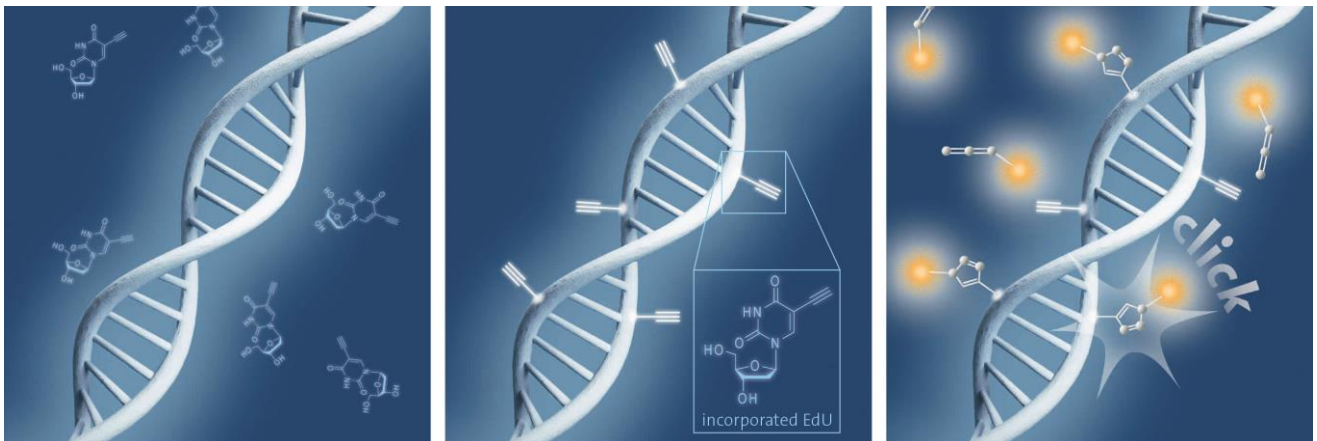




Gebrauchs- anweisung

EdU Click-488

ROTI[®]kit für Imaging



EdU Click-488

ROTI®kit für Imaging

Das *EdU Click-488* Kit beinhaltet Reagenzien für bis 100 Reaktionen (je 500 µL).

Einleitung und Produktbeschreibung:

Die Detektion der Zellproliferation ist von größter Bedeutung für die Überwachung von Zellvitalität, Genotoxizität oder zur Bestimmung und Bewertung von Krebsmedikamenten. Standardmäßig wird die DNA-Synthese in proliferierenden Zellen durch den Einbau von Thymidin-Analoga wie [³H]-Thymidin oder BrdU (5-Brom-2'-desoxyuridin) in die DNA während der Zellteilung nachgewiesen. Visualisierung findet hierbei autoradiographisch bzw. über Anti-BrdU-Antikörpermarkierung statt. Beide Methoden weisen jedoch einige Einschränkungen auf. Da die Arbeit mit der [³H]-Thymidin-Methode aufgrund der Radioaktivität und der zuweilen sehr zeitaufwändigen Analytik (nachteilig bei schnellen Hochdurchsatz Anwendungen) mühsam ist, werden derzeit fast ausschließlich BrdU-basierte Assays verwendet. Bei der BrdU-Methode ist die notwendige Denaturierung der doppelsträngigen DNA durch teils harsche Bedingungen als Nachteil anzusehen. Dieser Schritt ist notwendig um die Doppelhelix der DNA aufzubrechen und so die Detektion über strukturell komplexe Anti-BrdU-Antikörper zu ermöglichen.

Die Zellproliferationsassays von Roth mit EdU (5-Ethynyl-2'-desoxyuridin) bieten eine überlegene Alternative zu den Bromdesoxyuridin(BrdU)- und den [³H]-Thymidin-Assays um DNA-Synthese direkt zu messen. Ebenso wie BrdU wird das Thymidin-Analagon EdU bei der DNA-Neusynthese in teilungsaktive Zellen eingebaut. Unsere *EdU Click Kits* basieren nicht auf der Verwendung von Antikörpern und benötigen daher keine DNA-Denaturierung zur Erkennung des eingebauten Nukleosids. Stattdessen nutzen die *ROTI®kits für Imaging* die Click Chemie für den Nachweis durch verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe. Weiterhin reduziert das aufgezeigte Detektionsprotokoll die Gesamtzahl der Arbeitsschritte und verringert so auch signifikant die Gesamtarbeitszeit. Das einfach anzuwendende Click Chemie-basierte Nachweisverfahren ist innerhalb von 30 Minuten abgeschlossen.

Nur für Laborzwecke geprüft:

Die Informationen in diesem Dokument können sich jederzeit ohne Vorankündigung ändern. Die Carl Roth GmbH + Co. KG übernimmt keine Verantwortung für Fehler, die in diesem Dokument enthalten sein können.

