

Färbung lebender Zellen mit dem fluoreszierenden Nukleinsäurefärbemittel LUCS® 5

LUCS® 5 (1,5-bis{[2-(dimethylamino)ethyl]amino}-4,8-dihydroxyanthracen-9,10-dion, auch bekannt als DRAQ5®) ist ein zellgängiger, rot fluoreszierender Farbstoff zur DNA-Färbung in lebenden und fixierten Zellen für Bildgebung und Analysen.

LUCS® 5 dringt durch die Zellmembranen ein und interkaliert zwischen A-T-Basenpaaren der doppelsträngigen DNA (dsDNA). Der Farbstoff hat eine hohe Affinität zu dsDNA und zeigt kaum Bindung an RNA oder mitochondriale DNA (mtDNA). LUCS® 5 führt bei DNA-Bindung nicht zu einer Fluoreszenzverstärkung; daher ist die gemessene Fluoreszenz proportional und stöchiometrisch zur Menge an nukleärer DNA in der Zelle.

Aufgrund seiner Zellpermeabilität eignet sich LUCS® 5 zur Bestimmung des DNA-Gehalts und des Zellzyklus, ist jedoch nicht als Vitalitätsfarbstoff geeignet. Wie andere zellpermeable, interkalierende DNA-Farbstoffe kann LUCS® 5 bei Langzeitversuchen die Zellteilung hemmen — dieser Effekt sollte daher vor dem Experiment überprüft werden.

In der Mikroskopie und im Hochdurchsatz-Screening (High-Content Screening) dient LUCS® 5 als nukleärer Gegenfärber für lebende und fixierte Proben. In der Durchflusszytometrie ermöglicht der Farbstoff eine direkte Analyse von Blut- und Knochenmarkzellen ohne vorherige Hämolyse, Fixierung, Permeabilisierung oder RNase-Behandlung.

LUCS® 5 weist Absorptionsmaxima bei 600 nm und 646 nm sowie ein Emissionsmaximum bei 697 nm auf (bei Interkalation in dsDNA). Dadurch ist der Farbstoff spektral mit gängigen Markern wie GFP, FITC, R-PE oder RFP kompatibel. Zusätzlich zeigt LUCS® 5 eine hohe Photostabilität und keinen Photobleaching-Effekt während der Bildgebung.

Vorbereitung:

- Die LUCS® 5-Lösung sollte bei 2–8 °C gelagert werden. Nicht einfrieren! Durch Gefrieren kann LUCS® 5 ausfallen, und eine erneute Auflösung ist möglicherweise nicht einfach.
- Natriumazid (NaN₃) stört die Färbung mit LUCS® 5. Daher wird empfohlen, die Färbung in Dulbecco's Phosphatgepufferter Kochsalzlösung (DPBS), PBS (ohne NaN₃) oder Kulturmedium durchzuführen.
- Die Arbeitskonzentration für die Zellfärbung liegt zwischen 5–20 µM. Die optimale Verdünnung ist abhängig vom Zelltyp und von der Zelldichte und sollte experimentell bestimmt werden.
- Die optimale Zelldichte und Färbedauer für die DNA-Gehalt-Analyse variiert je nach Zelltyp. Das Protokoll sollte in Vorversuchen für beste Ergebnisse angepasst werden.
- *Hinweis:* Der an dsDNA gebundene Farbstoff fluoresziert stark im Zellkern, während ungebundener Farbstoff im Zytoplasma schwächer fluoresziert. Dies ermöglicht eine klare Segmentierung zwischen zytoplasmatischen und nukleären Kompartimenten.

Protokoll:

Färbung lebender Zellen zur Visualisierung von Zellkernen

1. Kultivieren Sie Zellen auf einem sterilen Deckglas. Adhärenente Zellen können direkt auf dem Deckglas gefärbt werden.
2. Verdünnen Sie die LUCS[®] 5-Lösung unmittelbar vor Gebrauch auf 5–20 µM in komplettem Medium oder einem anderen NaN₃-freien Puffer.
3. Geben Sie die LUCS[®] 5-Lösung zu den Proben und inkubieren Sie diese für 5–30 Minuten bei 37 °C im Dunkeln.
4. Entfernen Sie die Färbelösung durch Absaugen und waschen Sie die Zellen zweimal mit 1× PBS.

Optional: Die Zellen können auch ungewaschen analysiert werden, was jedoch den Hintergrund durch ungebundenen Farbstoff erhöhen kann.

5. Für die Fluoreszenzmikroskopie montieren Sie die Zellen unter einem Deckglas mit [Einbettmedium](#).
6. Führen Sie anschließend die Bildgebung durch. Wir empfehlen einen 715LP- oder längerwelligen Filter, obwohl der Farbstoff auch mit Standardfiltern für AF 647 (z. B. 660/20 oder 692/40 nm) gut nachweisbar ist.

