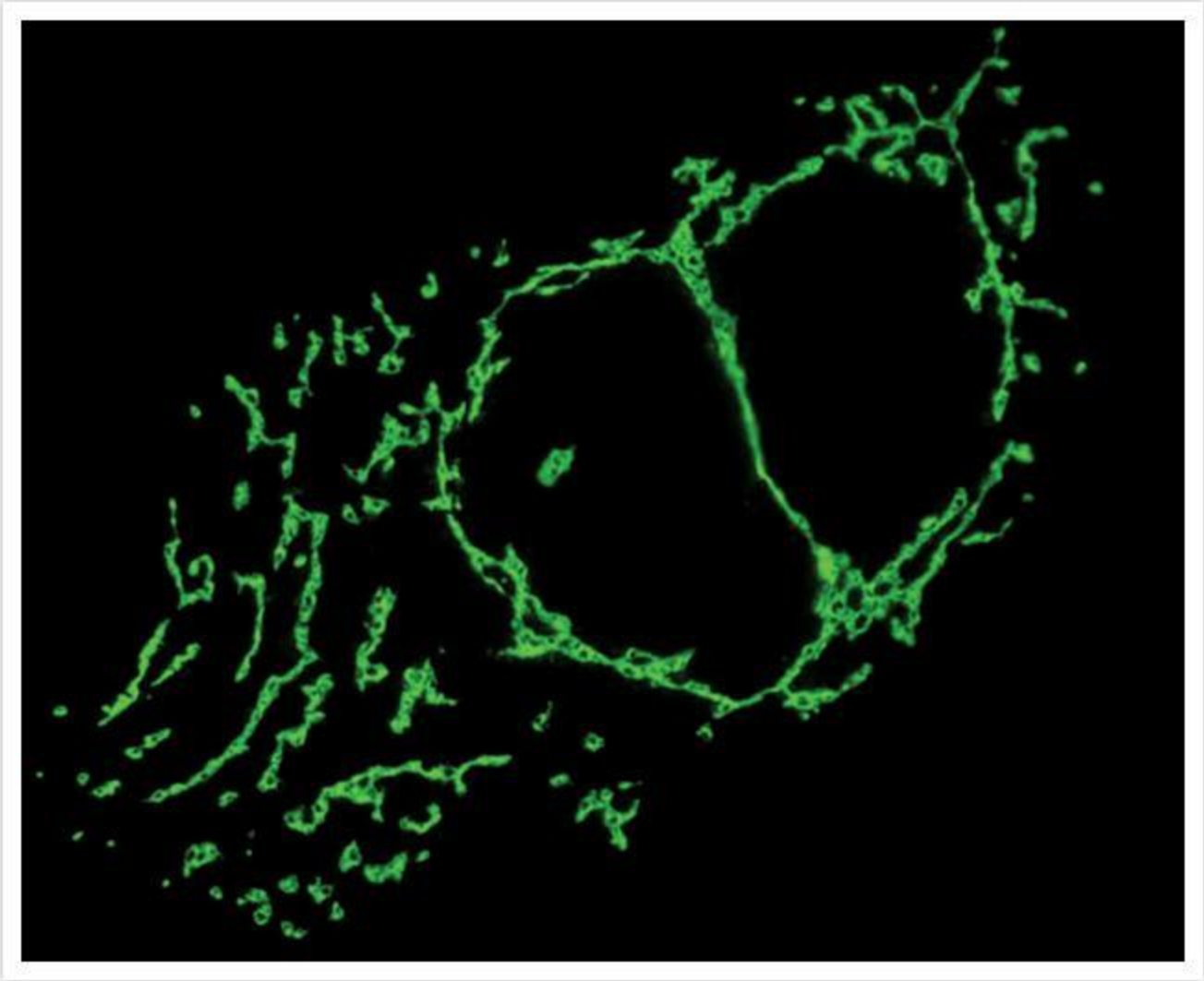
Table 2. Organelle Lights™ targeting information and available colors.