Die Carl Roth GmbH + Co. KG lehnt jegliche Haftung in Bezug auf dieses Dokument, weder ausdrücklich noch stillschweigend, ab, dies schließt unter anderem die Marktfähigkeit oder die Eignung für einen bestimmten Zweck mit ein. In keinem Fall ist die Carl Roth GmbH + Co. KG haftbar, weder vertraglich, bei unerlaubter Handlung, unter Garantie noch unter jeder Statue oder auf jeder anderen Grundlage für spezielle, zufällige, indirekte, Mehrfach- oder Folgeschäden im Zusammenhang mit diesem Dokument oder auch diesem Dokument Hervorgehendes, einschließlich, aber nicht beschränkt auf dessen Verwendung.

Gefahren:

EdU: ⚠ Gefahr H340-H360
P202-P280-P308+P313

Catalyst Solution: ⚠ ⚠ Achtung H302-H315-H319-H400-H410
P280-P301+P312a-P302+P352a-P305+P351+P338

Reaction Buffer: ⚠ Achtung H315-H319
P280-P302+P352a-P305+P351+P338

MSDS: das entsprechende MSDS kann von unserer Website www.carlroth.com heruntergeladen werden.

Zitation in der Literatur:

Wir bitten Sie bei der Veröffentlichung eines Verfahrens unter Verwendung dieses Produkts, darauf mit dem Namen „Carl Roth's ROTI®kit für Imaging (EdU Click-488)“ zu verweisen.

1. Material und Lagerbedingungen der im Kit enthaltenen Komponenten

Röhrchenfarbe	Menge	Komponente	Lagerung*
Gelb	5 mg	5-Ethynyl-deoxyuridine (5-EdU)	-20 °C
Rot	130 µL	6-FAM-Azide (10 mM)	dunkel, -20 °C
Lila	2 x 2 mL	DMSO	RT
Orange	4 x 2 mL	Reaction buffer (10x)	2 – 8 °C
Grün	2 x 2 mL	Catalyst solution	RT
Blue	4 x 200 mg	Buffer additive ¹	-20 °C

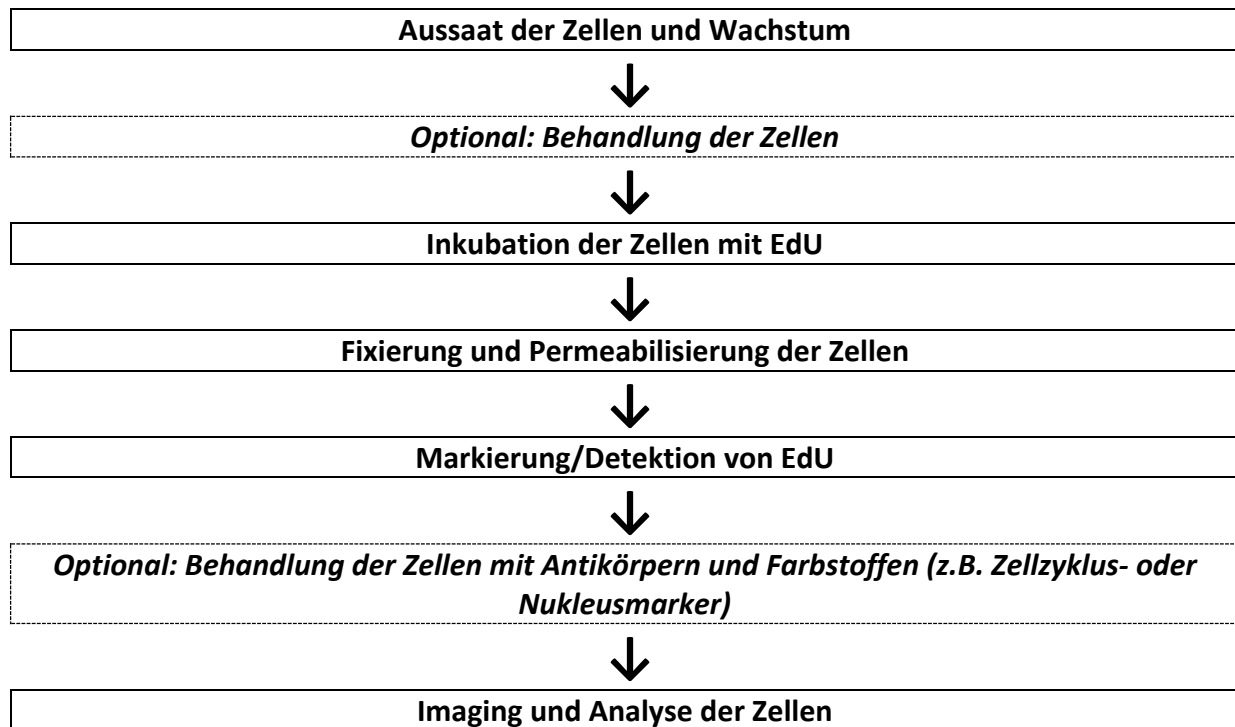
*Dieser Kit ist für mindestens ein Jahr stabil, wenn die Komponenten wie beschrieben gelagert werden.

