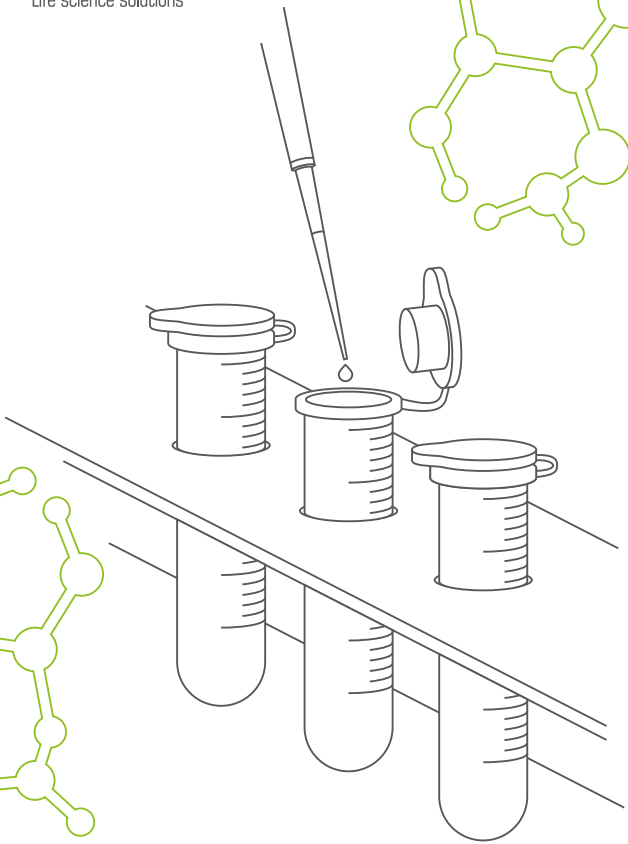
Lumiprobe
Life science solutions



Инструкция к набору AHA AF 488 Protein Synthesis Assay для анализа синтеза белка в клетках

Lumiprobe Corporation. All rights reserved.

Contents

Русский: Инструкция к набору AHA AF 488 Protein Synthesis Assay для анализа синтеза белка в клетках 3-8

RU

Инструкция к набору AHA AF 488 Protein Synthesis Assay для анализа синтеза белка в клетках

Набор предназначен для высокоточного анализа синтеза белка *de novo* в клетках с помощью метаболического мечения неканонической аминокислотой L-азидогомоаланином (AHA). AHA является аналогом метионина и включается в растущие полипептидные цепи в клетке посредством эндогенной метионинил-тРНК-синтетазы, что обеспечивает прямую маркировку только вновь синтезированных белков. После инкорпорации AHA детектируется в фиксированных клетках с помощью катализируемой медью клик-реакции (CuAAC) между азидной группой AHA и алкином, конъюгированным с ярким флуорофором AF 488.

Набор позволяет количественно и качественно оценивать синтез белка на уровне отдельных клеток; изучать действие ингибиторов трансляции и стрессовых факторов; анализировать динамику белкового биосинтеза в популяциях клеток; получать высококонтрастные изображения с минимальным фоном.

Набор совместим с широким спектром клеточных линий и протоколов HCS/HTS, обеспечивая высокую воспроизводимость и чувствительность при оценке активности синтеза белка *in situ*.

Набор рассчитан на 200 тестов (1 тест соответсвует 1 лунке 96-луночного планшета и объему рабочего раствора 100 мкл).

Состав набора

Компонент набора	Количество 41572 200 assays
3799-1mg, AHA (L-азидогомоаланин), 1 mg	1
S18B0, AF 488 алкин, 250 ug	1
15050, ДМСО (диметилсульфоксид) для мечения, 1 mL	1
10050, Cu(II)-BTTAA комплекс, 1 mL	2
77215, Tris-HCl buffer, 1×, 10 mL	2
2G010, Hoechst 33342, синий флуоресцентный краситель нуклеиновых кислот, 5 mL, 10 mg/mL in Water	1
12050, Аскорбиновая кислота, 10 mg	4

Хранить при температуре до -25°C. Не замораживать!

Срок хранения 12 месяцев.

Необходимые, но не предоставляемые материалы

- 96-луночные планшеты
- PBS (фосфатный буферный раствор)
- 100 мМ Трис-буфер, pH 7,4
- 3,7% формальдегид в PBS
- 0,5% Triton® X-100 в PBS
- 3% раствор бычьего сывороточного альбумина (BSA) в PBS (3% BSA в PBS), pH 7,4
- Деионизированная вода или очищенная вода 18 МОм
- Культуральная среда без метионина, например:
    - Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM, содержащая 4500 мг/л D-глюкозы, без L-глутамина, пирувата натрия, L-метионина и L-цистина)
    - RPMI Medium 1640, без L-метионина

