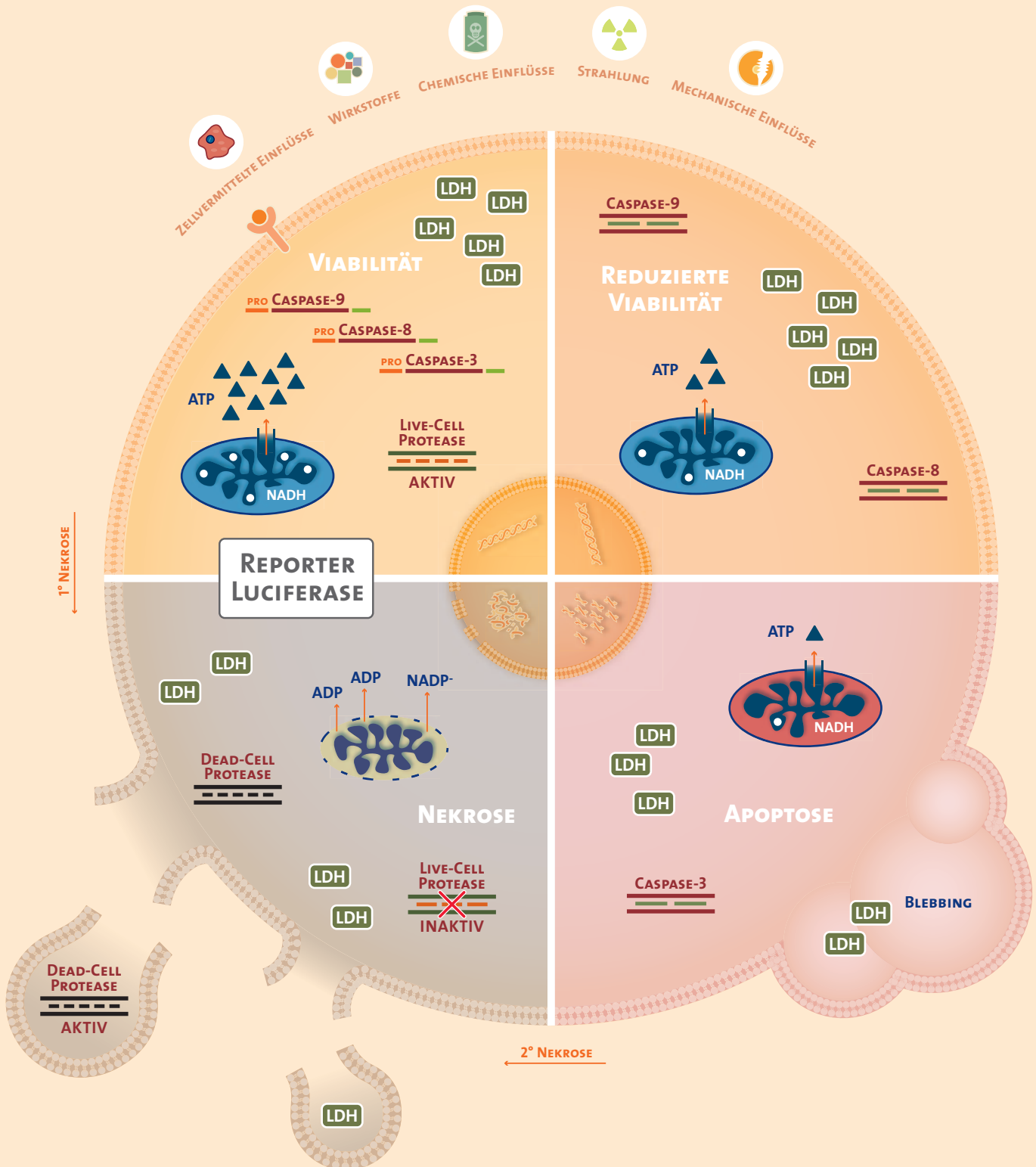
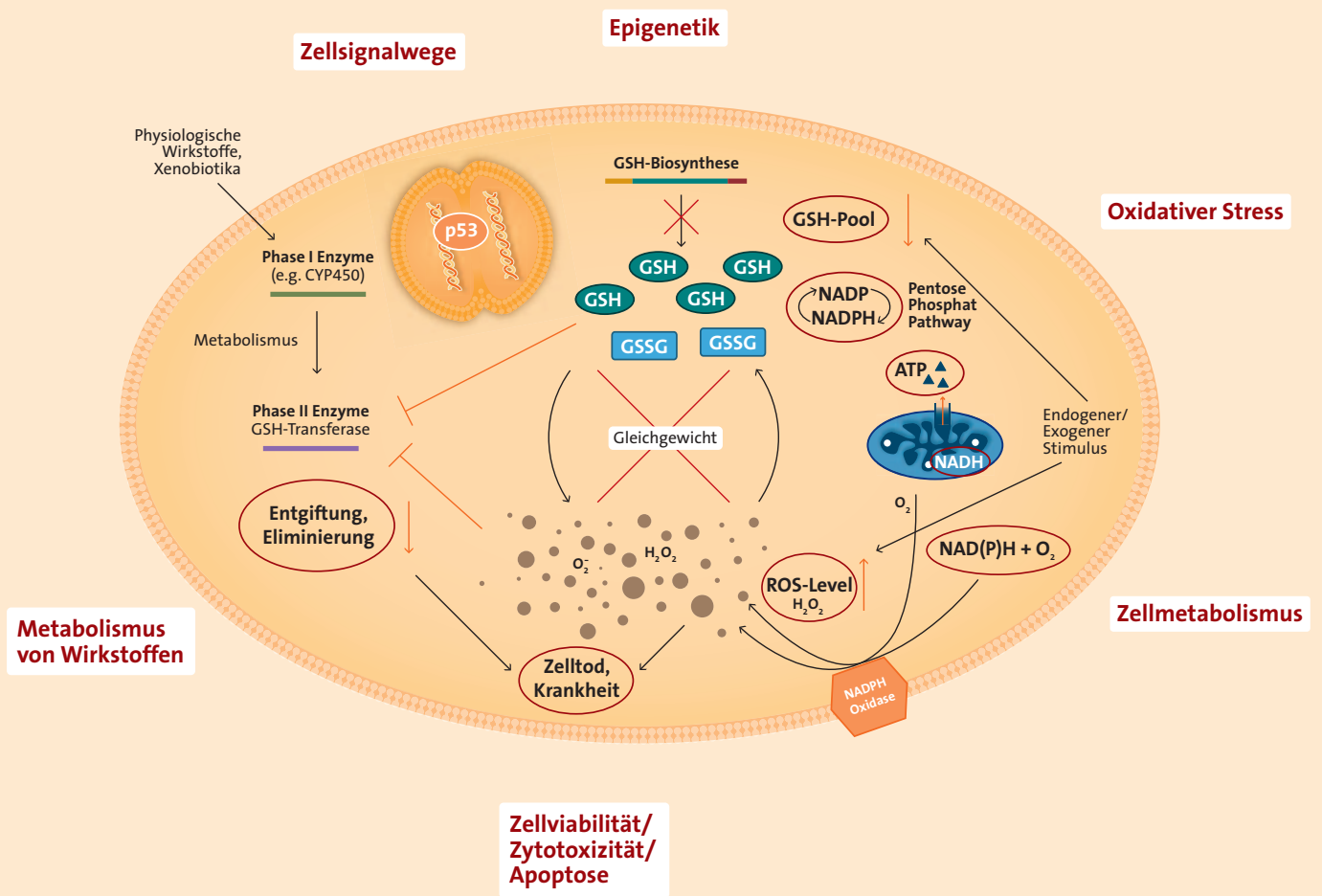


Zellbasierte & Biochemische Assays von Promega



Messparameter für zellbasierte Assays



Inhaltsverzeichnis

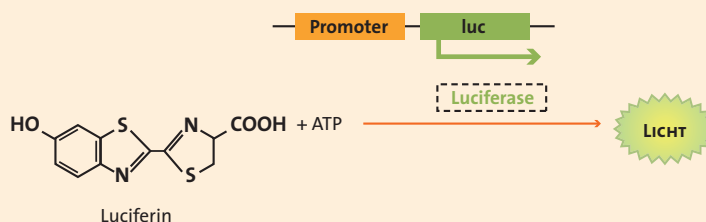
I Zellbasierte und biochemische Assay-Formate	4	III Zellmetabolismus	38
II Zellviabilität, Zytotoxizität, Apoptose und Entzündungsreaktionen	6	NAD(P)H-Glo™ Detection System	39
Assay-Übersicht	7	NAD ⁺ /NADH-Glo™ Assay	40
IIa Zellviabilität/Proliferation	8	NADP ⁺ /NADPH-Glo™ Assay	40
RealTime-Glo™ Metabolic Cell Viability Assay	9	IV Oxidativer Stress	42
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	10	ROS-Glo™ H ₂ O ₂ Assay	43
CellTiter-Glo® 2.0 Cell Viability Assay	11	GSH-Glo™ Glutathione Assay	44
CellTiter-Glo® 3D Viability Assay	12	GSH/GSSG-Glo™ Assay	45
CellTiter-96® AQ _{ueous} One Solution		V Epigenetische Assays	46
Cell Proliferation Assay (MTS)	13	HDAC-Glo™ 2 Assay	48
CellTiter-Blue® Cell Viability Assay	14	HDAC-Glo™ Class IIa Assay	49
CellTiter-Fluor™ Cell Viability Assay	15	HDAC-Glo™ I/II Assay	50
BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay	16	HDAC-Glo™ I/II Screening Systems	50
		SIRT-Glo™ Assays and Screening Systems	51
IIb Zytotoxizität	17	UDP-Glo™ Glycosyltransferase Assay	52
CellTox™ Green Cytotoxicity Assay	18	VI Zellsignalwege	53
CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay	19	cAMP-Glo™ Max Assay	54
CytoTox-Fluor™ Cytotoxicity Assay	20	ADP-Glo™ Kinase Assay	55
CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay (LDH)	21	ADP-Glo™ Max Assay	56
ViralTox-Glo™ Assay	22	Kinase-Glo® Luminescent Kinase Assay	56
		AMP-Glo™ Assay	57
IIc Apoptose	23	PDE-Glo™ Phosphodiesterase Assay	58
Caspase-Assays im Überblick	24	GTPase-Glo™ Assay	59
Caspase-Glo® 3/7 Assay	25	VII Metabolismus von Wirkstoffen – ADME Assays	60
Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay	26	P450-Glo™ CYP450 Assay Systems	61
CaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Marker	27	P450-Glo™ CYP450 Screening Systems	62
		Pgp-Glo™ Assay Systems	63
IIId Inflammasom/Entzündungsreaktionen	28	MAO-Glo™ Assay Systems	64
Caspase-Glo® 1 Inflammasome Assay	29	UGT-Glo™ Assay	65
		VIII Protease-Assays	66
IIe Multiplexing	30	Cell-based Proteasome-Glo™ Assays/ Proteasome-Glo™ Assays	67
Übersicht über die Kombinationsmöglichkeiten von zellbasierten Assays	31	Calpain-Glo™ Protease Assay	68
MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay	32	DUB-Glo™ Protease Assay (DUB/SENPNEDP)	69
MultiTox-Glo Multiplex Cytotoxicity Assay	33	DPPIV-Glo™ Protease Assay	70
ApoLive-Glo™ Multiplex Assay	34	IX Literatur	71
ApoTox-Glo™ Triplex Assay	35		
ONE-Glo™ + Tox Luciferase Reporter and Cell Viability Assay	36	X Produktübersicht	81
Mitochondrial ToxGlo™ Assay	37		

Drei Assay-Grundtypen basierend auf der Luciferase-Reaktion:

Typ I:

Messung der Luciferase-Expression

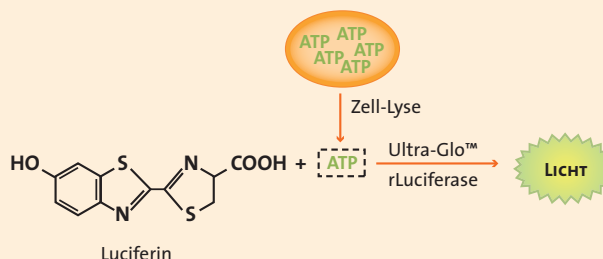
Die Messung der Luciferase-Expression liegt allen Reporter-Gen-Assays oder GPCR-Assays zugrunde. Die Menge der Luciferase ist der limitierende Faktor. Er hängt von der Expressionsstärke im jeweiligen Expressionssystem ab. Das Assay-Reagenz enthält einen Überschuss an Luciferin und ATP.



Typ II:

Messung des ATP-Gehalts

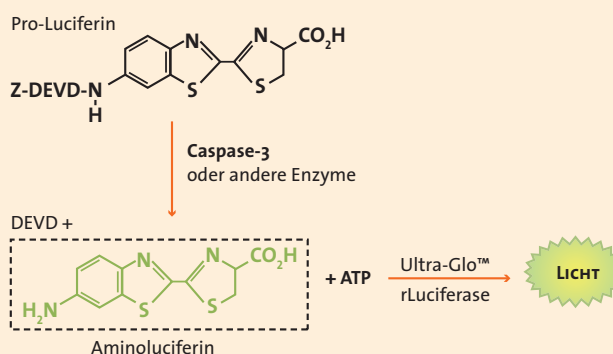
In ATP-abhängigen Assays wird der ATP-Gehalt in einer Probe gemessen. ATP ist hier der limitierende Faktor. Er wird indirekt über die Luciferase-Reaktion bestimmt. Dieses Prinzip wird u.a. bei der Bestimmung der Zellviabilität und bei der Messung von Kinaseaktivitäten eingesetzt. Das Assay-Reagenz enthält einen Überschuss der Ultra-Glo™ Luciferase und Luciferin.



Typ III:

Messung der Luciferin-Freisetzung

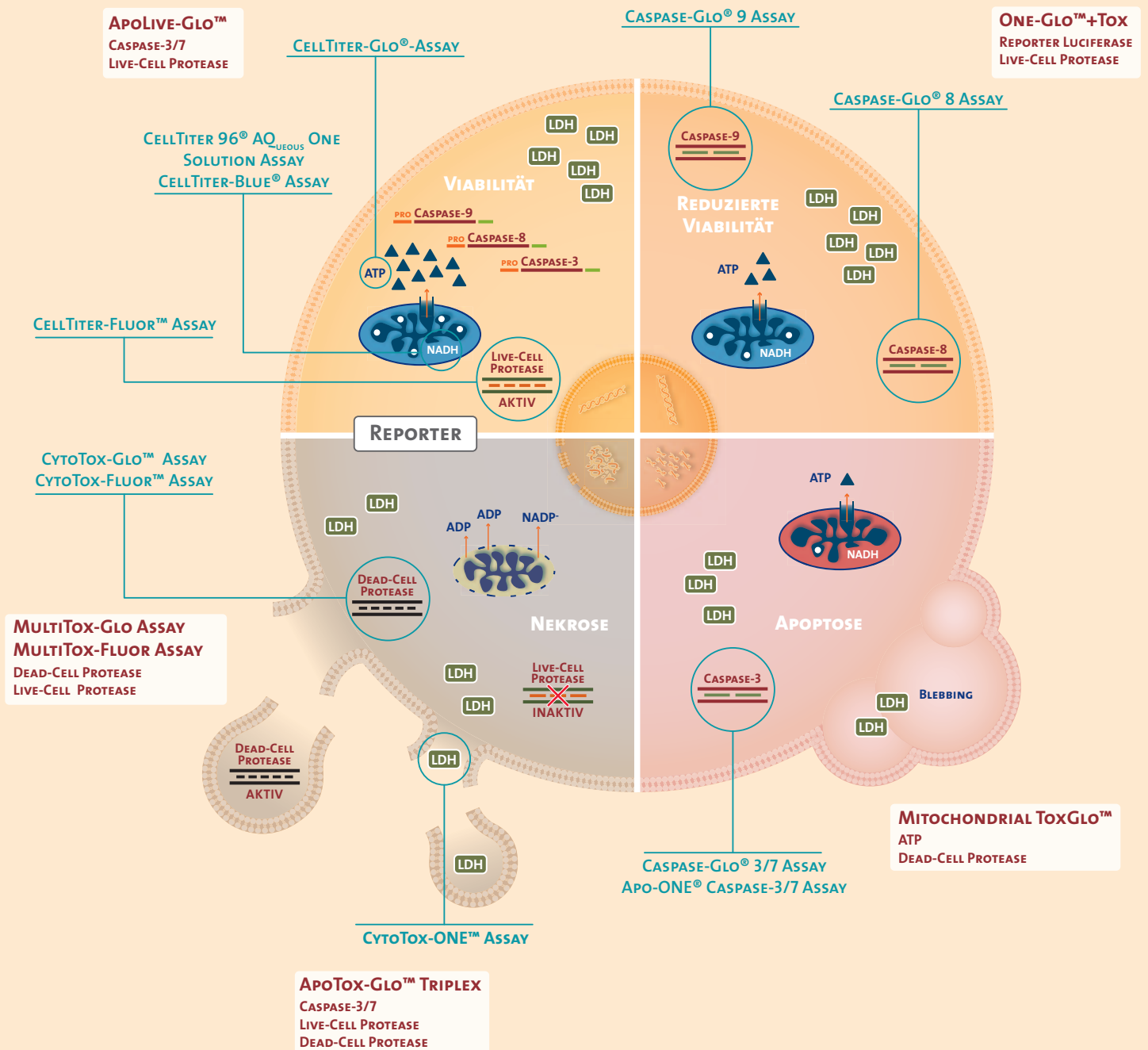
Die Luciferin-generierenden Assays enthalten ein Pro-Luciferin mit Enzym-Erkennungssequenzen, wie beispielsweise das DEVD-Tetrapeptid für die Bestimmung der Caspase-3/7 Aktivität. Erst nachdem das Substrat freigesetzt wird, entsteht das Lumineszenzsignal durch das entsprechende Enzym. Das Assay-Reagenz enthält modifiziertes Luciferin und einen Überschuss der Ultra-Glo™ Luciferase und ATP.



II Zellviabilität, Zytotoxizität, Apoptose und Entzündungsreaktionen

Die Erforschung und Bestimmung von Zellviabilität, Zytotoxizität, Apoptose und Entzündungsreaktionen zählt in vielen Bereichen der Biowissenschaften zu den wichtigsten Methoden. Zellbasierte Assays finden daher heutzutage routinemäßig ihren Einsatz bei der Entwicklung neuer Therapeutika und Identifizierung von potenziellen Wirkstoffkandidaten.

Mittlerweile gibt es eine Reihe verschiedener zellbasierter Assays für den Nachweis von Zellviabilität, Zytotoxizität, Apoptose und Entzündungsreaktionen. Dabei werden sowohl metabolische als auch nichtmetabolische Marker verwendet. Die Kombination verschiedener Assays (Multiplexing) ermöglicht die Analyse von mehr als einem Parameter in einer Probe. Dadurch wird die Interpretation der Daten erleichtert und erlaubt beispielsweise die Unterscheidung zwischen Nekrose und Apoptose.



Zellbasierte Assays auf einen Blick für Zellviabilität, Zytotoxizität, Apoptose und Entzündungsreaktionen

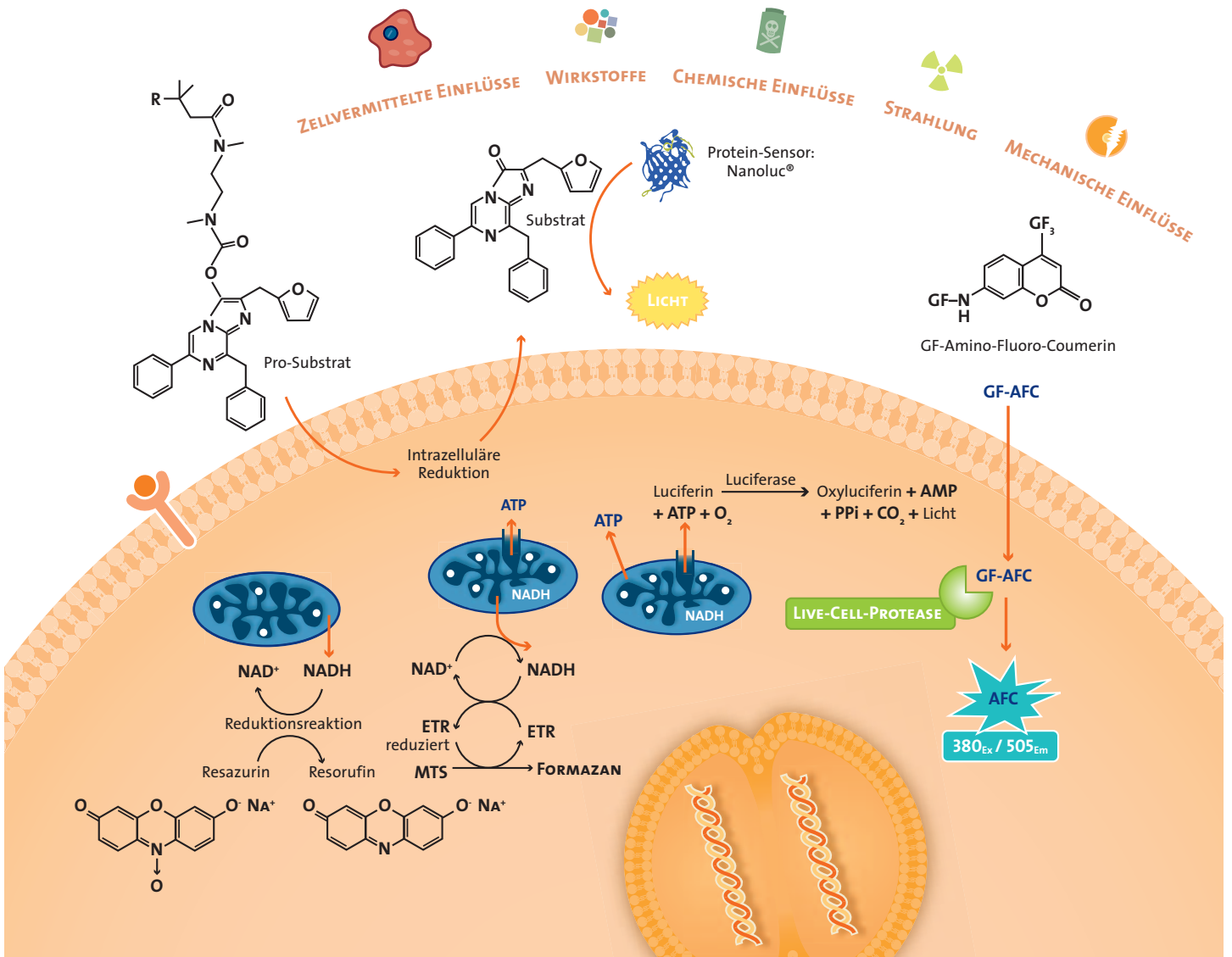
Assay	Parameter/Biomarker	Zeitbedarf	Sensitivität 96-Well	Platten Format	Instrument
RealTime-Glo™ Metabolic Cell Viability Assay	Redoxpotential	30 min	< 100 Zellen/Well im 96-Well Format	96/384/1536	Luminometer
CellTiter-Glo® Assay	ATP	10 min	10 lebende Zellen	96/384/1536	Luminometer/CCD
CellTiter-Glo® 2.0 Assay	ATP	10 min	15 lebende Zellen (384-well)	96/384/1536	Luminometer
CellTiter-Glo® 3D Assay	ATP	30 min	ND	Alle gängigen 3D-Zellkultur Formate	Luminometer
CellTiter-Fluor™ Assay	Live-Cell-Protease	0,5–3 h	40 lebende Zellen	96/384/1536	Fluorometer, AFC 400 _{ex} /505 _{em}
CellTiter-Blue® Assay	Resazurin Reduktion durch Reduktionsäquivalente	1–4 h	400 lebende Zellen	96/384/1536	Fluorometer, Resorufin 560 _{ex} /590 _{em}
CellTiter 96® AQ _{ueous} One Solution Assay	MTS Reduktion durch Reduktionsäquivalente	1–4 h	1000 lebende Zellen	96/384	Spektrophotometer Abs 490nm
BacTiter-Glo™ Assay	ATP	5 min	10 lebende Bakterien	96/384	Luminometer
CellTox™ Green Assay	DNA	15 min	ND	96/384/1536	Fluorometer, (485–500 _{ex} /520–530 _{em})
CytoTox-Glo™ Assay	Dead-Cell-Protease Freisetzung	15 min	10 tote Zellen	96/384/1536	Luminometer
CytoTox-Fluor™ Assay	Dead-Cell-Protease Freisetzung	0,5–3 h	10 tote Zellen	96/384	Fluorometer, R110 485 _{ex} /520 _{em}
CytoTox-ONE™ Assay	LDH-Freisetzung	10 min	200 tote Zellen	96/384	Fluorometer, Resorufin 560 _{ex} /590 _{em}
Viral ToxGlo™ Assay	ATP	10 min	15 lebende Zellen (384-well)	96/384/1536	Luminometer
Caspase-Glo® 3/7 Assay	Caspase-3/7-Aktivität	0,5 h	100 apoptotische Zellen	96/384/1536	Luminometer
Apo-ONE® Caspase 3/7 Assay	Caspase-3/7-Aktivität	1–18 h	625 apoptotische Zellen	96/384/1536	Fluorometer, R110 499 _{ex} /521 _{em}
Caspase-Glo® 8 Assay	Caspase-8-Aktivität	0,5 h	~1000 apoptotische Zellen	96	Luminometer
Caspase-Glo® 9 Assay	Caspase-9-Aktivität	0,5 h	~1500 apoptotische Zellen	96	Luminometer
Caspase-Glo® 2 Assay	Caspase-2-Aktivität	0,5 h	Enzympräparation	96/384/1536	Luminometer
Caspase-Glo® 6 Assay	Caspase-6-Aktivität	0,5 h	Enzympräparation	96/384/1536	Luminometer
Caspase-Glo® 1 Assay	Caspase-1-Aktivität	1 h	ND	96/384	Luminometer
MultiTox-Glo Assay	Viabilität + Zytotoxizität; Live- + Dead-Cell-Protease	0,5 h	40 lebende Zellen, 10 tote Zellen	96/384/1536	Fluorometer, AFC 400 _{ex} /505 _{em} Luminometer
MultiTox-Fluor Assay	Viabilität + Zytotoxizität; Live- + Dead-Cell-Protease	0,5–3 h	40 lebende Zellen, 10 tote Zellen	96/384/1536	Fluorometer, AFC 400 _{ex} /505 _{em} R110 485 _{ex} /520 _{em}
ApoLive-Glo™ Multiplex Assay	Viabilität + Apoptose; Live-Cell-Protease + Caspase-3/7	1–3 h	~ 40 lebende Zellen, 100 apoptotische Zellen	96/384	Fluorometer, AFC 400 _{ex} /505 _{em} Luminometer
ApoTox-Glo™ Triplex Assay	Viabilität, Zytotoxizität + Apoptose Live- + Dead-Cell-Protease + Caspase-3/7	1–3 h	~ 40 lebende Zellen, 100 apoptotische Zellen	96/384	Fluorometer, AFC 400 _{ex} /505 _{em} R110 485 _{ex} /520 _{em} Luminometer
One-Glo™ + Tox Assay	Viabilität + Reporterexpression; Live-Cell-Protease + Luciferase-Aktivität	0,6–3 h	~40 lebende Zellen	96/384	Fluorometer, AFC 400 _{ex} /505 _{em} Luminometer
Mitochondrial ToxGlo™ Assay	Mitochondriale Toxizität; Dead-Cell-Protease + ATP; (CrabTree Effekt, Galactose Medium)	0,6–3 h	ND	96/384	Fluorometer, R110 485 _{ex} /520 _{em} Luminometer

IIa Zellviabilität

Teilen und vermehren sich die Zellen in meiner Zellkultur oder nicht? Das ist meist die erste Frage, die sich stellt, wenn Zellen im Experiment Substanzen oder anderen Einflüssen ausgesetzt sind. Die Antwort darauf kann durch die Messung verschiedener Parameter gefunden werden. Eine bekannte Methode ist die Messung von Reduktionsäquivalenten einer Zellkulturprobe. Dieser Wert verhält sich proportional zur Anzahl der lebenden Zellen im Medium. Eine weitere Möglichkeit ist die Messung des ATP-Gehalts in lebenden Zellen, der indirekt mittels der Luciferase-Reaktion nachgewiesen werden kann. Die Verwendung eines lumineszenten Biosensors ist eine neue Methode, die es ermöglicht das Redoxpotential in der Zelle in Echtzeit über einen langen Zeitraum zu messen. Um zu unterscheiden, ob die Ab-

nahme der Zellpopulation auf Apoptose oder Nekrose beruht, empfehlen sich die Messung der Membranintegrität und/ oder der Nachweis der Caspase-Aktivität.

- RealTime-Glo™ Metabolic Cell Viability Assay
- CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay
- CellTiter-Glo® 2.0 Cell Viability Assay
- CellTiter-Glo® 3D Viability Assay
- CellTiter-96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS)
- CellTiter-Blue® Cell Viability Assay
- CellTiter-Fluor™ Cell Viability Assay
- BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay



RealTime-Glo™ Metabolic Cell Viability Assay

Zellbasiert

Geeignet für
3D-Zellkulturen

Multiplexing mit
CellTox™ Green

Anwendung

Langzeitmessungen von Zellviabilität in Echtzeit, Zytotoxizität, Kinetische Messungen, Multiplexing mit anderen zellbasierten Assays.

Assay-Beschreibung

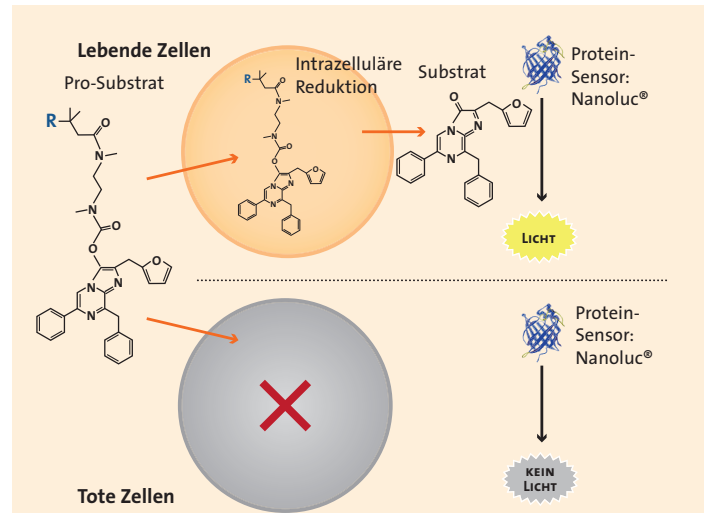
Der homogene **RealTime-Glo™ Assay** bietet eine biolumineszente Methode zur Bestimmung der Zellviabilität durch die Messung des Redoxpotentials in der Zelle. Der RealTime-Glo™ Assay verwendet die NanoLuc™ Luciferase als lumineszenten Biosensor. Die NanoLuc™ Luciferase ist ein kleiner, besonders sensibler Reporter, die das reduzierte metabolische Zellviabilitätssubstrat ATP-unabhängig umsetzt. Das gemessene Signal korreliert direkt mit der Anzahl lebender Zellen in einer Zellkultur zum Zeitpunkt der Messung. Der Assay ist weder toxisch, noch lytisch und eignet sich daher besonders für kinetische Viabilitätsstudien mit einer Inkubationszeit bis zu 72 Stunden.

Assay-Prinzip

Der RealTime-Glo™ Assay enthält ein zellgängiges Pro-Furimazin-Derivat, das sogenannte „metabolische Zellviabilitätssubstrat“ und die NanoLuc™ Luciferase. Nach Zugabe des Reagenzes zu den Zellen wird das Pro-Substrat in den Zellen zu Furimazin reduziert und ins Medium abgegeben. Dort dient es als Substrat für die NanoLuc™ Luciferase, die als Sensor außerhalb der Zelle agiert und ein stabiles Lumineszenzsignal generiert. Tote Zellen sind nicht in der Lage, das metabolische Zellviabilitätssubstrat zu reduzieren. Der Assay kann als a) Endpunktassay direkt zu den behandelten Zellen b) im Non-Step-Format für kinetische Bestimmungen zur Wirkstofflösung oder c) direkt bei der Aussaat hinzugegeben werden.

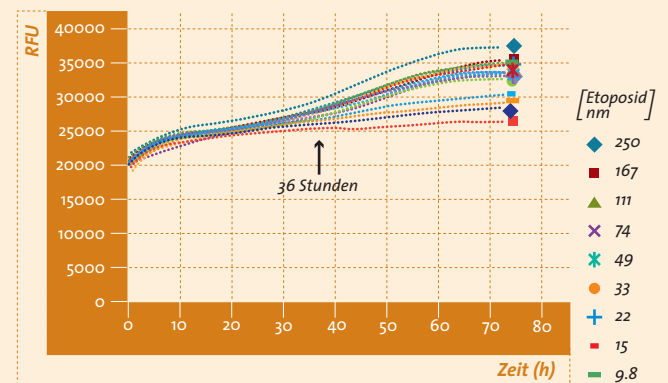
Assay-Merkmale

Assay-Typ	Lumineszent
Marker	Redoxpotential
Anwendung	Messung von Zellviabilität in Echtzeit, Kinetische Messungen, Multiplexing
Zelltyp	Zelllinien (adhärent oder in Suspension)
Durchführung	Homogener Non-Step Assay
Zeitbedarf	Inkubation von 30 Minuten (nach Zugabe des Reagenzes)
Sensitivität	< 100 Zellen/Well im 96-Well-Format, < 10 Zellen/Well im Low-Volume 384-Well-Format
Robust	HTS-geeignet, 96–1536-Well-Format

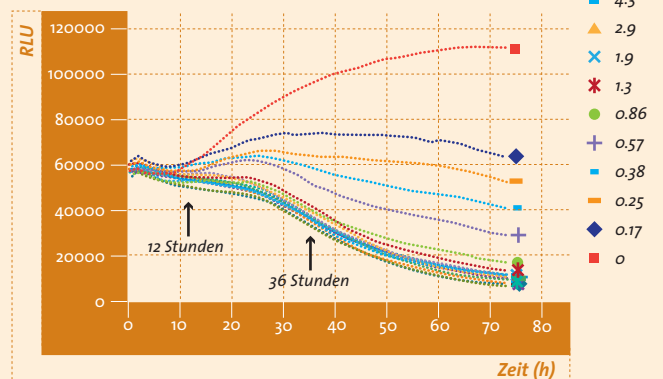


Messung der Zellviabilität mittels eines lumineszenten Protein-Sensors (NanoLuc™ Luciferase) und eines metabolischen Zellviabilitätssubstrats.

Zytotoxizität: CellTox™ Green



Viabilität: RealTime-Glo



Kinetische Bestimmung der Wirkung von Etoposid auf MCF7-Zellen durch Multiplexen von CellTox Green mit dem RealTime-Glo™ Assay. 500 MCF7-Zellen/Well wurden mit steigenden Konzentrationen an Etoposid behandelt bei gleichzeitiger Zugabe des RealTime-Glo™ Metabolic Cell Viability Reagenzes und CellTox™Green in das Zellmedium.

CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay

Zellbasiert

Anwendung

Zellviabilität; Proliferation; Zytotoxizität.