¹Wenn die Lösung beginnt eine braune Farbe zu entwickeln, zersetzt sich die Komponente und muss entsorgt werden. Wir empfehlen mehrere Aliquote vorzubereiten um wiederholte Einfrier- und Auftau-Zyklen zu vermeiden!

2. Benötigte Materialien und Ausrüstung – nicht in diesem Kit enthalten

- Adhärenz Zellen (auf einem Mikroskopieträger)
- Reaktionsröhrchen (Größe abhängig vom benötigten Volumen des Reaktionscocktails)
- Gepufferte Salzlösung (z.B. PBS, DPBS oder TBS, pH 7,2 – 7,6)
- Geeignetes Zellkulturmedium
- Fixierlösung (3,7% Formaldehyd in PBS)
- Permeabilisierungsreagenz (z.B. 0,5% Triton® X-100 in PBS)
- 18 MΩ gereinigtes Wasser
- 3% BSA (Bovines Serum Albumin) in PBS (3% BSA in PBS), pH 7,4
- 18 x 18 mm Deckgläser
- *Optional:* 6-well Mikrotiterplatte

3. Arbeitsablauf



4. Herstellung der Stammlösungen

- 4.1** Vor dem Öffnen alle Röhrcchen auf Raumtemperatur bringen.
- 4.1.1** Zur Herstellung einer 10 mM EdU-Stammlösung werden 2 mL DMSO (lila Röhrcchen) zu EdU (gelbes Röhrcchen) gegeben und gut durchmischt bis sich der Feststoff komplett gelöst hat. Nach dem Gebrauch wird die Restlösung bei -20 °C gelagert. Bei derartiger Lagerung ist diese Stammlösung bis zu einem Jahr stabil.
- 4.1.2** Zur Herstellung einer 10x *Buffer additive*-Stammlösung (blaues Röhrcchen) werden 2 ml 18 MΩ Wasser zum blauen Röhrcchen gegeben und gemischt bis sich der Feststoff vollständig gelöst hat. Nach Gebrauch lagern Sie die Restlösung bei -20 °C. Bei derartiger Lagerung ist diese Stammlösung für bis zu 6 Monate haltbar. Wenn die Lösung beginnt eine braune Farbe zu entwickeln, zersetzt sich die Komponente und muss entsorgt werden. Wir empfehlen mehrere Aliquote vorzubereiten um wiederholte Einfrier- und Auftau-Zyklen zu vermeiden!

5. Markierung von Zellen mit EdU

Dieses Protokoll kann für jeglichen adherenten Zelltyp angepasst werden. Als gute EdU-Ausgangskonzentration kann 10 µM angesehen werden. Variationen des Zelltyps, Zelldichte, Wachstumsmedium und weitere Faktoren können die Markierung beeinflussen

- 5.1** Säen Sie die Zellen auf Deckgläsern aus und lassen Sie diese bis zu der gewünschte Dichte (typischerweise ≈ 80% Konfluenz) wachsen.
- 5.2** Bereiten Sie eine 2x EdU-Arbeitslösung vor, indem Sie die 10 mM EdU-Stammlösung (gelbes Röhrcchen) mit frischem Kulturmedium verdünnen. Wenn Sie in Ihrem

Zellexperiment mit einer Inkubationskonzentration von 10 µM starten möchten, dann bereiten Sie eine 2x Arbeitslösung in der Konzentration von 20 µM vor.

- 5.3 Wärmen Sie die 2x EdU-Lösung etwas an und mischen Sie diese gut mit demselben Volumen an Kulturmedium, in dem die Deckgläser lagern. So erhalten Sie eine 1x EdU-Lösung. Wir empfehlen nicht das komplette Kulturmedium mit frischem Medium zu ersetzen, da dies die Zellteilung beeinflussen kann.
- 5.4 Entfernen Sie den Rest an Medium von den Deckgläsern und geben Sie die 1x EdU-Lösung zu.
- 5.5 Inkubieren Sie die Zellen. Dies sollte unter den optimalen Bedingungen für Ihren Zelltyp und über die gewünschte Zeitdauer durchgeführt werden.
- 5.6 Fahren Sie anschließend gleich mit der Zell Fixierung und Permeabilisierung wie im Schritt 6. beschrieben fort

6. Zellfixierung und Permeabilisierung

Dieses Protokoll wurde mit einem Fixierungsschritt unter Verwendung von 3,7% Paraformaldehyd in PBS, gefolgt von einem Permeabilisierungsschritt mit 0,5% Triton® X100, entwickelt. Es ist jedoch auch möglich andere Zellfixierungs-/Permeabilisierungsreagenzien zu verwenden. Zur besseren Handhabung empfehlen wir die Deckgläser in eine 6-Well-Platte zu übertragen, so dass jede Vertiefung ein einzelnes Deckglas enthält.

