



MANUEL OPÉRATEUR

EdU Click FC

ROTI[®]kit pour cytométrie en flux



EdU Click FC

ROTI®kit pour cytométrie en flux

Introduction et description du produit:

La détection de la prolifération cellulaire a une importance capitale pour évaluer la santé des cellules, déterminer la génotoxicité ou évaluer des traitements anticancéreux. Ceci est normalement effectué en ajoutant des analogues nucléosidiques, comme la thymidine [³H] ou la bromodeoxyuridine (5-bromo-2'déoxyuridine ou BrdU) aux cellules durant la réplication, leur incorporation à l'ADN étant détectée ou visualisée par autoradiographie ou à l'aide d'un anticorps anti-BrdU. Les deux méthodes présentent plusieurs limites. Travailler avec la thymidine [³H] est gênant du fait de sa radioactivité. L'autoradiographie est lente et ne convient donc pas pour les études à haut débit. Le principal inconvénient de la coloration de la BrdU est le fait que l'ADN à double brin bloque l'accès de l'anticorps anti-BrdU aux unités BrdU. Aussi les échantillons doivent-ils être soumis à d'importantes conditions de dénaturation, occasionnant la dégradation de la structure du spécimen.

Les tests *EdU Click FC* de Roth dépassent ces limites en fournissant une alternative supérieure aux tests BrdU et [³H] thymidine pour une mesure directe de la synthèse ADN. L'EdU (5-éthynyle-2'-désoxyuridine) est un analogue de nucléoside à la thymidine et est incorporé à l'ADN durant la synthèse ADN active. Contrairement aux tests BrdU, les tests *EdU Click FC* ne sont pas basés sur des anticorps et ne nécessitent donc pas de dénaturation de l'ADN pour détecter la nucléoside incorporée. A l'inverse, les *ROTI®kits pour cytométrie en flux* utilisent la chimie click pour la détection d'une variété de mesures fluorescentes. De plus, le protocole de détection simplifié réduit le nombre total d'étapes et réduit considérablement le temps nécessaire. La procédure simple de détection par chimie click est achevée en l'espace de 30 minutes et est compatible avec le multiplexage du contenu et des résultats dans divers contextes.

Les méthodes de cytométrie en flux standard sont utilisées pour déterminer le pourcentage de cellules en phase stationnaire dans la population (**Figure 1**).

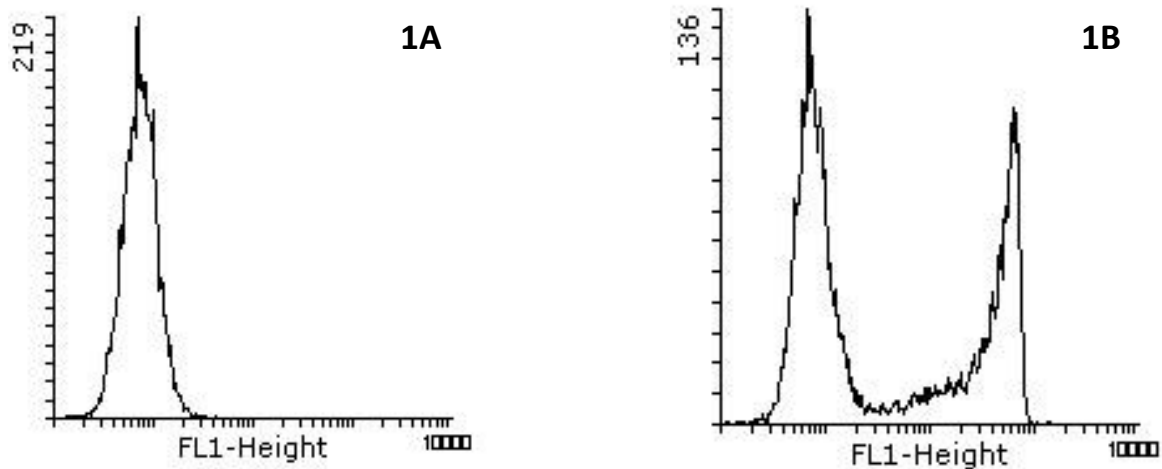


Figure 1: Histogrammes fluorescents de l'incorporation EdU avec le ROTI®kit pour cytométrie en flux.

