



ROTI®Bond

CL20.1, CL20.2, CL20.3

Adhäsionsobjektträger zur schnellen und effizienten Immobilisierung auch kleinster Mengen Zellmaterial bei optimaler Strukturhaltung

I. Einleitung

ROTI®Bond Adhäsionsobjektträger haben eine spezielle Oberfläche mit einer neuartigen, adhäsiven Beschichtung. Sie reagiert mit den natürlichen Oberflächenstrukturen von Zellen und Geweben und verankert diese über unterschiedliche Bindungsprinzipien außerordentlich schnell und dauerhaft auf der Glasoberfläche. Die Zellen verlieren dabei weder ihre Antigenität noch ihre Funktionalität und dreidimensionale Struktur.

Im Gegensatz zu herkömmlich beschichteten Objektträgern verhindern die ROTI®Bond Adhäsionsobjektträger sogar bei harschen Inkubationsprozeduren ein Abschwemmen der Zellen und Gewebe.

II. Zellbindung

Die Immobilisierung der Zellen oder Schnitte erfolgt sofort nach Kontakt mit der Glasoberfläche. Ein Eintrocknen der Proben ist somit nicht notwendig. Das Zellmaterial kann danach mit allen üblichen Fixiermitteln fixiert werden.

Nach bisherigen Erkenntnissen erfolgt bei heterogenem Zellmaterial keine präferentielle Bindung oder Ablösung einzelner Zelltypen.

Für eine optimal adhäsive Immobilisierung der Zellen sollte die Zellsuspension möglichst frei von Kulturmedium bzw. Proteinen sein, da Medienkomponenten mit der adhäsiven Beschichtung konkurrieren und dadurch eine Bindung möglicherweise stark reduzieren würden. Zellen bzw. Gewebe sollten daher mit einer geeigneten Pufferlösung (z.B. ROTI®Stock 10 x PBS, Art.-Nr. 1058.1) gewaschen und in der Pufferlösung auf die Träger aufgetropft werden.

III. Kultivierung von Zellen

Um lebende Zellen weiter zu kultivieren, kann der Auftragspuffer nach der Adhäsion gegen ein beliebiges Zellkulturmedium oder andere proteinhaltige Medien ausgetauscht werden. So lassen sich auch *in-vivo*-live-Untersuchungen durchführen, z.B. am Multiphotonen- oder Laserscan-Mikroskop.

Eine längere Kultivierung ist auf Grund der starken Zellhaftung nicht für alle Zelltypen geeignet. Wenn z.B. zu erwarten ist, dass sich Zellen nach dem Anhaften morphologisch noch stark verändern werden, sollte man zunächst Tests durchführen und das Verhalten der Zellen auf dem ROTI®Bond Adhäsionsobjektträger ermitteln.

Die Objektträger können auch ohne Verlust der Bindungseigenschaften autoklaviert (z. B.: 30 Minuten bei 123°C) oder mit Alkohol saniert werden (z.B.: 5 Minuten Inkubation in Ethanol 70% und anschließend trocknen lassen).

IV. Anwendungsbereiche

- Immunfluoreszenz oder vergleichbare Methoden
- Immunenzymatische Nachweismethoden (Peroxidase, Alkalische Phosphatase)
- Histologische Färbetechniken wie z. B: Pappenheim
- Intrazelluläre Antigennachweise
- Molekularbiologische Tests, z.B. FISH oder Nachweis spezifischer DNA-Modifikationen
- Mehrfachfärbungen
- *in vivo* live-Assays an Geweben und Zellen

V. Zelltypen

Folgende Zellen und Gewebe können mit ROTI®Bond-Adhäsionsobjektträgern untersucht werden:

- alle Blutzellen wie Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten, Thrombozyten und Erythrozyten
- Zellen aus Knochenmark, Ergüssen, Flüssigkeit, bronchoalveolärer Lavage und Zellsuspensionen von Lymphknoten und Tumoren
- Zelllinien wie z.B. Myelomzelllinien, Epithelzelllinien aus Knochen und Lunge, Hepatozytenzelllinien
- Künstliche Gewebe
- Gewebeschnitte und –präparationen
- Primärkulturen, z.B. Leberzellen, Tumorzellen
- Stammzellen wie z.B. adulte Stammzellen aus Knochen und Gehirn