- 6.1 Nach Inkubation entfernen Sie das Kulturmedium und geben Sie 1 mL 3.7% Formaldehyd in PBS (Fixierlösung) in jedes Well, das die Zellen eines Deckglas enthält. Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur.
- 6.2 Entfernen Sie die Fixierlösung und waschen Sie die Zellen in jedem Well zweimal mit je 1 mL an 3% BSA in PBS.
- 6.3 Entfernen Sie die Waschlösung und geben Sie 1 mL von 0,5% Triton® X-100 in PBS (Permeabilisierungslösung) in die entsprechenden Wells. Inkubation für 20 Minuten bei Raumtemperatur.

7. EdU-Detektion

In diesem Protokoll werden 500 µL des nachfolgenden Reaktionscocktails pro Deckglas genutzt. Geringere Mengen können auch verwendet werden, solange die Mengenverhältnisse der Komponenten im Cocktail nicht verändert werden.

- 7.1 Bereiten Sie den Reaktionscocktail in exakt der Reihenfolge vor wie in nachfolgender Tabelle beschrieben. Sollten die Komponenten nicht in der angegebenen Reihenfolge hinzugefügt werden, besteht die Gefahr, dass die Reaktion nicht optimal abläuft oder gar scheitert.

Wichtig: Sobald der Reaktionscocktail vorbereitet ist, verwenden Sie diesen sofort oder innerhalb den nächsten 15 Minuten!

Reaktionscocktail pro Deckglas (500 µL):

Komponente	Röhrchenfarbe	Volumen
18 MΩ gereinigtes Wasser	-	379 µL
Reaction buffer (10x)	Orange	50 µL
Catalyst solution	Grün	20 µL
6-FAM-Azide (10 mM)	Rot	1 µL
Buffer additive (10x) (hergestellt in 4.3)	Blau	50 µL
Gesamtvolumen		500 µL

- 7.2** Entfernen Sie die Permeabilisierungslösung und waschen Sie die Zellen in jedem Well zweimal mit je 1 mL 3% BSA in PBS. Entfernen Sie die Waschlösung.
- 7.3** Geben Sie 500 µL des Reaktionscocktails in jedes Well. Schütteln Sie die Platte vorsichtig um eine gleichmäßige Verteilung zu gewährleisten.
- 7.4** Inkubieren Sie die Platte für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Vor Licht schützen!
- 7.5** Entfernen Sie den Reaktionscocktail und waschen Sie anschließend die Zellen in jedem Well dreimal mit je 1 mL 3% BSA in PBS. Entfernen Sie dann die Waschlösung.

Optional: Fahren Sie nun mit einer Markierung des Nukleus (DAPI oder Hoechst 33342) bzw. mit einer Antikörperfärbung fort. Wichtig hierbei: Schützen Sie die Proben zu jeder Zeit vor Lichteinstrahlung. Sollten Sie keine weiteren Markierungsverfahren anwenden wollen, fahren Sie mit dem Imaging und Analysenschritt 8 fort.

8. Imaging und Analyse

EdU Click Kits sind mit allen Methoden der Objektträgervorbereitung kompatibel, einschließlich Nass- und Dauerpräparation.

Anregungs- und Emissionsmaxima für 6-FAM-Azide:

Absorption: 496 nm

Emission: 516 nm

Notizen:

Bestellinformationen:

(für detaillierte Informationen zum Kitinhalt siehe Tabelle unter Punkt 1.)

ROTI®kits für Imaging (für 100 Reaktionen):

Best. Nr.	Produkt	Fluoreszenzfarbstoff	Fliter
7773.1	EdU Click-488	6-FAM-Azide	Grün
7775.1	EdU Click-555	5-TAMRA-PEG3-Azide	Violett
7776.1	EdU Click-594	5/6-Sulforhodamine 101-PEG3-Azide	Orange
7777.1	EdU Click-647	Eterneon Red 645-Azide (Cyanine 5 Azide Analogon)	Rot

Für ihre Bestellung kontaktieren Sie uns bitte unter:

- Tel: +49 (0)721/5606-0
- Fax: +49 (0)721/5606-149
- Email: info@carlroth.com



Carl Roth GmbH + Co. KG
Schoemperlenstraße 3-5
76185 Karlsruhe, Germany

Tel: +49 (0)721/5606-0
Fax: +49 (0)721/5606-149
Email: info@carlroth.com

s.t. 04/2017