Assay-Beschreibung

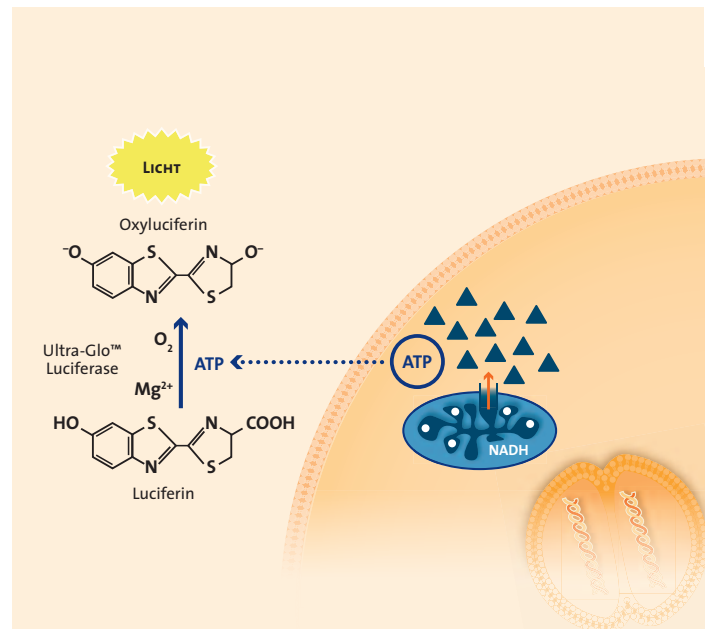
Der **CellTiter-Glo®** ist der sensitivste zellbasierte Assay für den Nachweis der Zellviabilität. Deshalb eignet er sich auch besonders für Studien an Primärzellen. Die einfache und schnelle Durchführung sowie die Reproduzierbarkeit der Daten sind herausragende Assay-Eigenschaften (Z' -Faktor $> 0,63$ in 1536-Well). Ebenso der äußerst breite lineare Messbereich von 10–50.000 Zellen.

Assay-Prinzip

Der Assay basiert auf der Messung des ATP-Gehalts in einer ATP-abhängigen Luciferase-Reaktion. Der ATP-Gehalt ist ein Maß für die metabolische Aktivität von Zellen. Durch Umsatz von Luciferin durch eine rekombinante Luciferase (Ultra-Glo™ Luciferase) entsteht Oxyluciferin und Licht. Das Lichtsignal kann sowohl im Luminometer als auch mit Hilfe einer CCD-Kamera gemessen werden und ist proportional zur Anzahl lebender Zellen. Das Assay-Reagenz wird direkt zu den Zellen gegeben und führt zur Lyse der Zellen.

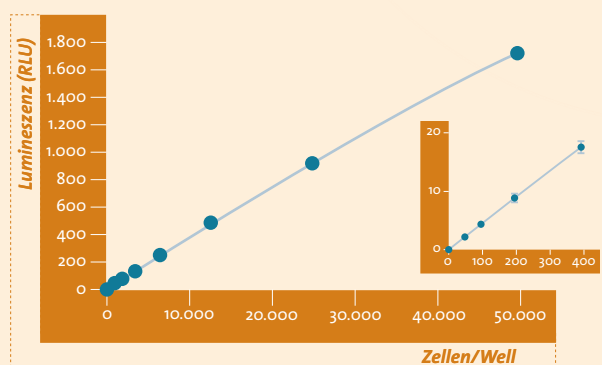
Assay-Merkmale

Assay-Typ	Lumineszent (Glow-Type; $T_{1/2} > 5$ h)
Marker	ATP
Anwendung	Zellviabilität, Proliferation, Zytotoxizität
Zelltyp	Zelllinien und Primärzellen (adhärent oder in Suspension)
Durchführung	Homogen, 1-Schritt-Assay
Zeitbedarf	10 Minuten
Sensitivität	10 lebende Zellen (96-Well)
Linerarität	10–50.000 Zellen
Robust	Hoher Z' -Faktor



- Messung des ATP-Gehalts
- Basiert auf einer ATP-abhängigen Luciferase-Reaktion
- Assay-Reagenz führt zur Lyse der Zellen

Ausgezeichnete Linearität und Sensitivität



Verdünnungsreihe von Jurkat Zellen in 96-Well-Platten. Die Anzahl lebender Zellen von 10 bis 50.000 Zellen pro Well ist direkt proportional zum gemessenen Lumineszenz-Signal ($R = 0,99$).

CellTiter-Glo® 2.0 Cell Viability Assay

Zellbasiert

Anwendung

Zellviabilität; Proliferation; Zytotoxizität.

Assay-Beschreibung

Der neu entwickelte Assay **CellTiter-Glo® 2.0** zeichnet sich besonders durch seine flexible Lagerungstemperatur und Einsetzbarkeit aus. Das Reagenz kann bei 4°C für 4 Wochen mit einer verbleibenden Enzymaktivität von > 90% oder bei Raumtemperatur für 7 Tage mit weniger als 15% Aktivitätsverlust gelagert werden, wodurch das Auftauen vor jeder Verwendung entfällt. Ebenso fällt das Mischen von Puffer und Substrat weg, da der Assay bereits als fertiges Reagenz geliefert wird. Der **CellTiter-Glo® 2.0 Assay** eignet sich daher perfekt für Screens im regulären oder Low-Volume 96-Well, 384-Well und 1536-Well Format mit einer hohen Sensitivität und einem hohen Z'-Faktor.

Assay-Prinzip

Der Assay basiert auf der Messung des ATP-Gehalts in einer ATP-abhängigen Luciferase-Reaktion. Der ATP-Gehalt ist ein Maß für die metabolische Aktivität von Zellen. Das Assay-Reagenz wird direkt zu den Zellen gegeben und führt zur Lyse der Zellen, wodurch Luciferin mit Hilfe der Ultra-Glo™ Luciferase (rekombinante Luciferase) umgesetzt wird. Nach einer Inkubation von 10 Minuten kann ein stabiles Lumineszenzsignal mit einer Halbwertszeit von > 3 Stunden gemessen werden, das proportional zur Anzahl lebender Zellen ist.

Assay-Merkmale

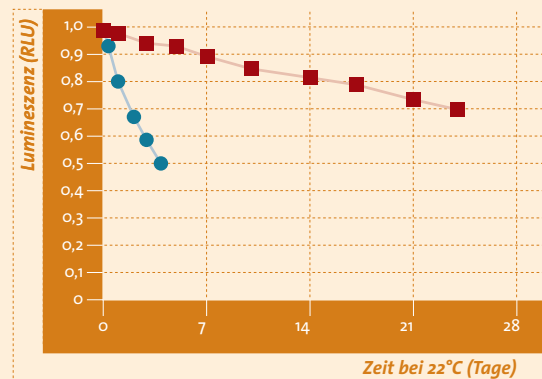
Assay-Typ	Lumineszent (Glow-Type; $T_{1/2} > 3$ Stunden)
Marker	ATP
Anwendung	Zellviabilität, Proliferation, Zytotoxizität
Zelltyp	Zelllinien und Primärzellen (adhärent oder in Suspension)
Durchführung	Homogen, 1-Schritt-Assay mit flexiblen Lagerungstemperaturen
Zeitbedarf	10 Minuten
Sensitivität	15 lebende Zellen (384-Well)
Linearität	15–50.000 Zellen
Robust	Hoher Z'-Faktor: 0,81 im 384-Well Format

**1 Woche
bei Raumtemperatur
stabil!**

CellTiter-Glo® 2.0 und CellTiter-Glo® im Vergleich

Verbesserte Stabilität: < 20% Abnahme der Enzymaktivität bei folgenden Lagerbedingungen

	22°C	4°C
CellTiter-Glo®	12 Stunden	3,5 Tage
CellTiter-Glo® 2.0	1 Woche	4 Monate



■ CellTiter-Glo® 2.0 Assay
● CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay

Aliquots der Reagenzien wurden bei unterschiedlichen Temperaturen gelagert und dann bei -80°C eingefroren. Nach dem Auftauen der Reagenzien und Zugabe von 2 µM ATP in Wasser (1:1) wurde die Lumineszenz gemessen.* Die 4°C Daten wurden durch eine Stabilitätsstudie bestätigt.

Ergebnisse mit verschiedenen Zelllinien und Medien

Medium	Zelltyp	Lumineszenz (RLU x 10 ⁶)		Signalhalbwertszeit (Stunden)	
		CellTiter-Glo® Reagent	CellTiter-Glo® 2.0 Reagent	CellTiter-Glo® Reagent	CellTiter-Glo® 2.0 Reagent
Memα	MCF7	4.06	6.40	7.30	4.81
	DU145	8.42	12.45	7.00	5.13
McCoy's 5A	U20S	5.98	9.27	7.14	5.07
F12	CHO	5.86	8.76	6.97	4.99
RPMI	HCT116	6.75	10.86	7.53	4.95
	Jurkat	12.80	21.10	7.41	5.33
	U397	13.51	20.86	7.07	5.33
DMEM	HEK293	6.21	10.07	7.27	4.83
	HeLa	5.80	9.01	7.02	4.88
	HepG2	6.52	10.34	7.27	4.83

10.000 Zellen wurden ausgesät und 24 Stunden inkubiert, das Medium 1:1 mit Reagenz gemischt und die Lumineszenz gemessen.

* 100.000 Suspensionszellen

CellTiter-Glo® 3D Viability Assay

Zellbasiert

Speziell entwickelt für 3D-Zellkulturen

Anwendung

Zellviabilität; Proliferation; Zytotoxizität in 3D-Mikrokulturen.

Assay-Beschreibung

Der CellTiter-Glo® 3D Viability Assay ist eine Weiterentwicklung des CellTiter-Glo® Assays zur Bestimmung der Zellviabilität speziell in 3D-Kulturen. Dreidimensionale und hoch organisierte Mikrogewebe spiegeln die natürliche Umgebung von Zell- und Gewebeverbänden besser wider als traditionelle Monolayer-Zellkulturen. Stoffwechselprozesse, Transportvorgänge und das Zusammenspiel von Signalnetzwerken können erst in ihrer organotypischen Mikroumgebung realistisch untersucht werden. Der CellTiter-Glo® 3D ist ein biolumineszenter ATP-Detektionsassay mit großer lytischer Stärke und vollständiger ATP-Freisetzung durch Optimierung von Reagenz und Protokoll. Er besteht aus nur einem Reagenz und kann für eine Reihe von 3D-Zellkulturmodellen angewendet werden, wie ECM-unabhängige (z.B. Hanging-Drop), ECM-abhängige (z.B. Matrigel™) und synthetische Gerüstsubstanzen (z.B. Alvetex™).

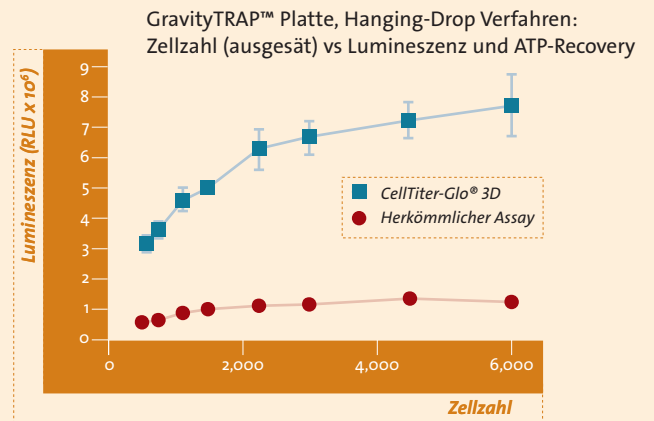
Assay-Prinzip

Das Assay-Prinzip entspricht dem des CellTiter-Glo®, wobei es sich bei diesem Assay um ein Einkomponenten-Reagenz mit einem verlängerten Lyseprotokoll handelt. Nach Zugabe des Reagenzes und einer Inkubation von insgesamt 30 Minuten lässt sich ein stabiles Lumineszenzsignal mit einer Halbwertszeit von > 4 Stunden messen.

Assay-Merkmale

Assay-Typ	Lumineszent (Glow-Type; $T_{1/2}$ > 4 Stunden)
Marker	ATP
Anwendung	Zellviabilität, Proliferation, Zytotoxizität in 3D-Zellkulturen
3D-Zellkulturen	Hanging-Drop-Mikrogewebe, Matrigel™, Alvetex™, Kollagen-Matrix
Durchführung	Homogen, 1-Schritt-Assay mit verbesserten Lyseprotokoll
Zeitbedarf	30 Minuten

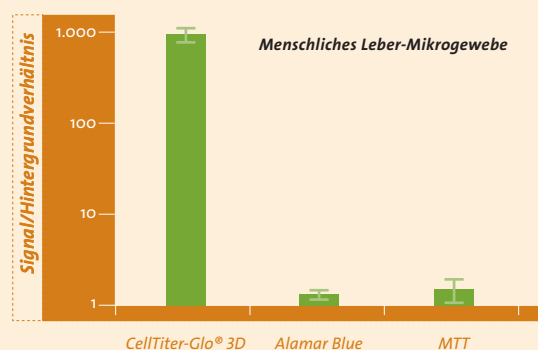
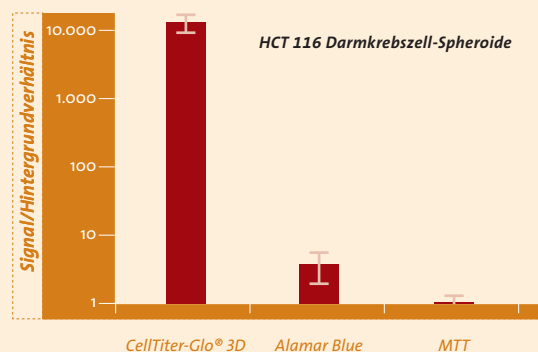
Anwendung des CellTiter-Glo® 3D Viability Assays bei 3D-Mikrokulturen



Zellzahl	Durchmesser (µm)	ATP (nM)	
		CellTiter-Glo® 3D	Herkömmlicher Assay
6,000	716	1,327	290
2,250	533	1,079	262
1,125	468	799	206
563	355	539	134

HCT 116-Zellen (RPMI + 10% FBS) wurden mittels der Hanging Drop Methode für 4 Tage zu einer Mikrokultur herangezogen (Gravity-TRAP™ Platte, InSphero).

Vergleich des Signal/Hintergrundverhältnisses mit anderen Zellviabilitätsassays



Vergleich der Sensitivität verschiedener Viabilitätsassays an 3D-Mikrogewebe. 400 HCT 116 Darmkrebszellen wurden in 96-Well GravityPlus™ Hanging-Drop-Platten (InSphero AG) ausgesät und für 4 Tage inkubiert. Die Zellviabilität der Spheroiden mit einem Durchmesser von ~ 340 µm wurde nach Herstellerangaben bestimmt. Der Zeitbedarf zur Durchführung der Assays lag für den CellTiter-Glo® 3D Assay bei 30 Minuten, für AlamarBlue® bei 3 Stunden und für MTT Assays bei 8 Stunden. Dasselbe Protokoll wurde für menschliches Leber-Mikrogewebe mit einem Durchmesser von ~ 200 µm angewendet.

CellTiter 96® AQ_{ueous} One Solution Cell Proliferation Assay (MTS)

Zellbasiert

Anwendung

Zellviabilität; Proliferation; Zytotoxizität.

Assay-Beschreibung

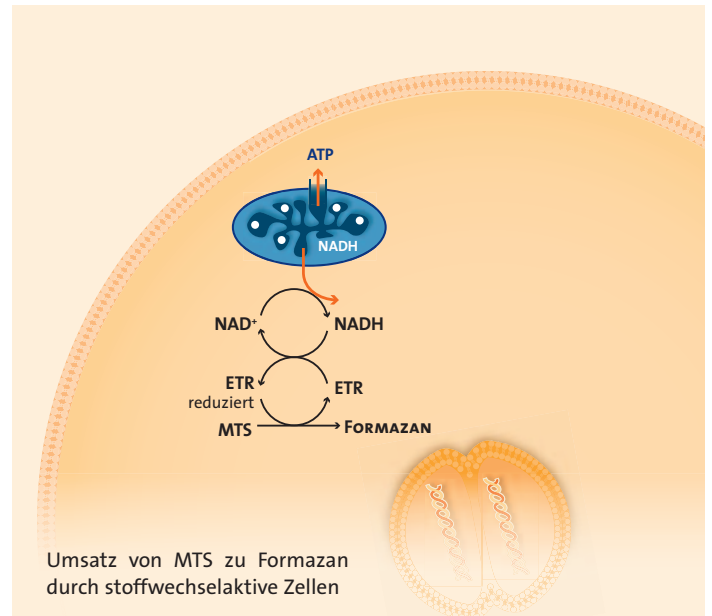
Der CellTiter 96® AQ_{ueous} One Solution Assay (MTS) beruht auf einer colorimetrischen Methode zur Bestimmung der lebenden Zellen und ist geeignet für Zellviabilitäts-, Proliferations- und indirekt auch Zytotoxizitätsmessungen. Dieser 1-Schritt-Assay hat gegenüber MTT-Assays den Vorteil, dass das MTS-Formazan-Produkt wasserlöslich ist. Somit entfallen Extraktionsschritte mit organischen Lösungsmitteln. Im Gegensatz zu herkömmlichen colorimetrischen Assays kann der MTS-Assay auch für Blutlymphozyten verwendet werden. Desweiteren besitzt das Assay-Reagenz eine erhöhte Lagerungsstabilität bei 4°C im Vergleich zu herkömmlichen Reagenzien.

Assay-Prinzip

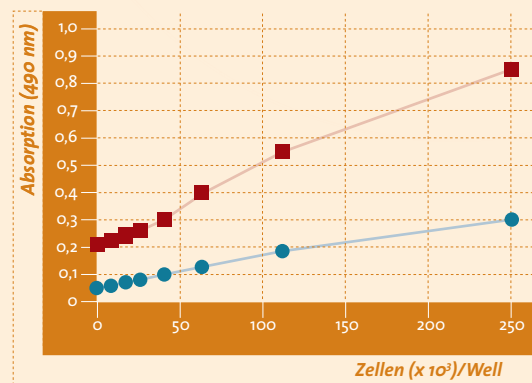
Der Nachweis der Zellviabilität mittels MTS beruht auf der Reduktion des Tetrazoliumsalses MTS zu wasserlöslichem Formazan durch stoffwechselaktive Zellen. Das Assay-Reagenz enthält zusätzlich ein Elektronen-Transfer-Reagenz (ETR), das Phenazinethosulfat (PES). PES wird intrazellulär durch Reduktionsäquivalente wie z.B. NADH oder NADPH reduziert und führt außerhalb der Zelle zur Reduktion von MTS in das farbintensive Formazan. Die Absorption des Formazans bei 490 nm kann ohne zusätzliche Behandlungsschritte direkt in der 96-Well-Platte gemessen werden. Der Readout ist direkt proportional zur Anzahl lebender Zellen in Kultur.

Assay-Merkmale

Assay-Typ	Absorptionsassay (Abs 490 nm +/- 40 nm)
Marker	Reduktionsäquivalente wie z.B. NADH/NADPH
Anwendung	Zellviabilität, Proliferation, Zytotoxizität
Zelltyp	Zelllinien, Pflanzen, Hefen, Blutlymphozyten
Durchführung	Homogen, 1-Schritt-Assay
Zeitbedarf	1–4 Stunden
Sensitivität	1000 lebende Zellen (96-Well)



Vergleich zwischen MTT- und MTS-Assay



■ MTS
● MTT

Bestimmung der Zellviabilität von PBMCs (Periphere mononukleäre Blutzellen) in einer 96-Well-Platte mit MTT bzw. MTS. Der MTS-Assay zeigt bei gleicher Zellzahl deutlich höhere Absorptionswerte als der MTT-Assay.

Abkürzungen:

MTS: 3-(4,5-Dimethyl-2-yl)-5-(3-Carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfofenyl)-Tetrazol

PES: Phenazinethosulfat

MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbrom

CellTiter-Blue® Cell Viability Assay

Zellbasiert

Anwendung

Zellviabilität; Proliferation; Zytotoxizität; Multiplexing.

Assay-Beschreibung

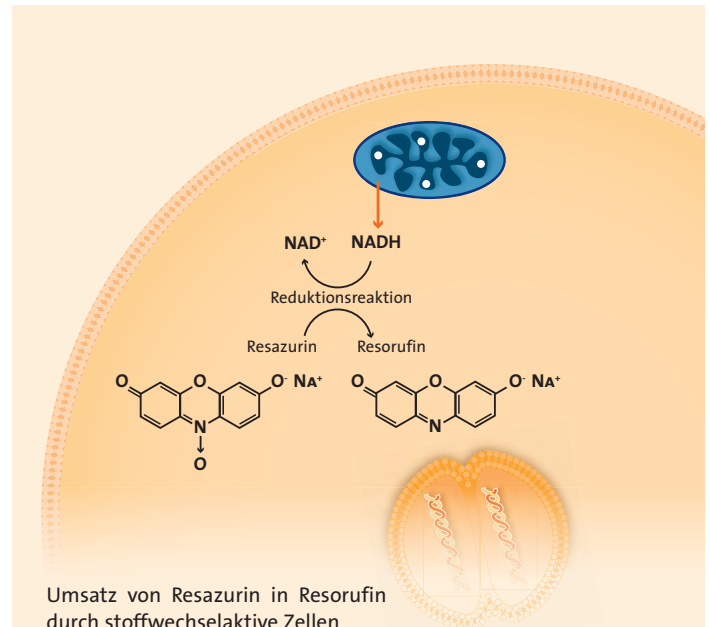
Der **CellTiter-Blue® Assay** ist ein fluoreszenter zellbasierter Assay für die Bestimmung der Zellviabilität, Proliferation und Zytotoxizität. Im Gegensatz zu vergleichbaren Assays ist das Assay-Reagenz Resazurin hochrein und nicht toxisch für die Zellen, so dass flexible Inkubationszeiten möglich sind. Kombinationen mit weiteren zellbasierten Assays können mit denselben Zellen durchgeführt werden (z.B. Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay).

Assay-Prinzip

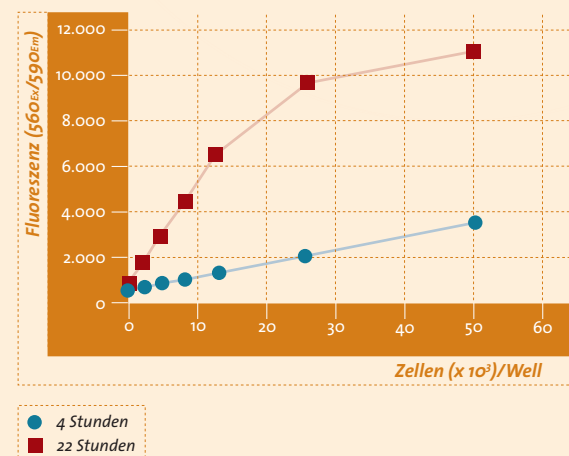
Der Nachweis der Zellviabilität beruht auf dem blauen Indikator-Farbstoff Resazurin, der intrazellulär durch stoffwechselaktive Zellen in das rosafarbene, fluoreszierende Resorufin umgesetzt wird. Das Assay-Reagenz wird direkt ins Medium gegeben. Die Bildung des Resorufins kann entweder im Fluorometer (empfohlene Methode $560_{\text{ex}}/590_{\text{em}}$) oder im Spektrophotometer (ELISA-Reader, 570 nm) detektiert werden.

Assay-Merkmale

Assay-Typ	Fluoreszent ($560_{\text{ex}}/590_{\text{em}}$)
Marker	Reduktionsäquivalente wie z.B. NADH
Anwendung	Zellviabilität, Proliferation, Zytotoxizität, Multiplexing
Zelltyp	Zelllinien (adhärent oder in Suspension)
Durchführung	Homogen, 1-Schritt-Assay
Zeitbedarf	1–4 Stunden (Inkubation bis zu 22 Stunden möglich)
Sensitivität	400 lebende Zellen (96-Well)
Robust	Hoher Z'-Faktor



Flexible Inkubationszeiten



Jurkat Zellen wurden in einer 96-Well-Platte ausgesät und über 4 Stunden bzw. 22 Stunden mit dem CellTiter-Blue® Assay inkubiert. Nach 4 Stunden liegt die Sensitivität bei 400 Zellen/Well und das Signal verhält sich über den gesamten Messbereich linear zur Zellzahl. Bei einer verlängerten Inkubation von 22 Stunden erhöht sich die Nachweisgrenze auf etwa 50 Zellen/Well; allerdings verhält sich der Assay bei einer Zellzahl von über 12.500 Zellen/Well nicht mehr linear.

CellTiter-Fluor™ Cell Viability Assay

Zellbasiert

Anwendung

Zellviabilität; Zytotoxizität; Multiplexing mit anderen zellbasierten Assays.

Assay-Beschreibung

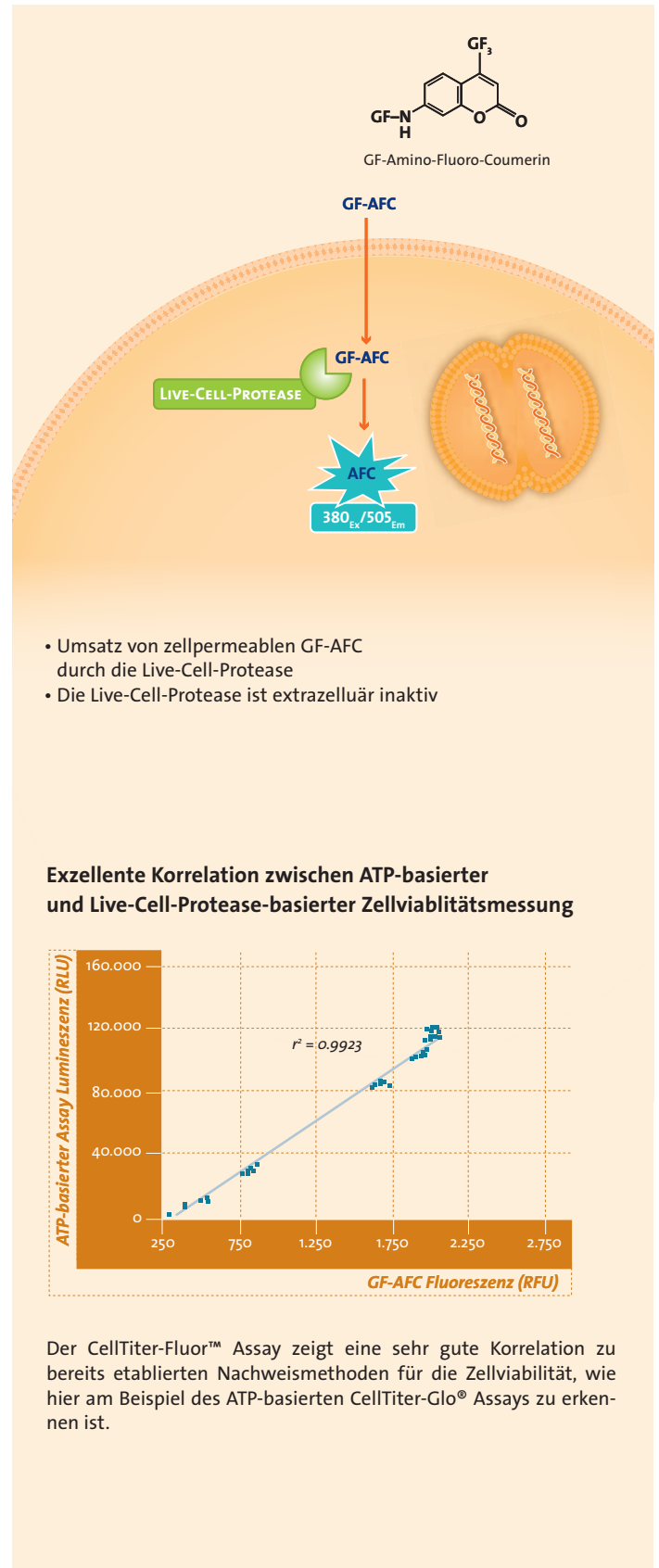
Der **CellTiter-Fluor™ Assay** ist ein fluoreszenter zellbasierter Assay für die Bestimmung der Zellviabilität. Der Assay eignet sich besonders für das Multiplexing, da die Zellen intakt bleiben. Der Assay wird häufig für die Normalisierung von Daten eingesetzt, d.h. um Unterschiede zwischen einzelnen Wells und Platten auszugleichen. Außerdem eignet sich der **CellTiter-Fluor™ Assay** sehr gut für die Automatisierung.

Assay-Prinzip

Der Assay basiert auf der Messung einer konservierten und konstitutiven Protease-Aktivität, der sogenannten Live-Cell-Protease, die nur in lebenden Zellen aktiv ist. Die Aktivitätsmessung erfolgt über das pro-fluorogene, zellpermeable Peptidsubstrat Gly-Phe-Aminofluorocoumarin (GF-AFC), das intrazellulär zu dem fluoreszierenden Produkt AFC umgesetzt wird. Das entstehende Fluoreszenz-Signal ist proportional zur Zellviabilität und korreliert mit anderen Zellviabilitätsmessungen, wie der Messung von ATP oder Reduktionsäquivalenten.

Assay-Merkmale

Assay-Typ	Fluoreszent (380–400 _{Ex} /505 _{Em})
Marker	Live-Cell-Protease
Anwendung	Zellviabilität, Zytotoxizität, Multiplexing mit anderen zellbasierten Assays
Zelltyp	Zelllinien (adhärent oder in Suspension)
Durchführung	Homogen, 1-Schritt-Assay
Zeitbedarf	0,5–3 Stunden
Sensitivität	40 lebende Zellen (96-Well)



BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay

Zellbasiert

Anwendung

Viabilität von Gram-positiven & Gram-negativen Bakterien & Hefen; einfache Bestimmung von Wachstumskurven; Aktivitätsbestimmung und Screening antimikrobieller Substanzen.

Assay-Beschreibung

Der BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay ist ein lumineszenter Assay für die Bestimmung der Viabilität von Bakterien in Kultur durch Messung des ATP-Gehalts. Dieser einzigartige 1-Schritt-Assay ist geeignet für den Hochdurchsatz. Er zeichnet sich durch eine äußerst hohe Sensitivität und einen breiten linearen Messbereich aus. Der Assay ist kompatibel mit gängigen Medien und Lösungsmitteln.

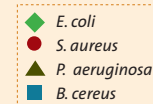
Assay-Prinzip

Der Assay basiert auf der Messung des ATP-Gehalts und korreliert somit mit metabolisch-aktiven Zellen. Die Formulierung des Assay-Reagenz führt zur Lyse der Bakterien. Dadurch wird ATP freigesetzt und über eine ATP-abhängige Luciferase-Reaktion bestimmt. Bereits nach 5-minütiger Inkubationszeit mit dem Assay-Reagenz können die Signale ausgelesen werden.

Assay-Merkmale

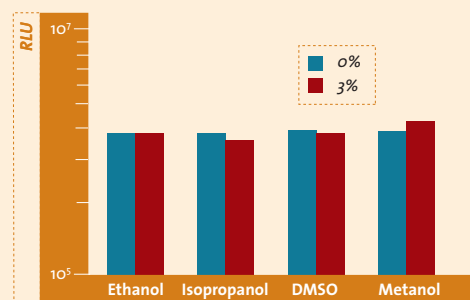
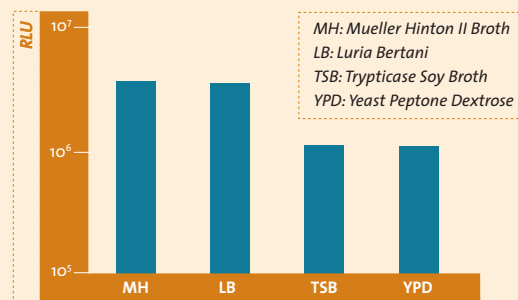
Assay-Typ	Lumineszent (Glow-Type; $T_{1/2} > 0,5$ h)
Marker	ATP
Anwendung	Viabilitätsmessung von Bakterien & Hefen
Bakterien/Hefe	Gram-positive Bakterien, Gram-negative Bakterien, Hefen
Durchführung	Homogen, 1-Schritt-Assay
Zeitbedarf	5 Minuten
Sensitivität	10 Bakterien (1.000-fach sensitiver als die Messung der optischen Dichte)
Robust	Hoher Z'-Faktor

Ausgezeichnete Sensitivität und Linearität



Korrelation zwischen Bakterienanzahl und Lumineszenzsignal. Es können bis zu 10 Zellen in Abhängigkeit des Bakterienstamms nachgewiesen werden.

BacTiter-Glo™-Assay ist kompatibel mit gängigen Medien und Lösungsmitteln



Die Kompatibilität des BacTiter-Glo™-Assays wurde in unterschiedlichen Medien und gegenüber verschiedenen Lösungsmittelzusätzen mit $\sim 1 \times 10^{-12}$ mol ATP getestet.

Iib Zytotoxizität

Der Begriff der Zytotoxizität steht für das Potenzial bzw. die Aktivität, Gewebezellen zu schädigen und den Zelltod einzuleiten. Dafür kommen unter anderem sowohl chemische und biologische Verbindungen als auch Immunzellen (z.B. zytotoxische T-Zellen) in Frage. Zytotoxische Aktivität führt zu einer Reduktion der Zellviabilität und leitet den Zelltod über Nekrose und/oder Apoptose ein. Häufig werden auch Zellviabilitätsassays eingesetzt, um das zytotoxische Potenzial von beispielsweise einer Substanz nachzuweisen. Möchte man allerdings zwischen nekrotischen und apoptotischen Prozessen unterscheiden, sind weitere Assays erforderlich, die auf dem Nachweis anderer Marker beruhen.

Die Nekrose wird durch Zellmembranintegritätstests gemessen. Der zeitlich schnell ablaufende Verlust der Zellmembranintegrität und die Freisetzung zytoplasmatischer Bestandteile sind typische Kennzeichen für Nekrose. Im Gegensatz dazu, bleibt bei der Apoptose die Membranintegrität erhalten und diese Zellen werden *in vivo* durch Phagozyten beseitigt. Bei der Interpretation von Datensätzen ist stets zu beachten, dass Phagozyten in der Zellkultur fehlen, und dass auch apoptotische Zellen ihre Membranintegrität verlieren. Der Verlust der

Membranintegrität bei apoptotischen Zellen wird als sekundäre Nekrose bezeichnet und findet zu einem späteren Zeitpunkt statt als bei der zeitlich schnell ablaufenden primären Nekrose. Daher ist die Wahl der optimalen Kultivierungsdauer entscheidend und sollte durch Messung zu verschiedenen Zeitpunkten ermittelt werden. In Abhängigkeit von der Substanz und der Konzentration sind teilweise gemischte Phänomene zu beobachten, d.h. der Zelltod verläuft über nekrotische und apoptotische Anteile.

Die hier im Folgenden beschriebenen Zytotoxizitätsassays basieren auf dem Nachweis von zytosolischen Enzymen (Lactat-Dehydrogenase (LDH); Dead-Cell-Protease) und DNA, die in Folge von Membranschäden in das Kulturmedium abgegeben wurden. Ein ATP-basierender Assay bestimmt den zytopathischen Effekt von lytischen Viren in Zellen.

