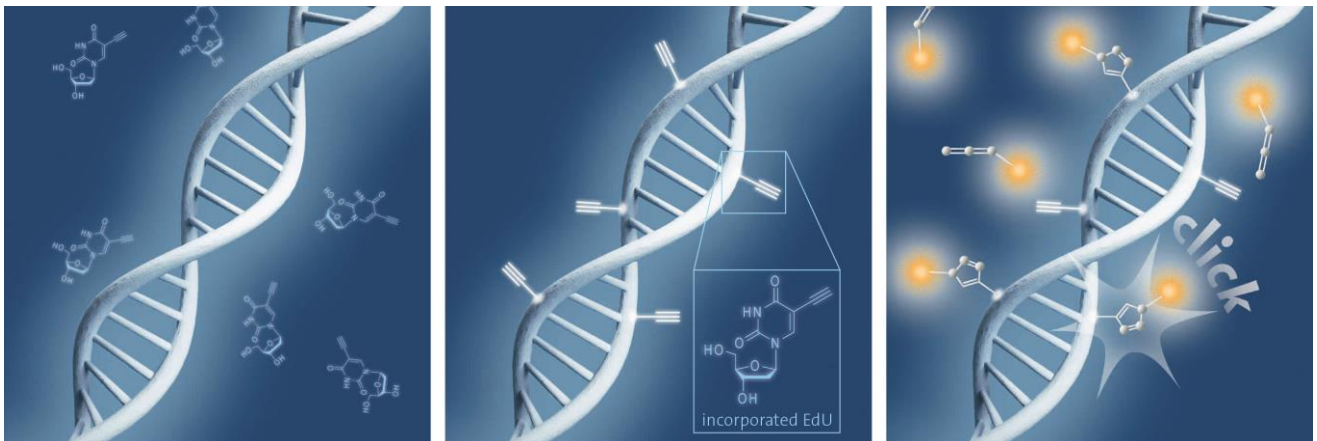




Gebrauchs- anweisung

EdU Click FC

ROTI[®]kit für Flow Cytometry



EdU Click FC

ROTI®kit für Flow Cytometry

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-Analogon 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 Flow Cytometry* 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.

Standard Durchflusszytometrie Methoden werden verwendet um den Prozentsatz der S-Phasen-Zellen in der Population (**Abbildung 1**) zu bestimmen.

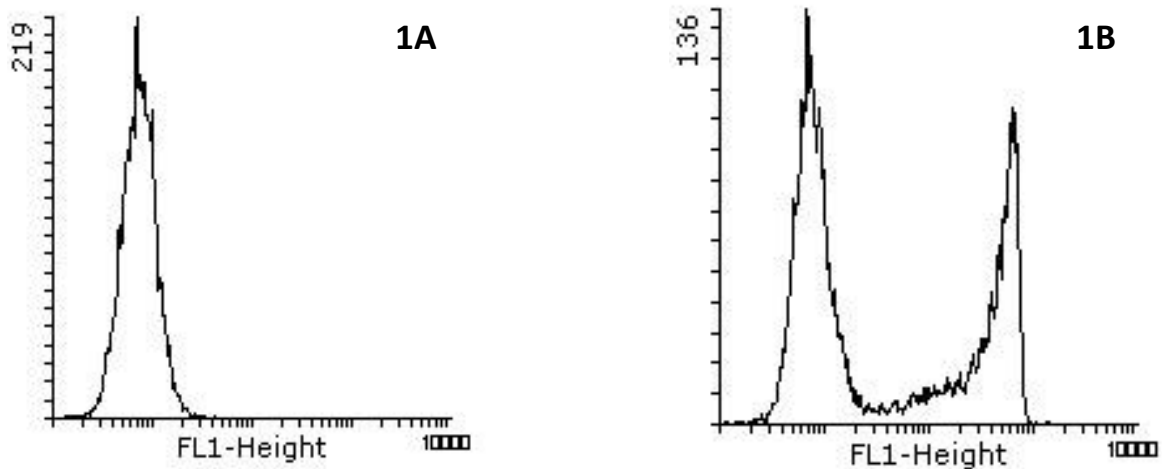


Abbildung 1. Fluoreszenz-Histogramme von EdU inkubierten Zellen mit dem ROTI®kit für Flow Cytometry.