Des échantillons de cellules HeLa traitées sans (**1A**) ou avec EdU (**1B**) ont été incubés avec 10 µM d'EdU pendant 2 heures. La réaction click à l'aide d'azoture 6-FAM a été effectuée conformément au protocole de coloration recommandé. L'intensité de fluorescence de 10.000 cellules a été mesurée par cytométrie en flux. Les résultats sont présentés sous forme d'histogrammes, montrant le nombre de cellules sur l'axe des y et la fluorescence FL1 sur l'axe des x. La tension FL1 a été réglée en fonction du signal de fluorescence de la population cellulaire négative (333 V avec 6-FAM). **1A** représente le contrôle négatif de la prolifération et de la non-prolifération sans incorporation EdU. **1B** montre les cellules non proliférantes sans incorporation EdU (courbe de gauche) et les cellules proliférantes (phase stationnaire) incorporant l'EdU et signalées par l'azoture 6-FAM (courbe de droite).

Le ROTI®kit pour cytométrie en flux est compatible avec plusieurs colorants pour cycles cellulaires. Vous trouverez un exemple à l'aide d'azoture 6-FAM en **Figure 2**.

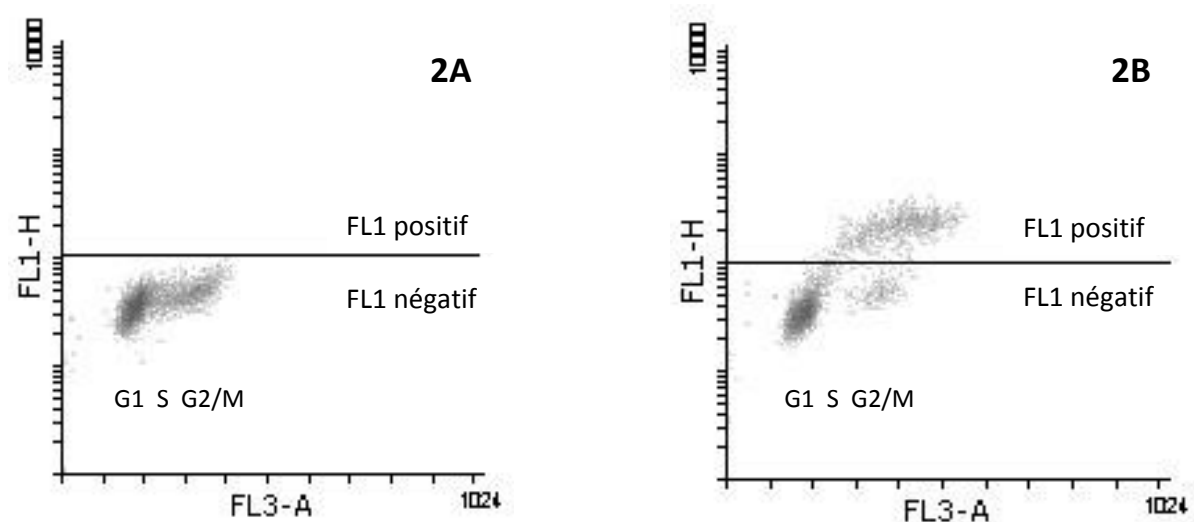


Figure 2: Taches de densité d'échantillons colorés à l'iodure de propidium (PI).

Des échantillons de cellules HeLa traitées sans (**2A**) ou avec EdU (**2B**) ont été incubés avec 10 µM d'EdU pendant 2 heures. Le cocktail de réaction portant l'azoture 6-FAM a été utilisé. Après réaction click, l'ADN a été coloré à l'iodure de propidium (canal fluorescent FL3). L'axe y présente l'intensité fluorescente FL1 et l'axe x le contenu de l'ADN mesuré sur la zone FL3. Les phases du cycle cellulaire sont nommées phases G1, S et G2/M.

Le *ROTI®kit pour cytométrie en flux* peut être utilisé avec des anticorps contre les marqueurs de surface et intracellulaires. Pour garantir la compatibilité de votre réactif ou anticorps, voir le **tableau 1**.