Färbung fixierter Zellen zur Kernvisualisierung

1. Kultivieren Sie Zellen auf einem sterilen Deckglas. Adhärenente Zellen können direkt auf dem Deckglas gefärbt werden.
2. Fixieren und permeabilisieren Sie die Zellen nach Bedarf.
3. Verdünnen Sie die LUCS[®] 5-Lösung unmittelbar vor Gebrauch auf 5–20 µM in 1× PBS oder einem anderen NaN₃-freien Puffer.
4. Geben Sie die LUCS[®] 5-Lösung zu den Proben und inkubieren Sie diese bei Raumtemperatur im Dunkeln.
5. Spülen Sie die Proben einmal mit 1× PBS.

Optional: Die Zellen können auch ungewaschen analysiert werden, was jedoch den Hintergrund erhöhen kann.

6. Für die Fluoreszenzmikroskopie montieren Sie die Zellen unter einem Deckglas mit [Einbettmedium](#).
7. Führen Sie die Bildgebung durch. Wir empfehlen einen 715LP- oder längerwelligen Filter.

Färbung lebender Zellen für DNA-Gehalt-Analyse mittels Durchflusszytometrie

1. Stellen Sie eine Einzelzellsuspension her.
2. Resuspendieren Sie die Zellen in einer Dichte von $\leq 0,5 \times 10^6$ Zellen/ml in komplettem Medium oder einem anderen NaN₃-freien Puffer mit 20 µM LUCS[®] 5.
3. Inkubieren Sie für 5–15 Minuten bei 37 °C im Dunkeln.
4. Pelletieren Sie die Zellen durch Zentrifugation bei 400 g für 3–4 Minuten bei Raumtemperatur und entfernen Sie die Färbelösung.
5. Resuspendieren Sie die Zellen in 1× DPBS und analysieren Sie sie umgehend mittels Durchflusszytometrie. Die Zellen können auch ungewaschen analysiert werden, was jedoch die Auflösung der DNA-Histogramme verringern kann.

6. Analysieren Sie die Zellen mit einem Durchflusszytometer mit 633 nm Rotlaser. Für Zellzyklusanalysen kann die Detektion im AF 700-Kanal mit 680LP- oder 715LP-Filter die Peak-Trennung verbessern.

Optional: LUCS® 5 kann auch mit 488 nm Blaulaser-Anregung detektiert werden.

Färbung fixierter Zellen für DNA-Gehalt-Analyse mittels Durchflusszytometrie

1. Stellen Sie eine Einzelzellsuspension her.
2. Fixieren Sie die Zellen für 30 Minuten auf Eis mit 70-80% kaltem Ethanol.
3. Waschen Sie die Zellen einmal mit 1× DPBS.
4. Verdünnen Sie die LUCS® 5-Lösung unmittelbar vor Gebrauch auf 20 µM in 1× DPBS oder einem anderen Na₃-freien Puffer.
5. Färben Sie die Zellen ($\leq 0,5 \times 10^6$ Zellen/ml) für 5–15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln.
6. Ein weiteres Waschen vor der Analyse ist nicht notwendig.
7. Analysieren Sie die Zellen mit einem Durchflusszytometer mit 633 nm Rotlaser. Für Zellzyklusanalysen kann die Detektion im AF 700-Kanal mit 680LP- oder 715LP-Filter die Peak-Trennung verbessern.

Optional: LUCS® 5 kann auch mit 488 nm Blaulaser-Anregung detektiert werden.

Spektrale Eigenschaften

Anregung:

- Maxima bei 600 nm und 646 nm;
- 647 nm Linie optimal;
- 488 nm, 514 nm, 568 nm und 633 nm Linien suboptimal;
- Zwei-Photonen-Anregung (1047 nm) und keine Anregung im Bereich von 700–850 nm.

Emission (geräteabhängig):

- Maxima bei 681 nm (freier Farbstoff) / 697 nm (gebundene DNA);
- Detektion im Bereich von 665 nm bis 850 nm im nahen Infrarot (NIR);
- Emissionsfilter können 695LP, 715LP oder 780LP umfassen.

Lumiprobe Corporation

115 Airport Dr Suite 160
Westminster, Maryland 21157
USA
Phone: +1 888 973 6353
Fax: +1 888 973 6354
Email: order@lumiprobe.com

Lumiprobe GmbH

Feodor-Lynen-Strasse 23
30625 Hannover
Germany
Phone: +49 511 16596811
Fax: +49 511 16596815
Email: de@lumiprobe.com

Lumiprobe RUS Ltd

Kotsyubinsky street, 4
121351 Moscow
Russian Federation
Phone: +7 800 775 3271
Email: ru@lumiprobe.com

Lumiprobe Limited

Suite 12, 3/F, Great Eagle Centre
23 Harbour Road, Wan Chai
Hong Kong
Mob.: +852-5929-0488 (from HK)
Phone: +86-147-14316277 (from China)
Email: hk@lumiprobe.com

Lumiprobe LTD

2 Tuvim St.
3223562, Haifa
Israel
Phone: +972-(0)4-374-0377
Email: il@lumiprobe.com

Lumiprobe Co., Ltd.

10H-11, Shenmao Commercial Center
No. 59 Xinwen Rd., Meiling Community
Lianhua Street, Futian District
Shenzhen, China
Phone: +86-1471431-6277
Email: cn@lumiprobe.com