Organelle or subcellular structure	Targeting sequence	Reference	CFP	GFP	YFP	OFP
Endoplasmic reticulum (ER)	ER signal sequence of calreticulin and KDEL (ER retention signal)	3		X		X
Golgi	Human Golgi-resident enzyme *N*-acetylgalactosaminyltransferase-2	4		X		X
Plasma membrane (PM)	Myristoylation/palmitoylation sequence from Lck tyrosine kinase	5	X	X	X	X
Mitochondria	Leader sequence of E1alpha pyruvate dehydrogenase	6		X		X
Nuclear envelope (NE)	Nesprin 1alpha C-terminal transmembrane domain (aa 923–982)	7		X		
Nucleus	SV40 nuclear localization sequence (C-terminus)	8	X	X	X	X
Peroxisomes	Peroxisomal C-terminal targeting sequence	9		X		X
Cytoplasm	Nuclear export sequence (C-terminus)	10		X		


Organelle Lights™ reagent
2 mL
3.5 mL
D-PBS without Ca2+/Mg2+
5.5 mL mix by inversion
plate cells, allow to attach and grow for ~4 hrs or overnight; format can be 96-well plate, coverslip, culture dish, etc.
Day 1
aspirate medium
add diluted Organelle Lights™ reagent; incubate 2–4 hours with gentle rotation (15–30 minutes for primary/stem cell culture) at 22–25°C
aspirate Organelle Lights™ reagent
add appropriate growth medium containing 1:1,000 dilution of enhancer;
A) incubate for 1.5–2 hours at 37°C
B) aspirate enhancer medium, add normal growth medium
Day 2
analyze using fluorescence microscopy
(optional) freeze cells for use later



Muntjac cell transduced with Organelle Lights Mito-GFP fluorescent protein. Cells were fixed prior to imaging.



OK (opossum kidney) cell transduced with Organelle Lights Golgi-GFP fluorescent protein.
Cells were fixed prior to imaging.

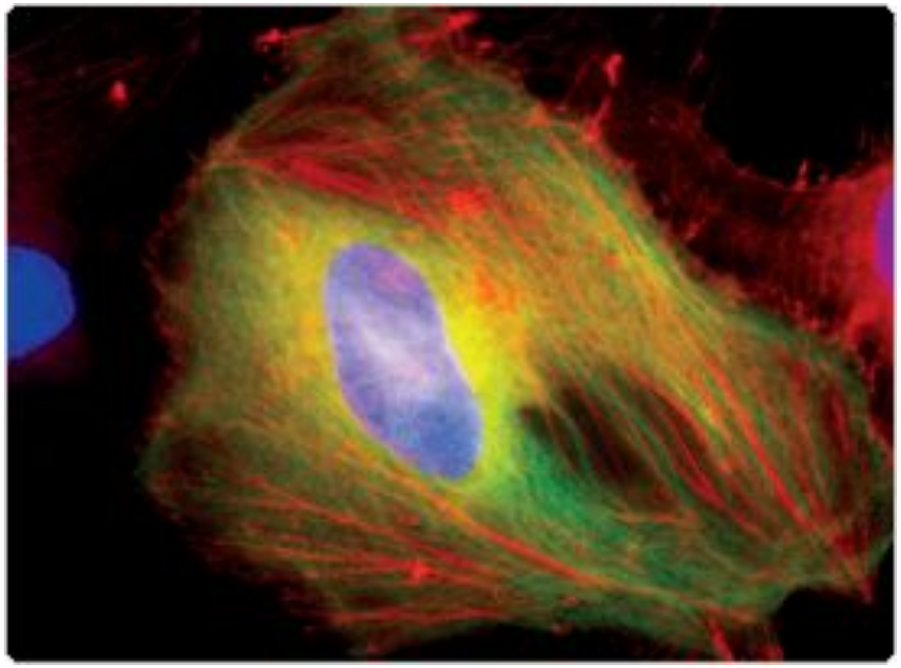


Figure 11.1.2 HeLa cell labeled with CellLight Actin-RFP (C10583 HeLa cell labeled with CellLight Actin-RFP (C10583, C10127 HeLa cell labeled with CellLight Actin-RFP (C10583,

Calcium Related Applications

- **Probe Ratioing**
  - Calcium Flux (Indo-1)
  - pH indicators (BCECF, SNARF)