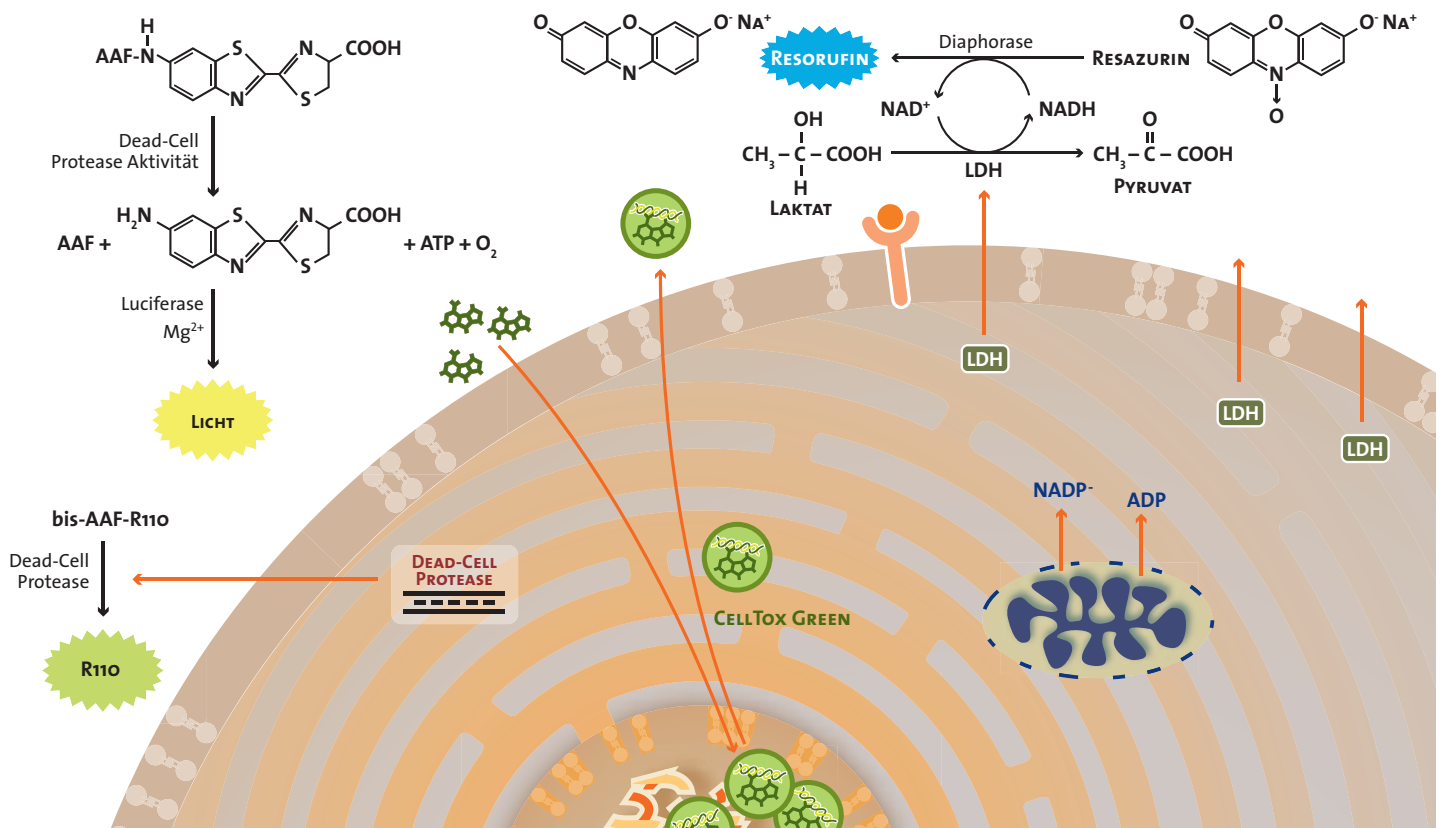
CellTox™ Green Cytotoxicity Assay

CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay

CytoTox-Fluor™ Cytotoxicity Assay

CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay (LDH)

ViralTox-Glo™ Assay



CellTox™ Green Cytotoxicity Assay

Zellbasiert

Anwendung

Nachweis von Zytotoxizität und Membranschäden; kinetische Studien; Multiplexing mit anderen Assays.

Assay-Beschreibung

Der CellTox™ Green Cytotoxicity Assay misst zytotoxische Effekte in Zellkulturen mittels eines fluoreszenten DNA-Markers. Der CellTox™ Green Fluoreszenzfarbstoff ist für mindestens 72 Stunden stabil, nicht toxisch und flexibel einsetzbar. Möglich sind sowohl kinetische Studien als auch Endpunkt-Bestimmungen im Add-Mix-Measure-Format. Besonders geeignet ist dieser Assay für Wirkstoffstudien mit langen Expositionszeiten (bis zu 72 Stunden) im Hochdurchsatzverfahren (96- bis 1536-Well Format). Sequenzielles oder simultanes Multiplexing erweitern die flexiblen Einsatzmöglichkeiten.

Assay-Prinzip

Der Nachweis der Zytotoxizität durch DNA ist besonders zuverlässig, da er nicht von enzymatischen Reaktionen abhängt. Der CellTox™ Green Fluoreszenzfarbstoff ist nicht membrangängig. Er bindet an die DNA toter Zellen, die nach Verlust der Membrantintegrität freigesetzt wird, was zu einer starken Zunahme der Fluoreszenz führt. Lebende intakte Zellen tragen nicht zum Signal bei. Somit ist das Fluoreszenzsignal direkt proportional zur Zytotoxizität.

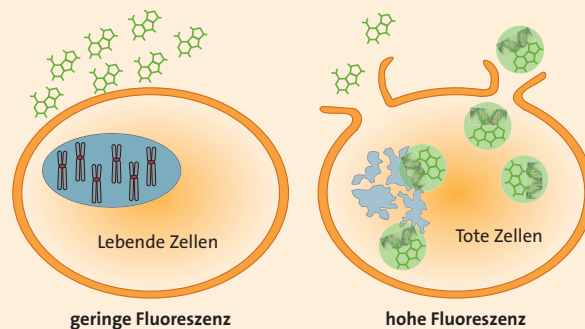
Der CellTox™ Green Farbstoff kann jederzeit zugegeben werden, z.B. während des An- oder Umsetzens der Zellen, des Mediumwechsels oder mit der Wirkstofflösung.

Assay-Merkmale

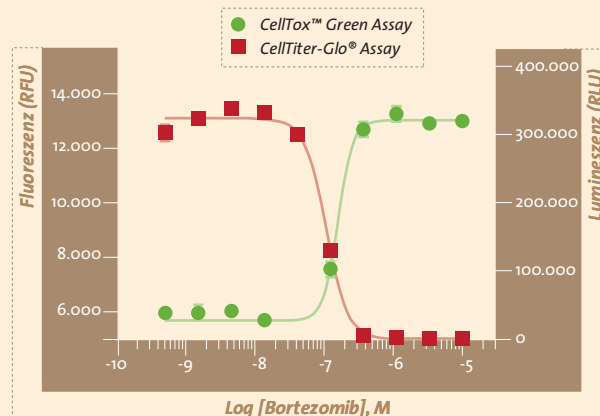
Assay-Typ	Stabiles Fluoreszenzsignal für 72 Stunden (485–500 _{Ex} /520–530 _{Em})
Marker	DNA
Anwendung	Zytotoxizität, Membrantintegrität, kinetische Studien, Multiplexing mit anderen Assays
Zelltyp	Zelllinien
Durchführung	Endpunktbestimmung oder No-step Express-Protokoll (Zugabe beim Aussäen oder direkt in Wirkstofflösung)
Zeitbedarf	15 Minuten Inkubation



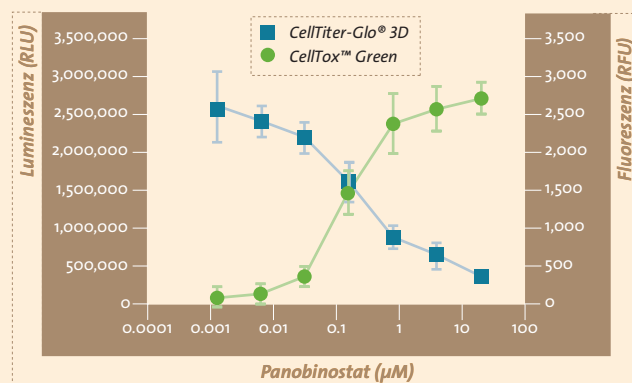
Freigesetzte DNA – ein stabiler Biomarker für die Zytotoxizität



Sequentielles oder simultanes Multiplexing mit CellTiter-Glo®



Multiplexing mit CellTiter-Glo® 3D



HCT 116 Zellen wurden in InSphero GravityPLUS™ 3D Zellkulturplatten 4 Tage kultiviert, um ein Mikrogewebe von 350 µm Dicke zu bilden. Die Ansätze wurden mit CellTox™ Green und Panobinostat für 48 Stunden behandelt. Nach Messung der Fluoreszenz wurde ein gleiches Volumen an CellTiter-Glo® 3D hinzugegeben, die Platten für 5 Minuten geschüttelt und nach einer Inkubation von 30 Minuten die Lumineszenz gemessen.

CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay

Zellbasiert

Anwendung

Zytotoxizität; Membranschäden; Multiplexing mit anderen Assays.

Assay-Beschreibung

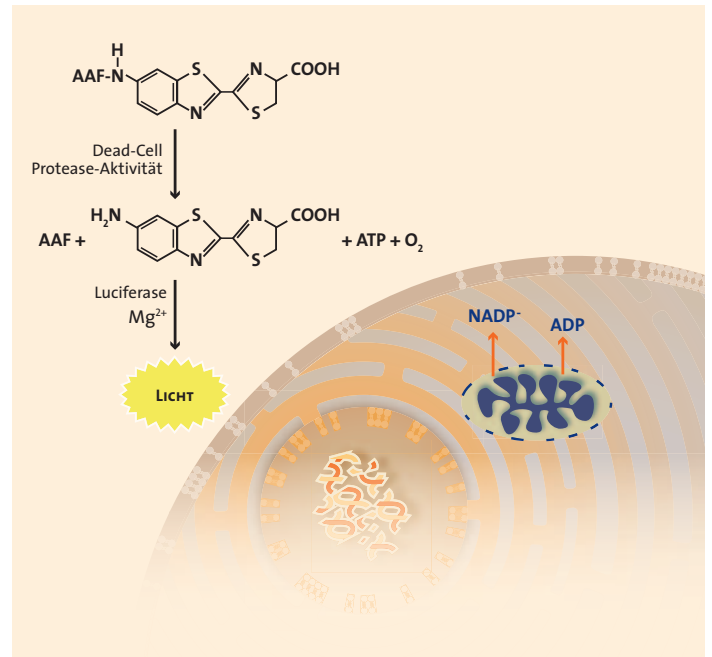
Der **CytoTox-Glo™ Assay** ist ein lumineszenter zellbasierter Assay für die Bestimmung der Zytotoxizität. Der Assay ist besonders für das Multiplexing geeignet, da die Zellen intakt bleiben. Er wird auch für die Normalisierung von Daten eingesetzt, d.h. um Unterschiede zwischen einzelnen Wells und Platten auszugleichen. Der CytoTox-Glo™ Assay korreliert sehr gut mit anderen Zytotoxizitätsmessungen wie LDH-Nachweis und DNA-Färbung.

Assay-Prinzip

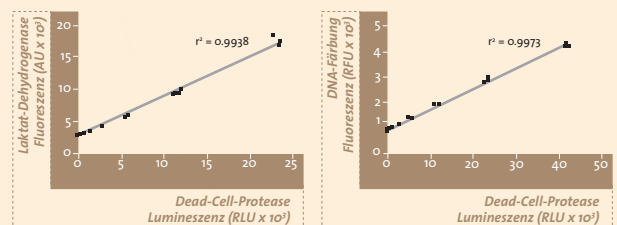
Das Prinzip des **CytoTox-Glo™ Assays** basiert auf der Aktivitätsmessung der Dead-Cell-Protease, die in Folge von Zellmembranschäden ins Medium freigesetzt wird. Über ein luminogenes Peptidsubstrat Ala-Ala-Phe-Aminoluciferin (AAF-Aminoluciferin), das nicht die Zellmembran passieren kann, wird die Aktivität der Dead-Cell-Protease indirekt über eine nachgeschaltete Luciferase-Reaktion gemessen. Das Reagenz wird direkt zu den Zellen gegeben. Bereits nach 15 Minuten kann der Assay ausgelesen werden. Das Lumineszenzsignal ist ein Maß für die Anzahl geschädigter Zellen. Durch Zugabe eines lytischen Reagenzes kann in einem weiteren Schritt zusätzlich ein Wert für die Gesamtzellzahl ermittelt werden (totale Lyse). Dieser Wert eignet sich zur Normalisierung.

Assay-Merkmale

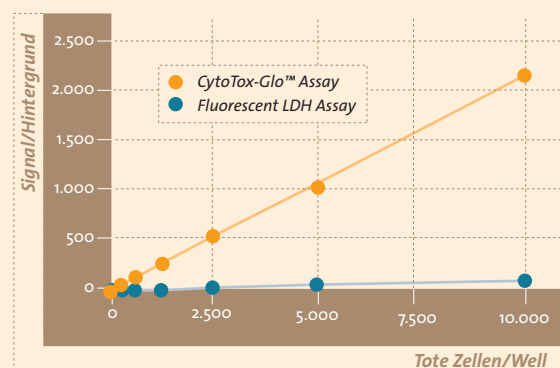
Assay-Typ	Lumineszent (Glow-Type)
Marker	Dead-Cell-Protease
Anwendung	Zytotoxizität, Membranintegrität, Multiplexing mit anderen zellbasierten Assays
Zelltyp	Zelllinien
Durchführung	Homogen, 1-Schritt-Assay
Zeitbedarf	15 Minuten
Sensitivität	10 tote Zellen (96-Well)



Der CytoTox-Glo™ Assay korreliert sehr gut mit etablierten Methoden zur Bestimmung der Membranintegrität



Vergleich zwischen LDH- und CytoTox-Glo™ Assay



Höhere Sensitivität und größerer Messbereich mit CytoTox-Glo™

CytoTox-Fluor™ Cytotoxicity Assay

Zellbasiert

Anwendung

Zytotoxizität; Membranschäden; Multiplexing mit anderen Assays.

Assay-Beschreibung

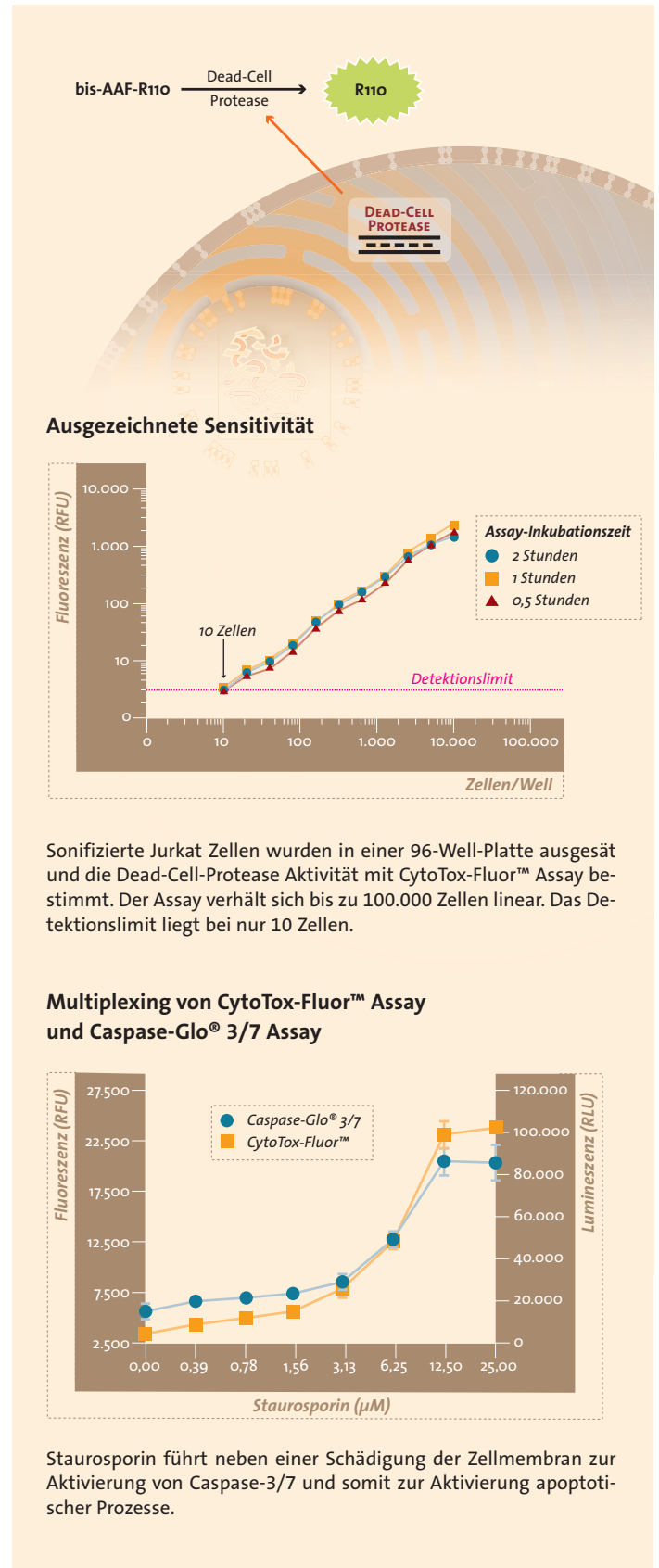
Der **CytoTox-Fluor™ Assay** ist ein fluoreszenter Assay zur Bestimmung von Zytotoxizität. Er misst den Anteil toter Zellen in einer Zellkulturprobe. Dieser Assay wird häufig für das Multiplexing eingesetzt und ist Bestandteil folgender Multiplexing Assays: MultiTox-Fluor-Assay, ApoTox-Glo™-Triplex Assay, Mitochondrial ToxGlo™ Assay.

Assay-Prinzip

Der Assay basiert auf dem Nachweis der Dead-Cell-Protease, die in Folge von Membranschäden freigesetzt wird. Der fluorige zellimpermeable Farbstoff bis-Ala-Ala-Phe-Rhodamin-110 (bis-AAF-R110) wird von der Dead-Cell-Protease spezifisch erkannt und zu fluoreszente Rhodamin-110 umgesetzt. Das gemessene Fluoreszenz-Signal ist ein Maß für die Anzahl geschädigter Zellen in Kultur. Das Fluoreszenz-Signal kann 0,5–3 Stunden nach Zugabe des Assay-Reagenzes ausgelesen werden.

Assay-Merkmale

Assay-Typ	Fluoreszent (485 _{Ex} /520 _{Em})
Marker	Dead-Cell-Protease
Anwendung	Zytotoxizität, Multiplexing mit anderen zellbasierten Assays
Zelltyp	Zelllinien
Durchführung	Homogen, 1-Schritt-Assay
Zeitbedarf	0,5 – 3 Stunden
Sensitivität	10 tote Zellen (96-Well)



Sonifizierte Jurkat Zellen wurden in einer 96-Well-Platte ausgesät und die Dead-Cell-Protease Aktivität mit CytoTox-Fluor™ Assay bestimmt. Der Assay verhält sich bis zu 100.000 Zellen linear. Das Detektionslimit liegt bei nur 10 Zellen.

Staurosporin führt neben einer Schädigung der Zellmembran zur Aktivierung von Caspase-3/7 und somit zur Aktivierung apoptotischer Prozesse.

CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay (LDH)

Zellbasiert

Anwendung

Zytotoxizität; Membranschäden; Multiplexing mit anderen Assays.

Assay-Beschreibung

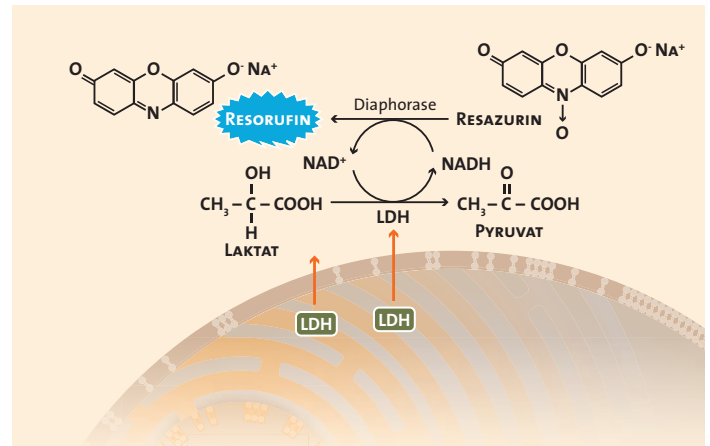
Mit dem **CytoTox-ONE™ Assay** können sowohl die zytotoxische Wirkung von Substanzen auf zelluläre Systeme als auch die zellvermittelte Zytotoxizität (z.B. Immunantwort) gemessen werden. Bei einer Schädigung der Zellen durch diese Prozesse verliert die Zellmembran ihre Integrität, und es gelangen u. a. zytosolische Proteine, wie z. B. die Laktatdehydrogenase (LDH) in den extrazellulären Raum. Dieser Assay kann im gleichen Versuchsansatz mit anderen Assays wie z. B. CellTiter-Glo®-Assay oder Apo-ONE®-Caspase-3/7-Assay kombiniert werden.

Assay-Prinzip

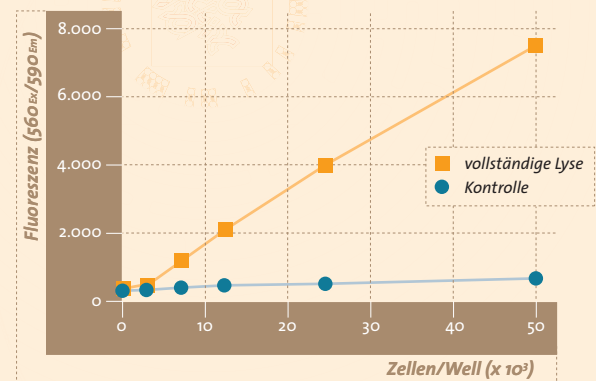
Als Maß für die Zellschädigung wird die Aktivität der LDH in einer gekoppelten enzymatischen Reaktion gemessen. Das Assay-Reagenz enthält Laktat, NAD^+ , Resazurin und das Enzym Diaphorase. Im ersten Schritt wird Laktat zu Pyruvat durch die LDH oxidiert. Dabei werden zunächst die Reduktionsäquivalente auf NAD^+ und im zweiten Schritt mit Hilfe der Diaphorase auf den fluorogenen Farbstoff Resorufin übertragen. Das Fluoreszenz-Signal des entstandenen Resorufins ist proportional zur Menge an freigesetzter LDH und damit zur Anzahl geschädigter Zellen.

Assay-Merkmale

Assay-Typ	Fluoreszent (560 _{Ex} /590 _{Em})
Marker	LDH
Anwendung	Zytotoxizität; Multiplexing
Zelltyp	Zelllinien
Durchführung	Homogen, 2-Schritt-Assay
Zeitbedarf	10 Minuten
Sensitivität	200 tote Zellen (96-Well)

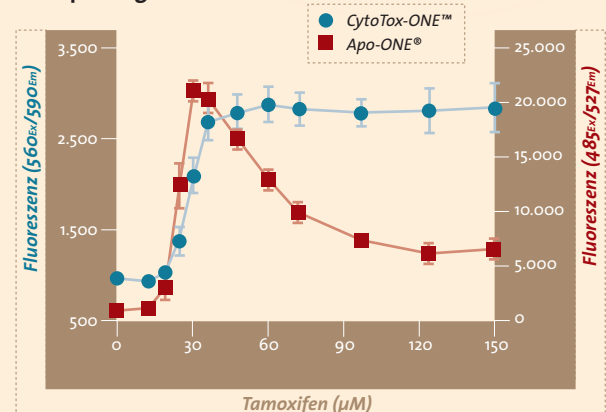


Sensitivität und Linearität des CytoTox-ONE™ Assays



Nach Behandlung von L929 Zellen mit Triton X-100 (vollständige Lyse) bzw. mit PBS (Kontrolle) wurde das CytoTox-One™ Reagenz zugegeben. Die Reaktion wurde nach 10 Minuten gestoppt und die Absorption im Fluorometer gemessen.

Multiplexing



Bestimmung der Membranintegrität und Caspase-Aktivierung an einer Probe nach Behandlung von HepG2 Zellen mit Tamoxifen. In Abhängigkeit der Tamoxifen-Konzentration werden Apoptose bzw. Nekrose induziert.

Viral ToxGlo™ Assay

Zellbasiert

Anwendung

Bestimmung des zytopathischen Effekts (CPE) in Zellen, induziert durch eine lytische Virusinfektion.

Assay-Beschreibung

Der **Viral ToxGlo™ Assay** basiert auf der lumineszenten Messung von zellulärem ATP als Maß für die Zellviabilität der Wirtszelle. Tritt ein zytopathischer Effekt durch eine Infektion mit lytischen Viren auf, wird die Reduzierung von ATP im Vergleich zu unbehandelten Zellen in einer ATP-abhängigen Luciferase-Reaktion gemessen und in Korrelation zur Viruslast gesetzt. Viral ToxGlo™ kann für die beiden wichtigsten Quantifizierungsmethoden des zytopathischen Effekts von lytischen Viren eingesetzt werden: die Bestimmung des TCID₅₀ (Tissue culture infective dose), die Bestimmung der Wirksamkeit von antiviralen Substanzen sowie deren off-target-Zytotoxizität.

Assay-Prinzip

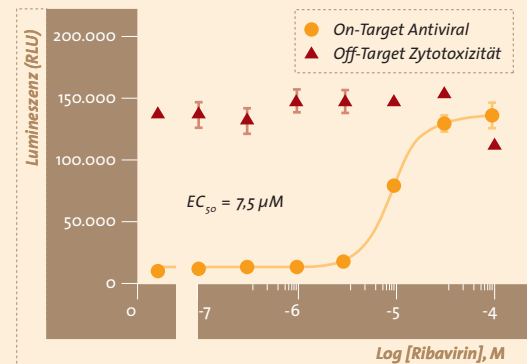
Bei dem Assay im homogenen „Add-Mix-Measure“-Format wird ein ATP-Detektionsreagenz nach einer viralen Behandlung direkt zu den Wirtszellen pipettiert. Das in der Luciferase-Reaktion entstandene Glow-Type-Lumineszenzsignal ist proportional zum ATP-Gehalt in den Zellen und zeichnet sich durch eine Halbwertszeit von mehr als 5 Stunden aus. Langwierige manuelle Schritte und eine visuelle Beurteilung sind für die Bewertung des CPE nicht notwendig. 10 Minuten nach Zugabe des Detektionsreagenzes kann der Assay bis zu 15 Zellen/Well im 384 Well-Format detektieren. Der Assay zeichnet sich durch ein hohes Signal/Hintergrundverhältnis aus und ergibt ausgezeichnete Z'-Werte im Screening.

Assay-Merkmale

Assay-Typ	Lumineszent (Halbwertszeit > 5 Stunden)
Marker	ATP
Anwendung	Bestimmung CPE, TCID ₅₀ , Wirksamkeit von antiviralen Substanzen und off-target Zytotoxizität.
Viren	Assay ist geeignet für lytische Viren, die einen zytopathischen Effekt erzeugen.
Durchführung	Homogener 1-Schritt-Assay
Zeitbedarf	10 Minuten
Sensitivität	15 lebende Zellen (384-Well)
Robust	HTS-geeignet. Skalierbar von 96–1536-Well-Format. Hoher Z'-Faktor

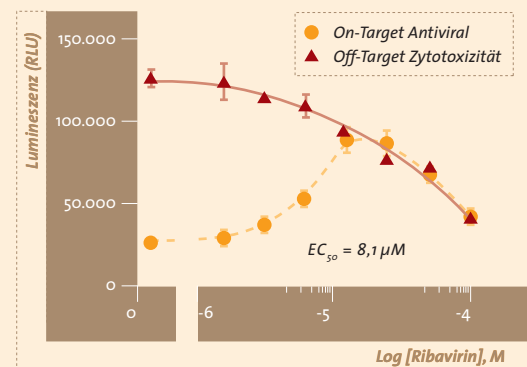
Bestimmung der Wirksamkeit der antiviralen Substanz Ribavirin

A.



Höhere Lumineszenz bedeutet antivirale Wirksamkeit der Testsubstanz.

B.



A. Verdünnungen von Ribavirin wurden entweder zu MDCK-Zellen, infiziert mit 100 TCID₅₀ H1N1 Virus (On-Target), oder zu nichtinfizierten MDCK-Zellen (Off-Target-Zytotoxizität) pipettiert.

B. Ribavirin wurde in zweifachen Schritten verdünnt und entweder zu BHK-21-Zellen, infiziert mit 100 TCID₅₀ Dengue-Virus (On-Target), oder zu nichtinfizierten BHK-21 Zellen (Off-Target) pipettiert.

Nach 72 und 96 Stunden Inkubation wurde das ATP Detection Reagenz zu den Zellen pipettiert und die Lumineszenz gemessen. In hohen Konzentrationen erzeugt Ribavirin keine Zytotoxizität bei nicht infizierten MDCK-Zellen, während BHK-21-Zellen eine Off-Target-Zytotoxizität zeigen.

Die Daten wurden von Southern Research Institut, Birmingham, AL zur Verfügung gestellt.

IIc Apoptose

Der „programmierte Zelltod“, die Apoptose, ist ein mehrstufiger Prozess zur Beseitigung körpereigener Zellen. Apoptose ist im Gegensatz zum Zelltod durch Nekrose ein physiologischer Vorgang, der durch äußere Faktoren (extrinsisch) oder zellinterne Einflüsse (intrinsisch) eingeleitet wird. Apoptotische Zellen schrumpfen und sind u.a. durch Aktivierung von Caspasen und Fragmentierung der DNA in Stücke mit charakteristischer Länge gekennzeichnet. Die Zellmembran bleibt bei diesen Vorgängen intakt. Durch Ausstülpung und Blasenbildung an der Zytoplasmamembran entstehen die sogenannten apoptotischen Körperchen, die von Makrophagen oder Nachbarzellen

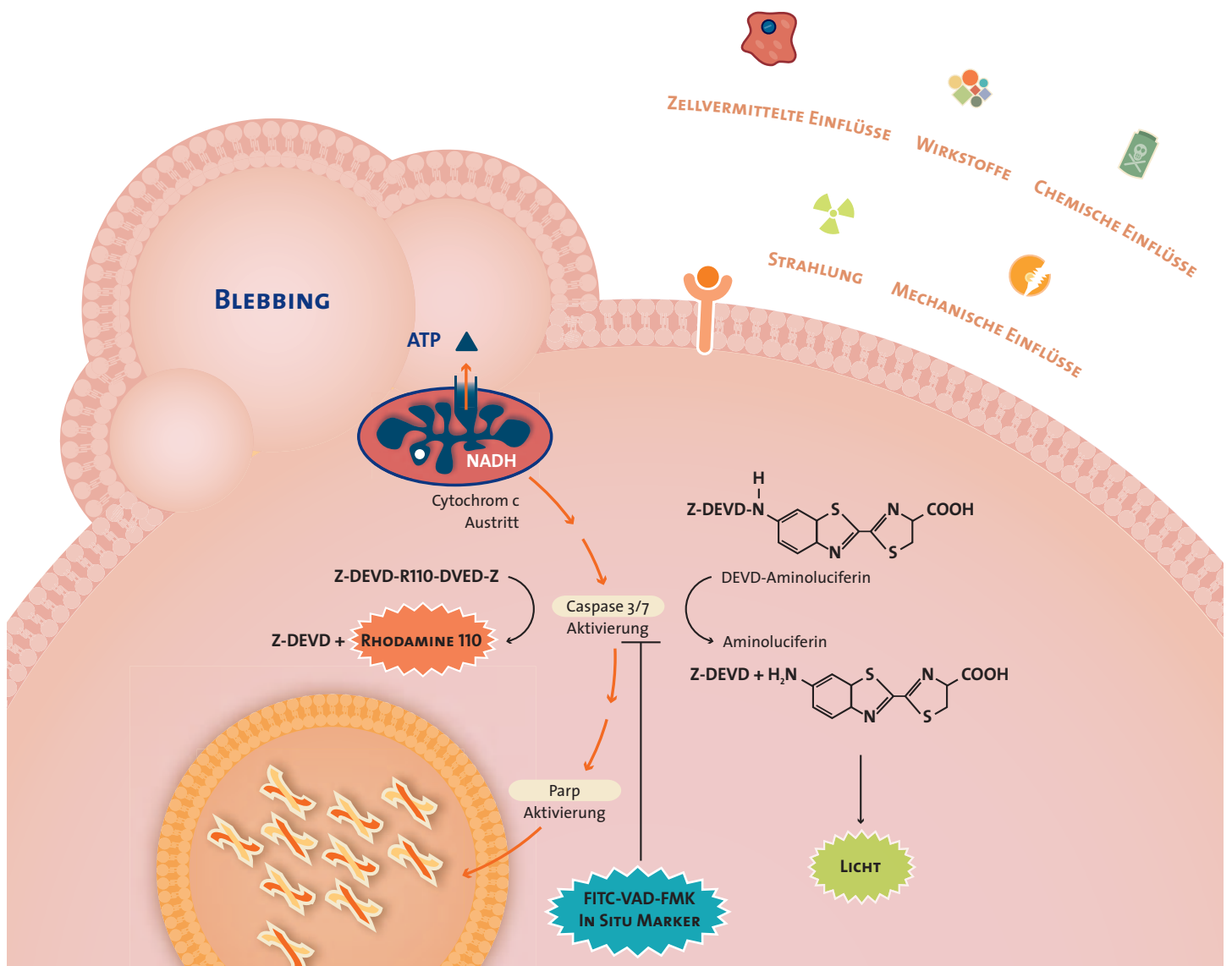
phagozytiert werden. Daher wird bei der Apoptose im Gegensatz zur Nekrose keine Entzündungsreaktion ausgelöst und Nachbarzellen bleiben intakt. Die Caspasen nehmen als Initiator- bzw. Effektorcaspasen in der Apoptose eine Schlüsselrolle ein. Durch ihren Nachweis lassen sich apoptotische Prozesse im Detail untersuchen.

Caspase -Assays im Überblick

Caspase-Glo® 3/7 Assay

Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay

CaspACE™ FITC-VAD-FMK in situ Marker



Caspase-Assays im Überblick

Caspasen nehmen bei der Apoptose eine Schlüsselrolle ein. Ihre Aktivierung erfolgt über verschiedene Signalwege, die zum Teil noch Gegenstand aktueller Forschung sind. Allgemein akzeptiert ist, dass die Aktivierung der Initiatorcaspase-8 über die Superfamilie der Todesrezeptoren verläuft. Caspase-8 aktiviert nachfolgend die Effektorcaspasen-3, -6 und -7, die ihrerseits zahlreiche zelluläre Proteinsubstrate spalten, wodurch letztlich

der Tod der Zelle bedingt wird. Der sogenannte intrinsische Apoptoseweg wird z.B. durch ultraviolettes Licht, virale Infektion oder Verletzung der Zellmembran ausgelöst. Als Folge davon wird Cytochrom c ins Zytosol freigesetzt. Diese Ereignisse aktivieren die Initiatorcaspase-9 und diese wiederum im nächsten Schritt die Effektorcaspasen-3, -6 und -7.

	Caspase	Biologische Relevanz	Assay-Bezeichnung	Assay-Substrat	Assay-Optimierung durch Zugabe von Inhibitoren
Initiatorcaspasen	Caspase-2*	Involviert bei stress-induzierter und TRAIL-vermittelter Apoptose.	Caspase-Glo® 2 Assay	Z-VDVAD-Aminoluciferin	<ul style="list-style-type: none"> • Caspase-3/7-Inhibitor (Ac-DEVD-CHO) • Proteasom-Inhibitor (MG-132)
	Caspase-8	Rezeptor-vermittelte Apoptose (aktiviert z. B. durch Fas-Ligand, TNF- α).	Caspase-Glo® 8 Assay	Z-LETD-Aminoluciferin	<ul style="list-style-type: none"> • Proteasom-Inhibitor (MG-132)
	Caspase-9	Durch oxidativen Stress, virale Infektion etc. werden die Mitochondrien geschädigt und Cyt c freigesetzt. Caspase-9 wird durch Bindung an Cyt c aktiviert.	Caspase-Glo® 9 Assay	Z-LEHD-Aminoluciferin	<ul style="list-style-type: none"> • Proteasom-Inhibitor (MG-132)
Effektorcaspasen	Caspase-3/7	Primäre Effektorcaspasen im Apoptoseweg. Die Aktivierung kann durch Caspase-8 oder Caspase-9 erfolgen. Löst Apoptose durch Proteolyse von anti-apoptischen Proteinen (ICAD, Bcl-2 Proteine, PARP etc.) aus.	Caspase-Glo® 3/7 Assay Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay	Z-DEVD-Aminoluciferin Z-DEVD-R110-DVED-Z	
	Caspase-6*	Spielt eine Rolle bei neurodegenerativen Krankheiten, z. B. Alzheimer oder Huntington.	Caspase-Glo® 6 Assay	Z-VEID-Aminoluciferin	<ul style="list-style-type: none"> • Caspase-3/7-Inhibitor (Ac-DEVD-CHO) • Proteasom-Inhibitor (MG-132)

Bemerkung:

* Caspase-Glo® 2- und Caspase-Glo® 6-Assay werden nur für den Aktivitätsnachweis von aufgereinigten Enzympräparationen empfohlen! Caspase-Glo® 3/7, 8, 9 Assays können direkt in Zellkultur oder mit aufgereinigten Enzympräparationen verwendet werden.

Die Funktionsweise einiger Assays kann durch Zugabe von Inhibitoren optimiert werden.