Приготовление стоковых растворов

- *50 мМ L-AHA:* В пробирку с 1 мг L-AHA добавьте 112 мкл ДМСО из набора для получения 50 мМ стокового раствора, отцентрифугируйте раствор непосредственно перед использованием.
- *2 мМ AF 488 алкин:* растворите 250 мкг алкина в 193 мкл ДМСО из набора, чтобы получить готовый 2 мМ (1000×) сток. Разделите раствор на небольшие порции и храните аликвоты при -20°C.
- *100 мМ аскорбиновая кислота:* Раствор готовится непосредственно перед окрашиванием! В пробирку с 10 мг аскорбиновой кислоты добавьте 568 мкл деионизированной воды для получения 100 мМ стокового раствора, перемешайте содержимое пробирки до полного растворения.
- *Культуральная среда для L-AHA:* Добавьте в культуральную среду без L-метионина недостающие для культуры клеток аминокислоты.

Метаболическое мечение клеток

1. Культивируйте клетки на стерильном покровном стекле.
2. Адгезированные клетки можно окрашивать непосредственно на покровном стекле.
3. Подвергните клетки экспериментальному воздействию.
4. Приготовьте 50 мкМ рабочий раствор AHA, разбавив сток 1:1000 в предварительно нагретой среде без L-метионина.
5. Аспирируйте среду из лунки с покровным стеклом.
6. Добавьте 100 мкл/лунку рабочего раствора AHA.
7. Инкубируйте в течение 30 минут в условиях, оптимальных для данного типа клеток.

Фиксация и пермеабилизация клеток

1. После инкубации удалите среду, содержащую AHA, и промойте клетки один раз PBS. Удалите PBS.
2. Добавьте 100 мкл/лунку 3,7% формальдегида в PBS. Инкубируйте в течение 15 минут при комнатной температуре. Удалите фиксатор.

   Опционально. Клетки также могут быть обработаны другими фиксаторами, например этанолом и метанолом.
3. Дважды промойте клетки 3% BSA в PBS. Удалите промывочный раствор.
4. Добавьте 100 мкл/лунку 0,2% Triton® X-100 в PBS и инкубируйте в течение 20 минут при комнатной температуре.

Клик реакция

1. Приготовьте необходимый объем реакционной смеси для клик-реакции непосредственно перед работой в соответствии с таблицей. Соблюдайте последовательность, указанную в таблице.

Компонент реакции	Объем		
	На 0,5 планшета (48 тестов)	На 1 планшет (96 тестов)	На 2 планшета (192 теста)
Трис-буфер, pH 7,4	3,5 мл	7 мл	14 мл
Cu(II)-BTTAA комплекс	1 мл	2 мл	4 мл
Аскорбиновая кислота (100 мМ)	500 мкл	1 мл	2 мл
AF 488 алкин (2 мМ)	5 мкл	10 мкл	20 мкл
Общий объем	5 мл	10 мл	20 мл

1. Удалите пермеабилизационный буфер и дважды промойте клетки 100 мкл/лунку 3% BSA в PBS. Удалите промывочный раствор.
2. Добавьте 100 мкл/лунку реакционной смесь в каждую лунку и хорошо перемешайте.
3. Инкубируйте в течение 30 минут при комнатной температуре, в защищенном от света месте.
4. Удалите реакционную смесь и промойте лунки один раз 3% раствором BSA в PBS.
5. Промойте три раза в PBS.
6. Докрасьте клетки иммуногистохимически или другими красителями при необходимости.

Контрастное окрашивание ДНК

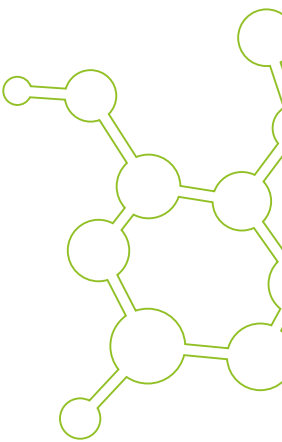
1. Разведите раствор Hoechst 33342 в буфере PBS в соотношении 1:1000 для получения рабочего раствора Hoechst 33342 (конечная концентрация — 10 мкг/мл).
2. Замените в каждой лунке PBS на 100 мкл рабочего раствора Hoechst 33342. Инкубируйте в течение 30 минут при комнатной температуре, защищая от света. Удалите раствор Hoechst 33342.
3. Дважды промойте каждую лунку буфером PBS.

Визуализация и анализ

1. Замените PBS в каждой лунке. При необходимости закройте планшет пленкой для герметизации.
2. Проведите сканирование планшета с помощью автоматизированной системы визуализации, используя фильтры, подходящие для DAPI/Hoechst и FITC. Синтез вновь образованных белков оценивают по интенсивности сигнала в канале FITC в кольцевой области вокруг ядра, определенной по окрашиванию красителем Hoechst.

Ver. QT6CG

22.09.509-QM
Issued by INSPECT



www.lumiprobe.com