

Messung der Zellproliferation und DNA-Replikation mittels Click-Chemie

Zellproliferationsmessungen spielen eine wichtige Rolle bei der Untersuchung der Zytotoxizität, in der Krebsforschung und vielen anderen Bereichen der Zellbiologie. Dazu wurden eine Reihe von Methoden entwickelt, die auch isotopenbasierte Techniken einschließen. Die meisten Methoden, die auf optischen Nachweisverfahren beruhen, wie z. B. Fluoreszenzdetektion, sind auch für Hochdurchsatzverfahren geeignet.

Lumiprobe bietet Ihnen kostengünstige Reagenzien für Zellproliferationsmessungen.

Der Nachweis replizierter DNA stellt wohl den direktesten Weg dar, um Proliferation zu messen. Das wird z. B. durch den Einsatz von [Bromodesoxyuridin \(BrdU\)](#) erreicht, das während der Replikation in die DNA eingebaut wird. Anschließend können diese exogenen Nucleoside mit Hilfe von anti-BrdU-Antikörpern in der DNA nachgewiesen werden. Dieses Nachweisverfahren ist mühsam und schwierig zu reproduzieren, weil die Zellen mit harschen Reagenzien behandelt werden müssen, damit die DNA für die Antikörper zugänglich wird, die die zellulären Strukturen andernfalls nicht durchdringen könnten.

Eine sanftere Alternative bietet der Einsatz des Nucleosids [Ethinyldesoxyuridin \(EdU\)](#), das durch Fütterung oder Injektion appliziert wird. Nachdem das Nucleosid in die DNA eingebaut wurde, kann es mit verschiedenen [Fluorophor-Aziden](#) mittels Kupfer(I)-Katalyse konjugiert werden, wodurch die replizierte DNA mit dem Fluoreszenzmarker angefärbt wird. Das Verfahren ist leicht durchzuführen, schnell und reproduzierbar. Es bedarf keiner so harschen Behandlung der Zellen (lediglich die Permeabilisierung mit Triton ist erforderlich), wodurch zelluläre Strukturen besser erhalten bleiben. Die Vorgehensweise ist mit einer Zellfixierung vergleichbar und erlaubt Mehrfarben-Imaging.

Benötigte Reagenzien:

- [EdU](#) – Ethinyldesoxyuridin
- [Kupfer\(II\)-BTAA-Komplex](#) – Katalysator für die Click-Chemie
- [Ascorbinsäure](#) – Reduktionsmittel für Kupfer
- [Fluorophor-Azide](#)
- [DMSO, Markierungsgüte](#) – Lösungsmittel für Azide
- Triton X-100 oder Tween-20
- PBS, pH 7,4
- 100 mM Tris-Puffer, pH 7,4

Protokoll

Die Details der Durchführung hängen vom jeweiligen Zell- oder Gewebetyp ab. Im Folgenden stellen wir Ihnen die

grundsätzlichen Schritte vor:

1. Zellen bzw. Gewebe mit [EdU](#) kultivieren.
2. Zellen mit PBS waschen.
3. Zellen permeabilisieren mit PBS + 0,2 % Triton X-100 oder 0,5 % Tween-20 für 30 min.
4. Zellen erneut mit PBS waschen.
5. Entwicklerlösung frisch herstellen: 2 mM Kupfer(II)-BTAA-Komplex, 5 µM Fluorophor-Azid und 10 mM Ascorbinsäure in 100 mM Tris-Puffer pH 7,4 (für sulfonierte Azide) oder 100 mM Tris-Puffer mit 50 % DMSO (für nicht-sulfonierte Azide). Diese Lösung sollte frisch hergestellt werden, weil Kupfer(I)- und Ascorbinsäurelösungen nicht stabil sind.
6. Zellen 30 min in der Entwicklerlösung inkubieren.
7. Zellen mit PBS waschen.

Sulfonierte, wasserlösliche Azide wie [Sulfo-Cyanin-3-azid](#) und [Sulfo-Cyanin-5-azid](#) liefern die besten Ergebnisse. Beim Einsatz nicht-sulfonierter Azide wie [Cyanin-5-azid](#), [Cyanin-3-azid](#) oder [BDP-FL-azid](#) muss die Entwicklerlösung 50 % DMSO enthalten. Bei Bedarf können die Zellen später mit Ethanol entfärbt werden.

Referenz

Ranall, M.; Gabrielli, B.; Gonda, T. Adaptation and validation of DNA synthesis detection by fluorescent dye derivatization for high-throughput screening. *BioTechniques*, **2010**, 48(5), 379-386. doi: [10.2144/000113410](https://doi.org/10.2144/000113410)

Lumiprobe Corporation

201 International Circle, Suite 135
Hunt Valley, Maryland 21030
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