Nähere Informationen dazu erhalten Sie in der entsprechenden technischen Anleitung unter www.promega.com.

Caspase-Glo® 3/7 Assay

Zellbasiert/Biochemisch

Geeignet für
3D-Zellkulturen

Anwendung

Apoptose; Multiplexing mit anderen zellbasierten Assays; Inhibitorscreening.

Assay-Beschreibung

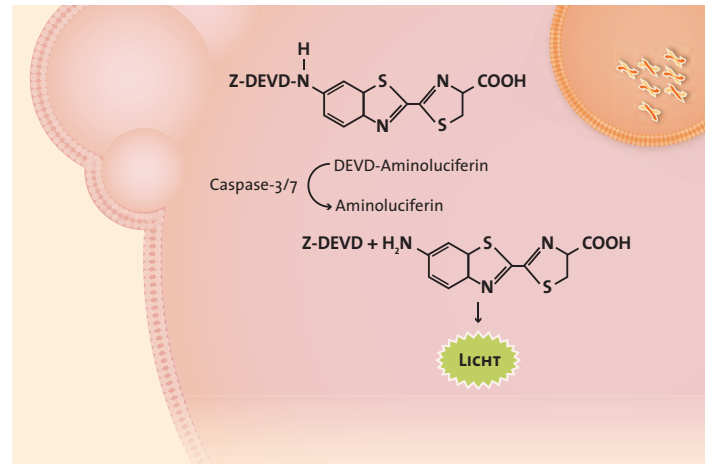
Der **Caspase-Glo® 3/7 Assay** ist ein äußerst sensitives Testsystem zur Bestimmung der Apoptose in Zellkultur oder auch von Enzympräparationen. Gemessen wird die Aktivität der Effektorcaspasen-3 und -7 durch Spaltung eines prolumineszenten Substrates. Es trägt das Tetrapeptid DEVD als Erkennungssequenz. Das Ergebnis ist ein Aktivitätsnachweis der Caspase-3 und -7 mit einem exzellenten Signal-Hintergrund-Verhältnis. Der Caspase-Glo® 3/7 Assay ist schnell und einfach durchzuführen. Er kann flexibel im gewünschten Format für Zellkulturen oder Enzympräparationen angewendet werden (Küvette, 6- bis 1536-Well).

Assay-Prinzip

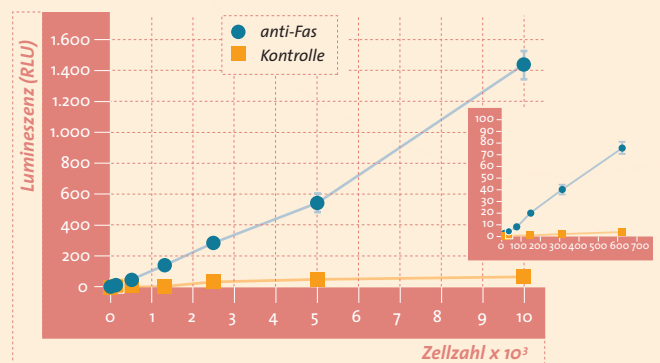
Der Assay basiert auf der Aktivitätsmessung der Caspasen-3/7 über das Tetrapeptid DEVD. Zwei enzymatische Schritte laufen bei diesem Nachweis unmittelbar hintereinander ab: Das Caspase-Glo® 3/7 Reagenz enthält ein Substrat für die Caspase-3 und -7 (Z-DEVD-Aminoluciferin), das gespalten wird und dabei Aminoluciferin freisetzt. Das Aminoluciferin dient als Substrat für die thermostabile und besonders robuste UltraGlo™ Luciferase, welche eine Luciferase-Reaktion mit verlängerter Halbwertszeit katalysiert (Glow-Type Luciferase-Reaktion).

Assay-Merkmale

Assay-Typ	Lumineszent (Glow-Type)
Marker	Caspase-3 und -7
Anwendung	Apoptose, Multiplexing mit anderen zellbasierten Assays
Zelltyp/Probe	Zelllinien, Primärzellen, Enzympräparationen
Durchführung	Homogen, 1-Schritt-Assay
Zeitbedarf	0,5–3 Stunden
Sensitivität	100 apoptotische Zellen (96-Well)
Robost	Hoher Z'-Faktor; exzellentes Signal-Hintergrund-Verhältnis

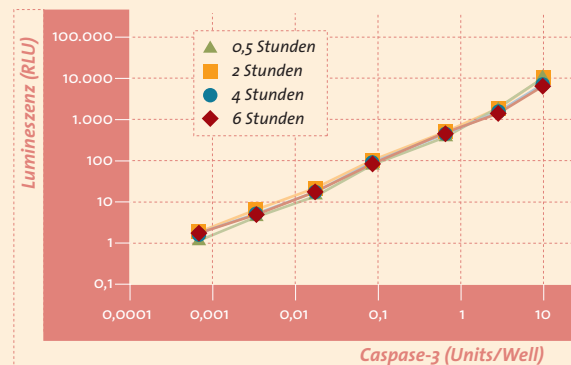


Breiter linearer Messbereich von 20 bis 10.000 Zellen



Jurkat Zellen wurden zur Induktion der Apoptose 4,5 Stunden mit anti-Fas mAb behandelt. Nach Zugabe des Caspase-Glo® 3/7 Assay-Reagenz zur 96-Well-Platte wurde das Signal nach 1 Stunde Inkubationszeit ausgelesen. In der Ausschnittvergrößerung sind die Werte für 0-625 Zellen dargestellt.

Hohe Stabilität des Lumineszenzsignals



Rekombinante Caspase-3 wurde im 96-Well-Format über 0,5–6 Stunden mit Caspase-Glo® 3/7 Assay Reagenz inkubiert. Das Lumineszenz-Signal ist für mehrere Stunden stabil. Der Assay verhält sich über mindestens fünf Größenordnungen linear.

Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay

Zellbasiert

Geeignet für
3D-Zellkulturen

Anwendung

Apoptose; Multiplexing mit anderen zellbasierten Assays;
Inhibitorscreening.

Assay-Beschreibung

Der Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay ist ein fluoreszenter zellbasierter Assay zur Bestimmung der Aktivität der Caspase-3 und Caspase-7. Dieser Assay ist auch für das Multiplexing geeignet.

Assay-Prinzip

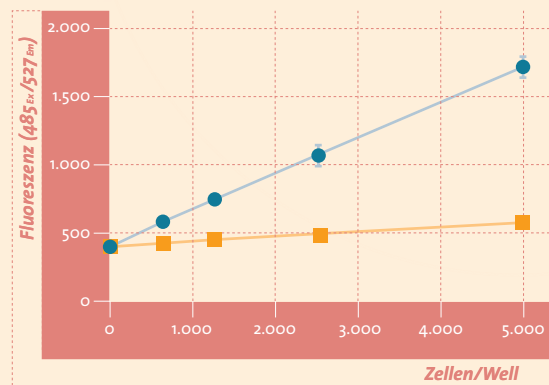
Der Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay verwendet ein fluoreszenzmarkiertes Substrat (Z-DEVD-R110-DVED-Z) zum Nachweis aktiver Caspasen-3 und -7 aus den verschiedensten Ausgangsmaterialien. Durch die Kopplung von Rhodamin-110 an das Caspasesubstrat wird eine wesentlich höhere Sensitivität erreicht als bei vergleichbaren fluoreszenten Assays (ca. 600 apoptotische Zellen im 96-Well-Format). Das Fluoreszenz-Signal ist dabei proportional zur Menge aktivierter Caspasen. Wir empfehlen die Verwendung im 96- oder 384-Well-Format.

Assay-Merkmale

Assay-Typ	Fluoreszent (499 _{Ex} /521 _{Em})
Marker	Caspase-3 und -7
Anwendung	Apoptose, Multiplexing mit anderen zellbasierten Assays
Zelltyp/Probe	Zelllinien, Primärzellen, Enzympräparationen
Durchführung	Homogen, 1-Schritt-Assay
Zeitbedarf	1–18 Stunden
Sensitivität	~ 600 apoptotische Zellen (96-Well)
Robust	Hoher Z'-Faktor; exzellentes Signal-Hintergrund-Verhältnis



Sensitivität

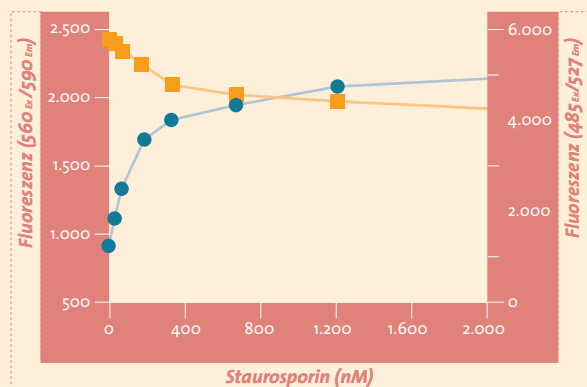


● anti-Fas
■ Kontrolle

Jurkat Zellen wurden zur Induktion der Apoptose 4,5 Stunden mit anti-Fas mAb behandelt. Nach Zugabe des Apo-ONE®-Assay-Reagenz zur 96-Well-Platte wurde das Signal nach 1 Stunde Inkubationszeit ausgelesen.

Multiplexing:

Bestimmung von zwei Endpunkten in einer Probe



● Apo-ONE®
■ CellTiter-Blue®

Bestimmung der Zellviabilität und Apoptose in einer Probe. Von Staurosporin-behandelten Jurkat Zellen wurde die Zellviabilität mit CellTiter-Blue® Reagenz (5 Stunden) ermittelt. Anschließend wurde die Aktivität der Caspasen mit dem Apo-ONE®-Assay-Reagenz (1 Stunde) bestimmt.

CaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Marker

Zellbasiert

Anwendung

In situ Nachweis apoptotischer Zellen im Durchflusszytometer oder im Fluoreszenzmikroskop.

Assay-Beschreibung

Der CaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Marker dient dem schnellen und direkten *in vivo* Nachweis von Caspaseaktivität und kann für Doppelfärbungen mit anderen Markern (z. B. Antikörpern) kombiniert werden. Es handelt sich um ein fluoreszentes Analogon des PAN-Caspase Inhibitors Z-VAD-FMK (Carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketon). Die Carbobenzoxy-Gruppe ist durch den Fluoreszenzfarbstoff Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) ersetzt. Dieser Marker ist zellpermeabel und wird direkt zu den Zellen gegeben.

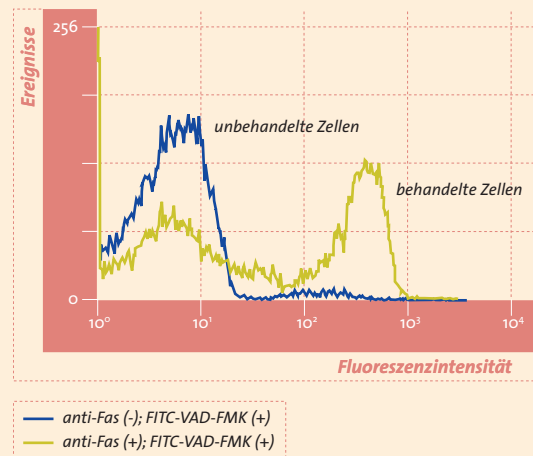
Assay-Prinzip

Der zellpermeable FITC-VAD-FMK Marker bindet irreversibel in einem stöchiometrischen Verhältnis an alle aktivierten PAN-Caspasen. Der Marker wird als 5 mM Stocklösung in DMSO angeboten. Das Reagenz wird direkt zu den Zellen gegeben und über 20 Minuten inkubiert. Anschließend können die Zellen im Durchflusszytometer analysiert werden. Bei der Analyse im Fluoreszenzmikroskop hingegen ist eine nachfolgende Fixierung mit Formalin notwendig.

Assay-Merkmale

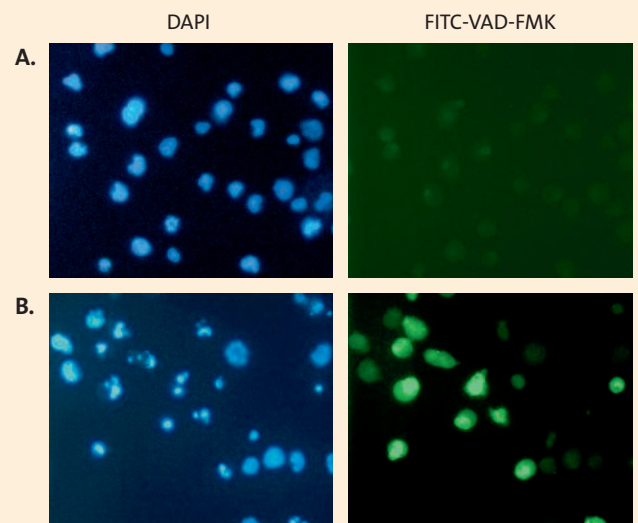
Assay-Typ	Fluoreszent
Marker	Pan-Caspasen
Anwendung	Apoptose, kombinierbar mit Antikörpermarkierungen
Zelltyp	Zelllinien, Primärzellen
Durchführung	Zugabe direkt ins Medium
Zeitbedarf	0,5–1 Stunden
Sensitivität	4.000 apoptotische Zellen

Durchflusszytometrische Analyse apoptotischer Jurkat Zellen



Jurkat Zellen wurden zur Induktion der Apoptose 4 Stunden mit anti-Fas mAb behandelt und anschließend mit CaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Marker gefärbt (Endkonzentration 10 µM). Die Fluoreszenzprofile wurden mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

Fluoreszenzmikroskopische Analyse apoptotischer Jurkat Zellen



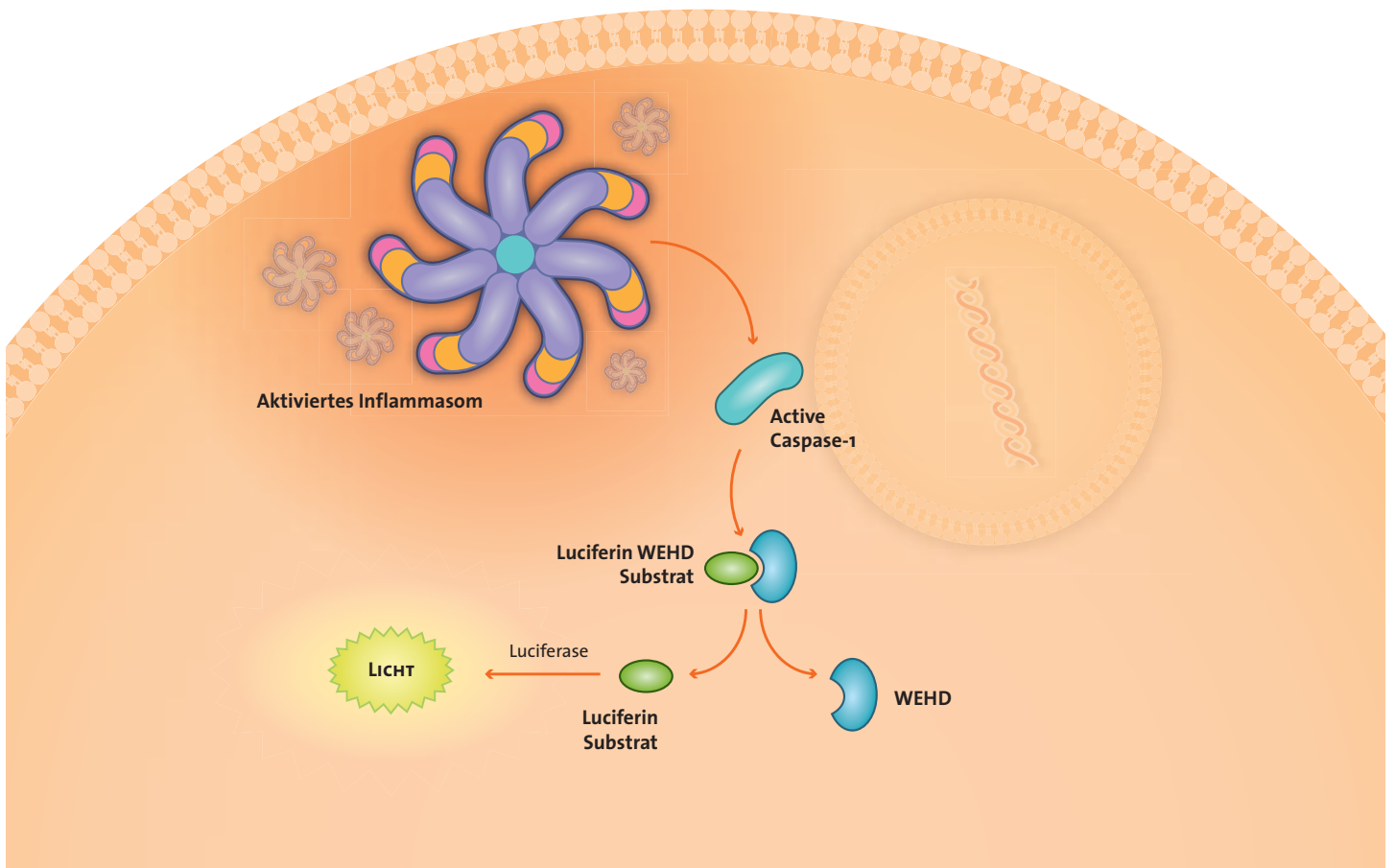
In situ Markierung mit CaspACE™ FITC-VAD-FMK korrespondiert mit der oben dargestellten durchflußzytometrischen Analyse. Jurkat Zellen wurden im Fluoreszenzmikroskop analysiert. **A:** unbehandelte Zellen und **B:** Anti-Fas behandelte Zellen. Die nukleäre Färbung mit dem DAPI-Farbstoff bestätigt die Aktivierung der Apoptose (kondensiertes Chromatin und fragmentierter Nukleus) der FITC-VAD-FMK-markierten Zellen.

IId Inflammasom/Entzündungsreaktionen

Das Inflammasom ist ein zytosolischer Multi-Protein-Komplex in Makrophagen und neutrophilen Granulozyten, der durch diverse inflammatorische Stimuli induziert wird und nach Aktivierung der Caspase-1 eine Entzündungsreaktion auslöst. Das am besten untersuchteste Inflammasom ist aus Eiweißen der NALP-Familie (NALP1 bis NALP3) und dem Adaptor-Protein ASC (Apoptosis-associated speck-like protein) aufgebaut.

ASC rekrutiert Pro-Caspase-1 in den NALP-ASC-Komplex, wo sich Pro-Caspase-1 durch autokatalytische Spaltung aktiviert. Caspase-1-Aktivierung führt zu: 1) Prozessierung und Freisetzung der Cytokine IL-1 β und IL-18 und 2) Pyroptose, einer immunogenetischen Form des programmierten Zelltods.

Caspase-Glo[®] 1 Inflammasome Assay



Caspase-Glo® 1 Inflammasome Assay

Zellbasiert/Biochemisch

Anwendung

Bestimmung der Inflammasom-Aktivität durch Aktivatoren oder Inhibitoren in Zellen oder Zellkulturmedium; in vitro-Reaktion mit Caspase-1 Enzym.

Assay-Beschreibung

Der **Caspase-Glo® 1 Inflammasome Assay** ist eine biolumineszente Methode zur selektiven Messung der Caspase-1-Aktivität. Caspase-1 ist ein Mitglied der Cystein-Asparaginsäure-spezifischen Protease (Caspase) Familie und eine essenzielle Komponente des Inflammasoms.

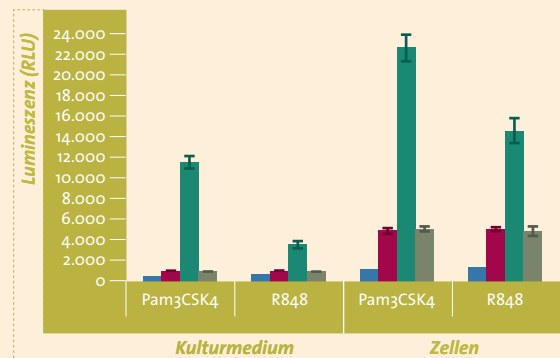
Assay-Prinzip

Der **Caspase-Glo® 1 Inflammasome Assay** besteht aus einem optimierten lytischen Reagenz, welches ein luminogenes Caspase-1-Prosubstrat (Z-WEHD-Aminoluciferin) zur Messung der Caspase-1-Aktivität enthält. Nach einmaliger Zugabe des Reagenzes und gleichzeitiger Lyse der Zellen wird das Prosubstrat durch Caspase-1 gespalten und somit Aminoluciferin freigesetzt. Das Aminoluciferin wird direkt durch die thermostabile rekombinante Luciferase (Ultra-Glo™ Recombinant Luciferase) in ein stabiles Lumineszenzsignal umgewandelt, welches direkt proportional zur Caspase-1-Aktivität ist. Das Reagenz enthält zusätzlich den Proteasom-Inhibitor MG-132, wodurch nicht-spezifische Proteasom vermittelte Spaltungen des Substrates eliminiert werden und somit eine selektive Messung der Caspase-1-Aktivität ermöglicht wird.

Assay-Merkmale

Assay-Typ	Lumineszent (Glow-Type; T1/2 > 3h)
Marker	Caspase-1-Aktivität
Anwendung	Bestimmung der Inflammasom-Aktivität oder in vitro-Reaktion mit Caspase-1
Zelltyp	Zellen oder Zellkulturmedium in Multi-Well-Platten. Keine Lysat-Präparation erforderlich
Durchführung	Homogen, 1-Schritt-Assay
Zeitbedarf	1 Stunde (nach Zugabe des Reagenzes)
Spezifische Aktivität	Das selektive Caspase-1-Substrat (Z-WEHD) und der Inhibitor (MG-132) ermöglichen eine direkte Messung der Caspase-1-Aktivität
Robust	Skalierbar von 96–384-Well-Format

Messung von freigesetzter Caspase-1 im Zellkulturmedium unter Anwendung des Caspase-Glo® 1 Inflammasome Assays

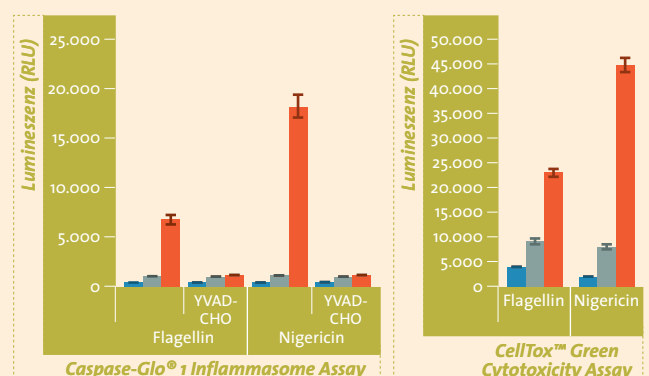


Signal-Hintergrund-Verhältnis

- Negative Kontrolle (keine Zellen)
- Unbehandelte Zellen
- Behandelte Zellen
- Behandelte Zellen + YVAD-CHO Inhibitor

THP-1 Zellen wurden für 2 Tage mit 20 nM Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) kultiviert und anschließend mit Pam3CSK4 (2 µg/ml) oder Resiquimod (R848, 20 µM) für 2 Stunden behandelt. Die Hälfte des Zellkulturmediums (50 µl/Well) wurde in eine zweite Platte transferiert und 50 µl/Well Caspase-Glo® 1 Reagenz oder Caspase-Glo® 1 YVAD-CHO Reagenz (Reagenz + Caspase-1 Inhibitor Ac-YVAD-CHO) dazugegeben und nach einer Stunde das Lumineszenzsignal gemessen.

Multiplexing von Caspase-Glo® 1 und CellTox™ Green



- Negative Kontrolle
- Unbehandelte Zellen
- Behandelte Zellen

5 × 10⁵ THP-1 Zellen/ml wurden in 100 µl Medium ausgesät und mit PMA (20 nM, 3 Tage) in 96-Well Platten differenziert. Die Zellen wurden anschließend mit Flagellin (1 µg/ml, 1 h) oder Nigericin (20 µM, 2 h) behandelt. Die Hälfte der Kultur wurde in eine separate Platte transferiert und 50 µl Caspase-Glo® 1 oder Caspase-Glo® 1 YVAD-CHO Reagenz dazugegeben. Nach einer Inkubation von einer Stunde wurde das Lumineszenzsignal gemessen. Parallel wurde die Zytotoxizität in der Ausgangsplatte durch Zugabe des CellTox™ Green Reagenzes bestimmt.

Ile Multiplexing

Die Nachfrage nach erhöhtem Durchsatz in der modernen biomedizinischen Forschung hat starken Einfluss auf den Einsatz von zellbasierten Assays genommen. Zunehmend von Bedeutung ist die Möglichkeit, Assays miteinander zu kombinieren. Dieses so genannte Multiplexing von zellbasierten Assays erlaubt die effiziente Analyse von mehr als einem Parameter aus einem Versuchsansatz. Hierzu sind verschiedene Assay-Kombinationen denkbar, sofern die Assay-Chemie kompatibel ist, und die Detektionssignale voneinander getrennt werden können. Durch die Messung und Verknüpfung von mehreren Parametern werden Daten aussagekräftig und reproduzierbar. Je nach Kombination kann ein Assay als interne Kontrolle für

den anderen Assay dienen. Dieses Vorgehen spart Zeit, Probenmaterial und teure Testsubstanzen. Somit ermöglicht Multiplexing ein besseres Verständnis von komplexen zellulären Prozessen.

MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay

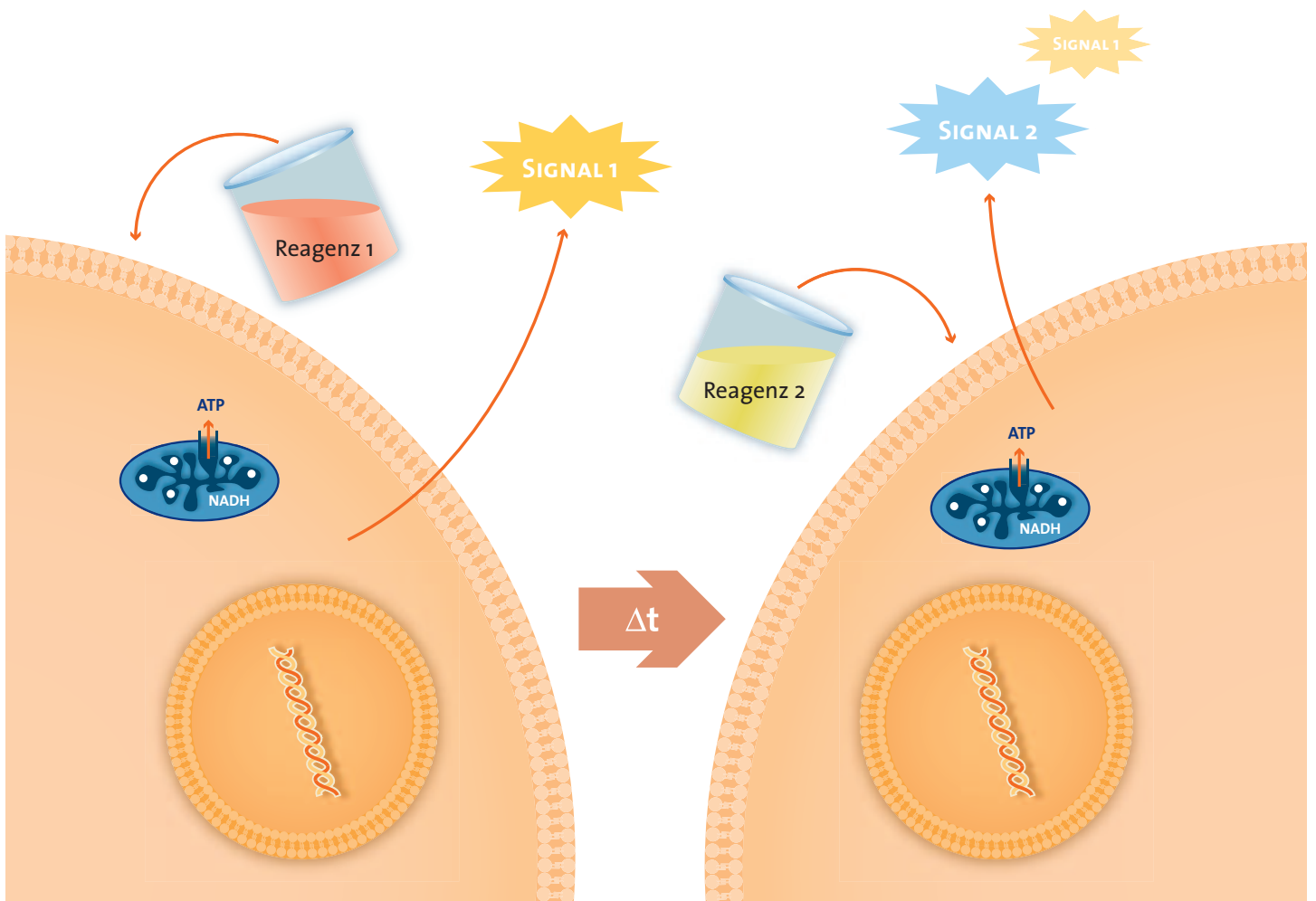
MultiTox-Glo Multiplex Cytotoxicity Assay

ApoLive-Glo™ Multiplex Assay

ApoTox-Glo™ Triplex Assay

ONE-Glo™ + Tox Luciferase Reporter and Cell Viability Assay

Mitochondrial ToxGlo™ Assay



Übersicht über die Kombinationsmöglichkeiten von zellbasierten Assays

Das Kombinieren von verschiedenen zellbasierten Assays ist nur bedingt möglich. Im Folgenden werden die gängigsten Kombinationsmöglichkeiten vorgestellt, die jedoch zum Teil ein mo-

difiziertes Protokoll benötigen. Eine Beratung durch unseren technischen Service wird daher dringend empfohlen!

Zellviabilitätsassay

Assay	Multiplexing mit	
RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay	CellTox™ Green Cytotoxicity Assay	Zytotoxizität
	CytoTox-Fluor™ Cytotoxicity Assay	Zytotoxizität
	NAD/NADH-Glo™ Assay	Messung von NAD ⁺ und NADH
	NADP/NADPH-Glo™ Assay	Messung von NADP ⁺ and NADPH
	Reporter-Assays	Reporter-Gen-Aktivität
	RNA-Isolation	RNA-Analysen
CellTiter-Fluor™ Assay Live-Cell-Protease-Aktivität, Fluoreszent (Gly-Phe-AFC) 400 _{ex} /505 _{em}	CellTiter-Glo® Assay, CellTiter-Glo®2.0 Assay	Viabilität
	CytoTox-Glo™ Assay (erhältlich als MultiTox-Glo™ Multiplex Assay)	Zytotoxizität
	CytoTox-Fluor™ Assay (erhältlich als MultiTox-Fluor™ Multiplex Assay)	Zytotoxizität
	Caspase-Glo® 3/7 Assay (erhältlich als ApoLive-Glo™ Multiplex Assay)	Apoptose
	GSH-Glo™ Assay	Oxidativer Stress
	P450-Glo™ Assay	Cytochrom P450
CellTiter-Blue® Assay Resazurin zu Resorufin, Fluoreszent 560 _{ex} /590 _{em}	CytoTox-ONE™ Assay	Zytotoxizität
	Apo-ONE® Caspase 3/7 Assay	Apoptose

Zytotoxizitätsassay

Assay	Multiplexing mit	
CellTox™ Green Assay DNA-Farbstoff, Fluoreszent 485–500 _{ex} /520–530 _{em}	Der CellTox™ Green Assay kann mit allen zellbasierten Glo-Assays kombiniert werden.	
CytoTox-ONE™ Assay LDH-Freisetzung, Fluoreszent (Resazurin zu Resorufin) 560 _{ex} /590 _{em}	CellTiter-Glo® Assay, CellTiter-Glo®2.0 Assay	Viabilität
	CellTiter-Blue® Assay	Viabilität
	Caspase-Glo® 3/7 Assay	Apoptose
	Apo-ONE® Caspase 3/7 Assay	Apoptose
CytoTox-Fluor™ Assay Dead-Cell Protease-Aktivität, Fluoreszent (bis-AAF-R110) 485 _{ex} /520 _{em}	CellTiter-Glo® Assay, CellTiter-Glo®2.0 Assay	Viabilität
	Caspase-Glo®3/7 Assay	Apoptose
	ONE-Glo™ Assay	Single Reporter System
	GSH-Glo™ Assay	Oxidativer Stress

Apoptose-Assay

Assay	Multiplexing mit	
Apo-ONE® Caspase 3/7 Assay Caspase-Aktivität, Fluoreszent (Z-DEVD-R110) 499 _{ex} /521 _{em}	CellTiter-Blue® Assay	Viabilität
	CytoTox-ONE™ Assay	Zytotoxizität
	Caspase-Glo® 8 und 9 Assay	Apoptose
	EnduRen™ Live Cell Substrate	Live Cell Substrat

Multiplex Assay

Assay	Multiplexing mit	
MultiTox-Fluor™ Multiplex Assay Zellviabilität und Nekrose, Fluoreszent CellTiter-Fluor™: 400 _{ex} /505 _{em} ; CytoTox-Fluor™: 485 _{ex} /520 _{em}	Caspase-Glo® 3/7 Assay (erhältlich als ApoTox-Glo™ Triplex Assay)	Apoptose
	GSH-Glo™ Assay	Oxidativer Stress

MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay

Zellbasiert

Anwendung

Gleichzeitige Bestimmung der Zellviabilität und Zytotoxizität in einem Well.

Assay-Beschreibung

Der **MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay** ist ein fluoreszenter zellbasierter Assay für die gleichzeitige Bestimmung der Zellviabilität und Zytotoxizität in einem Well. Der Assay ist eine Kombination aus dem CellTiter-Fluor™ und dem CytoTox-Fluor™ Assay.

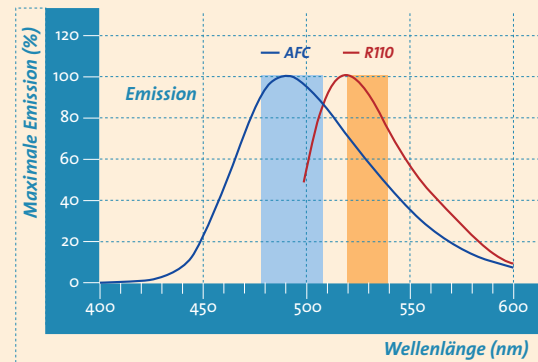
Assay-Prinzip

Der Assay basiert auf der gleichzeitigen Aktivitätsbestimmung der Live-Cell-Protease und der Dead-Cell-Protease. Beides sind Proteaseaktivitäten, die aussagekräftige Ergebnisse über Zellviabilität und Zytotoxizität liefern. Das Assay-Reagenz enthält zwei verschiedene fluorogene Peptidsubstrate: das zellgängige GF-AFC zur Bestimmung der Zellviabilität und das nicht-zellgängige bis-AAF-R110 zur Bestimmung der Zytotoxizität. Für weitere Details siehe CellTiter-Fluor™ Assay und CytoTox-Fluor™ Cytotoxicity Assay.

Assay-Merkmale

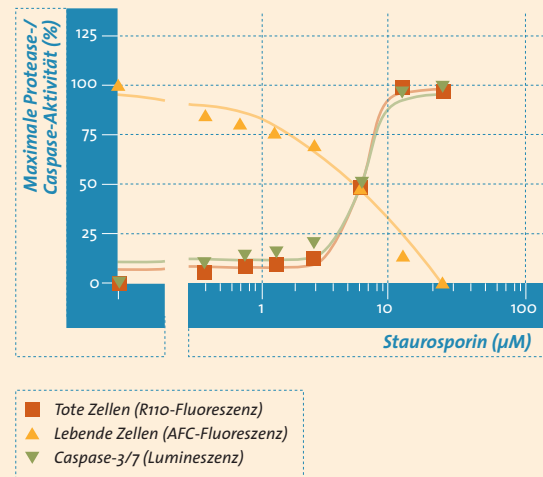
Assay-Typ	Fluoreszent (AFC 400 _{Ex} /505 _{Em} , R110 485 _{Ex} /520 _{Em})
Marker	Live-Cell-Protease; Dead-Cell-Protease
Anwendung	Gleichzeitige Messung der Zellviabilität und Zytotoxizität in einem Well
Zelltyp	Humane Zelllinien (adhärent oder in Suspension)
Durchführung	Homogen, 1-Schritt-Assay
Zeitbedarf	0,5–3 Stunden
Sensitivität	40 lebende Zellen; 10 tote Zellen (96-Well)

Die Unterscheidung der Messsignale ist durch getrennte Fluoreszenzspektren möglich



Optimale Ergebnisse werden durch den Einsatz von Filtern für Anregungen bei 400 nm (AFC) bzw. 485 nm (Rhodamin-110) erreicht.