HeLa Zellen, unbehandelt (**1A**) und nach 2 Stunden Inkubation mit 10 μ M EdU (**1B**). Die Click Reaktion wurde mit 6-FAM-Azide durchgeführt. **1A**: negative Kontrolle von unbehandelten Zellen. **1B**: nicht proliferierte Zellen ohne EdU Inkorporation (linker Peak) sowie proliferierte Zellen (S-Phase), die nach EdU-Einbau unter Verwendung des *EdU Click FC-488 Kits* mit 6-FAM-Azide gelabelt wurden (rechter Peak). Vermessen wurden 10.000 Zellen mittels Durchflusszytometrie. Die Ergebnisse sind in Form von Histogrammen dargestellt und zeigen die Anzahl der Zellen in der Y-Achse und der FL1-Fluoreszenz in der x-Achse. FL1 Spannungseinstellung wurde gemäß dem Fluoreszenzsignal der negativen Zellpopulation (333 V mit 6-FAM), eingestellt.

Das ROTI®kit für Flow Cytometry Kit ist mit mehreren Zellzyklusfarbstoffen kompatibel. Ein Beispiel hierfür unter der gleichzeitigen Verwendung von 6-FAM-Azide ist in **Abbildung 2** dargestellt.

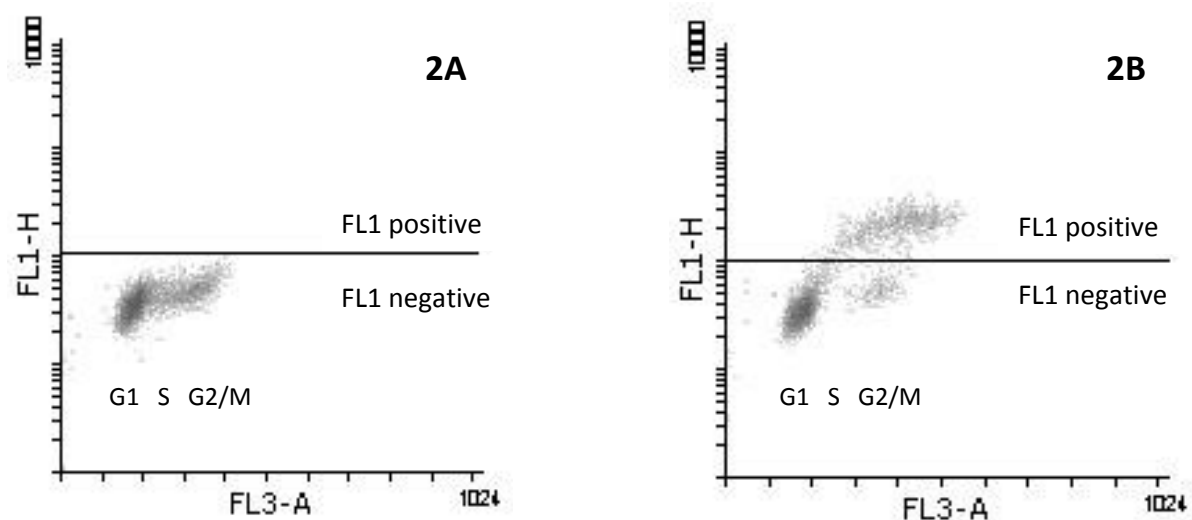


Abbildung 2: Dichte-Blots von Propidiumiodid (PI) gefärbten Proben.

