

## **Färbung lebender Zellen mit endoplasmatischem Retikulum-selektiven Farbstoffen LumiTracker® ER**

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; werfen Sie den Überstand.
2. Waschen Sie die Zellen zweimal mit vorgewärmtem HBSS, jeweils 5 Minuten bei 37 °C.
3. Die empfohlene Zelldichte beträgt  $1 \times 10^6$  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<sub>2</sub>.
5. Zentrifugieren Sie die Zellen bei 400 *g* für 3-4 Minuten bei Raumtemperatur; werfen Sie den Überstand.

6. Waschen Sie die gefärbten Zellen zweimal mit Medium.
7. Resuspendieren Sie die Zellen in serumfreiem Zellkulturmedium oder PBS.
8. Analysieren 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<sub>2</sub>.
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](#).