Multiplexing mit weiteren Assays



Nachweis der Zellviabilität und Zytotoxizität von Stauosporin behandelten LN-18 Zellen mit MultiTox-Fluor-Reagenz und Caspase-Glo® 3/7-Reagenz. Mit steigender Stauosporin-Konzentration nimmt die Zellviabilität ab, während die Caspase-Aktivität zunimmt.

MultiTox-Glo Multiplex Cytotoxicity Assay

Zellbasiert

Anwendung

Sequenzielle Bestimmung der Zellviabilität und Zytotoxizität in einem Well.

Assay-Beschreibung

Der **MultiTox-Glo Multiplex Cytotoxicity Assay** ist ein zellbasierter Assay für die sequenzielle Bestimmung der Zellviabilität und Zytotoxizität in einem Well. Der Assay ist eine Kombination aus dem CellTiter-Fluor™ und dem CytoTox-Glo™ Assay.

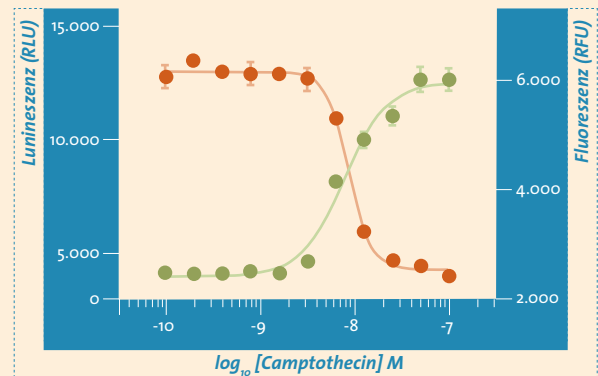
Assay-Prinzip

Der Assay basiert auf der sequenziellen Aktivitätsbestimmung der Live-Cell-Protease und der Dead-Cell-Protease. Beides sind Protease-Aktivitäten, die aussagekräftige Ergebnisse in Bezug auf Zellviabilität und Zytotoxizität liefern. Das Assay-Reagenz enthält zwei verschiedene Peptidsubstrate: das fluorogene zellgängige GF-AFC zur Bestimmung der Zellviabilität und das luminesgene nicht zellgängige AAF-Aminoluciferin zur Bestimmung der Zytotoxizität. Für weitere Details siehe CellTiter-Fluor™ und CytoTox-Glo™ Assay.

Assay-Merkmale

Assay-Typ	Fluoreszent (AFC 400 _{Ex} /505 _{Em}); Lumineszent (Glow-Type)
Marker	Live-Cell-Protease; Dead-Cell-Protease
Anwendung	Sequenzielle Messung der Zellviabilität und Zytotoxizität in einem Well
Zelltyp	Humane Zelllinien (adhärent oder in Suspension)
Durchführung	Homogen, 2 -Schritt-Assay
Zeitbedarf	0,5 Stunden
Sensitivität	40 lebende Zellen; 10 tote Zellen (96-Well)

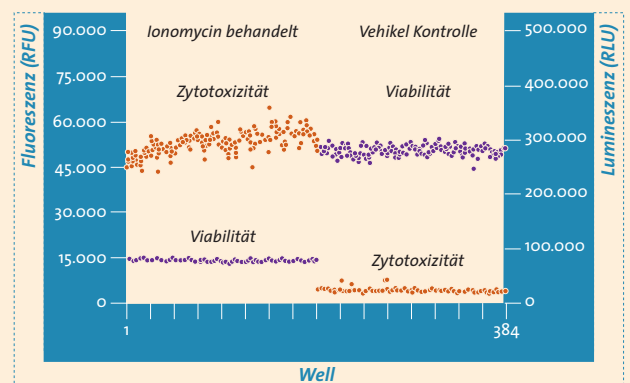
MultiTox-Glo Multiplex Cytotoxicity Assay



- GF-AFC Substrat (Viabilität) $EC_{50} = 8,5 \text{ nM}$
- AAF-Glo™ Substrat (Zytotoxizität) $EC_{50} = 7,6 \text{ nM}$

Vergleichbare EC_{50} -Werte durch parallele Messung der Live-Cell- und Dead-Cell-Protease. Jurkat Zellen wurden über 24 Stunden mit dem Alkaloid Camptothecin behandelt. Die Zellviabilität und Zytotoxizität wurden mit MultiTox-Glo bestimmt. Die ermittelten EC_{50} -Werte sind vergleichbar.

Geringe Variation der Messergebnisse & ein hohes Signal-Hintergrund-Verhältnis führen zu exzellenten Z' Faktoren



- GF-AFC Substrat (Viabilität) $Z' = 0,85$
- AAF Substrat (Zytotoxizität) $Z' = 0,75$

Geringe Streuung der Einzelmessungen unter Verwendung des MultiTox-Glo-Reagenz. In diesem Versuch wurden 5×10^3 Zellen in einer 384-Well-Platte mit dem zytotoxischen Agens Ionomycin ($50 \mu\text{M}$) bzw. der Vehikel Kontrolle über 2 Stunden behandelt. Die Zugabe des MultiTox-Glo-Reagenz erfolgte gemäß der Beschreibung im Technischen Manuel #TB358. Die Ergebnisse zeigen eine geringe Variation der einzelnen Messergebnisse und ein sehr gutes Signal-Hintergrund-Verhältnis. Dies drückt sich auch in den ausgezeichneten Z' Faktoren von $> 0,5$ aus.

ApoLive-Glo™ Multiplex Assay

Zellbasiert

Anwendung

Sequenzielle Bestimmung der Zellviabilität und Apoptose in einem Well.

Assay-Beschreibung

Der ApoLive-Glo™ Multiplex Assay ermöglicht die Messung von Zellviabilität und Apoptose in einem Well. Er verbessert dadurch – im Vergleich zu einer Messung mit einem Einzel-Parameter-Assay – deutlich die Qualität der Daten. Gleichzeitig reduziert er den Zeit- und Kostenaufwand.

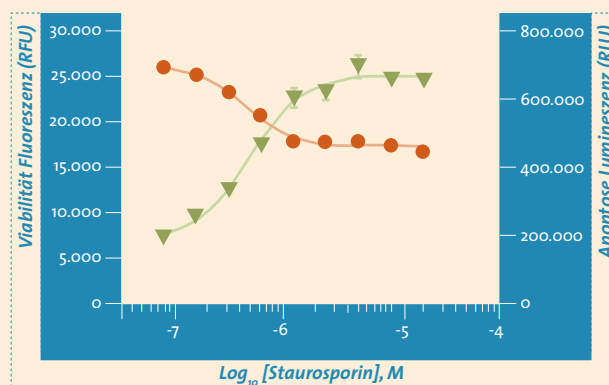
Assay-Prinzip

Der Assay ist eine Kombination aus dem CellTiter-Fluor™ Cell Viability Assay und dem Caspase-Glo® 3/7 Assay. Im ersten Schritt wird die Zellviabilität über die Live-Cell-Protease-Aktivität mit dem Peptidsubstrat GF-AFC ermittelt. Im zweiten Schritt wird die Apoptose über die Aktivität der Caspasen-3/7 bestimmt.

Assay-Merkmale

Assay-Typ	Fluoreszent (AFC 400 _{Ex} /505 _{Em}); Lumineszent (Glow-Type)
Marker	Live-Cell-Protease + Caspase-3/7
Anwendung	Sequenzielle Messung der Zellviabilität und Apoptose in einem Well
Zelltyp	Zelllinien (adhärent oder in Suspension)
Durchführung	Homogen, 2-Schritt-Assay
Zeitbedarf	1–3 Stunden
Sensitivität	40 lebende Zellen; 100 apoptotische Zellen (96-Well)

Induktion von Apoptose durch Staurosporin



● Viabilität (GF-AFC Substrat) $EC_{50} = 463 \text{ nM}$
▼ Apoptose (Caspase-Glo® 3/7 Substrat) $EC_{50} = 491 \text{ nM}$

Jurkat Zellen wurden 6 Stunden mit Staurosporin behandelt und die Zellviabilität bzw. Apoptose mit dem ApoLive-Glo™ Multiplex Assay bestimmt. Die Zellviabilität nimmt mit steigender Konzentration von Staurosporin ab, wohingegen die Caspase-3/7 Aktivität zunimmt.

ApoTox-Glo™ Triplex Assay

Zellbasiert

Anwendung

Sequenzielle Bestimmung von Zellviabilität, Zytotoxizität und Apoptose in einem Well; Zelltod-Forschung.

Assay-Beschreibung

Der ApoTox-Glo™ Triplex Assay ist ein neuartiges Multiplex-Analyse System, um Viabilität, Zytotoxizität und Apoptose von Zelllinien in nur einem Well zu bestimmen. Der Triplex-Assay misst die drei Parameter in zwei Schritten über Fluoreszenz und Lumineszenz.

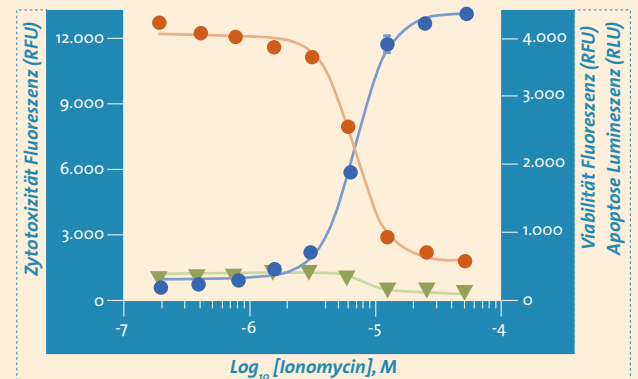
Assay-Prinzip

Der Assay ist eine Kombination aus dem Multitox-Fluor™ Multiplex Cytotoxicity Assay und dem Caspase-Glo® 3/7-Assay. Im ersten Teil des Assays werden über zwei Protease-Aktivitäten, Live-Cell- und Dead-Cell-Protease die Zellviabilität und Zytotoxizität gemessen. Im zweiten Schritt wird die Apoptose über die Aktivität der Caspasen-3/7 bestimmt.

Assay-Merkmale

Assay-Typ	Fluoreszent (AFC 400 _{Ex} /505 _{Em} , R110 485 _{Ex} /520 _{Em}); Lumineszent (Glow-Type)
Marker	Live-Cell- und Dead-Cell-Protease; Caspase-3/7
Anwendung	Sequenzielle Messung der Zellviabilität, Zytotoxizität und Apoptose
Zelltyp	Zelllinien (adhärent oder in Suspension)
Durchführung	Homogen, 2-Schritt-Assay
Zeitbedarf	1–3 Stunden
Sensitivität	40 lebende Zellen; 10 tote Zellen; 100 apoptotische Zellen (96-Well)

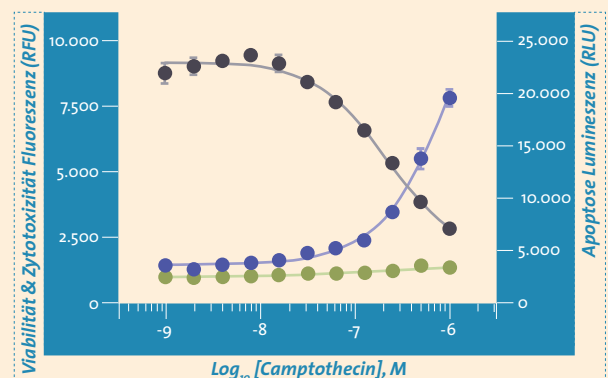
Induktion der primären Nekrose durch Ionomycin



- Viabilität (GF-AFC) $EC_{50} = 6,89 \mu M$
- ▼ Apoptose (Caspase-3/7) $EC_{50} = N.D.$
- Zytotoxizität (bis-AAF-R110) $EC_{50} = 6,87 \mu M$

Behandlung von Jurkat Zellen mit Ionomycin über 6 Stunden führt zur Reduktion der Zellviabilität ohne Aktivierung der Caspase-3/7. Es ist allerdings eine Schädigung der Zellmembran durch die Freisetzung der Dead-Cell-Protease zu beobachten (Anstieg der Zytotoxizitätskurve). Die Daten unterstützen die Annahme, dass Ionomycin die primäre Nekrose induziert.

Induktion der Apoptose durch Camptothecin



- Viabilität/Zytotoxizität Reagenz (Viabilität)
- Viabilität/Zytotoxizität Reagenz (Zytotoxizität)
- Caspase-Glo® 3/7 Reagenz (Apoptose)

Behandlung von K562 Zellen mit Camptothecin über 48 Stunden. Camptothecin führt in Abhängigkeit der Konzentration zur Reduktion der Zellviabilität, ohne die Zellmembran zu schädigen. Es ist eine konzentrationsabhängige Induktion der Apoptose zu erkennen.

ONE-Glo™ + Tox Luciferase Reporter and Cell Viability Assay

Zellbasiert

Anwendung

Bestimmung der Firefly-Luciferase-Reportergenaktivität und Zellviabilität in einem Well.

Assay-Beschreibung

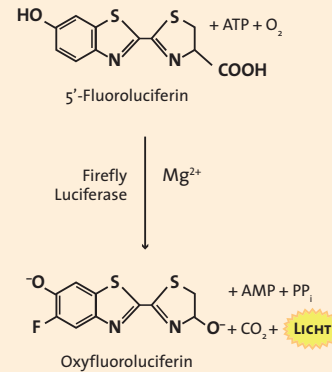
Der **ONE-Glo™ + Tox Luciferase Reporter and Cell Viability Assay** ist ein Assay mit 2 Pipettierschritten für die gleichzeitige Bestimmung der Firefly-Luciferase-Reportergen-Expression und Zellviabilität in einem Well. Durch Anwendung dieses Assays wird die Interpretation der Reportergen-Expressionsdaten deutlich vereinfacht und verbessert.

Assay-Prinzip

Der Assay ist eine Kombination aus dem CellTiter-Fluor™ Cell Viability Assay und One-Glo™ Luciferase Assay System. Im ersten Schritt wird die Zellviabilität über die Live-Cell-Protease-Aktivität nachgewiesen. Hierbei wird der Umsatz des pro-fluorogenen Substrats GF-AFC in das fluoreszente AFC gemessen. Im zweiten Schritt wird die Luciferase-Reportergenaktivität mit 5'-Fluoroluciferin als Luciferasesubstrat bestimmt. Reporter-Assays mit 5'-Fluoroluciferin besitzen eine erhöhte Stabilität und erhöhte Toleranz gegenüber Medienzusätzen.

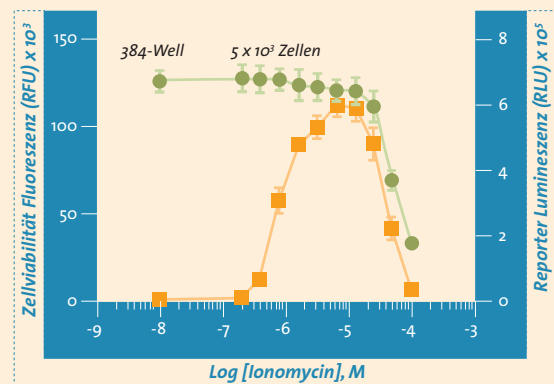
Assay-Merkmale

Assay-Typ	Fluoreszent (AFC 400 _{Ex} /505 _{Em}); Lumineszent (Glow-Type)
Marker	Live-Cell-Protease; Luciferase-Reportergen
Anwendung	Luciferase-Reportergenaktivität + Zellviabilität
Zelltyp	Zelllinien
Durchführung	Homogen, 2-Schritt-Assay
Zeitbedarf	0,6–3 Stunden



5'-Fluoroluciferin als Substrat für die Firefly-Luciferase-Reaktion

Multiplexing zur besseren Interpretation der Reportergen-Daten



● Viabilität
■ Reporter

GloResponse™ NFAT-RE-luc2P HEK293 Reporterzellen (384-Well-Platte) wurden in Anwesenheit von PMA mit steigenden Konzentrationen an Ionomycin behandelt. Bis zu einer bestimmten Konzentration von Ionomycin führen die beiden Substanzen zur Stimulation der NF-AT-abhängigen Genexpression der Luciferase. Höhere Konzentrationen an Ionomycin wirken zytotoxisch auf die Zellen und haben eine verminderte Reportergen-Expression zur Folge.

Mitochondrial ToxGlo™ Assay

Zellbasiert

Anwendung

Vorhersage über mitochondriale Toxizität; Wirkstoffscreening; HTS geeignet.

Assay-Beschreibung

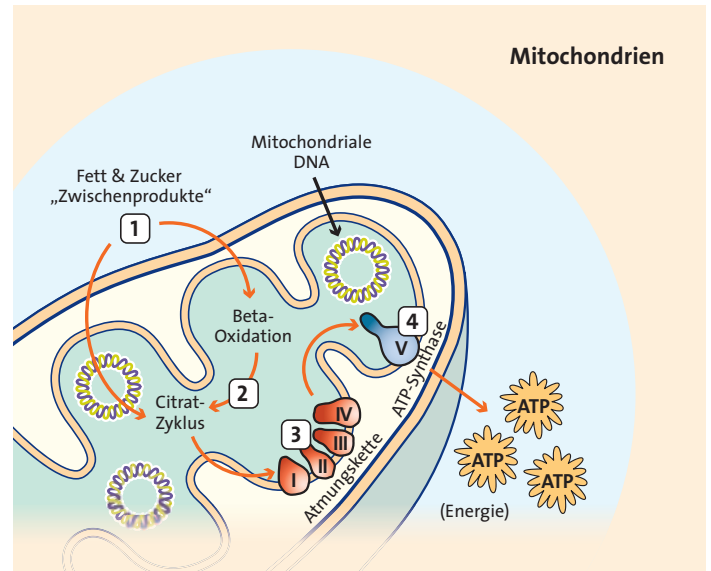
Der **Mitochondrial ToxGlo™ Assay** ist ein zellbasierter Assay für die Vorhersage mitochondrialer Toxizität, die z. B. durch Behandlung mit Xenobiotika auftreten kann. Der Assay wird direkt in der Zellkulturplatte durchgeführt. Es werden ATP-Gehalt und Membranintegrität gemessen. Die Kombination beider Datensätze erlaubt die Unterscheidung zwischen mitochondrialen Funktionsstörungen und nicht-mitochondrialen zytotoxischen Mechanismen.

Assay-Prinzip

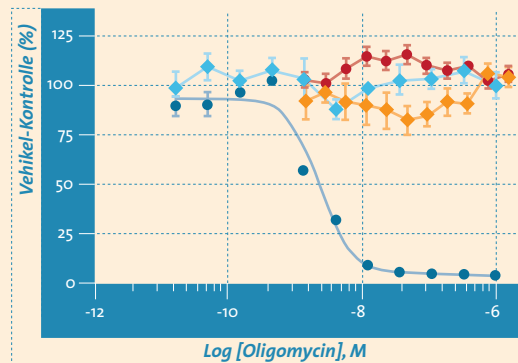
Der Assay basiert auf der sequenziellen Messung zweier Biomarker. Im ersten Schritt wird die Zellmembranintegrität über die Aktivität der sogenannten Dead-Cell-Protease im Medium bestimmt. Dazu wird ein fluorogenes Peptidsubstrat (bis-AFF-R110) eingesetzt, das nicht die Zellmembran passieren kann, und deshalb kein Signal in lebenden Zellen erzeugt (vgl. CytoTox-Fluor™ Cytotoxicity Assay). Im zweiten Schritt wird der ATP-Gehalt der Zelle bestimmt. Das ATP-Detektions-Reagenz führt zur Lyse der Zellen und der ATP-Gehalt wird in einer Luciferase-Reaktion gemessen (vgl. CellTiter-Glo® Assay). Um die mitochondriale Antwort zu erhöhen, sollten die Zellen in Galaktose-haltigem Medium ohne Glukosezusatz kultiviert werden.

Assay-Merkmale

Assay-Typ	Fluoreszent (R110 485 _{Ex} /520 _{Em}); Lumineszent (Glow-Type)
Marker	Dead-Cell-Protease, ATP
Anwendung	Mitochondriale Toxizität
Zelltyp	Zelllinien in Galaktose-Medium
Durchführung	Homogen, 2-Schritt-Assay
Zeitbedarf	0,6–3 Stunden
Robust	Hoher Z'-Faktor



Mitochondrien verwenden Sauerstoff, um den Hauptanteil (90–95 %) des ATP für multizelluläre Organismen zu generieren. Deshalb sind sowohl der Verbrauch an Sauerstoff als auch der Gehalt an ATP ein gutes Maß für die mitochondriale Aktivität.



- ATP (Galaktose) $EC_{50} = 2,3 \text{ nM}$
- ATP (Glukose) $EC_{50} = \text{ND}$
- ◆ Zytotoxizität (Glukose) $EC_{50} = \text{ND}$
- ◆ Zytotoxizität (Galaktose) $EC_{50} = \text{ND}$

Mitochondriale Responsivität/Toxizität am Beispiel von Oligomycin*-behandelten K562 Zellen in Glukose- bzw. Galaktose-haltigem Medium. Säugerzellen generieren ATP sowohl über Mitochondrien (oxidative Phosphorylierung) als auch über nicht-mitochondriale Reaktionswege (Glykolyse). In Glukose-freiem Medium werden die Zellen „gezwungen“ das ATP über die oxidative Phosphorylierung zu generieren. Die mitochondriale Toxizität lässt sich nur in Galaktose-haltigem Medium bestimmen.

*Oligomycin ist ein bekannter Inhibitor für die mitochondriale H⁺-ATP-Synthase und führt hier zur Reduktion des ATP-Gehalts, aber nicht zur Schädigung der Zellmembran (Zytotoxizität).

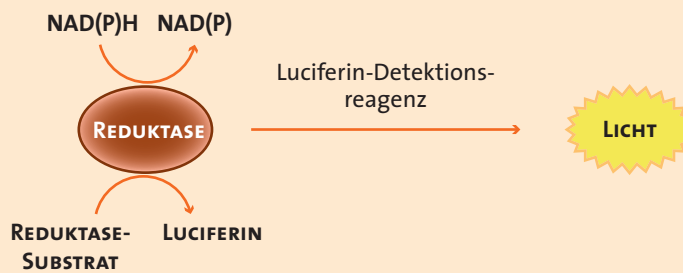
III Zellmetabolismus

Nicotinamidadeninucleotid (NAD⁺) und Nicotinamidadeninucleotidphosphat (NADP⁺) sind Coenzyme, die als „Cofaktoren“ von vielen Enzymen benötigt werden und an zahlreichen Redoxreaktionen des Stoffwechsels und bei der Signalübertragung der Zelle beteiligt sind. Eine wichtige Familie metabolischer Enzyme sind z.B. die NAD-abhängigen Dehydrogenasen, die eine klinisch signifikante Rolle bei der Entstehung

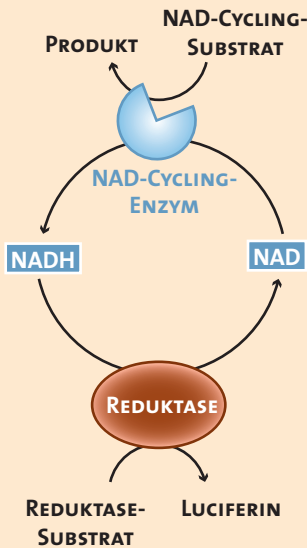
von Stoffwechsel- und Krebserkrankungen spielen. Die Untersuchung dieser Cofaktoren und das Screening von biologisch relevanten Wirkstoffen ermöglicht die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze.

Promega bietet drei verschiedene Biolumineszenz-basierte Assay-Formate zur Messung von NAD(P)H, NAD⁺ und NADP⁺ an:

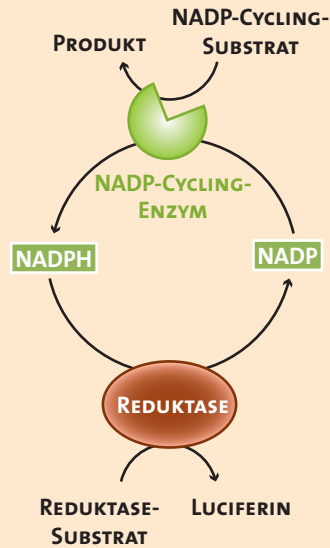
NAD(P)H-Glo™ Detection System – Zur Messung von NADH und NADPH *in vitro*



NAD⁺/NADH-Glo™ Assay – Zur Messung von NAD und NADH in Zellen



NADP⁺/NADPH-Glo™ Assay – Zur Messung von NADP und NADPH in Zellen



NAD(P)H-Glo™ Detection System

Biochemisch

Anwendung

Nachweis von reduziertem NADH oder NADPH, Untersuchung der Aktivität von NAD(P)H-abhängigen Enzymen im High-Throughput-Format, Screening von Inhibitoren von NAD(P)H-abhängigen Enzymen *in vitro*.

Assay-Beschreibung

Das NAD(P)H-Glo™ Detection System ist ein homogener Assay, der in Anwesenheit von NADH oder NADPH ein lumineszentes Signal durch eine biochemische Reaktion generiert. Das NAD(P)H-Glo™ Detection System dient zum quantitativen Nachweis der Konzentration an reduziertem NADH und NADPH, kann jedoch nicht zwischen diesen beiden Dinukleotiden differenzieren. Die oxidierten Formen NAD⁺ und NADP⁺ interferieren nicht mit der Quantifizierung und werden somit nicht detektiert. Der Assay zeichnet sich durch einen breiten linearen Messbereich von 0,1 µM bis 25 µM NAD(P)H mit einem hohen Signalhintergrundverhältnis aus. Der Assay ist kompatibel mit 96-, 384-, low-volume 384- und 1536-Well Formaten und eignet sich besonders für das Screening von Inhibitoren NAD(P)H-abhängiger Enzyme.

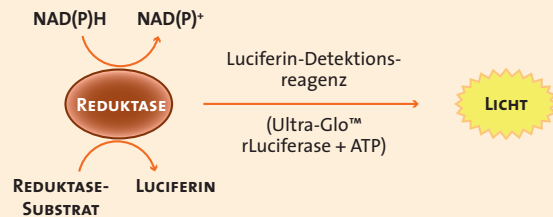
Assay-Prinzip

In Anwesenheit von NAD(P)H wird das ProLuciferin-Reduktase-Substrat in einer gekoppelten enzymatischen Reaktion durch ein Reduktase-Enzym zu Luciferin reduziert. Dieses dient gleichzeitig als Substrat für die Ultra-Glo™ Luciferase und wird in ein Lichtsignal umgewandelt. Das generierte Licht ist proportional zu der Menge an NAD(P)H in der Probe. Die Reaktion läuft durch Zugabe eines einzigen Reagenzes ab, welches sowohl das modifizierte ProLuciferin-Reduktase-Substrat, das Reduktase-Enzym als auch die Luciferase enthält. Der Assay kann nach einer Inkubationszeit von nur 40 bis 60 Minuten gemessen werden.

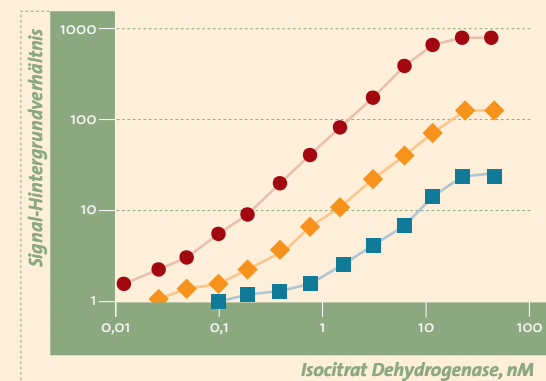
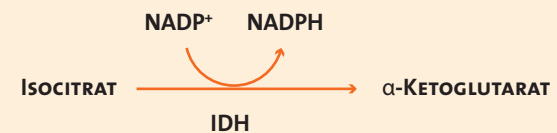
Assay-Merkmale

Assay-Typ	Lumineszent, (Halbwertszeit > 2 Stunden)
Marker	NADH, NADPH
Probenmaterial	Enzympräparationen
Durchführung	Homogener 1-Schritt-Assay
Linearität	Das NAD(P)H-Glo™ Detection System detektiert 0,1 µM bis 25 µM NAD(P)H.
Sensitivität	Detektionslimit ≤ 0,1 µM NADH, mit einem maximalen Assay-Fenster von 250
Robust	Z'-Faktor > 0,7

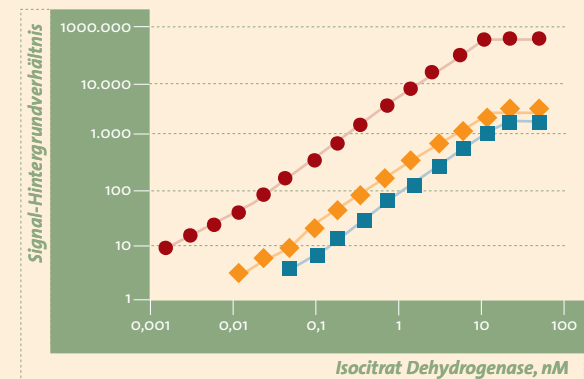
NAD(P)H™ Detection System Assay-Prinzip



Vergleich des NAD(P)H™ Detection System mit fluoreszenz-basierten Assay-Systemen



◆ Direkte Fluoreszenz
 ● NAD(P)H-Glo
 ■ Resazurin Fluoreszenz



Die Isocitrat-Dehydrogenase katalysiert die oxidative Abspaltung von Kohlendioxid von Isocitrat, wobei es gleichzeitig zur Reduzierung von NAD(P)H⁺ zu NAD(P)H kommt und α-Ketoglutarat entsteht.

NAD⁺/NADH-Glo™ Assay | NADP⁺/NADPH-Glo™ Assay

Zellbasiert und biochemisch

Beide Assays nutzen die gleiche Technologie (siehe Abbildung.):

- Umwandeln von oxidiertem Nicotinamidadeninucleotid oder Nicotinamidadeninucleotidphosphat zur reduzierten Form durch ein Cycling-Enzym
- Das eingesetzte Cycling-Enzym ist spezifisch für nicht phosphoryliertes NAD⁺ respektive phosphoryliertes NADP⁺
- Die Cycling-Reaktion erhöht die Sensitivität der Assays
- Cycling-Enzym-, Reduktase- und Luciferase-Reaktion erfolgen in einem Ansatz durch Zugabe eines Reagenzes

Im Folgenden wird ausschließlich der **NAD⁺/NADH-Glo™ Assay** beschrieben, der in Anwendung, Assay-Prinzip und Assay-Merkmalen dem **NADP⁺/NADPH-Glo™ Assay** entspricht.

Anwendung

Nachweis der Veränderung des zellulären Gehaltes an Gesamt-NAD⁺ und NADH sowie des NAD⁺/NADH-Verhältnisses oder als Einzelbestimmung, Screening von Inhibitoren in einer enzymatischen Reaktion oder direkt in den Zellen im High-Throughput-Format.

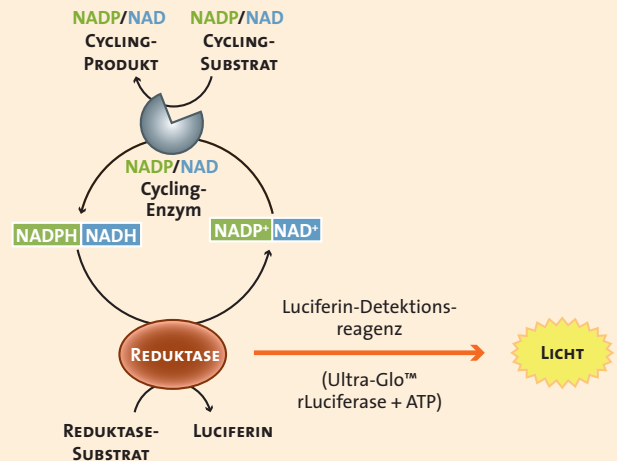
Assay-Beschreibung

Der NAD⁺/NADH-Glo™ Assay ist ein biolumineszenter, hochempfindlicher 1-Schritt-Assay zur Bestimmung der oxidierten und/oder reduzierten Form von NAD⁺ und NADH und deren Verhältnis zueinander in biologischen Proben. Die Umwandlung von NAD⁺ und NADH durch das NAD-Cycling-Enzym und die Reduktase erhöhen die Sensitivität des Assays und ermöglichen die Unterscheidung von nicht phosphoryliertem NAD⁺ und NADH im Vergleich zu den phosphorylierten Formen NADP⁺ und NADPH. Der Assay hat einen linearen dynamischen Bereich von 10 nM bis 400 nM NAD⁺ mit einem hohen Signalhintergrundverhältnis. Der Assay ist kompatibel mit 96-, 384-, low-volume 384- und 1536-Well Platten.

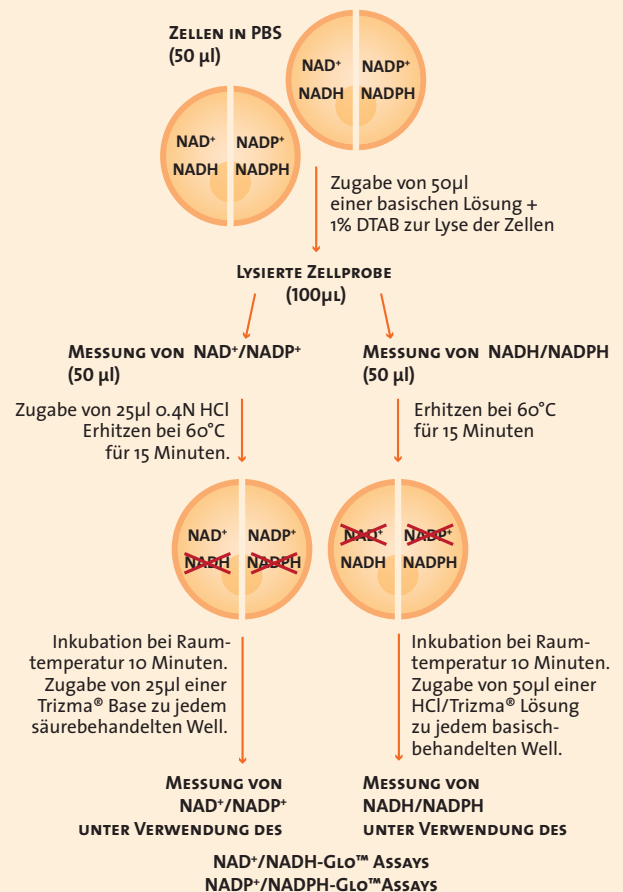
Assay-Prinzip

In Anwesenheit eines NAD-Cycling-Enzyms und eines NAD-Cycling-Substrats wird NAD⁺ zu NADH reduziert. Gleichzeitig wird das ProLuciferin-Reduktase-Substrat in einer gekoppelten Reaktion durch die Reduktase zu Luciferin umgewandelt, welches als Substrat für die Ultra-Glo™ Luciferase dient. Alle Komponenten sind in einem Reagenz enthalten, welches direkt zu den Zellen gegeben wird. Der Assay ist lytisch, so dass nach

Assay-Prinzip des NAD/NADH-Glo™ Assays und NADP/NADPH-Glo™ Assays



Schematische Darstellung der Einzelbestimmung von a) NAD⁺ und NADH und b) NADP⁺ und NADPH durch Basen- (links) bzw. Säurebehandlung der Zellen (rechts).