VI. Kompatibilität mit Farbstoffen

Die ROTI®Bond-Adhäsionsobjektträger sind für alle gängigen fluoreszierenden und nicht fluoreszierenden Farbstoffe geeignet, speziell getestet wurden folgende Fluoreszenzfarbstoffe:

- Fluoresceinderivate, z.B. FITC
- Rhodaminderivate, z.B. TRITC, Texas Red
- Cy3 und Cy5
- Phycobilliproteine, z.B. PE
- DAPI
- Hoechst 33358 und 3334
- Alexafarbstoffe

VII. Anwendungsbeispiele

VII.1. Immunhistochemische Assays

In der Tumorforschung werden ROTI®Bond-Adhäsionsobjektträger z.B. für immunhistochemische Färbungen eingesetzt. Hier ist vor allem eine Erhaltung der Gewebsstruktur wichtig, auch wenn während des Nachweises harsche Inkubationsbedingungen herrschen, wie z.B. Hitzdenaturierung oder hohe pH-Werte.

Im Beispielfall (s. Abb. 1) wurde zum Verständnis der Nebenwirkungen (Taubheit, Nierenerkrankungen) des Zytostatikums Cisplatin die Bildung von Platin-DNA-Addukten (Pt-(GG)) im Gewebe von Innenohr und Niere untersucht.

Man verwendete Marginalzellen des Innenohrs und Zellen des proximalen Tubulus der Niere.

Gefrierschnitte von beiden Gewebetypen wurden auf ROTI®Bond-Adhäsionsobjektträger aufgebracht und durch Alkalidenaturierung (70 mM NaOH, 140 mM NaCl, 40 % Methanol, pH 12,8, 5 min, 0°C) und Proteinaseverdau (Pepsin, 10 min, 37°C, gefolgt von Proteinase K, 37°C) permeabilisiert. Nach immunhistochemischer Färbung (3-Schritt-Sandwich Immunofärbung mit ALEXA FLUOR 488 als Endfärbung) und DAPI- Gegenfärbung der Nuclei wurden die Schnitte im Fluoreszenzmikroskop analysiert und dokumentiert. Die morphologische Analyse des Gewebes zeigte eine vollständige Erhaltung der Probenzellkerne, in denen die Pt-(GG) Addukte gut zu erkennen waren (siehe Abb.1). Trotz vollständiger Entfernung der Zellstrukturen durch die äußerst harsche Behandlung der Schnitte sind die Nuclei nach wie vor an dem Objektträger fixiert und können problemlos angefärbt werden (Abb. 1 A, B). Die Gewebsstruktur ist problemlos darstellbar.

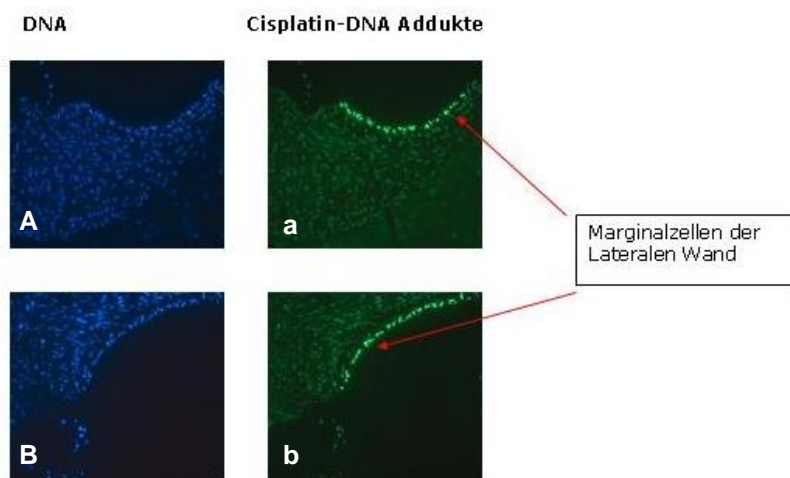


Abbildung 1:
Darstellung der Pt-(GG) Addukte in Marginalzellen im Innenohr des Meerschweinchens nach Cisplatin-Behandlung. Trägermaterial der Schnitte: ROTI®Bond-Adhäsionsobjektträger
A, B: Nuclei nach DAPI-Färbung.
a, b: Nachweis der Pt-(GG) Addukte.