HeLa-Zellen ohne Behandlung (**2A**) oder nach EdU (**2B**) Inkubation mit 10 μ M EdU für 2 Stunden. Ein Reaktionscocktail mit 6-FAM-Azide als Farbstoff wurde verwendet. Nach der Click-Reaktion wurde die DNA mittels von PI (FL3 Fluoreszenzkanal) gefärbt. Die y-Achse stellt die FL1-Fluoreszenzintensität und die x-Achse den Gehalt an im FL3-Bereich gemessener DNA. Zellzyklusphasen sind als G1-, S- und G2/M-Phase gekennzeichnet.

Das *ROTI®kit für Flow Cytometry* kann mit Antikörpern gegen Oberflächen- und intrazelluläre Marker verwendet werden. Ob Ihr Reagenz oder Antikörper mit diesem Kit kompatibel ist können Sie in **Tabelle 1** ablesen.

Tabelle 1: EdU Detektionsfarbstoff Kompatibilität

Fluoreszentes Molekül	Kompabilität
Organische Farbstoffe wie Fluorescein und Alexa Farbstoffe	Kompatibel
PerCP, Allophycocyanin (APC) und APC-basierte Tandems	Kompatibel
R-Phycoerythrin (R-PE) und R-PE basierte Tandems	Benutzen Sie R-PE and R-PE basierte Tandems nach der EdU-Detektionsreaktion.
Quantum Dots	Wenden Sie Quantum Dots nach der EdU-Detektionsreaktion an.
Fluoreszente Proteine (z.B. GFP)	Nutzen Sie anti-GFP-Antikörper* vor der EdU-Detektionsreaktion oder nutzen Sie Reagenzien, die auf organischen Farbstoffen basieren, für Proteinexpressionsdetektion.

* Unter Kompatibilität soll hier verstanden werden inwiefern die beteiligten Komponenten stabil in Gegenwart des Kupferkatalysators in der EdU-Detektionsreaktion sind (entweder der Fluoreszenzfarbstoff selbst oder das Nachweisverfahren). Nicht alle GFP-Antikörper erkennen die gleiche Antigenstelle. Kaninchen und Huhn anti-GFP-Antikörper führen i.d.R. zu einer guten Fluoreszenzintensität. Die getesteten monoklonalen Maus-Antikörpern werden für diese Anwendung nicht empfohlen, da sie i.d.R. zu keiner akzeptablen Fluoreszenzintensität führen.

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.

Bitte lesen Sie das Sicherheitsdatenblatt (SDB) für dieses Kit.

Gefahren:

EdU (Component A): ⚠️ Gefahr H340-H360
P202-P280-P308+P313

Fixative solution (Component D): ⚠️⚠️ Achtung H317-H351
P280-P302+P352a-P308+P313

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

Saponin-based permeabilization and wash reagent (Component E): enthält Natriumazid. Diese Lösung ist orange.

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 Flow Cytometry (EdU Click FC)*“ zu verweisen.

1. Material und Lagerbedingungen der im Kit enthaltenen Komponenten

Tabelle 2: Inhalt des Kits und Lagerbedingungen

Röhrchen-bezeichnung	Menge für 50 Tests	Komponente	Langzeit-lagerung der Komponenten	Kit-lagerung*
Component A	10 mg	5-Ethynyl-deoxyuridine (5-EdU)	-20 °C	2 – 8 °C Dunkel Nicht einfrieren Trocken
Component B Rot	130 µL	6-FAM-Azide (EdU Click FC-488) 5-TAMRA-PEG3-Azide (EdU Click FC-555) 5/6-Sulforhodamine 101-PEG3-Azide (EdU Click FC-594) Eterneon-Red 645 Azide (Cyanine 5 Azide Analogon) (EdU Click FC-647)	-20 °C dunkel	
Component C	5 mL	DMSO	RT	
Component D	5 mL	Fixative solution (4% Paraformaldehyde in PBS)	2 – 8 °C	
Component E	50 mL	Saponin-based permeabilization and wash reagent (10x solution)	2 – 8 °C	
Component F Grün	2 mL	Catalyst solution	RT	
Component G	400 mg	Buffer additive	-20 °C	

*Dieses Kit ist für mindestens ein Jahr stabil, wenn es wie beschrieben gelagert werden.

