

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.

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 Ca^{2+} und 0,5 mM Mg^{2+} 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 50 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 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in frischem Medium inkubieren.
8. Die Zellen in frischem Medium abspülen.
9. *(Optional)* Gefärbte Zellen können für 2 Minuten bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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.

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

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

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

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