Tableau 1: Compatibilité colorant de détection EdU

Molécule fluorescente	Compatibilité*
Colorants organiques tels que la fluorescéine et les colorants Alexa	Compatible
PerCP, C-phycoyanine, allophycoyanine (APC) et tandems à base d'APC	Compatible
R-phycoérythrine (R-PE) et tandems à base de R-PE	Utiliser la R-PE et les tandems à base de R-PE après la réaction de détection EdU
Points quantiques	Utiliser les points quantiques après la réaction de détection EdU
Protéines fluorescentes (ex. GFP)	Utiliser des anticorps anti-GFP* avant la réaction de détection EdU ou utiliser des réactifs organiques à base de colorant pour la détection de l'expression des protéines

* La compatibilité indique quels composants sont instables en présence d'un catalyseur au cuivre pour la réaction de détection EdU (le colorant fluorescent lui-même ou la méthode de détection). Tous les anticorps GFP ne reconnaissent pas le même site antigène. Les anticorps anti-GFP des lapins et des poulets offrent un bon niveau de fluorescence. Les anticorps monoclonaux de souris testés ne sont pas recommandés pour cette application du fait qu'ils ne génèrent pas une quantité acceptable de fluorescence.

A des fins de recherche exclusivement.

Les informations du présent document sont sujettes à modification sans avis préalable. Carl Roth GmbH + Co. KG ne se porte pas garant des erreurs pouvant apparaître dans le présent document.

Carl Roth GmbH + Co. KG décline toute garantie, explicite ou implicite, quant au présent document, incluant, mais sans s'y limiter, les garanties implicites de qualité marchande et de convenance à une fin particulière. En aucun cas, Carl Roth GmbH + Co. KG ne peut être tenu pour responsable par contrat, tort, garantie ou en vertu de toute autre statut ou base des dommages spéciaux, accidentels, indirects, punitifs, multiples ou consécutifs liés à ou résultant de ce document, y compris, mais sans s'y restreindre, à son utilisation.

Lire les fiches de données de sécurité des produits (MSDS) fournies pour ce kit.

Attention:

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

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

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

Saponin-based permeabilization and wash reagent (Component E): contient de l'azote de sodium. Cette solution est orange.

MSDS: la fiche de données de sécurité correspondante peut être téléchargée sur le site internet www.carlroth.com.

Ouvrage de référence:

Pour toute description d'une procédure à des fins de publication reposant sur ce produit, citer le produit comme *ROTI®kit pour cytométrie en flux (EdU Click FC) de Carl Roth*.

1. Matériaux fournis avec le kit et conditions de stockage

Tableau 2: Contenu du kit et conditions de stockage

Étiquette de fiole	Quantité pour 50 tests	Composant	Stockage de longue durée du composant	Stockage du kit*
Component A	10 mg	5-Ethynyl-deoxyuridine (5-EdU)	-20 °C	2 – 8 °C Foncé Ne pas congeler Sec
Component B rouge	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 Foncé	
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 vert	2 mL	Catalyst solution	RT	
Component G	400 mg	Buffer additive	-20 °C	

*Ce kit est stable jusqu'à 1 an après réception lorsqu'il est stocké selon les instructions.