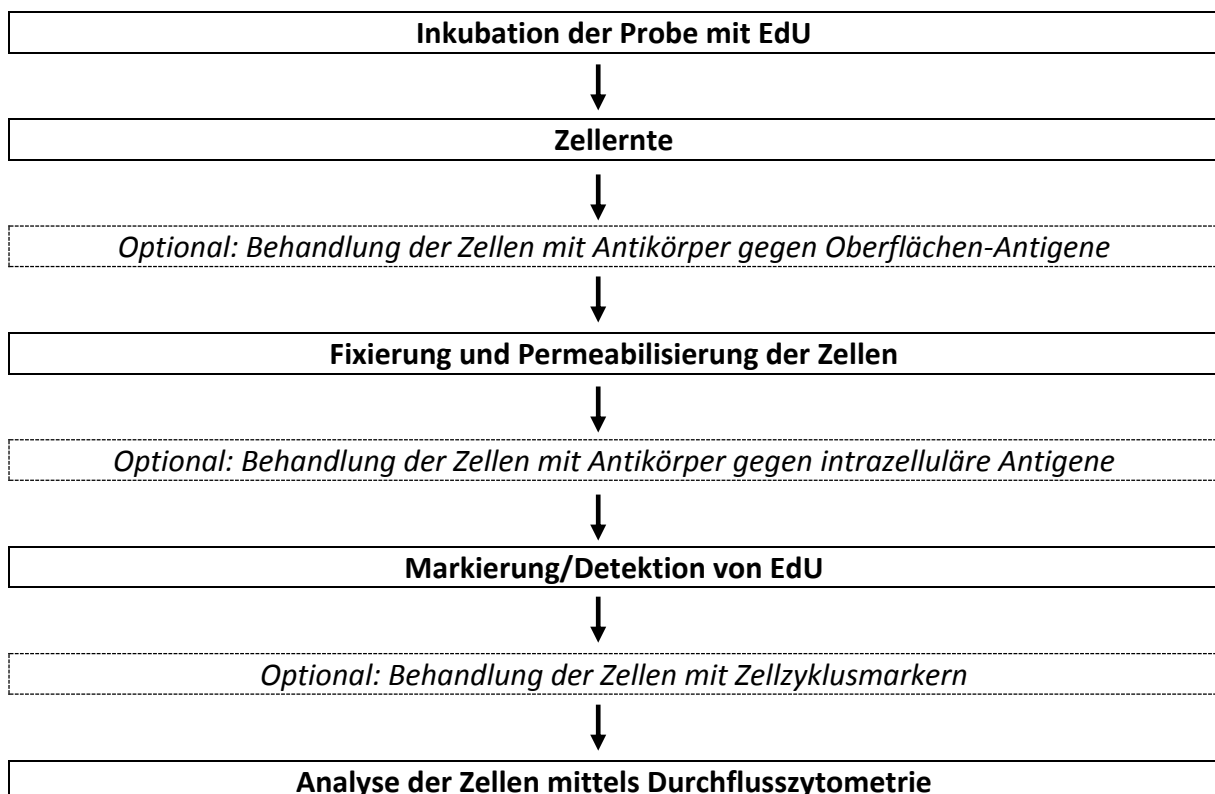
2. Benötigte Materialien und Ausrüstung – nicht in diesem Kit enthalten

- Adhärenz Zellen
- Reaktionsröhrchen (Größe abhängig vom benötigten Volumen des Reaktionscocktails)
- Gepufferte Salzlösung (z.B. PBS, DPBS oder TBS)
- Geeignetes Zellkulturmedium
- 18 MΩ gereinigtes Wasser
- 1% BSA (Bovines Serum Albumin) in PBS, pH 7,1 – 7,4
- Durchflusszytometrieröhrchen

