

Оценка клеточной пролиферации и репликации ДНК методом клик-химии

Методы количественной оценки пролиферации клеток широко используются в исследованиях цитотоксичности, онкологических исследованиях и многих других областях клеточной биологии. Многие из них позволяют визуализировать пролиферирующие клетки с помощью флуоресцентных красителей и могут быть использованы для проведения скрининга с высокой пропускной способностью.

Обнаружение реплицированной ДНК является одним из наиболее прямых способов выявления клеточной пролиферации. Для этого чаще всего используют [бромодезоксиуридин \(BrdU\)](#) — нуклеозид, который встраивается в ДНК во время ее репликации. Содержащая BrdU ДНК обнаруживается затем с помощью антител против этого нуклеозида. Несмотря на свою специфичность, данный метод выявления клеточной пролиферации отличается трудоемкостью и сложностью реализации, поскольку включает обработку клеток агрессивными реагентами, обеспечивающими экспонирование ДНК для связывания с антителами против BrdU, и проникновение указанных антител внутрь клетки.

Более мягкой альтернативой является использование другого нуклеозида — [этинилдезоксиуридина \(EdU\)](#), который может быть доставлен в клетку путем его добавления в питательную среду культуры, а также путем инъекции животным. После встраивания в ДНК этот нуклеозид может быть конъюгирован с [азидами различных флуоресцентных красителей](#) при катализе медью(II), что обеспечивает флуоресцентное окрашивание реплицированной ДНК. Эта методика достаточно проста, отличается быстротой и легкостью реализации. Она не требует обработки клеток агрессивными реагентами (нужна только их пермеабиллизация Тритоном) и поэтому обеспечивает лучшую сохранность клеточных структур. После обработки азидом красителя и последней отмытки (этап 8) клетки можно пометить с помощью реагентов, содержащих флуорофоры с различной длиной волны эмиссии, таких как Hoechst, [DAPI](#) или антител с флуоресцентной меткой.

Необходимые реагенты

- [5-Этинил-2'-дезоксиуридин \(EdU\)](#)
- [Cu\(II\)-ВТТАА комплекс](#) — катализатор для реакции клик-химии
- [Аскорбиновая кислота](#) — восстановитель для меди
- [Азиды флуоресцентных красителей](#)
- [ДМСО, диметилсульфоксид для мечения](#) — растворитель для азидов
- Triton X-100 (or Tween-20)
- PBS, pH 7,4
- 100 мМ Трис-буфер, pH 7,4

Протокол

Точный протокол зависит от конкретного типа клеток или ткани. В общем он может быть описан следующим образом:

1. Обработайте клетки/ткань добавлением 10–20 мкМ EdU в питательную среду в течение определенного времени.

2. Зафиксируйте клетки в 3,7% растворе формальдегида в PBS в течение 15 мин.
3. Отмойте клетки с помощью PBS.
4. Пермеабелизируйте клетки в PBS, содержащем 0,2% Triton X-100 (или 0,5% Tween-20), в течение 30 мин.
5. Отмойте клетки с помощью PBS еще раз.
6. Приготовьте смесь, содержащую 2 мМ Cu(II)-ВТТАА комплекса, 5 мкМ азида красителя и 10 мМ аскорбиновой кислоты в 100 мМ Трис-буфере, pH 7,4 (для сульфированных азидов) или в 100 мМ Трис-буфере, pH 7,4, содержащем 50% ДМСО (для несulfированных азидов). Смесь должна быть свежеприготовленной из-за нестабильности меди(I) в растворе.
7. Инкубируйте клетки в реакционной смеси в течение 30 мин.
8. Отмойте клетки с помощью PBS.
9. *(Опционально)* Если клетки необходимо пометить другим флуорофором, далее для окрашивания используйте ваш стандартный протокол.

Использование сульфированных (водорастворимых) азидов — азидов сульфоцианинов и AF красителей, дает наилучшие результаты. При использовании несulfированных азидов — азидов цианинов и BDP, реакционная смесь должна содержать 50% ДМСО.

Ссылки

1. *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