2. Matériaux et équipements nécessaires non inclus dans le kit

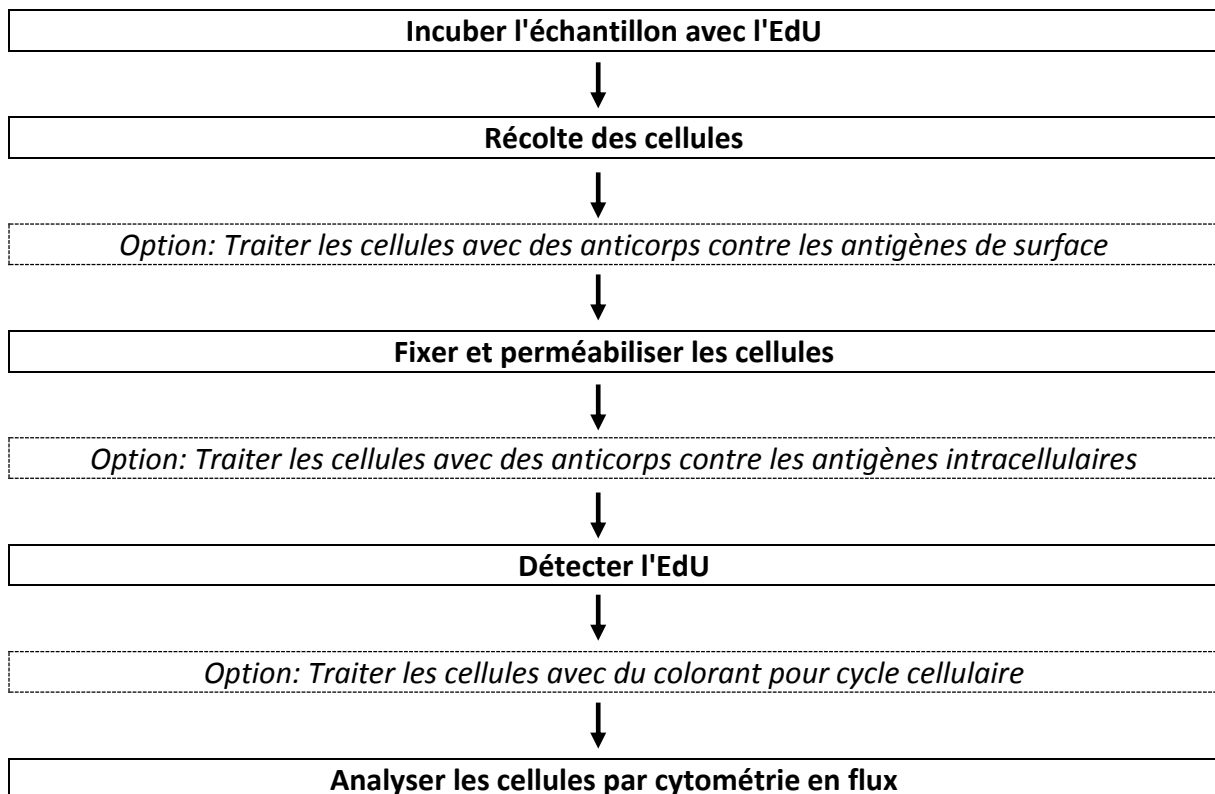
- Cellules adhérentes
- Tubes de réaction (la taille dépend du volume de cocktail de réaction nécessaire)
- Solution saline tamponnée, comme PBS, DPBS ou TBS
- Milieu de culture cellulaire approprié
- 1% d'ASB (sérum-albumine bovine) en tampon PBS, pH 7,1 – 7,4
- Eau purifiée 18 MΩ
- Tubes de cytométrie en flux

3. Flux de production

Le protocole suivant a été mis au point sur la base d'une concentration d'EdU de 10 µM et peut être adapté à tout type de cellule. De nombreux facteurs peuvent influencer le marquage, comme le milieu de croissance, la densité et le type de cellules. Pour déterminer la concentration optimale pour votre expérience, une gamme de concentrations EdU doit être testée pour votre type de cellules et vos conditions expérimentales.

En principe, une concentration similaire au BrdU peut être utilisée pour l'EdU comme point de départ. L'héparine peut être utilisée comme anticoagulant pour collecte si un échantillon de sang complet est utilisé.

Schéma du flux de production pour le test EdU Click FC



4. Préparation des solutions mères

- 4.1 Faire chauffer tous les flacons à la température ambiante avant ouverture.
- 4.2 Pour la préparation d'une solution mère d'EdU de 10 mM, ajouter la quantité appropriée de DMSO (**Component C**) ou de solution aqueuse (PBS) à l'EdU (**Component A**) en se reportant au **tableau 3** et mélanger jusqu'à ce que le composé soit totalement dissout. Après utilisation, stocker toute solution résiduelle à -20°C. Si le stockage est effectué selon les indications, cette solution mère sera stable pendant une durée pouvant atteindre un an.

Tableau 3: Quantités de DMSO ou de solution aqueuse nécessaire pour dissoudre l'EdU à une concentration finale de 10 mM

Quantité d'EdU	Quantité de DMSO/solution aqueuse
10 mg	4 mL

- 4.3** Pour la préparation d'une solution mère 10x *Buffer additive*, ajouter 4 mL d'eau déionisée au **Component G** et mélanger jusqu'à ce que le composé soit totalement dissout. Après utilisation, stocker toute solution résiduelle à -20°C. Si le stockage est effectué selon les indications, cette solution mère sera stable pendant une durée pouvant atteindre six mois. Si la solution commence à développer une couleur brune, celle-ci s'est dégradée et doit être jetée. Nous recommandons de préparer des aliquotes pour éviter des cycles de congélation et de décongélation répétés!
- 4.4** Pour la préparation de 500 mL d'1x *Saponin-based permeabilization and wash reagent* (pour 50 tests), ajouter 50 mL du **Component E** à 450 mL d'ASB à 1% dans le tampon PBS. Pour la préparation de 1L d'1x *Saponin-based permeabilization and wash reagent* (pour 100 tests), ajouter 100 mL du **Component E** à 900 mL d'ASB dans le tampon PBS. Après utilisation, stocker la solution résiduelle à 2 - 8 °C.