3. Arbeitsablauf

Das folgende Protokoll wurde unter Verwendung einer EdU-Konzentration von 10 µM entwickelt und kann für jeden Zelltyp angepasst werden. Es gibt viele Faktoren, die die Markierung beeinflussen können, wie Wachstumsmedium, Dichte und Typ der Zellen. Um die optimale Konzentration an EdU für Ihr Experiment zu ermitteln, sollte eine Reihe von EdU-Konzentrationen für Ihren Zelltyp und Ihre Versuchsbedingungen getestet werden. Grundsätzlich kann eine ähnliche Konzentration an EdU wie für BrdU als Ausgangspunkt verwendet werden. Wenn eine Vollblutprobe verwendet wird, kann Heparin als Antikoagulationsmittel benutzt werden.

Workflowschema für den *EdU Click FC Test*



4. Herstellung der Stammlösungen

- 4.1 Vor dem Öffnen alle Röhrchen auf Raumtemperatur bringen.
- 4.2 Für die Herstellung einer 10 mM EdU-Stammlösung von wird die entsprechende Menge (siehe Tabelle 3) an DMSO (**Component C**) oder wässriger Lösung (PBS) zu EdU (**Component A**) gegeben. Danach wird die Mischung 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.

Tabelle 3: Menge an DMSO oder wässriger Lösung, die benötigt wird um eine 10 mM EdU-Lösung herzustellen.

EdU Menge	Menge an DMSO/wässriger Lösung
10 mg	4 mL

- 4.3** Für die Herstellung einer 10x *Buffer additive* Stammlösung werden 5,5 ml entionisiertes Wasser zu **Component G** gegeben und gemischt bis sich der Feststoff vollständig gelöst hat. Nach Gebrauch lagern Sie bitte 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!
- 4.4** Zur Herstellung von 500 ml des 1x *Saponin-based permeabilization and wash reagent* (für 50 Tests) werden 50 ml **Component E** zu 450 ml 1% BSA in PBS gegeben. Zur Herstellung von 1 l des 1x *Saponin-based permeabilization and wash reagent* (für 100 Tests) werden 100 ml **Component E** zu 900 ml 1% BSA in PBS gegeben. Nach dem Gebrauch wird die Restlösung bei 2 - 8 °C gelagert.

Hinweis: *Saponin-based permeabilization and wash reagent* enthält Natriumazid.

5. Markierung von Zellen mit EdU

- 5.1** Die Zellen werden in einem geeigneten Zellkulturmedium suspendiert, um ein optimales Zellwachstum zu ermöglichen. Bitte beachten Sie, dass das Wachstum der Zellen während der Inkubation abnimmt sollte sich die Temperatur ändern oder die Zellen vor der Inkubation mit EdU gewaschen worden sein.
- 5.2** Zum Erreichen der gewünschten Endkonzentration fügen Sie die entsprechende Menge an EdU zum Kulturmedium zu und durchmischen Sie gut. Wir empfehlen eine Konzentration von 10 µM bei 1-2 Stunden Inkubationszeit als Ausgangspunkt. Verwenden Sie höhere EdU-Konzentrationen für kürzere Inkubationszeiten. Eine längere Inkubationszeit erfordert niedrigere EdU-Konzentrationen.
- 5.3** Die Inkubation der Zellen mit EdU sollte unter den optimalen Bedingungen für Ihren Zelltyp und über die gewünschte Zeit durchgeführt werden. Verschiedenste DNA-Synthese- und Proliferationsparameter können durch das Verändern der Inkubationszeit oder durch Anwendung von EdU-Pulsmarkierung ausgewertet werden. Effektive Zeitintervalle für Pulsmarkierung sowie die effektive Länge eines jeden Pulses sind abhängig von der Zellwachstumsrate.
- 5.4** Sollten Sie Oberflächenantikörper Markierung durchführen wollen fahren Sie nun mit Schritt 6 fort, andernfalls gehen Sie weiter zu Schritt 7.