Mit freundlicher Unterstützung des Labors Dr.J.Thomale, DNA-Repair Group, Institut für Zellbiologie, Westdeutsches Tumorforschungszentrum, Universitätsklinikum Essen

VII.2. Vergleichsuntersuchung zur Zellhaftung

Bei Untersuchungen an kostbaren Zellproben wie Stammzellen, kleinsten Blutproben o.ä. ist vor allem die Zahl der nach den Inkubationsschritten wiedergefundenen Zellen relevant. Auf Adhäsionsobjektträger der SuperFrost™-Linie und ROTI®Bond-Adhäsionsobjektträger wurden je 1800 murine Myelomzellen in 30 µl PBS aufgetropft. Ohne Fixierung wurden die Proben in mehreren Parallelversuchen einem vollständigen immunhistochemischen Assay (ohne Antikörper) mit integrierter NaOH-Denaturierung (70 mM NaOH, 150 mM NaCl, 40 % Ethanol, 5 min, Raumtemperatur) unterzogen. Durch DAPI-Gegenfärbung wurden die Nuclei gefärbt, im Fluoreszenzmikroskop die Zellzahlen analysiert und die Wiederfindungsraten bestimmt. Abbildung 2 zeigt einen Ausschnitt der DAPI-gefärbten Präparate.

™: SuperFrost Fa. Menzel

Objektträger	Zellzahl im gezeigten Präparat	Wiederfindungsrate
SuperFrost	285	15,83 %
SuperFrost Plus Gold	195	10,83 %
ROTI®Bond	1792	99,56 %

Tabelle 1: Wiederfindungsrate der murinen Myelomzellen im Beispiexperiment aus Abb. 2

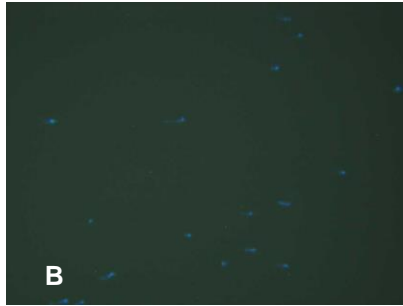
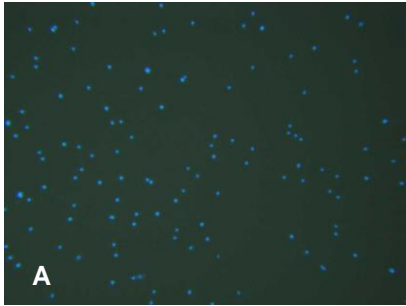


Abbildung 2:
Vergleichsanalysen zur Zellhaftung. A: ROTI®Bond Adhäsionsobjektträger, B: Superfrost Plus Gold Objektträger. DAPI-Färbung der Zellkerne.

ROTI®Bond-Adhäsionsobjektträger	5 Stück	CL20.1
	50 Stück	CL20.2
	100 Stück	CL20.3

Carl Roth GmbH + Co. KG

Schoemperlenstraße 3-5 • 76185 Karlsruhe
Postfach 100121 • 76231 Karlsruhe
Telefon: +49 (0) 721/ 5606-0
Fax: +49 (0) 721/ 5606-149
info@carlroth.de • www.carlroth.de

sse 06/2021

Die Firma ist eine Kommanditgesellschaft mit Sitz in Karlsruhe, Reg. Gericht Mannheim HRA 100055. Persönlich haftende Gesellschafterin ist die Roth Chemie GmbH mit Sitz in Karlsruhe, Reg. Gericht Mannheim HRB 100428.
Geschäftsführer: André Houdelet