Remarque: Le *Saponin-based permeabilization and wash reagent* contiennent de l'azoture de sodium.

5. Marquage des cellules à l'EdU

- 5.1** Suspendre les cellules dans un milieu de culture tissulaire approprié pour obtenir des conditions de croissance cellulaire optimales. Noter que la croissance des cellules décélère durant l'incubation, en cas de modification de température ou si les cellules sont lavées avec l'EdU avant l'incubation.
- 5.2** Pour la concentration finale désirée, ajouter la quantité appropriée d'EdU au milieu de culture et bien mélanger. Nous recommandons d'utiliser une concentration de 10 µM pendant 1 à 2 heures pour débiter. Pour une durée d'incubation inférieure, utiliser de plus fortes concentrations d'EdU. Une durée d'incubation plus longue nécessite de plus faibles concentrations d'EdU.
- 5.3** L'incubation des cellules avec l'EdU doit avoir lieu en conditions optimales pour votre type de cellules et pour la durée désirée. Des synthèses d'ADN et des paramètres de prolifération variés peuvent être évalués en modifiant la durée d'incubation EdU ou en soumettant les cellules au marquage pulsé à l'EdU. L'intervalle de marquage pulsé et la longueur de chaque impulsion dépendent de la vitesse de croissance des cellules.
- 5.4** Récolte des cellules. Pour le marquage d'anticorps de surface, procéder immédiatement au point 6 ou passer au point 7.

6. Coloration d'antigènes de surface avec des anticorps(option)

- 6.1** Laver les cellules avec 3 mL d'ASB à 1 % dans le tampon PBS. Centrifuger pour réduire les cellules en fragments et enlever le surnageant.

- 6.2 Déloger les fragments et resuspendre les cellules dans de l'ASB à 1 % dans le tampon PBS à 1×10^7 cellules/mL.
- 6.3 Ajouter 100 µL de suspension de cellule ou l'échantillon de sang complet dans les tubes de circulation.
- 6.4 Ajouter des anticorps de surface et bien mélanger.
Remarque: Ne pas utiliser de conjugués d'anticorps PE, PE-tandem ou point quantique avant d'effectuer la réaction click (point 8).
- 6.5 Incuber les cellules pendant la durée et à la température recommandées. Protéger de la lumière!
- 6.6 Effectuer le point 7.

7. Fixation et perméabilisation des cellules

Ce protocole a été mis au point avec une étape de fixation utilisant 4% de paraformaldéhyde dans le tampon PBS, suivie d'une perméabilisation à base de saponine. La perméabilisation à base de saponine et le réactif de lavage (*Saponin-based permeabilization and wash reagent*) peuvent être utilisés avec des suspensions cellulaires contenant des globules rouges ou du sang entier, ainsi qu'avec des suspensions cellulaires contenant divers types de cellules. Les caractéristiques morphologiques et de diffusion de lumière des leucocytes sont maintenues par un réactif de perméabilisation durant la lyse des globules rouges.

- 7.1 Ôter le milieu d'incubation et laver les cellules avec 3 mL d'ASB à 1 % dans le tampon PBS. Fragmenter les cellules et ôter le surnageant.
- 7.2 Déloger le culot de cellule. Ajouter 100 µL de fixateur (**Component D**) aux cellules. Bien mélanger et incuber à température ambiante pendant 15 minutes. Protéger de la lumière.
- 7.3 Ôter le fixateur et laver les cellules avec 3 mL d'ASB à 1 % dans le tampon PBS. Fragmenter les cellules et enlever le surnageant. Si des globules rouges ou de l'hémoglobine sont présentes dans l'échantillon, répéter l'étape de lavage. Ôter tous les débris de globules rouges et d'hémoglobine avant de débiter.
- 7.4 Déloger les fragments de cellule. Resuspendre les cellules dans 100 µL de 1x *Saponin-based permeabilization and wash reagent* dans le tampon PBS (préparé au point 4.4). Bien mélanger et passer au point 8 pour la réaction click.