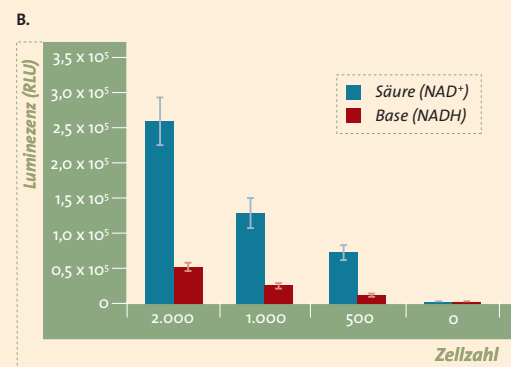
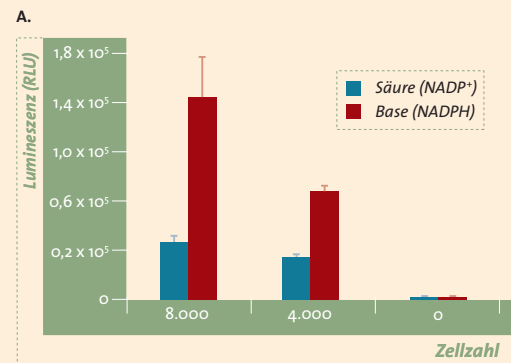


Reagenzzugabe der Gesamtgehalt an zellulärem NAD^+ und NADH im Multi-Well Format gemessen werden kann. Ein zusätzliches Protokoll ermöglicht die separate Messung von NAD^+ und NADH und somit die Kalkulation des Verhältnisses von NAD^+ zu NADH . Aufgrund der gekoppelten enzymatischen Umwandlungsreaktion wird eine stetige Zunahme des Lumineszenzsignals nach direkter Zugabe des $\text{NAD}/\text{NADH-Glo}^{\text{TM}}$ Detection Reagenz gemessen. Das Lumineszenzsignal verhält sich nach einer Inkubationszeit von 30 bis 60 Minuten direkt proportional zu dem NAD^+ - und NADH -Gehalt der Probe im linearen Messbereich des Assays.

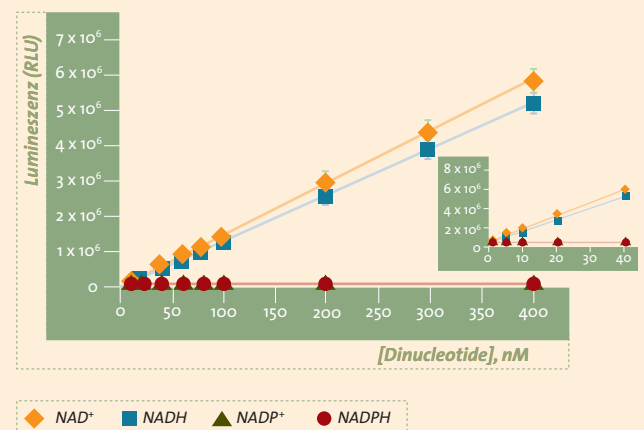
Assay-Merkmale

Assay-Typ	Lumineszent
Marker	NAD^+ und NADH
Anwendung	Nachweis der Veränderung des zellulären Gehalts an Gesamt- NAD^+ und NADH sowie des NAD/NADH -Verhältnisses oder als Einzelbestimmung, Screening von Inhibitoren in einer enzymatischen Reaktion oder direkt in den Zellen im High-Throughput-Format.
ZellTyp/Probe	Zelllinien und Enzympräparationen
Durchführung	Homogener 1-Schritt-Assay. Bestimmung des Gesamtgehalts an NAD^+ und NADH , Einzelbestimmung und Berechnung des Verhältnisses von NAD^+ und NADH .
Sensitivität und Linearität	Der $\text{NAD}/\text{NADH-Glo}^{\text{TM}}$ Assay detektiert 10 nM bis 400 nM mit einem maximalen Assay Fenster ≥ 100 (Signalhintergrundverhältnis).
Robust	Z'-Faktor $> 0,7$

Separate Messung des A) $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ und B) NAD^+/NADH Gehalts nach Säure-/Basebehandlung der Zellen.



Linearer Bereich und Spezifität des $\text{NAD}^+/\text{NADH-Glo}^{\text{TM}}$ Assays



$\text{NAD}^+/\text{NADH-Glo}^{\text{TM}}$ wurde zu ansteigenden Konzentrationen an gereinigten Dinucleotiden gegeben. Der Assay detektiert ausschließlich nur NAD^+ und NADH , nicht aber die phosphorylierten Formen NADP^+ und NADPH .

IV Oxidativer Stress

Glutathion ist das bedeutendste und stärkste Antioxidans in der Zelle. Zusätzlich ist Glutathion an der Biotransformation der Phase II beteiligt. Es kann in der reduzierten Form als Monomer (GSH) oder in der oxidierten Form als Dimer (GSSG) vorliegen. Das Verhältnis von reduziertem GSH zu oxidiertem GSSG ist ein Indikator für oxidativen Stress, der zu Apoptose oder Zelltod führen kann. Als Folge können akute, degenerative Erkrankungen wie Schlaganfall, Arteriosklerose, Diabetes, Alzheimer und Parkinson entstehen. Erkenntnisse über den Einfluss des Glutathion-Gehaltes auf zelluläre Signalwege bieten neue Ansätze für die Therapierbarkeit von Alterungsprozessen und degenerativen Erkrankungen.

Glutathion besteht aus den drei Aminosäuren Glutaminsäure, Cystein und Glycin. Neben der Funktion als Hauptbestandteil des reduktiven Pools, stellt GSH vermutlich die wichtigste Reserve für die Aminosäure Cystein dar.

Zum Schutz vor oxidativem Stress z.B. durch reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS) wird Glutathion oxidiert und geht von seiner reduzierten monomeren Form GSH in seine oxidierte dimere Form GSSG über. Durch die Glutathion-Reduktase werden unter Energieverbrauch aus GSSG wieder zwei Moleküle

GSH gebildet. Im Körper liegt zu 98% die reduzierte Form GSH vor.

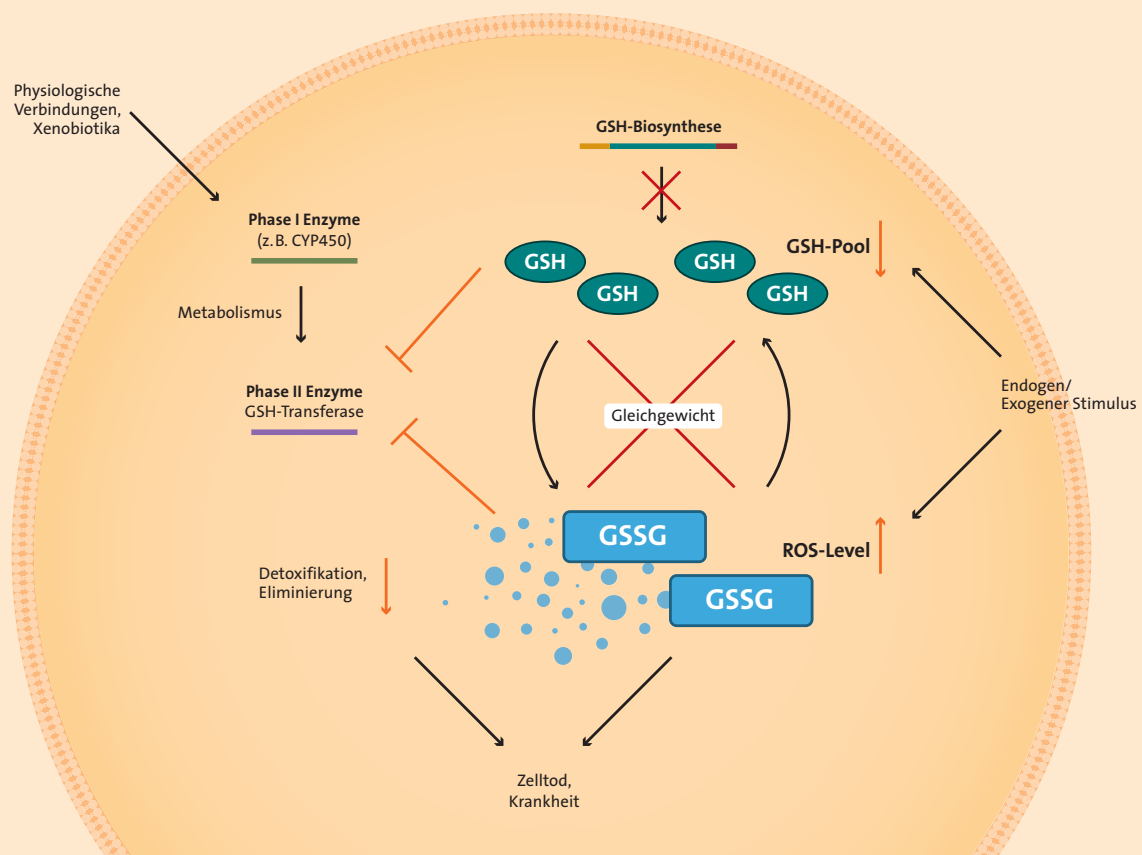
Promega bietet zwei Assays für die Analyse von GSH und einen Assay zur Bestimmung des H_2O_2 - Gehaltes an:

1. **GSH-Glo™ Glutathione Assay** für die quantitative Bestimmung von reduziertem GSH.
2. **GSH/GSSG-Glo™ Assay** für die Messung des Gesamt-Glutathion-Gehalts (GSH+GSSG) sowie für die Messung von oxidiertem GSSG. Das GSH:GSSG-Verhältnis dient als Indikator für den Redox-Status einer Säugerzelle oder eines Gewebes. Es ist abhängig vom verwendeten Zelltyp und liegt unter physiologischen Bedingungen üblicherweise bei 50:1 bis 100:1. Änderungen des GSH:GSSG-Verhältnisses erlauben konkretere Aussagen über mögliche Stressbedingungen und Toxizitätsmechanismen in der Zelle oder im Zellverband.
3. **ROS-Glo™ H_2O_2 Assay** für die Messung der reaktiven Sauerstoffspezies (H_2O_2) in Zellen.

GSH-Glo™ Glutathione Assay

GSH/GSSG-Glo™ Assay

ROS-Glo™ H_2O_2 Assay



ROS-Glo™ H₂O₂ Assay

Zellbasiert und biochemisch

Anwendung

Messung der reaktiven Sauerstoffspezies Wasserstoffperoxid (H₂O₂) in Zellen oder enzymatischen Reaktionen. Der Assay dient zur Identifikation von Testsubstanzen, welche die Menge an reaktiven Sauerstoffspezies in der Probe verändern.

Assay-Beschreibung

Der ROS-Glo™ H₂O₂ Assay ist ein homogener, lumineszenter 2-Schritt-Assay, der in weniger als 2 Stunden durchgeführt werden kann. Das ROS-Glo H₂O₂-Substrat reagiert direkt mit H₂O₂, ohne dass Meerrettichperoxidase (HRP) als Kopplungsenzym benötigt wird. Dadurch werden falsch-positive Treffer nahezu ausgeschlossen.

Derselbe Assay ist sowohl für biochemische als auch für zellbasierte Anwendungen im lytischen wie nichtlytischen Format geeignet. Seine geringe Rate an falsch-positiven Treffern, hohe Signalstabilität und Kompatibilität mit automatisierten Hochdurchsatzverfahren macht ROS-Glo™ zum idealen Assay für das Small molecule screening.

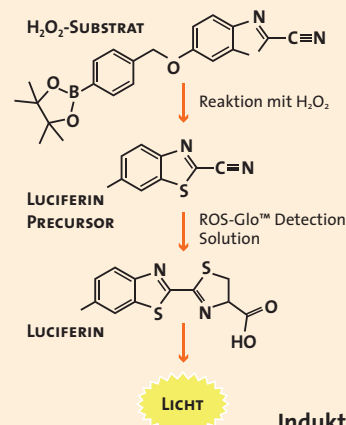
Assay-Prinzip

Der ROS-Glo™ Assay setzt ein Substrat ein, das direkt mit H₂O₂ zu einem Vorläufer von Luciferin reagiert. Nach Zugabe von ROS-Glo™ Detection Solution wird der Vorläufer zu Luciferin umgewandelt und reagiert mit der rekombinanten Ultra-Glo™ Luciferase unter Aussendung von Licht. Das Lichtsignal ist proportional zur H₂O₂-Menge.

Assay-Merkmale

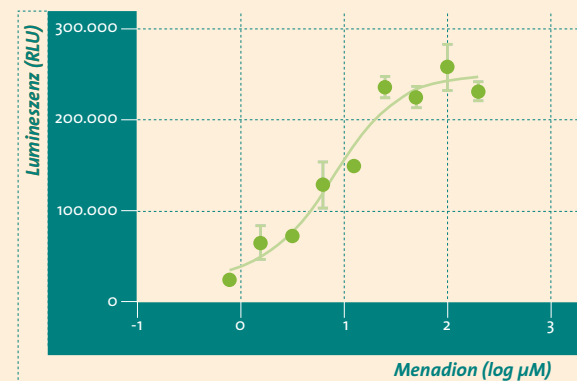
Assay-Typ	Lumineszenter homogener 2-Schritt-Assay, Basiert nicht auf Meerrettichperoxidase.
Marker	H ₂ O ₂
Anwendung	Messung der reaktiven Sauerstoffspezies Wasserstoffperoxid. Multiplexing mit anderen zellbasierten Assays.
Probenmaterial	Zellen, Enzyme, Niedermolekulare Substanzen
Zeitaufwand	2 Stunden
Robust	HTS-geeignet. Skalierbar von 96–384-Well Format

ROS-Glo™ H₂O₂ Assay



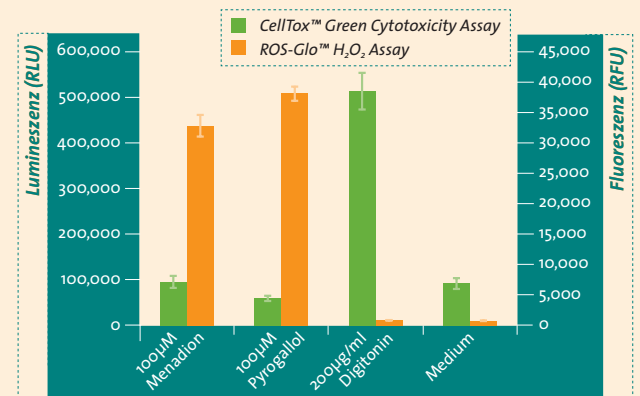
Zellen, die H₂O₂ enthalten, wurden mit dem H₂O₂-Substrat versetzt. H₂O₂ oxidiert das Substrat zu einem Vorläufer von Luciferin. Nach Zugabe eines zweiten Reagenzes, das Ultra-Glo™ Luciferase, ATP und D-Cystein enthält, wird der Vorläufer in Luciferin umgewandelt. Der Nachweis von Luciferin erfolgt über eine Luciferase-Reaktion.

Induktion von ROS in Zellen



K562 Zellen in 384-Well-Platten wurden mit zunehmenden Konzentrationen an Menadione behandelt. ROS-Glo™ Detection Solution wurde der Reaktion hinzugefügt, für weitere 20 Minuten inkubiert und die Lumineszenz gemessen.

ROS-Glo™ H₂O₂ Assay kombiniert mit CellTox™ Green



HepG2 Zellen wurden in einer Dichte von 2000 Zellen/Well in einer 384-Well-Platte ausgesät und nach 12 Stunden mit verschiedenen Testsubstanzen für 2 Stunden inkubiert. Der CellTox™ Green Farbstoff (RFU) und das H₂O₂-Substrat wurden zu Beginn der Behandlung zugegeben und anschließend das ROS-Glo Detection Reagenz (RLU).

GSH-Glo™ Glutathione Assay

Zellbasiert

Anwendung

Quantifizierung von reduziertem Glutathion (GSH) in Zellen oder Gewebeextrakten als Indikator für Zellviabilität; Screening von Wirkstoffen zur Regulation des GSH-Gehalts in Zellen, Geweben oder Blutproben.

Assay-Beschreibung

Der **GSH-Glo™ Assay** ist ein sensitiver, lumineszenter 2-Schritt-Assay, der sich für HTS-Anwendungen eignet und eine einfache und schnelle Alternative zu den herkömmlichen colorimetrischen und fluoreszenzbasierten Methoden darstellt. Da die Zellen nicht transferiert werden, minimiert sich der Verlust von Glutathion im Vergleich zu konventionellen Assays. Interferenzen durch oxidiertes Glutathion (GSSG) oder reduzierenden Substanzen sind ausgeschlossen.

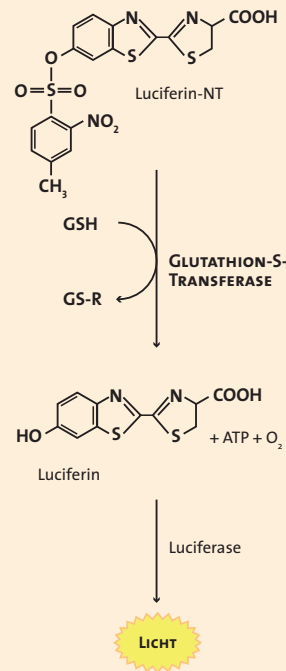
Assay-Prinzip

Der Assay koppelt die Reaktion der Glutathion-S-Transferase (GST) an die lichterzeugende Luciferin-Reaktion. Dabei löst GST eine nicht-funktionelle Gruppe von einem Luciferin-Derivat und koppelt diese an das reduzierte Glutathion. Das freigewordene Luciferin geht in die Luciferase-Reaktion ein. Das Lichtsignal ist dabei direkt proportional zu dem GSH-Gehalt in der Zelle. Das Medium der Probe muss abgenommen werden. Proteine im Lysat müssen jedoch nicht aufwändig abgetrennt werden. Ein stabiles Lumineszenz-Signal kann in weniger als 60 Minuten mit einem exzellenten Signal-Hintergrund-Verhältnis detektiert werden.

Assay-Merkmale

Assay-Typ	Lumineszent (Glow-Type)
Marker	GSH
Anwendung	Quantifizierung von reduziertem Glutathion (GSH)
Probenmaterial	Zellen, Gewebeextrakte oder Blutproben
Durchführung	Homogen, 2-Schritt-Assay
Zeitaufwand	45 Minuten

Schematische Darstellung des GSH-Glo™ Glutathione Assays



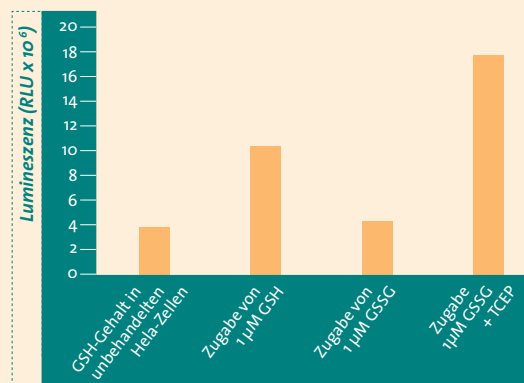
Schritt 1:

- Lyse der Säugerzellen in Anwesenheit von Luciferin-NT und Glutathion-S-Transferase
- Bildung von Luciferin in Abhängigkeit der GSH-Konzentration

Schritt 2:

- Luciferin-Nachweis über die Luciferase-Reaktion
- Licht-Signal ist proportional zur Konzentration an GSH in der Zelle

Messung von reduziertem Glutathion in Hela-Zellen



Der GSH-Gehalt wurde mit dem GSH-Glo™ Assay in unbehandelten Hela-Zellen und nach Zugabe von GSH, GSSG bzw. GSSG, das mit dem reduzierenden Agens TCEP behandelt wurde, bestimmt. Der GSH-Glo™ Assay misst ausschließlich reduziertem Glutathion (GSH) und wird durch die Anwesenheit von oxidiertem Glutathion (GSSG) nicht beeinflusst. Durch Zugabe eines reduzierenden Agens (z. B. TCEP) kann der Gesamt-Glutathion Gehalt durch die Umwandlung von GSSG zu GSH gemessen werden.

Geeignet für
3D-Zellkulturen

GSH/GSSG-Glo™ Assay

Zellbasiert

Anwendung

Bestimmung des GSH/GSSG-Verhältnisses in Zellen als Indikator für oxidativen Stress;
Quantifizierung des Gesamt-Glutathions (reduziert und oxidiert) in Zellen als Indikator für Zellviabilität.

Assay-Beschreibung

Der Assay erlaubt die Quantifizierung von drei Parametern:

1. Gesamt-Glutathion (GSH + GSSG)
2. oxidiertes Glutathion (GSSG)
3. Verhältnis von GSH:GSSG

Da die Zellen nicht transferiert werden, minimiert sich der Verlust von GSH und GSSG im Vergleich zu konventionellen Assays.

Assay-Prinzip

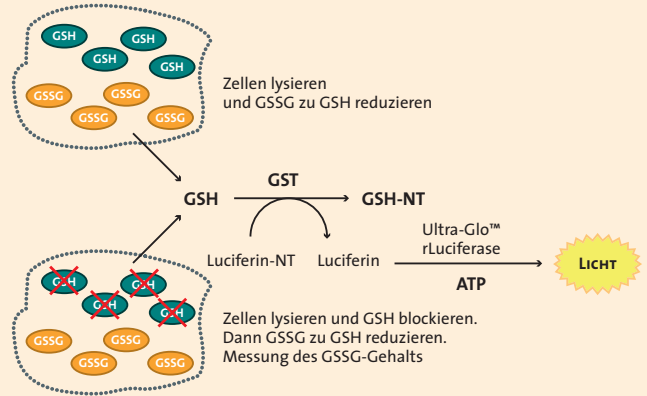
Der GSH/GSSG-Glo™ Assay lässt sich einfach an 96- und 384-Well-Formate anpassen.

Die Bestimmung von Gesamt-Glutathion und GSSG wird in zwei parallelen Reaktionen durchgeführt. Der GSH-Gehalt kann durch Substraktion des GSSG-Gehalts vom Gesamt-Glutathion-Gehalt errechnet werden.

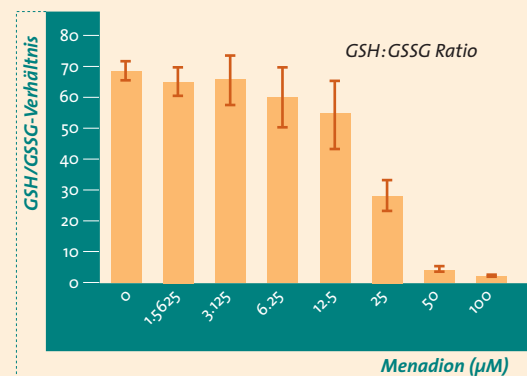
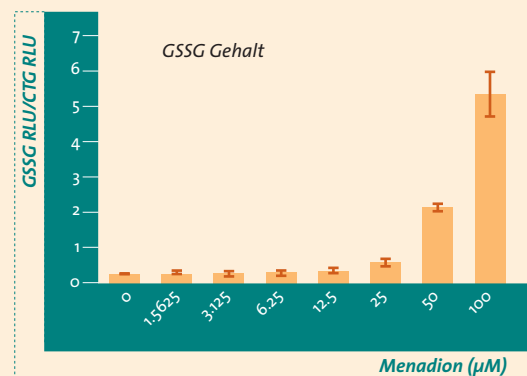
1. Im ersten Ansatz wird nach Zugabe des *Total Glutathione Reagent*, das gesamte zelluläre Glutathion (GSSG und GSH) in GSH umgewandelt.
2. Im parallelen zweiten Ansatz wird nach Zugabe des *Oxidized Glutathione Reagent* zuerst das zelluläre GSH blockiert. Das GSSG bleibt intakt und wird dann zu GSH reduziert.

In beiden Ansätzen wird das zurückbleibende GSH an die licht-erzeugende Luciferase-Reaktion gekoppelt. Die Glutathion-S-Transferase (GST) im Reagenz löst dabei eine nicht-funktionelle Gruppe von einem Luciferin-Derivat und koppelt diese an das reduzierte Glutathion. Das freigewordene Luciferin geht in die Luciferase-Reaktion ein, das Lichtsignal ist dabei direkt proportional zum GSH-Gehalt in der Zelle. Zur Bestimmung von reduzierten Glutathion (GSH) wird der GSSG-Gehalt vom Gesamt-Glutathion-Gehalt subtrahiert.

Gesamt Glutathion-Messung



Messung von oxidativem Stress in A549 Lungenkarzinom-Zellen



Oben: 5.000 Zellen/Well wurden mit einer Verdünnungsreihe von Menadion behandelt (60 Minuten, 37°C). Nach Messung von GSSG wurde gegen eine Viabilitätsmessung mit CellTiter-Glo™ (CTG) normalisiert, um den Einfluß von toxischen Effekten durch Menadion und experimentellen Schwankungen auszugleichen. Menadion wirkt in Konzentrationen > 49 µM bei längerer Inkubationszeit toxisch.

Unten: Bestimmung des GSH/GSSG-Verhältnisses durch Messung von GSSG und Gesamt-Glutathion in A549-Zellen. Es ist zu erkennen, dass das Menadion bei höheren Konzentrationen einen deutlichen Effekt auf den Redox-Status der Zellen hat.

Assay-Merkmale

Assay-Typ	Lumineszent (Glow-Type)
Marker	Gesamt-Glutathion und GSSG
Anwendung	Bestimmung des GSH/GSSG-Verhältnisses
Probenmaterial	Zellen, Gewebeeextrakte oder Blutproben
Durchführung	Homogen, 2-Schritt-Assay automatisierbar
Zeitbedarf	45 Minuten

V Epigenetische Assays

Als „Epigenetik“ bezeichnet man die Veränderung der Genexpression durch Mechanismen, die nicht in der DNA-Sequenz festgelegt sind. Diese Regulationsmechanismen können einzelne Gene und/oder Genabschnitte an- und abschalten, ohne dass sich die Abfolge der DNA ändert. Es entstehen übergeordnete Expressionsmuster, die auf die Tochterzellen vererbt werden können. Zu den wichtigsten epigenetischen Regulationsmechanismen zählen die DNA-Methylierung, die RNA-Interferenz und die Modifikation der Histone.

Ein Ziel der heutigen Forschung ist es, die epigenetischen Regulationsvorgänge während der Zelldifferenzierung zu verstehen. Dieses Wissen bildet die Grundlage für neue Therapiekonzepte („epigenetische Therapie“) zur Behandlung von Krebs, z.B. des Myelo-Sysplastischen Syndroms und auch für die Diagnose von Krebs und Erbkrankheiten.

Ein vielversprechendes therapeutisches Target bei der Behandlung von Tumorerkrankungen sind die Histon-Deacetylasen (HDAC).

HDACs und die NAD⁺-abhängigen Sirtuine (Klasse III Histon-Deacetylasen) sind Histon-modifizierende Enzyme, die die Deacetylierung von Lysinresten in Histonen katalysieren und damit deren Aktivität beeinflussen. Sie spielen eine bedeutende Rolle bei zahlreichen biologischen Prozessen. HDAC-Inhibitoren wie *Anti-Cancer Agents* arretieren den Zellzyklus in Tumorzellen, tragen zur Tumordifferenzierung bei und induzieren Apoptose. Die Entwicklung neuer HDAC-selektiver Inhibitoren ist ein zentrales Thema in der Grundlagen- und angewandten Forschung.

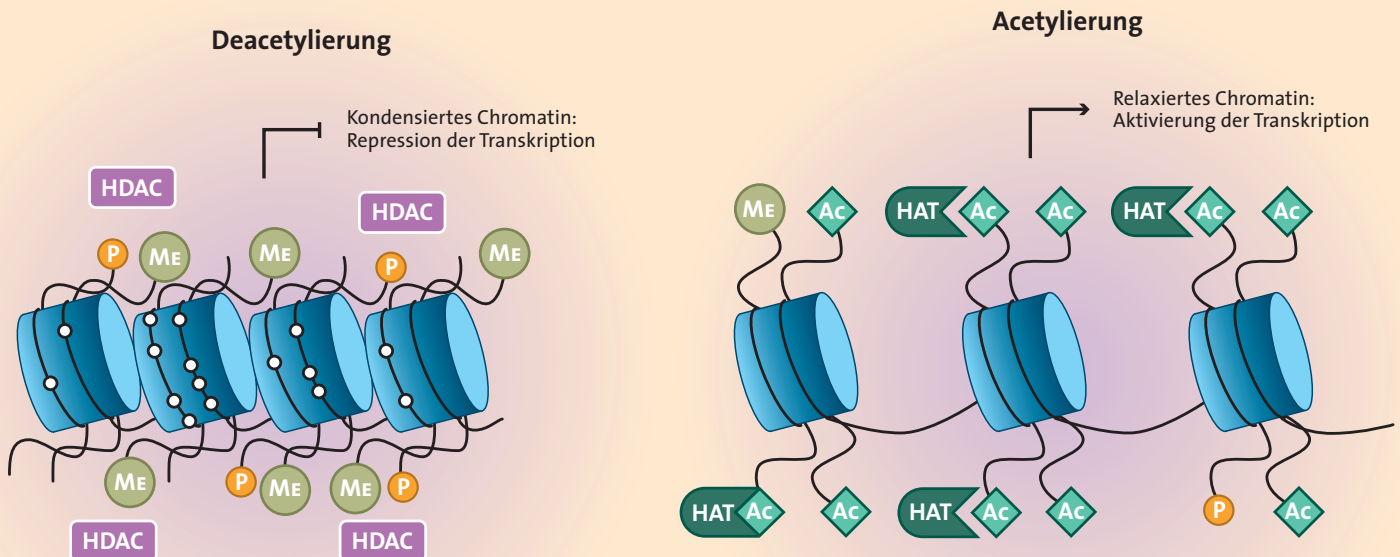
HDAC-Glo™ 2 Assay

HDAC-Glo™ Class IIa Assay

HDAC-Glo™ I/II Assay & HDAC-Glo™ I/II Screening Systems

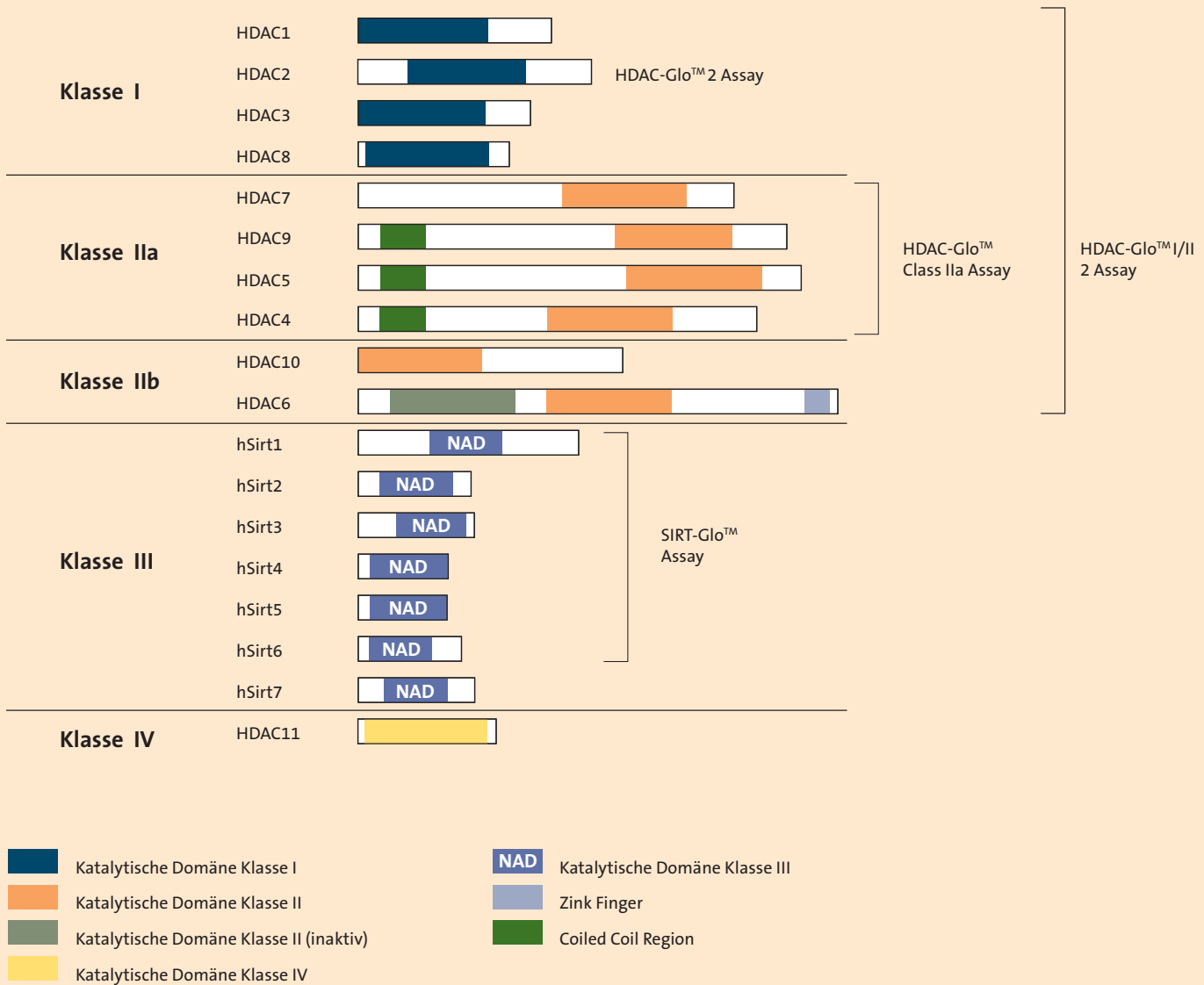
SIRT-Glo™ Assays and Screening Systems

UDP-Glo™ Glycosyltransferase Assay



Eine Aktivierung der Histon-Deacetylasen (HDACs) bewirkt, dass Lysinreste am N-terminalen Ende der Histone deacetyliert werden. Die damit verbundene Ladungsänderung des Lysinrests führt zur Kondensation der Chromatinstruktur und darüber hinaus zur Repression der Transkription. Die Histon-Acetyltransferasen (HATs) kehren den Prozess durch Acetylierung der Lysinreste um. Dadurch relaxiert das Chromatin und wird somit zugänglich für Transkriptionsfaktoren.

Histon-Deacetylasen (HDACs)-Klassen in höheren Eukaryoten



Einteilung der HDAC-Klassen und schematische Darstellung der Domänenstruktur. Zellbasierte und/oder biochemische Assays für die selektive Aktivitätsmessung einzelner HDAC-Klassen und spezifischen Nachweis von HDAC2 sind eingezeichnet.

(Modifiziert von: Hess-Stumpp, H. et al. (2007) MS-275, a potent orally available inhibitor of histone deacetylases--the development of an anticancer agent. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39 (7-8):1388-1405.)

HDAC-Glo™ 2 Assay

Zellbasiert/Biochemisch

Anwendung

Messung der HDAC2-Enzymaktivität in Zellen, Extrakten oder von aufgereinigten Enzympräparaten.

Assay-Beschreibung

Der HDAC-Glo™ 2 Assay wird eingesetzt, um spezifisch die Aktivität der Histon-Deacetylase 2 (HDAC2) in Zellen, Extrakten oder von aufgereinigten Enzymen zu bestimmen. Dieser lumineszente Assay ist bis zu 100x sensitiver als vergleichbare Messungen mit fluoreszenten Methoden. Der HDAC-Glo™ 2 Assay kann mit fluoreszenten zellbasierten Methoden zur gleichzeitigen Bestimmung von Zellviabilität und Zytotoxizität kombiniert werden.

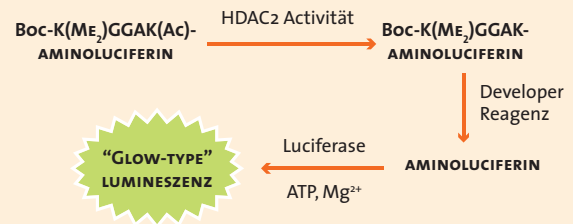
Assay-Prinzip

Der Assay basiert auf der enzymatischen Kopplung der HDAC2-Enzymaktivität an die Luciferase-Reaktion. Die Aktivität von HDAC2 wird über das Aminoluciferinderivat Boc-K(Me₂)GGAK-(AC)-Aminoluciferin bestimmt. Das Substrat wird deacetyliert, um das daraus resultierende Peptid für die proteolytische Spaltung zugänglich zu machen (Developer Reagenz). In Folge dient das freigesetzte Aminoluciferin als Substrat für die nachgeschaltete Luciferase-Reaktion. Die drei ablaufenden Enzymreaktionen (Deacetylase-, Proteolyse- und Luciferase-Reaktion) sind gekoppelt und laufen nahezu simultan ab. Die dabei entstehende Lumineszenz ist proportional zur Deacetylase-Aktivität.