6. Markierung von Zell Oberflächen-Antigenen mittels Antikörper (optional)

- 6.1** Waschen Sie die Zellen mit 3 ml 1% BSA in PBS. Zentrifugieren Sie anschließend die Zellen (Pelletbildung) und entfernen Sie den Überstand.

- 6.2 Resuspendieren Sie die Zellen mit 1% BSA in PBS, so dass eine Konzentration von 1×10^7 Zellen/mL entsteht.
- 6.3 Geben Sie 100 µL der Zellsuspension aus 6.2 bzw. eine Vollblutprobe in ein Durchflusszytometrie Röhrchen.
- 6.4 Fügen Sie Oberflächenantikörper hinzu und mischen Sie gut.
Hinweis: PE-, PE-Tandem- oder Quantum Dot-Antikörperkonjugate sollten erst nach der Click-Reaktion verwendet werden (Schritt 8).
- 6.5 Inkubation der Zellen bei empfohlener Temperatur für die entsprechende Zeit. Vor Lichteinstrahlung schützen!
- 6.6 Fahren Sie mit Schritt 7 fort.

7. Zellfixierung und Permeabilisierung

Dieses Protokoll wurde mit einem Fixierungsschritt unter Verwendung von 4% Paraformaldehyd in PBS, gefolgt von einem Saponin-basierten Permeabilisierungsschritt, entwickelt. Das Saponin-basierende Permeabilisierung- und Waschreagenz (*Saponin-based permeabilization and wash reagent*) kann für Vollblut, Zellsuspensionen, die rote Blutzellen enthalten, oder auch Zellsuspensionen, die unterschiedliche Zelltypen enthalten, verwendet werden. Die morphologischen Lichtstreuungseigenschaften von Leukozyten werden durch das Permeabilisierungreagenz aufrechterhalten; die roten Blutzellen hingegen werden hierbei lysiert.

- 7.1 Entfernen Sie das Inkubationsmedium und waschen Sie die Zellen mit 3 ml 1% BSA in PBS. Zentrifugieren Sie die Zellen und entfernen Sie den Überstand.
- 7.2 Lösen Sie das Zellpellet. Geben Sie 100 µl der Fixierlösung (**Component D**) zu den Zellen. Gut mischen und die Probe für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Vor Licht schützen.
- 7.3 Entfernen Sie die Fixierlösung und waschen Sie die Zellen mit 3 ml 1% BSA in PBS. Zentrifugieren Sie die Zellen und entfernen Sie den Überstand. Wenn rote Blutkörperchen oder Hämoglobin in der Probe vorhanden sind wiederholen Sie den Waschschritt. Entfernen Sie Restblutzelltrümmer und Hämoglobin bevor Sie fortfahren.
- 7.4 Lösen Sie das Zellpellet. Resuspendieren Sie die Zellen in 100 µL 1x *Saponin-based permeabilization and wash reagent* in PBS (hergestellt in 4.4). Durchmischen Sie gut und fahren Sie mit Schritt 8., der Click Reaktion, fort.

8. EdU-Detektion

- 8.1 Bereiten Sie den Reaktionscocktail in exakt der Reihenfolge vor wie in **Tabelle 4** 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!

Tabelle 4: Reaktionscocktail für die Click-Reaktion

Material	Component	Anzahl an Tests				
		1	2	3	5	10
PBS, DPBS or TBS	Nicht mitgeliefert!	438 µL	875 µL	1,32 mL	2,19 mL	4,38 mL
Catalyst solution	F - Grün	10 µL	20 µL	30 µL	50 µL	100 µL
Farbstoffazid (10 mM)	B – Rot	2,5 µL	5 µL	7,5 µL	12,5 µL	25 µL
Buffer additive (10x) (hergestellt in 4.3)	G	50 µL	100 µL	150 µL	250 µL	500 µL
Gesamtvolumen	-	500 µL	1 mL	1,5 mL	2,5 mL	5 mL