Molecule-probe	Excitation	Emission
Calcium - Indo-1	351 nm	405, >460 nm
Calcium- Fluo-3	488 nm	525 nm
Calcium - Fura-2	363 nm	>500 nm
Calcium - Calcium Green	488 nm	515 nm
Magnesium - Mag-Indo-1	351 nm	405, >460 nm
Phospholipase A- Acyl Pyrene	351 nm	405, >460 nm

Фагоцитоз, эндоцитоз, транспорт в ядро

Бактериальные липополисахариды

Субъединицы **Cholera Toxin Subunit B** – проба на рафты

Флуоресцентные, биотинилированные

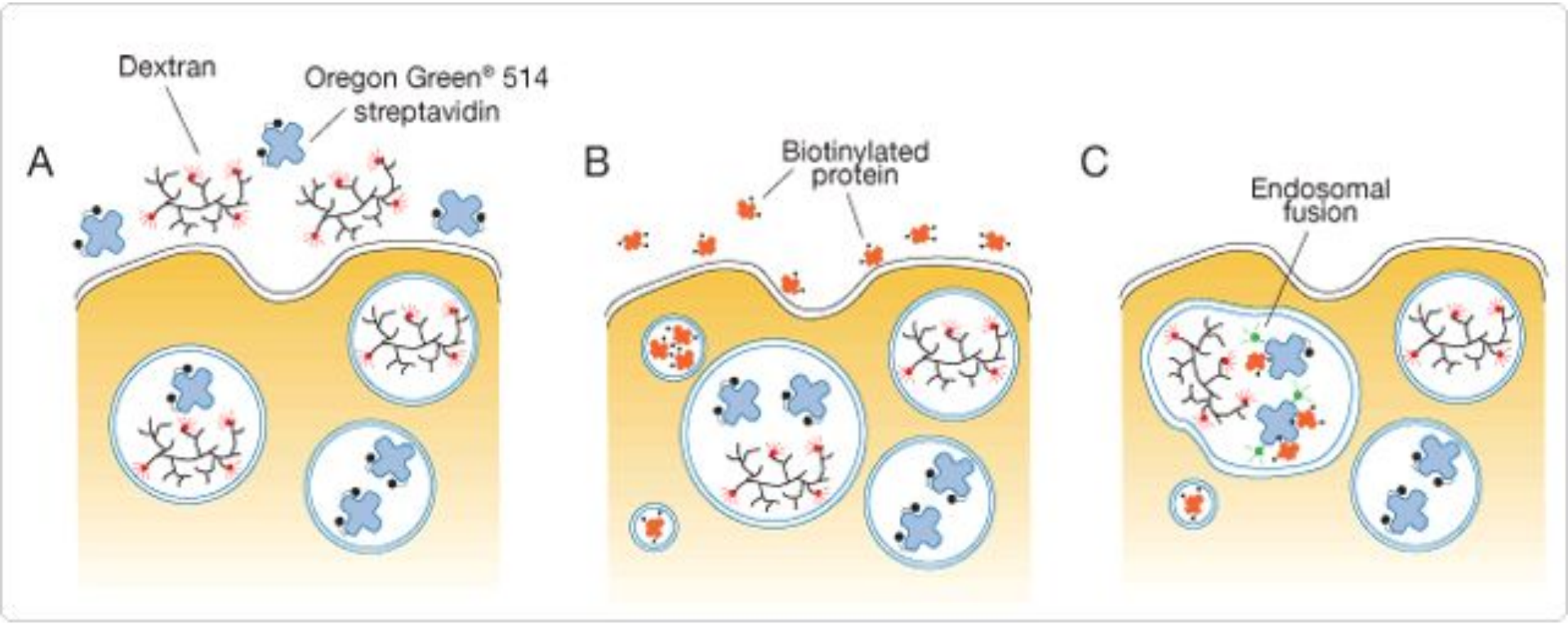
Коллаген, фибриноген

Гистон Н1

Декстран, микросферы

Трансферин, эпидермальный фактор роста

Рециклирование везикул в синапсах **FM 1-43**

Желатин, инсулин, казеин, дексаметазон (кортикостериоидные рецепторы)

Detection of endosomal fusion