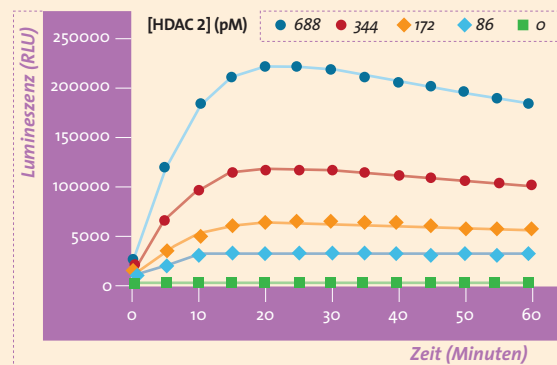
Assay-Merkmale

Assay-Typ	Lumineszent (Glow-Type)
Marker	Histon-Deacetylase 2 (HDAC2)
Anwendung	Bestimmung der HDAC2-Enzymaktivität
Ausgangsmaterial	Zellen, Extrakten oder aufgereinigtes/rekombinantes Enzym
Durchführung	Homogen, 1-Schritt Assay (1 x Reagenzzugabe), automatisierbar
Zeitbedarf	20–30 Minuten

HDAC-Glo™2 Assay Prinzip

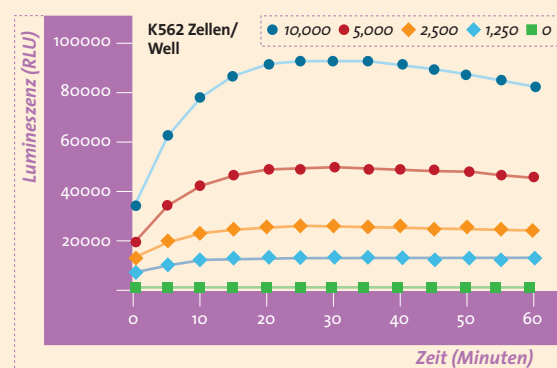


Bestimmung der HDAC2-Aktivität



Nach Zugabe des Assayreagenz zu HDAC2 Enzym wird ein Anstieg des Signals bis zur Einstellung des dynamischen Gleichgewichts gemessen. Das Signal bleibt für ca. 60 Minuten stabil.

Bestimmung der HDAC2-Enzym-Aktivität in Zellen



Die Zellen werden durch die Zugabe des Assayreagenz lysiert. Das dynamische Gleichgewicht der nahezu simultan ablaufenden Enzymreaktionen wird nach ca. 20 Minuten erreicht. Das Signal bleibt über einen längeren Zeitraum stabil (bis ca. 60 Minuten nach Zugabe des Assayreagenz).

HDAC-Glo™ Class IIa Assay

Zellbasiert/Biochemisch

Anwendung

Bestimmung der HDAC-Klasse IIa-Enzymaktivität in Zellen, Extrakten oder von aufgereinigten Enzympräparaten.

Assay-Beschreibung

Der **HDAC-Glo™ Class IIa Assay** wird eingesetzt, um selektiv die Aktivität der Histon-Deacetylasen (HDAC) der Klasse IIa (HDAC 4, 5, 7, 9) in Zellen, Extrakten oder von aufgereinigten Enzympräparaten zu bestimmen. Dieser lumineszente Assay ist bis zu 100x sensitiver als vergleichbare Messungen mit fluoreszenten Methoden. Der HDAC-Glo™ Class IIa Assay kann mit fluoreszenten zellbasierten Methoden zur gleichzeitigen Bestimmung von Zellviabilität und Zytotoxizität kombiniert werden.

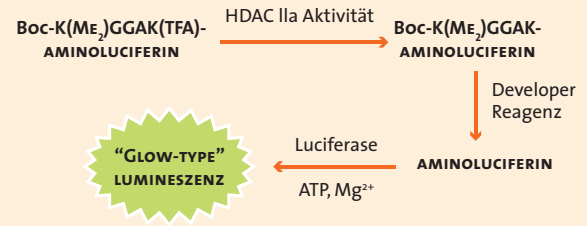
Assay-Prinzip

Der Assay basiert auf der enzymatischen Kopplung der HDAC-Aktivität mit der Luciferase-Reaktion. Die Aktivität der HDAC-Klasse IIa Enzyme wird über das Aminoluciferinderivat Boc-K(Me₂)GGAK(TFA)-Aminoluciferin bestimmt. Die Deacetylaseaktivität führt zur Abspaltung der Trifluoracetylenschutzgruppe (TFA). Das daraus resultierende Peptid wird zugänglich für die proteolytische Spaltung (Developer Reagenz), die zur Freisetzung von Aminoluciferin führt. Das Aminoluciferin dient als Substrat für die nachgeschaltete Luciferase-Reaktion. Die drei ablaufenden Enzymreaktionen (Deacetylase-, Proteolyse- und Luciferase-Reaktion) sind gekoppelt und laufen nahezu simultan ab. Die dabei entstehende Lumineszenz ist proportional zur Deacetylaseaktivität.

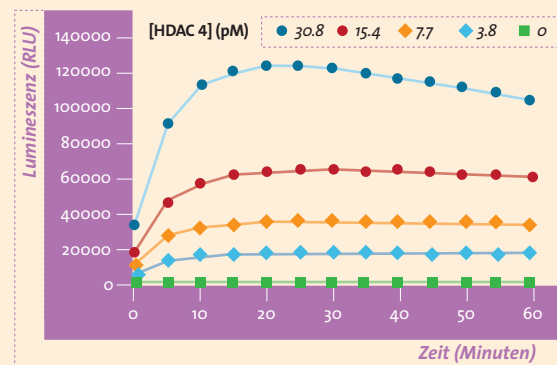
Assay-Merkmale

Assay-Typ	Lumineszent (Glow-Type)
Marker	HDAC Klasse-IIa Enzyme (HDAC 4, 5, 7, 9)
Anwendung	Bestimmung der HDAC-Klasse IIa-Enzymaktivitäten
Ausgangsmaterial	Zellen, Extrakten oder aufgereinigte/rekombinante Enzyme
Durchführung	Homogen, 1-Schritt Assay (1 x Reagenzzugabe), automatisierbar
Zeitbedarf	10–20 Minuten

HDAC-Glo™ Class IIa Assay Prinzip

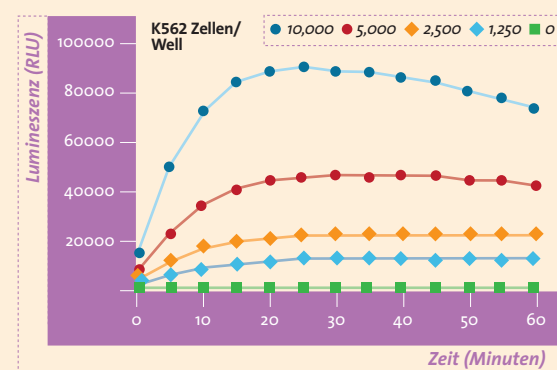


Messung der HDAC4-Aktivität



Das Signal bei der Aktivitätsmessung von aufgereinigtem HDAC4 zeigt innerhalb der ersten 10–15 Minuten einen Anstieg. Dann wird das dynamische Gleichgewicht der nahezu simultan ablaufenden Enzymreaktionen erreicht. Das Signal bleibt über einen längeren Zeitraum stabil (bis ca. 60 Minuten nach Reagenzzugabe).

Messung der HDAC-Aktivität der Klasse IIa in Zellen



Die Zellen werden durch die Zugabe des Assayreagenz lysiert. Das dynamische Gleichgewicht der nahezu simultan ablaufenden Enzymreaktionen wird nach ca. 15–20 Minuten erreicht. Signalstabilität bis ca. 60 Minuten nach Reagenzzugabe.

HDAC-Glo™ I/II Assays & Screening Systems

Zellbasiert

Anwendung

Bestimmung der HDAC-Klasse I und II Enzymaktivität;
Screening von HDAC-Inhibitoren in lebenden oder lysierten Zellen.

Assay-Beschreibung

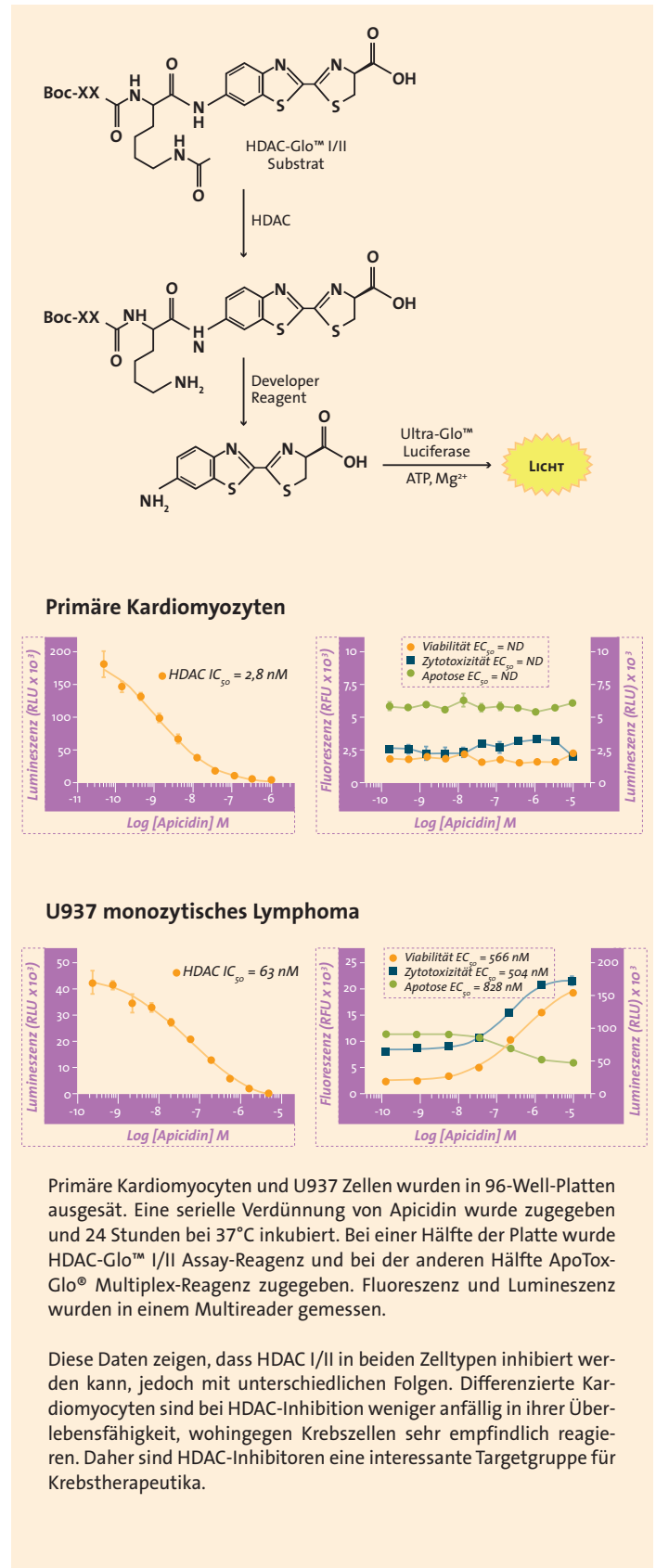
Der **HDAC-Glo™ I/II Assay** bestimmt die Aktivität von HDAC-Klasse I und II Enzymen aus Zellen, Extrakten oder aufgereinigten Enzymfraktionen. Die Assays sind 10- bis 100-Mal sensitiver als vergleichbare fluoreszente Messungen und erfordern weniger Einzelschritte sowie nur geringe Enzymmengen für ein sehr gutes Signal-Hintergrund-Verhältnis. Die lumineszenten HDAC-Assays können mit fluoreszenten zellbasierten Assays zur zeitgleichen Bestimmung von Viabilität und Zytotoxizität kombiniert werden.

Assay-Prinzip

Der Assay beruht auf der enzymatischen Kopplung der HDAC-Aktivität an die Luciferase-Reaktion. Die Reagenzien enthalten ein zellpermeables Peptidsubstrat, das aus einer acetylierten Lysin-Peptidsequenz aus Histon-4 besteht und an Aminoluciferin gekoppelt ist. Nach Deacetylierung des Lysinrestes durch HDAC-Enzyme wird das Peptid durch ein Developer-Enzym von Aminoluciferin abgespalten. Das Aminoluciferin dient als Substrat für die Ultra-Glo™ Luciferase. Das HDAC-vermittelte Lumineszenz-Signal ist proportional zur Deacetylase-Aktivität. Die Zellpermeabilität des Peptidsubstrates ermöglicht eine Real-Time Messung der HDAC-Inhibition und nachfolgende Analysen des Ansatzes. Als Kontrolle steht ein deacetyliertes Substrat zur Verfügung.

Assay-Merkmale

Assay-Typ	Lumineszent (Glow-Type)
Maker	HDAC-Enzymaktivität
Anwendung	Bestimmung von HDAC Klasse I und II Enzymaktivitäten
Ausgangsmaterial	Lysierte oder nicht-lysierte Zelllinien (primär, adhärent oder in Suspension)
Durchführung	Homogen, 1-Schritt-Assay, automatisierbar
Zeitbedarf	15–45 Minuten



Primäre Kardiomyocyten und U937 Zellen wurden in 96-Well-Platten ausgesät. Eine serielle Verdünnung von Apicidin wurde zugegeben und 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Bei einer Hälfte der Platte wurde HDAC-Glo™ I/II Assay-Reagenz und bei der anderen Hälfte ApoTox-Glo® Multiplex-Reagenz zugegeben. Fluoreszenz und Lumineszenz wurden in einem Multireader gemessen.

Diese Daten zeigen, dass HDAC I/II in beiden Zelltypen inhibiert werden kann, jedoch mit unterschiedlichen Folgen. Differenzierte Kardiomyocyten sind bei HDAC-Inhibition weniger anfällig in ihrer Überlebensfähigkeit, wohingegen Krebszellen sehr empfindlich reagieren. Daher sind HDAC-Inhibitoren eine interessante Targetgruppe für Krebstherapeutika.

SIRT-Glo™ Assays and Screening Systems

Biochemisch

Anwendung

Bestimmung der Sirtuin Enzymaktivität; Screening von SIRT-Inhibitoren.

Assay-Beschreibung

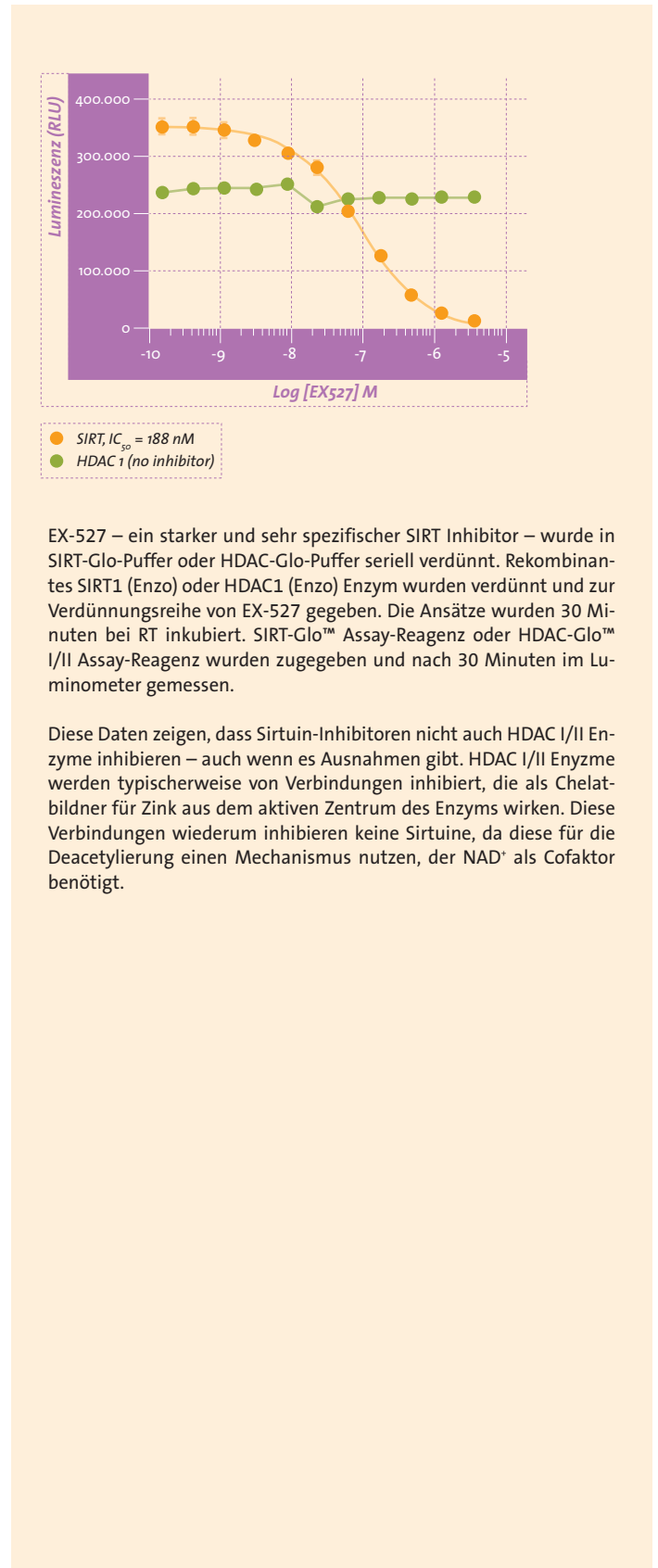
Bestimmung der Enzymaktivität von NAD⁺-abhängigen (Klasse III Histon-Deacetylasen) Sirtuinen (SIRT1-6). Dieser Assay ist als biochemischer Assay verfügbar.

Assay-Prinzip

Der Assay beruht – wie auch der HDAC-Assay – auf einer enzymatischen Kopplung der SIRT-Aktivität an die Luciferase-Reaktion. Die Reagenzien enthalten ein zellpermeables luminesgenes Peptidsubstrat, das die Lysin-Peptidsequenz von p53 enthält und an Aminoluciferin gekoppelt ist.

Assay-Merkmale

Assay-Typ	Lumineszent (Glow-Type)
Anwendung	Bestimmung von SIRT 1–6 Enzymaktivitäten
Ausgangsmaterial	aufgereinigte Enzyme
Durchführung	Homogen, 1-Schritt-Assay, automatisierbar
Zeit	15–45 Minuten



EX-527 – ein starker und sehr spezifischer SIRT Inhibitor – wurde in SIRT-Glo-Puffer oder HDAC-Glo-Puffer seriell verdünnt. Rekombinantes SIRT1 (Enzo) oder HDAC1 (Enzo) Enzym wurden verdünnt und zur Verdünnungsreihe von EX-527 gegeben. Die Ansätze wurden 30 Minuten bei RT inkubiert. SIRT-Glo™ Assay-Reagenz oder HDAC-Glo™ I/II Assay-Reagenz wurden zugegeben und nach 30 Minuten im Lumimeter gemessen.

Diese Daten zeigen, dass Sirtuin-Inhibitoren nicht auch HDAC I/II Enzyme inhibieren – auch wenn es Ausnahmen gibt. HDAC I/II Enzyme werden typischerweise von Verbindungen inhibiert, die als Chelatbildner für Zink aus dem aktiven Zentrum des Enzyms wirken. Diese Verbindungen wiederum inhibieren keine Sirtuine, da diese für die Deacetylierung einen Mechanismus nutzen, der NAD⁺ als Cofaktor benötigt.

UDP-Glo™ Glycosyltransferase Assay

Biochemisch

Anwendung

Untersuchung der Glycosyltransferase-Aktivität und deren Regulierung durch den Nachweis von UDP. Screening von selektiven und potenziellen Glykosylierungsinhibitoren.

Assay-Beschreibung

UDP-Zucker sind die häufigsten Zucker-Donoren für glykosylierende Enzyme (z.B. UDP-Galactose, UDP-Glucose, UDP-GlcNac, UDP-Glucuronsäure). Der **UDP-Glo™ Glycosyltransferase Assay** basiert auf dem Nachweis von UDP als universellem Reaktionsprodukt der Glycosyltransferase (GT)-Aktivität. Dieser homogene, biolumineszente Assay zeichnet sich mit einer Signalstabilität von 100% nach 150 Minuten und einem 2-fachen Signalhintergrundverhältnis beim Nachweis von 10 nM UDP insbesondere durch seine Sensitivität und Robustheit aus. Der Assay ist schnell durchzuführen und erfordert keine Antikörper oder zusätzliche Substrate. Durch die hohe Flexibilität des Assay-Formates können markierte, native, gereinigte oder an Affinitäts-Beads gebundene Glycosyltransferasen eingesetzt werden.

Assay-Prinzip

Nach Ablauf der GT-Reaktion und Zugabe des Reagenzes wird in nur einem Schritt UDP in ATP konvertiert und dieses unter Ausenden von Licht in der Luciferase-Reaktion umgesetzt. Ein stabiles Lumineszenzsignal kann nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten gemessen werden. Das generierte Lumineszenzsignal ist proportional zur Konzentration an UDP in der Probe und kann in einem Bereich von wenigen nM bis 20 µM nachgewiesen werden. Der Assay ist resistent gegen chemische Einflüsse und eignet sich daher besonders für das Screening von GT-Inhibitoren.

Assay-Merkmale

Assay-Typ	Lumineszenter homogener 1-Schritt Assay
Marker	UDP
Anwendung	Untersuchung der Glycosyltransferase-Aktivität und deren Regulierung. Screening von selektiven und potenziellen Glykosylierungsinhibitoren.
Probenmaterial	Markierte, native, gereinigte oder an Affinitäts-Beats gebundene Glycosyltransferasen
Zeitaufwand	60 Minuten
Sensitivität	Nachweis von 0,1 – 0,5 pmol UDP mit einem 2-fachen Signalhintergrundverhältnis
Robust	HTS-geeignet, 96–1536 Well-Format

UDP-Glo™ Glycosyltransferase Assay-Prinzip

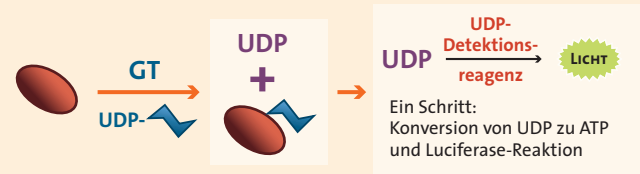
Einfaches „Add and Read“ Format:
Keine Radioisotope
Keine Produktseparation
Keine HPLC

96-Well Platte

25 µl GT-Reaktion
(UDP-Zucker-Donor + Akzeptor-Substrat + GT)
30–60 Minuten Inkubation

25 µl UDP-Detektionsreagenz
60 Minuten Inkubation

Messung der Lumineszenz



UDP-produzierende Reaktion

Reaktionsprodukt

UDP-Detektionsassay

GT Glycosyltransferase
Glycosyltransferase-Substrat

UDP UDP-Zucker-Substrat

Der **UDP-Glo™ Glycosyltransferase Assay** eignet sich besonders für das Screening von selektiven und potenziellen Glycosyltransferase-Inhibitoren.

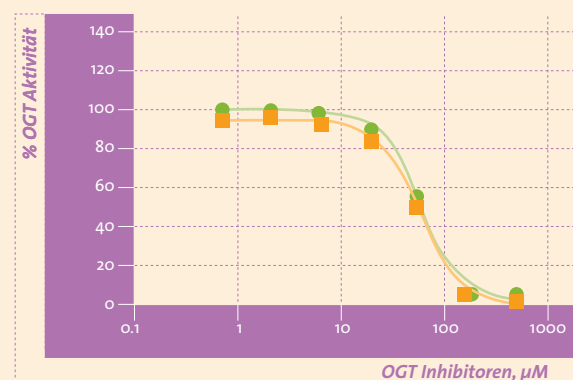
O-GlcNAc Transferase-Reaktion (25 µl)

50 µM OGT Peptid-Substrat
100 µM UDP-N-Acetylglucosamin
2,5 ng OGT
0–500 µM Inhibitoren
60 Minuten Inkubation

25 µl UDP-Detektionsreagenz
60 Minuten Inkubation

Messung der Lumineszenz

Dosis-Wirkungsbeziehung von OGT-Inhibitoren



■ S TO78925 IC₅₀ = 55,5 µM
● S TO45849 IC₅₀ = 57,7 µM

VI Zellsignalwege

Die Untersuchung von Zellsignalwegen ist von besonderer Bedeutung für das Verständnis zellulärer Vorgänge. Hierbei sind viele Proteine und sekundäre Botenstoffe beteiligt, die über Signalkaskaden extrazelluläre Informationen umwandeln und in das Zellinnere weiterleiten. Darüber werden zelluläre Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose gesteuert. Die Induktion der Signalkaskaden erfolgt im Allgemeinen über die Bindung von extrazellulären Liganden wie Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Neurotransmittern oder Hormonen an die entsprechenden Zellrezeptoren. Die G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) stellen dabei eine der größten Rezeptorfamilien innerhalb des humanen Genoms dar. Sie sind Angriffspunkt bei mehr als der Hälfte aller markteingeführten Wirkstoffe. Die Hauptklasse der GPCRs beeinflusst den zellulären Gehalt an cAMP, ein sekundärer Botenstoff, der zahlreiche Effektorsysteme und u.a. die Gentranskription beeinflusst. Nach Behandlung von Zellen mit GPCR-Modulatoren kann der cAMP-Gehalt zellbasiert mit dem cAMP-Glo™ Assay bestimmt werden. Der sekundäre Botenstoff cAMP aktiviert die Proteinkinase-A (PKA), die wiederum über Proteinphosphorylierung zur Signalweiterleitung beiträgt. Proteinphosphorylierung ist die häufigste post-translational Modifikation, die zur Weiterleitung und Amplifikation primärer Signale führt. Deshalb nehmen sowohl Kinasen als auch

Phosphatasen eine Schlüsselrolle in vielen Signalwegen ein. Die Aktivitäten gereinigter Kinasen bzw. ATPasen können mit dem ADP-Glo™- oder Kinase-Glo®-Assay bestimmt werden. Die Phosphodiesterasen (PDEs) stellen eine weitere wichtige Gruppe innerhalb der Signaltransduktion dar. Sie regulieren über die Degradation der sekundären Botenstoffe cAMP und cGMP die Signaltransduktion. Die Aktivität gereinigter PDEs kann mit dem PDE-Glo™ Phosphodiesterase Assay bestimmt werden. GTPasen spielen eine entscheidende Rolle bei einer Vielzahl von Zellfunktionen, wie z.B. der Signaltransduktion, Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Modulation des Zytoskeletts und Zellbeweglichkeit. GTPasen fungieren in der Signalweiterleitung als molekulare „Schalter“, da sie durch alternierende Bindung der Nukleotide GDP und GTP aktiviert oder inaktiviert werden können. Eine Deregulierung oder Mutation dieser Proteine ist die Ursache einer Vielzahl pathologischer Erkrankungen.

cAMP-Glo™ Max Assay

ADP-Glo™ Kinase Assay

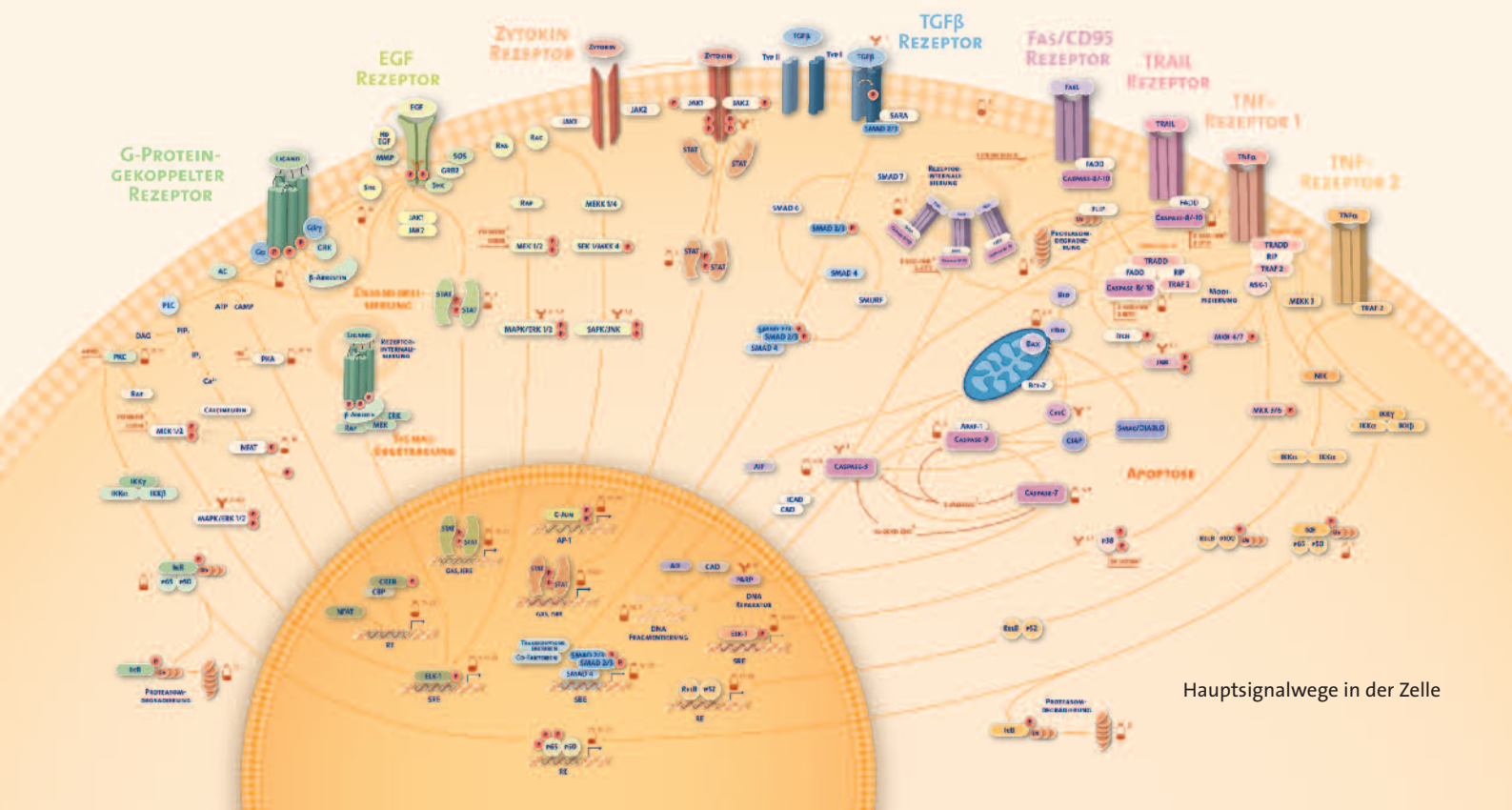
ADP-Glo™ Max Assay

Kinase-Glo® Luminescent Kinase Assay

AMP-Glo™ Assay

PDE-Glo™ Phosphodiesterase Assay

GTPase-Glo™ Assay



Hauptsignalwege in der Zelle

cAMP-Glo™ Max Assay (GPCR-Signalweg)

Zellbasiert & Biochemisch

Anwendung

Hochdurchsatz-Analysen von Wirkstoff-Bibliotheken für die Identifizierung von Modulatoren der GPCR-Aktivität; Quantifizierung des cAMP-Levels in einer Vielzahl von Zelllinien.

Assay-Beschreibung

Der **cAMP-Glo™ Max Assay** ist ein robuster, hochempfindlicher Biolumineszenztest zur Messung des cAMP-Gehalts in Zellen (Suspensionszellen, adhären oder gefrorenen Zellen). Der Assay im Multiwell-Format ist speziell für Hochdurchsatzanwendungen konzipiert. Bereits nach einer halben Stunde ist die maximale Signalstärke erreicht. Das ausgezeichnete Signal-Hintergrund-Verhältnis garantiert ein breites Messfenster bei höchster Sensitivität. Die Lyse und die anschließende cAMP-Reaktion werden durch Zugabe des cAMP-Glo™ ONE-Puffers initiiert.

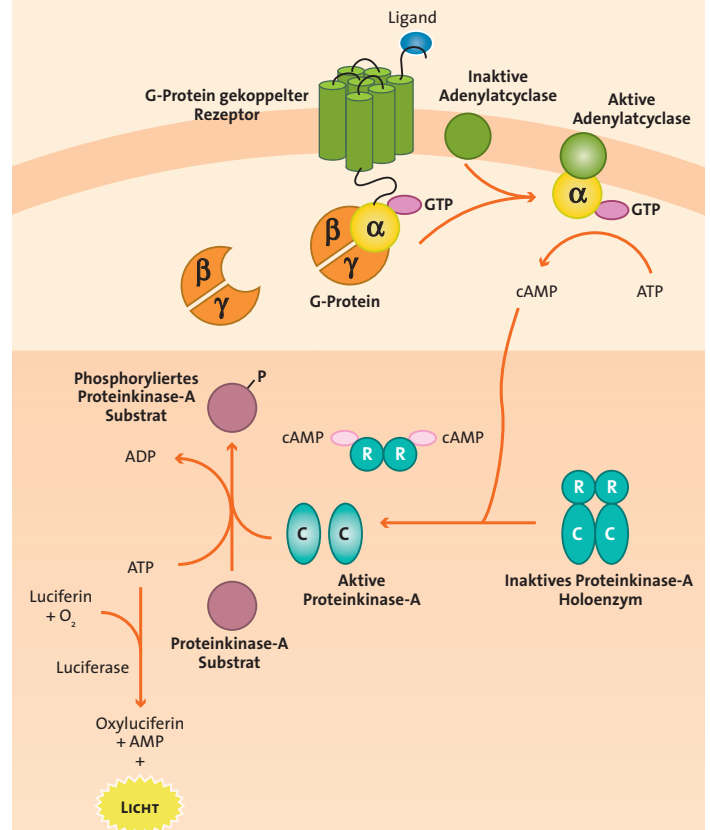
Assay-Prinzip

Der **cAMP-Glo™ Max Assay** lässt sich in zwei Schritte unterteilen: Durch Zugabe des cAMP-Glo™ ONE-Puffers werden die Zellen lysiert, um das intrazelluläre cAMP freizusetzen. Das im Reagenz enthaltene Proteinkinase-A (PKA) Holoenzym wird durch Bindung von cAMP aktiviert. Die aktive PKA verbraucht ATP zur Substratphosphorylierung, wodurch die ATP-Konzentration abnimmt. Mit der Zugabe von Kinase-Glo®-Reagenz wird die Reaktion der PKA gestoppt und das verbleibende ATP in einer gekoppelten Luciferase-Reaktion umgesetzt. Das stabile Lumineszenz-Signal ist hierbei umgekehrt proportional zur cAMP-Konzentration.

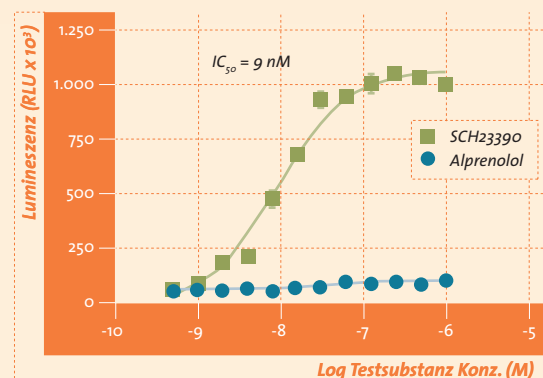
Assay-Merkmale

Assay-Typ	Lumineszenz (Glow-Type; T1/2 > 4h)
Anwendung	Quantitative Bestimmung des cAMP-Gehalts
Probenmaterial	Zelllinien
Durchführung	Homogen, 2-Schritt-Assay
Signal-Hintergrund	> 200 (mit cAMP), > 15 (in Zellen).
Zeitbedarf	30 Minuten
Robust	Skalierbar von 96–1536-Well-Format

Darstellung der cAMP-Bildung in der Zelle und das Assay-Prinzip des cAMP-Glo™ Max Assays



Bestimmung des cAMP-Gehalts nach Behandlung von Zellen mit GPCR-Modulatoren



Antagonist-abhängige Dosis-Wirkungskurve am Beispiel des Dopamin D1-Rezeptors. D293 Zellen, die stabil den Dopamin D1-Rezeptor exprimieren (5.000 Zellen/Well), wurden in Anwesenheit von 100 nM Dopamin (Agonist) mit verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanz SCH23390 (Antagonist) behandelt. Im Kontrollansatz wurde die Substanz Alprenolol eingesetzt. Erhaltene IC_{50} Werte korrelieren mit kompetitiven radioaktiven Bindungsassays.

