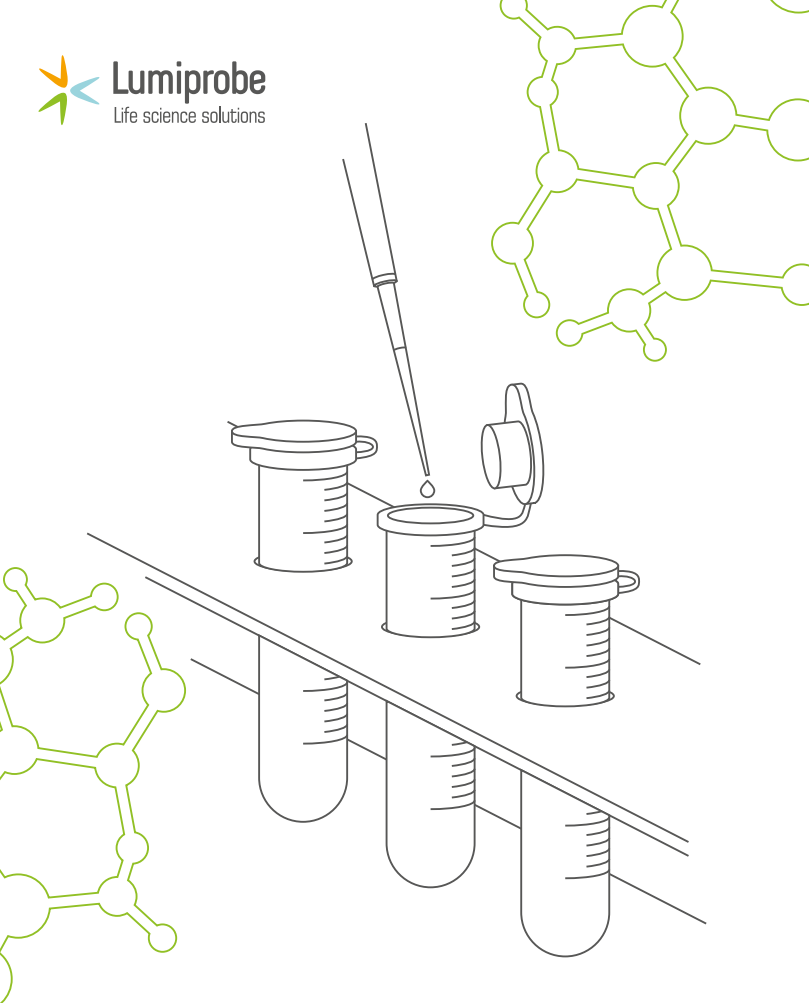




Инструкция к набору АНА AF 488 Protein
Synthesis Assay для анализа синтеза
белка в клетках

Contents

Русский: Инструкция к набору AHA AF 488 Protein Synthesis

Assay для анализа синтеза белка в клетках 3-8

Инструкция к набору АНА 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 мечення неканонической аминокислотой L-азидогомоаланином (АНА). АНА 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 АНА детектируется в фиксированных клетках с помощью катализируемой медью клик-реакции (CuAAC) между азидной группой АНА 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 FACS/HTS, обеспечивая высокую воспроизводимость и чувствительность при оценке активности синтеза белка *in situ*.

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

Состав набора

Компонент набора	Количество
	41572
	200 assays
3799-1mg, АНА (L-азидогомоаланин), 1 mg	1
S18B0, AF 488 алкин, 250 ug	1
15050, ДМСО (диметилсульфоксид) для мечения, 1 mL	1
10050, Cu(II)-BTAA комплекс, 1 mL	2
77215, Tris-HCl buffer, 1×, 10 mL	2
26010, 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-АНА*: В пробирку с 1 мг L-АНА 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 аликваты 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-АНА*: 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 АНА, 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 АНА.
7. Инкубируйте в течение 30 минут в условиях, оптимальных для данного типа клеток.

Фиксация и пермеабелизация клеток

1. После инкубации удалите среду, содержащую АНА, 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)-БТТАА 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

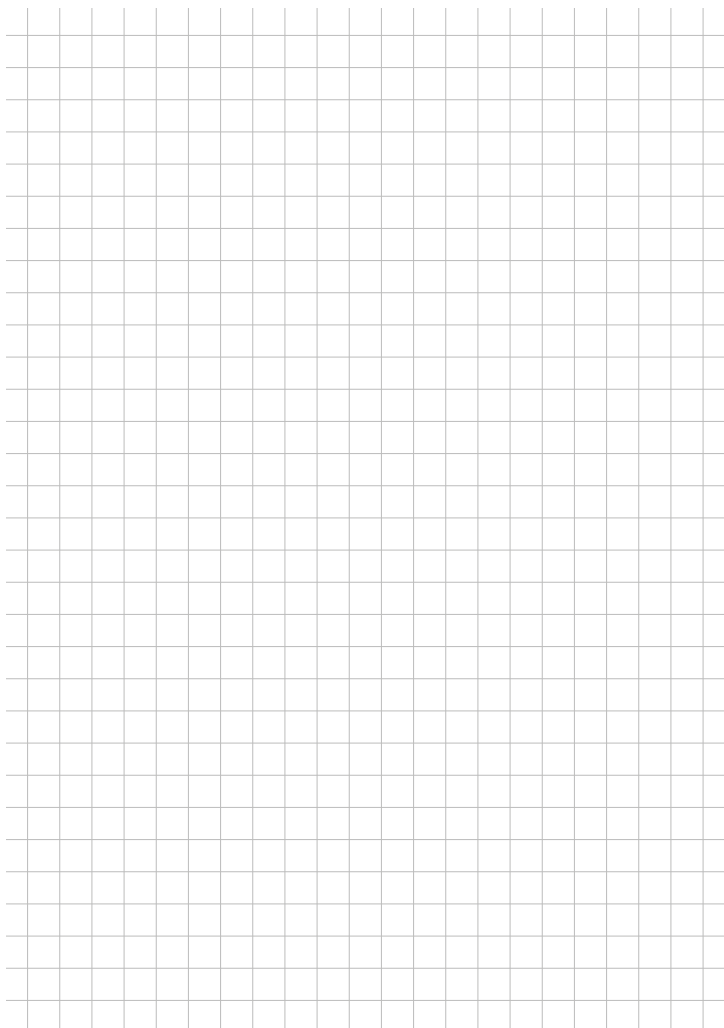
2. Удалите пермеабилизационный буфер и дважды промойте клетки 100 мкл/лунку 3% BSA в PBS. Удалите промывочный раствор.
3. Добавьте 100 мкл/лунку реакционной смеси в каждую лунку и хорошо перемешайте.
4. Инкубируйте в течение 30 минут при комнатной температуре, в защищенном от света месте.
5. Удалите реакционную смесь и промойте лунки один раз 3% раствором BSA в PBS.
6. Промойте три раза в PBS.
7. 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.





22.09.509-QM
Issued by INSPECT



www.lumiprobe.com