8. Détection EdU

- 8.1 Préparer le cocktail de test dans le même ordre que décrit dans le **tableau 4**. Si les ingrédients ne sont pas ajoutés dans l'ordre indiqué, la réaction ne sera pas optimale et risque même d'échouer.

Important: Une fois le cocktail de test préparé, l'utiliser immédiatement et au plus tard dans les 15 minutes qui suivent!

Tableau 4: Cocktails de test Click

Matériau	Component	Nombre de tests				
		1	2	3	5	10
PBS, DPBS ou TBS	Néant!	438 µL	875 µL	1,32 mL	2,19 mL	4,38 mL
Catalyst solution	F - vert	10 µL	20 µL	30 µL	50 µL	100 µL
Azoture de coloration (10 mM)	B – rouge	2,5 µL	5 µL	7,5 µL	12,5 µL	25 µL
Buffer additive (10x) (préparé au point 4.3)	G	50 µL	100 µL	150 µL	250 µL	500 µL
Volume total	-	500 µL	1 mL	1,5 mL	2,5 mL	5 mL

- 8.2** Ajouter la quantité appropriée de cocktail de test aux cellules et bien mélanger pour distribuer régulièrement la solution de test.
- 8.3** Incuber le mélange de test pendant 30 minutes à température ambiante. Protéger de la lumière!
- 8.4** Laver les cellules avec 3 mL de 1x *Saponin-based permeabilization and wash reagent* (préparés au point 4.4). Fragmenter les cellules et ôter le surnageant. Déloger le culot de cellule. En cas de traitement avec marquage aux anticorps intracellulaires au point 9, resuspendre les cellules dans 100 µL de 1x *Saponin-based permeabilization and wash reagent*. Sinon, ajouter 500 µL de 1x *Saponin-based permeabilization and wash reagent* et effectuer le point 10 pour l'analyse des cellules avec un cytomètre en flux.

Important: Protéger les échantillons de la lumière pendant toute la procédure.

9. Coloration d'antigènes de surface ou intracellulaires (option)

- 9.1** Ajouter des anticorps contre les antigènes intracellulaires ou de surface utilisant des conjugués d'anticorps RPE, PR-tandem ou à point quantique. Bien mélanger.
- 9.2** Incuber les tubes pendant la durée et à la température nécessaires pour la coloration de l'anticorps. Protéger de la lumière.
- 9.3** Laver les cellules avec 3 mL de 1x *Saponin-based permeabilization and wash reagent* (préparés au point 4.4). Fragmenter les cellules et ôter le surnageant. Déloger le culot de cellule et resuspendre les cellules dans 500 µL de 1x *Saponin-based permeabilization and wash reagent*.
- 9.4** Effectuer le point 10 pour analyser les cellules avec un cytomètre en flux.

10. Imagerie et analyse

Utiliser un faible débit durant l'acquisition en cas d'utilisation d'un cytomètre en flux traditionnel avec focus hydrodynamique pour mesurer la quantité totale d'ADN. Utiliser le même taux de prélèvement et la même concentration de cellules pour chaque échantillon de l'expérience. Détecter le signal fluorescent généré par la coloration de l'ADN par amplification linéaire. Le signal fluorescent généré par marquage EdU est plus facile à détecter par amplification logarithmique.

Les maxima d'excitation et d'émission des colorations disponibles sont listés dans le **tableau 5**.

Tableau 5: Maxima d'émission et d'excitation des colorations disponibles.

Numéro de produit	Coloration	Excitation (nm)	Émission (nm)	Filtre
7779.1	6-FAM-Azide	496	516	Vert
7780.1	5-TAMRA-PEG3-Azide	546	579	Violet
7781.1	5/6-Sulforhodamine 101-PEG3-Azide	584	603	Orange
7783.1	Eterneon-Red 645 Azide (analogue azoture cyanine 5)	643	662	Rouge

Information de commande:

(pour le contenu détaillé du kit, voir le tableau 2)

ROTI®kits pour cytométrie en flux (pour 50 tests):

Numéro de produit	Produit	Colorant fluorescent utilisé
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 (analogue azoture cyanine 5)

Pour passer commande, nous contacter:

- 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, Allemagne

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

s.t. 04/2017