- 8.2** Fügen Sie die entsprechende Menge an Reaktionscocktail zu den Zellen und mischen Sie gut um den Reaktionscocktail gleichmäßig zu verteilen.
- 8.3** Inkubation der Zellen für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Vor Licht schützen!
- 8.4** Waschen Sie die Zellen mit 3 ml 1x *Saponin-based permeabilization and wash reagent* (hergestellt in 4.4). Zentrifugieren Sie die Zellen und entfernen Sie den Überstand. Lösen Sie das Zellpellet. Sollten Sie mit der intrazellulären Antikörper-Markierung (siehe Schritt 9) fortfahren wollen empfehlen wir die Zellen in 100 µl 1x *Saponin-based permeabilization and wash reagent* zu resuspendieren. Andernfalls fügen Sie 500 µl von 1x *Saponin-based permeabilization and wash reagent* zum Pellet hinzu und fahren Sie mit Schritt 10 für die Analyse der Zellen mit einem Durchflusszytometer fort.

Wichtig: Schützen Sie Ihre Proben während der gesamten Prozedur vor Licht!

9. Färbung intrazellulärer oder Oberflächenantigene (optional)

- 9.1** Zugabe von Antikörper gegen intrazelluläre Antigene oder gegen Oberflächenantigene, die RPE-, PR-Tandem- oder Quantum Dot-Antikörper-Konjugate verwenden. Gut mischen.
- 9.2** Inkubation für die Dauer und bei der Temperatur entsprechend der Antikörper-Färbungsvorschrift. Vor Licht schützen.
- 9.3** Waschen Sie die Zellen mit 3 ml 1x *Saponin-based permeabilization and wash reagent* (hergestellt in 4.4). Zentrifugieren Sie die Zellen und entfernen Sie den Überstand. Lösen das Zellpellet und resuspendieren Sie die Zellen in 500 µl 1x *Saponin-based permeabilization and wash reagent*.
- 9.4** Fahren Sie mit Schritt 10 für die Analyse der Zellen mit einem Durchflusszytometer fort.

10. Imaging und Analyse

Wenn Sie ein herkömmliches Durchflusszytometer mit hydrodynamischer Fokussierung nutzen um den Gesamt-DNA-Gehalt zu messen empfehlen wir eine niedrige Durchflussrate während der Messung zu verwenden. Eine einheitliche Sammelrate und Zellkonzentration

sollte für jede Probe innerhalb eines Experiments verwendet werden. Ermitteln Sie das durch DNA-Gehalt erzeugten Fluoreszenzsignale mit linearer Amplifikation. Das durch die EdU-Markierung erzeugte Fluoreszenzsignal wird am besten mit logarithmischer Amplifikation nachgewiesen.

Die Anregungs- und Emissionsmaxima der verfügbaren Farbstoffe sind in **Tabelle 5** aufgeführt.

Tabelle 5: Anregungs- und Emissionsmaxima der verfügbaren Farbstoffe

Best. Nr.	Farbstoff	Anregung (nm)	Emission (nm)	Filter
7779.1	6-FAM-Azide	496	516	Grün
7780.1	5-TAMRA-PEG3-Azide	546	579	Violett
7781.1	5/6-Sulforhodamine 101-PEG3-Azide	584	603	Orange
7783.1	Eterneon-Red 645 Azide (Cyanine 5 Azide Analogon)	643	662	Rot

Bestellinformationen:

(für detaillierte Informationen zum Kitinhalt siehe Tabelle 2)

ROTI®kits für Flow Cytometry (für 50 Assays):

Best. Nr.	Produkt	mitgelieferter Fluoreszenzfarbstoff
7779.1	EdU Click FC-488	6-FAM-Azide
7780.1	EdU Click FC-555	5-TAMRA-PEG3-Azide
7781.1	EdU Click FC-594	5/6-Sulforhodamine 101-PEG3-Azide
7783.1	EdU Click FC-647	Eterneon-Red 645 Azide (Cyanine 5 Azide Analogon)

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