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(I), 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 пермеабилизация Тритоном) и поэтому обеспечивает лучшую сохранность клеточных структур. После обработки азидом красителя и последней отмывки (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)-BTTAA 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.

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

2. Зафиксируйте клетки в 3,7% растворе формальдегида в PBS в течение 15 мин.
3. Отмойте клетки с помощью PBS.
4. Пермеабилизируйте 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)-BTTAA 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 несульфированных 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 несульфированных 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