ADP-Glo™ Kinase Assay

Biochemisch

Anwendung

Bestimmung der Effekte von Kinase-Aktivatoren oder -Inhibitoren;

Identifizierung von selektiven Wirkstoffsubstanzen gegen die Ziel-Kinasen;

Bestimmung der Aktivität von immunopräzipitierten Kinasen.

Assay-Beschreibung

Die universelle **ADP-Glo™ Kinase Assay** Familie wird zum Nachweis von Kinaseaktivitäten und ATPasen eingesetzt und hat sich insbesondere für schwierige Kinasen, wie z.B. Rezeptor-tyrosin-Kinasen, bewährt. Der **ADP-Glo™ Assay** ist eine einfache, schnelle und hochempfindliche *in vitro* Methode, die ohne Radioaktivität auskommt und mit jedem beliebigen Kinase-Substrat (Lipid, Peptid, Protein oder Zucker) durchgeführt werden kann. In diesem Assay kann das ATP der Kinase-Reaktion über einen sehr breiten linearen Konzentrationsbereich (Mikro- bis Millimolar) zugegeben werden. Das erlaubt die Unterscheidung zwischen kompetitiven und nicht-kompetitiven Inhibitoren. Hohe Signal-Hintergrund-Verhältnisse sind so auch bei niedriger ATP-zu-ADP-Umsetzung (0,2 pmol ADP) erreichbar und ermöglichen eine Automatisierung und Miniaturisierung des Assays bei optimalen Z'-Werten > 0,7.

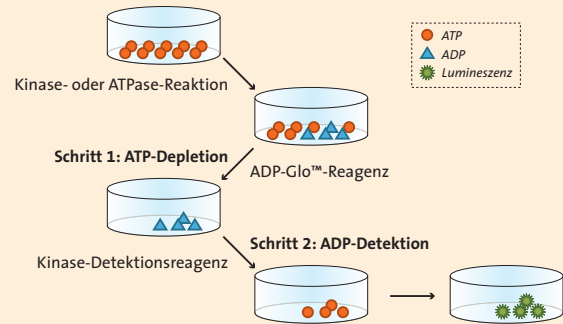
Assay-Prinzip

Der **ADP-Glo™ Assay** wird in zwei Schritten durchgeführt: Im ersten Schritt wird die Kinase-Reaktion durch die Zugabe des ADP-Glo™ Assay-Reagenz gestoppt und das im Reaktionsansatz verbleibende ATP depletiert. Im zweiten Schritt wird das ADP, das durch die Aktivität der Kinase entstanden ist, in ATP umgewandelt. Dieses neu synthetisierte ATP steht als limitierender Faktor für die anschließende Luciferase-Reaktion zur Verfügung. Das stabile Lichtsignal ist direkt proportional zur Kinase-Aktivität.

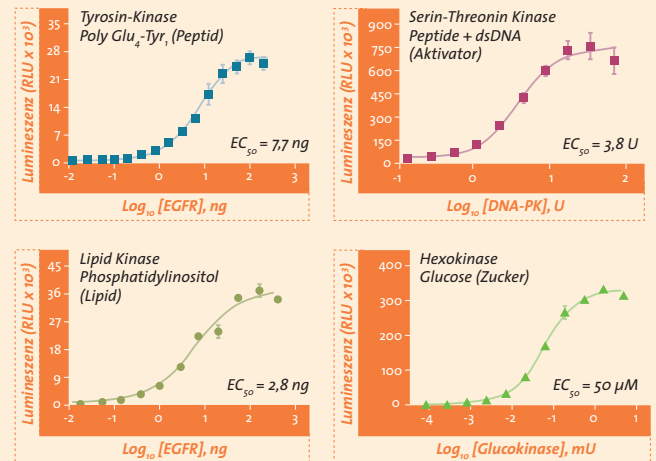
Assay-Merkmale

Assay-Typ	Lumineszent (Glow-Type)
Anwendung	Quantitative Bestimmung der Kinase-Aktivität
Probenmaterial	Aufgereinigte Kinasen
Durchführung	Homogen, 2-Schritt-Assay
Zeitbedarf	60–90 Minuten
Sensitivität	Nachweis noch bei geringsten Enzymkonzentrationen; 0,2 pmol ADP

Einfache Durchführung:



ADP-Glo™ Kinase Assay ist zum Nachweis verschiedenster Kinasen unabhängig von der Substratklasse geeignet



Bestimmung verschiedener Kinase-Aktivitäten mit dem ADP-Glo™ Kinase Assay

ADP-Glo™ Max Assay

Biochemisch

Anwendung

Bestimmung von ATP-abbauenden Enzymen mit hohen K_m -Werten für ATP.

Assay-Beschreibung

Der **ADP-Glo™ Max Assay** ist eine Weiterentwicklung des ADP-Glo™ Kinase Assays. Während im ADP-Glo™ Kinase Assay bis zu 1 mM ATP eingesetzt werden kann, toleriert der **ADP-Glo™ Max** Konzentrationen bis zu 5 mM ATP und ist daher besonders für Enzyme mit hohen K_m -Werten für ATP geeignet, wie z. B. ATPasen.

Assay-Prinzip

Das Assay-Prinzip und die Durchführung des **ADP-Glo™ Max Assays** sind identisch mit dem ADP-Glo™ Kinase Assay.

Assay-Merkmale

Assay-Typ	Lumineszent (Glow-Type)
Anwendung	Quantitative Bestimmung von ATP-abbauenden Enzymen mit hohem K_m -Wert für ATP
Probenmaterial	Aufgereinigte Kinasen, ATPasen
Durchführung	Homogen, 2-Schritt-Assay
Zeitbedarf	60–90 Minuten
Sensitiv	Nachweis noch bei geringsten Enzymkonzentrationen

Kinase-Glo® Luminescent Kinase Assay

Biochemisch

Anwendung

Screening und Identifizierung von Kinase-Inhibitoren; Unterscheidung zwischen ATP-kompetitiven und nicht-kompetitiven Inhibitoren.

Assay-Beschreibung

Die homogene **Kinase-Glo® Luminescent Kinase Assay** Familie wird zur Aktivitätsbestimmung gereinigter Kinasen über die Quantifizierung des verbleibenden ATP-Gehalts im Reaktionsansatz eingesetzt. Die Assays dieser Familie sind homogen, einfach durchführbar und nicht-radioaktiv. Weiterhin kann jedes beliebige Kinase-Substrat (Peptid, Protein, Lipid oder Zucker) in diesem universellen Assay-Format verwendet werden.

Die **Kinase-Glo® Assays** sind miniaturisierbar und eignen sich für Hochdurchsatzverfahren bei einer langen Signalstabilität ($T_{1/2} > 5$ h) und exzellenten Z' -Werten. Die Kinase-Glo®-Plattform besteht aus drei Assay-Formaten, mit denen die Kinase-Aktivitäten innerhalb definierter ATP-Konzentration bestimmt werden können:

Kinase-Glo® Assay: 10 μ M ATP

Kinase-Glo® Plus Assay: 100 μ M ATP

Kinase-Glo® Max Assay: 500 μ M ATP

Assay-Prinzip

Die Zugabe des Kinase-Glo®-Reagenz führt zur Terminierung der Kinase-Reaktion. Das von der Kinase nicht verbrauchte ATP wird von der Ultra-Glo™-Luciferase in ein stabiles Lichtsignal umgesetzt. Das Signal ist invers proportional zur Kinase-Aktivität.

Assay-Merkmale

Assay-Typ	Lumineszent (Glow-Type)
Anwendung	Quantitative Bestimmung von Kinase-Aktivitäten über den verbleibenden ATP-Gehalt
Probenmaterial	Gereinigte Kinasen
Durchführung	Homogen, 1-Schritt-Assay
Linearität	Linear bis zu einer ATP-Konzentration von 500 μ M ATP
Zeitbedarf	10–15 Minuten

AMP-Glo™ Assay

Biochemisch

Anwendung

Quantitatives Monitoring der Konzentration von AMP in einer biochemischen Reaktion; Hochdurchsatz-Analysen von Wirkstoff-Bibliotheken auf den Effekt der Ziel-Enzyme.

Assay-Beschreibung

Der **AMP-Glo™ Assay** ist eine robuste und hochsensitive biolumineszente Methode, um den AMP-Gehalt einer biochemischen Reaktion durch die Generierung eines Lumineszenzsignals zu messen. Dieses vielseitige System ermöglicht die Bestimmung einer Vielzahl von Enzymen, wie z.B. zyklische AMP-spezifische Phosphodiesterasen, Aminoacyl-tRNA-Synthetasen, DNA-Ligasen und Ubiquitin-Ligasen oder AMP-modulierten Enzymen. Das stabile Lumineszenzsignal ermöglicht die Anwendung im Hochdurchsatz. Der Assay kann zur Bestimmung des AMP-Gehalts sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von ATP als Substrat angewendet werden.

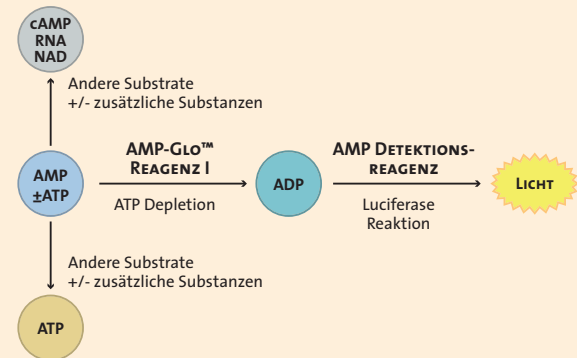
Assay-Prinzip

Der Assay enthält zwei Reagenzien: Das erste Reagenz beendet die AMP-generierende enzymatische Reaktion bei gleichzeitiger Entfernung von ATP und der Umwandlung von produziertem AMP zu ADP. Nach Zugabe des zweiten Reagenzes wird das ADP in ATP umgewandelt, welches dann der Luciferase-Reaktion zur Verfügung steht. Der Assay ist besonders für biochemische Reaktionen mit Enzymen geeignet, die kein ATP als Substrat verwenden.

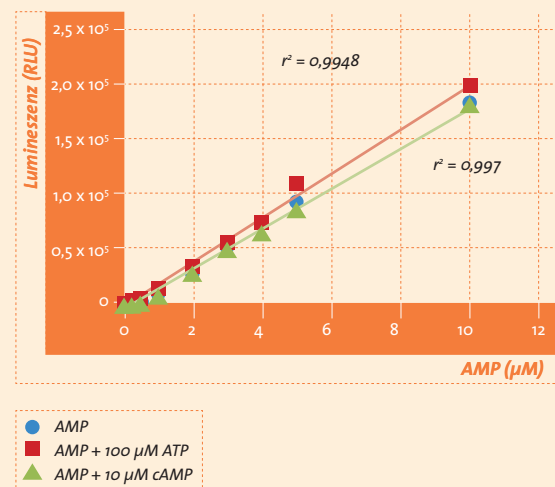
Assay-Merkmale

Assay-Typ	Lumineszent (Glow-Type)
Anwendung	Quantitative Bestimmung des AMP-Gehaltes
Probenmaterial	Ubiquitin-Ligase, zyklische AMP-spezifische Phosphodiesterase, Aminoacyl-tRNA-Synthetase, DNA-Ligase, poly(A)-Deadenylase, Demethylase (indirekte Methode)
Durchführung	Homogen, 2-Schritt-Assay
Zeitbedarf	2 Stunden
Hohe Signale bei geringer Substrat-umwandlung	Ermöglicht die Bestimmung von sehr geringen Enzymaktivitäten (nahe physiologischen Bedingungen)
Robust	Z'-Faktor > 0,7, Skalierbar von 96–1536-Well-Format

Substrate für Enzyme, die kein ATP verwenden



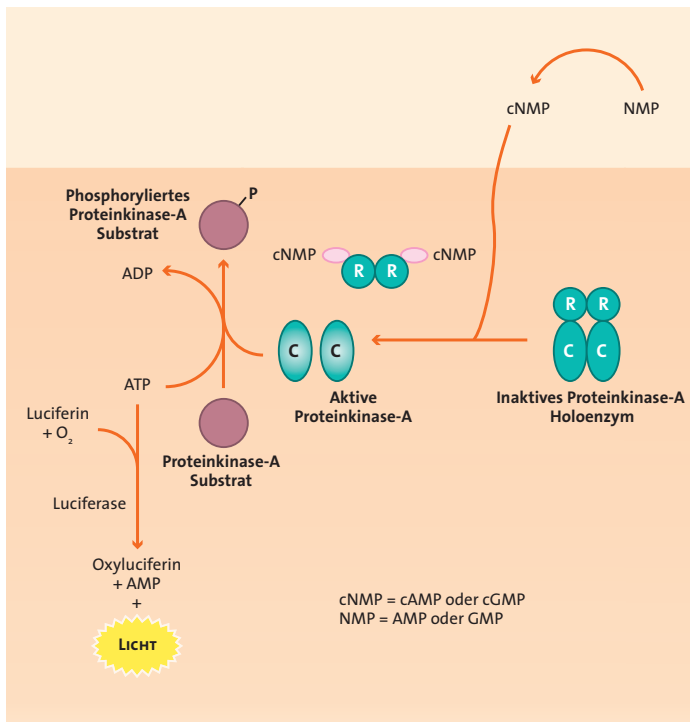
Keine Interferenz durch ATP und cAMP



Titration von reinem AMP. Die Reaktionen wurden in den angegebenen AMP-Konzentrationen in 384-Well Platten angesetzt und anschließend mit 100 µM ATP oder mit 10 µM cAMP versetzt. Jeder Messpunkt ist der Mittelwert von vier separaten Reaktionen.

Phosphodiesterasen

Zyklische Nukleotid-Phosphodiesterasen (PDE) kommen in unterschiedlichen Geweben und Organen vor und hydrolysieren die *Second Messenger* Signal-Moleküle cAMP und cGMP. Aufgrund dieser Fähigkeit sind PDEs in unzählige zelluläre Prozesse involviert und konnten mit verschiedenen Krankheitsbildern wie z.B. Asthma oder Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht werden. Die Verfügbarkeit selektiver PDE-Inhibitoren hat die Untersuchung der zyklischen Nukleotid-Signalwirkung erleichtert. Somit ist es möglich die Rolle der PDEs bei zellulären oder Gewebeveränderungen zu erforschen.



Assay-Merkmale

Assay-Typ	Lumineszent (Glow-Type)
Anwendung	Quantitative Bestimmung der Phosphodiesterase-Aktivitäten
Probenmaterial	Aufgereinigte Phosphodiesterase
Durchführung	Homogen, 3-Schritt-Assay
Zeitbedarf	1 Stunde
Robust	HTS geeignet; exzellentes Signal-Hintergrund-Verhältnis

PDE-Glo™ Phosphodiesterase Assay

Biochemisch

Anwendung

Bestimmung der zyklischen Nukleotid-Phosphodiesterase-Aktivität.

Assay-Beschreibung

Der **PDE-Glo™ Phosphodiesterase Assay** ist ein robuster und zuverlässiger Assay zur Bestimmung der Aktivität gereinigter PDEs. Der Assay ist sowohl für die Verwendung von cAMP- als auch cGMP-spezifischen Phosphodiesterasen optimiert. Der einfache und sensitive Assay kann innerhalb von 60 Minuten durchgeführt werden. Darüber hinaus sind seine Miniaturisierbarkeit, die lange Signalstabilität und das exzellente Signal-Hintergrund-Verhältnis ideal für den Einsatz in automatisierten Hochdurchsatzmessungen.

Assay-Prinzip

Der **PDE-Glo™ Phosphodiesterase Assay** umfasst die Zugabe von drei verschiedenen Reagenzien zum Reaktionsansatz. Im ersten Schritt des Assays wird die Phosphodiesterase-Reaktion durch die Zugabe des PDE-Glo™ Termination Puffers gestoppt. Die PDE-Detektionslösung enthält inaktives Proteinkinase-A (PKA) Holoenzym, ein PKA-Substrat und ATP. Die Bindung zyklischer Nukleotid-Monophosphate (cNMPs) an das inaktive PKA-Holoenzym bewirkt über eine Konformationsänderung die Freisetzung seiner katalytischen Untereinheiten, welche dann unter ATP-Verbrauch die Übertragung des terminalen Phosphates auf ein PKA-Substrat katalysieren. Mit dem Luciferase-basierten Kinase-Glo® Reagenz kann nun die verbleibende Menge an ATP bestimmt werden. Da die Phosphodiesterasen cAMP bzw. cGMP zu AMP bzw. GMP hydrolysieren können, nimmt die Menge an zyklischem Nukleotid-Monophosphat ab. Je weniger zyklisches Nukleotid-Monophosphat im Reaktionsansatz vorhanden ist, desto weniger PKA kann aktiviert und ATP verbraucht werden, welches nun für die Ultra-Glo™-Luciferase-Reaktion zur Verfügung steht. Daraus resultiert eine gesteigerte Biolumineszenz. Diese ist somit direkt proportional zu den verbleibenden ATP-Mengen, welche wiederum invers-proportional zur Aktivität der PDE ist.

GTPase-Glo™ Assay

Biochemisch

Anwendung

Bestimmung des Effekts von Protein-Modulatoren (wie z.B. GAP- und GEF-Proteine) auf die GTPase-Aktivität; besonders geeignet für Hochdurchsatz-Analysen.

Assay-Beschreibung

Der **GTPase-Glo™ Assay** misst durch eine ATP-abhängige Luciferase-Reaktion die wichtigsten Komponenten des GTPase-Zyklus, wie z.B. die intrinsische GTPase-Aktivität, GAP-stimulierende GTPase-Aktivität, GAP-Aktivität und GEF-Aktivität. Die GTPase-, GAP- und GEF-Aktivität korreliert invers mit der Menge an generiertem Licht. Eine hochaktive GTPase hydrolysiert mehr GTP, wodurch weniger ATP produziert wird und der Luciferase-Reaktion zur Verfügung steht, resultierend in einem geringeren Lumineszenzsignal.

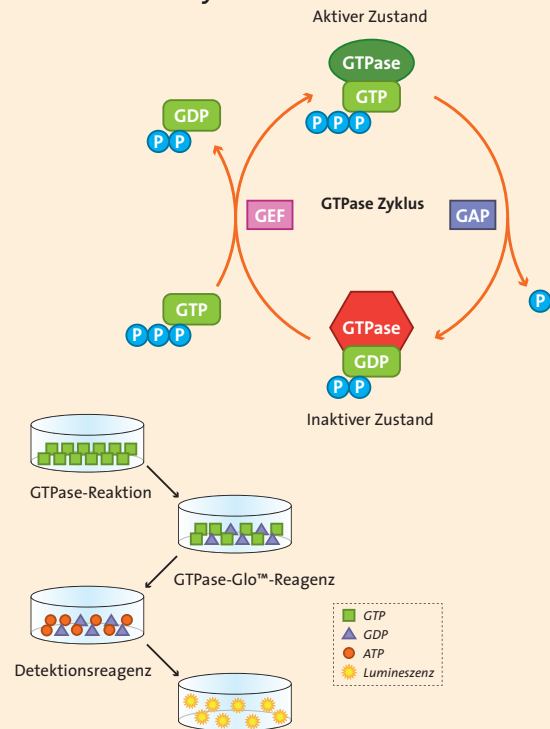
Assay-Prinzip

Der Assay beruht auf der Bestimmung des verbleibenden GTP-Gehaltes nach GTP-Hydrolyse in einer GTPase-Reaktion. Das vorhandene GTP wird nach Zugabe des GTPase-Glo™-Reagenzes (enthält Ultra-Glo™ Recombinant Luciferase + Luciferin) in ATP umgewandelt, welches direkt der Luciferase-Reaktion zur Verfügung steht, wodurch ein stabiles Lumineszenzsignal entsteht. Der Assay enthält optimierte Reaktionspuffer, GTPase/GAP-Puffer und GEF-Puffer zur Durchführung von GTPase/GAP-Reaktionen oder GEF-Reaktionen.

Assay-Merkmale

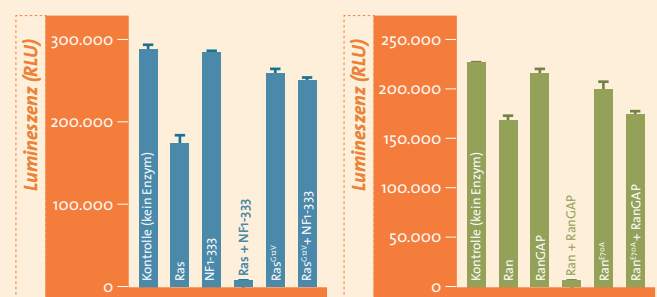
Assay-Typ	Lumineszent (Glow-Type)
Marker	GTPase-Aktivität, GAP-stimulierende GTPase-Aktivität, GAP-Aktivität und GEF-Aktivität
Anwendung	Bestimmung des Effekts von Protein-Modulatoren (wie z.B. GAP- und GEF-Proteinen) auf die GTPase-Aktivität
Durchführung	Homogen, 2-Schritt-Assay
Zeitbedarf	GTPase-Reaktion: 60–120 Minuten; GTPase-Nachweis: 35–40 Minuten (nach Zugabe der Reagenzien)
Sensitivität	Exzellentes Signal-Hintergrund-Verhältnis bei niedrigen Enzymkonzentrationen
Robust	Skalierbar von 96–1536-Well-Format

Der GTPase-Zyklus und schematische Darstellung des GTPase-Glo™ Assays



GTPase in aktivem und inaktivem Zustand im Zusammenspiel mit GDP, GTP. B. GTPase-Glo™ Assay-Prinzip. Nach der GTPase-Reaktion wird durch Zugabe des GTPase-Glo™-Reagenzes das verbleibende GTP zu ATP konvertiert, welches der Luciferase-Reaktion zur Verfügung steht und in der Generierung eines Lumineszenzsignals resultiert.

Stimulierung der GTPase-Aktivität durch GAP-Proteine



A. Die Reaktionen wurden mit dem GTPase/GAP-Puffer angesetzt und enthalten 2 μ M des Wildtyps oder der Ras-Mutante (RasG12V) sowie 1 μ M NF1-333 (GAP-Protein). B. Die Reaktionen wurden mit dem GTPase/GAP-Puffer angesetzt und enthalten 2 μ M des Wildtyps oder der Ran Mutante (RanE70A) sowie 1 μ M RanGAP (GAP-Protein). Ein niedriges Lumineszenzsignal weist auf eine hohe GTPase-Aktivität hin.

VII Metabolismus von Wirkstoffen – ADME Assays

Phase I und II Enzyme

ADME/Tox steht für Resorption, Verteilung, Metabolismus und Ausscheidung von pharmazeutisch wirksamen Verbindungen im menschlichen Körper. Metabolische Enzyme lassen sich sehr gut in zellbasierten und biochemischen Assays nachweisen, jedoch kann die Nachweisgrenze limitierend sein. Die Sensitivität der Lumineszenz ist daher beim Nachweis von geringen Enzymmengen sehr vorteilhaft. Zur Messung der ADME-Parameter bietet Promega verschiedene hochsensitive zellbasierte und biochemische Assays an, die auf dem Nachweis der

Cytochrom-P450-Aktivität, UDP-Glucuronosyltransferase-Aktivität, Monoamin-Oxidase (MAO)-Aktivität oder des Plasmamembranproteins P-Glykoproteins (Pgp) basieren.

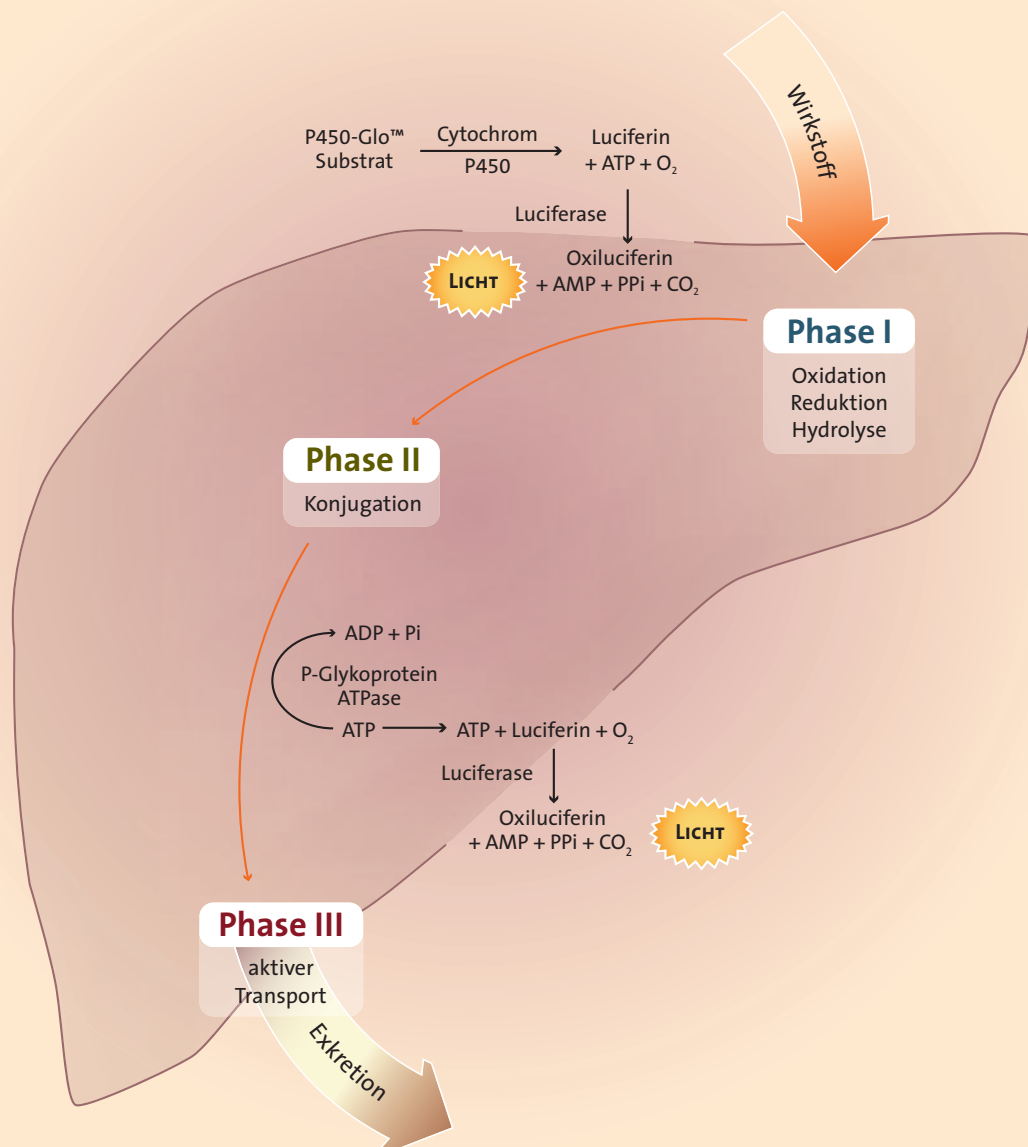
P450-Glo™ CYP450 Assay Systems

P450-Glo™ CYP450 Screening Systems

Pgp-Glo™ Assay

MAO-Glo™ Assay Systems

UGT-Glo™ Assay



Cytochrom P450-Enzyme Phase I

Das Cytochrom-P450-System (CYP450) spielt bei der Verstoffwechslung von Arzneimitteln eine wichtige Rolle. Die Enzyme der Cytochrom P450-Superfamilie werden hauptsächlich in der Leber exprimiert und fungieren als Monoxygenasen. Aufgrund von Homologien in der Aminosäuresequenz unterteilt sich die Superfamilie der Cytochrom P450-Gene in 36 Gen-Familien, welche sich wiederum in Subfamilien aufgliedern. Die CYP3A-Subfamilie ist davon die Wichtigste. Min-

destens 50 bis 60 Prozent aller therapeutisch eingesetzten Arzneistoffe sind CYP3A-Substrate. Zur Bestimmung der Induktion und Inhibition der CYP450-Enzymaktivitäten werden verschiedene Methoden eingesetzt. Die lumineszenten Assays haben im Vergleich zu bekannten radioaktiven und LC/MS-Methoden den Vorteil, dass sie bei vergleichbaren IC_{50} - und EC_{50} -Werten schneller und einfacher durchzuführen sind.

P450-Glo™ CYP450 Assay Systems

Biochemisch & Zellbasiert

Anwendung

Bestimmung der rekombinanten CYP450-Aktivität in Membranfraktionen von heterologen Expressionssystemen, wie z. B. Sf9 Zellen und *E.coli*;

Bestimmung der nativen CYP450-Aktivität in Mikrosomalfraktionen von Geweben (z. B. HLMS: *Human Liver Microsomes*); Identifizierung und Charakterisierung von CYP induzierenden und inhibierenden Wirkstoffen in Zellen.

Assay-Beschreibung

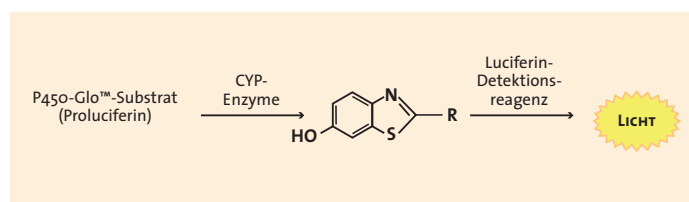
Alle CYP450-Assays besitzen eine ausgezeichnete Sensitivität, eine geringe Hintergrundsignalstärke und einen breiten Messbereich. Die Assays können biochemisch für zellfreie CYP-Inhibierungsstudien eingesetzt werden, manche zudem zur zellbasierten CYP-Induktion. Der Vorteil des nicht-lytischen Assays ist die Kombination mit weiteren Nachweismethoden, z. B. können die Zellen durch den CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay auf ihre Viabilität getestet werden.

Assay-Prinzip

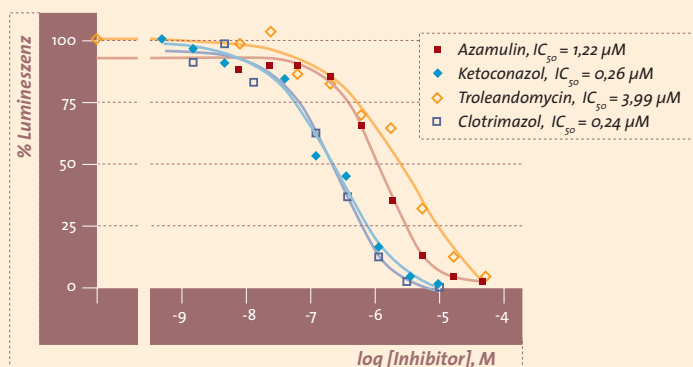
Bei den lumineszenten CYP450-Assays ist das Luciferasesubstrat so modifiziert, dass es spezifisch von den CYP450-Isoenzymen erkannt und metabolisiert wird. In diesem ersten Schritt der Reaktion wird Luciferin freigesetzt, welches anschließend im zweiten Schritt in der Luciferase-Reaktion umgesetzt wird. Die entstehende Lumineszenz ist proportional zur CYP450-Aktivität. Für ein nicht-lytisches Assay-Format kann der Zellüberstand gemessen werden. Alternativ wird durch direkte Zugabe des Detektionsreagenzes zu den Zellen (lytischer Assay) ein stabiles Lumineszenz-Signal gemessen.

Assay-Merkmale

Assay-Typ	Lumineszent (Glow-Type)
Marker	CYP450-Enzyme
Anwendung	Bestimmung der Cytochrom P450-Enzymaktivität
Probenmaterial	Native und rekombinante Fraktionen, primäre Leberzellen
Durchführung	Homogen, 2-Schritt-Assay
Zeitbedarf	20–60 Minuten

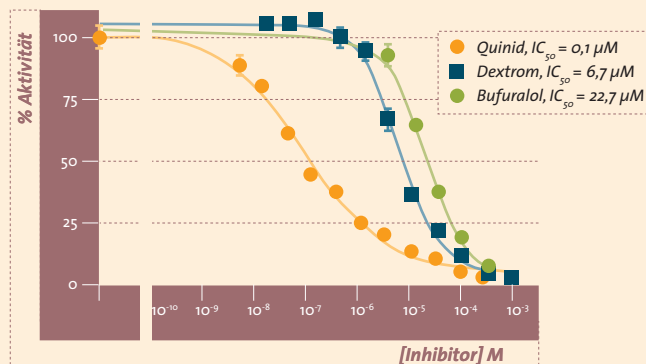


CYP3A4/Luciferin-IPA



Primäre Hepatozyten eines 40-jährigen Spenders wurden mit unterschiedlichen CYP3A4 Inhibitoren behandelt und die Enzymaktivität mittels des zellgängigen CYP3A4 Substrats Luciferin-IPA ermittelt. Die Zellen wurden hierzu 15 Minuten in einer Suspensionskultur mit dem Aminoluciferinsubstrat inkubiert.

CYP2D6/Luciferin-ME EGE



Rekombinantes CYP2D6 wurde zur Untersuchung der Wirkung verschiedener Substanzen auf die Aktivität des Leberenzym eingesetzt. Aktives CYP2D6 setzt ihr Substrat Luciferin-MEEGE um, Luciferin entsteht und dient wiederum der Firefly Luciferase im zweiten Reaktionsschritt als Substrat. Das hierbei entstehende Lichtsignal ist proportional zur CYP-Aktivität.

Cyp450 Isoform	Assays	Anwendung*	Substrate
3A4	P450-Glo™ CYP3A4 Assay with Luciferin-IPA	BCA & ZBA, Inhibition und Induktion	Luc-IPA
1A2	P450-Glo™ CYP1A2 Induction/Inhibition Assay	BCA & ZBA, Inhibition und Induktion	Luc-1A2
2C9	P450-Glo™ CYP2C9 Assay	BCA & ZBA, Inhibition und Induktion	Luc-H
4A11 (4A1,2,3)	Luciferin-4A und Luciferin-Detektionsreagenz	BCA & ZBA, Inhibition und Induktion	Luc-4A
2D6 (1A1, 1A2)	P450-Glo™ CYP2D6 Assay	BCA, Inhibition	Luciferin-ME-EGE
2C19 (1A1, 1A2)	P450-Glo™ CYP2C19 Assay	BCA, Inhibition	Luciferin-H-EGE
1A1, 1B1, 3A7	P450-Glo™ CYP1A1 Assay	BCA, Inhibition	Luciferin-CEE
1A1, 1B1, 3A7	P450-Glo™ CYP1B1 Assay	BCA, Inhibition	Luciferin-CEE
A2, 2C8/9, 2J2, 4A11, 4F3B, 19	P450-Glo™ CYP2C8 Assay	BCA, Inhibition	Luciferin-ME
3A7	Luciferin-3A7 und Luciferin-Detektionsreagenz	BCA, Inhibition	Luciferin-3A7
4F2, 4F3	Luciferin-4F2/3 und Luciferin-Detektionsreagenz	BCA, Inhibition	Luciferin-4F2/3
4F12	Luciferin-4F12 und Luciferin-Detektionsreagenz	BCA, Inhibition	Luciferin-4F12
2J2, 4F12	Luciferin-2J2/4F12 (Ester) und Luciferin-Detektionsreagenz mit Esterase	BCA, Inhibition	Luciferin-2J2/4F12 (Ester)
Viele CYPs	Luciferin-MultiCYP (Ester) und Luciferin-Detektionsreagenz mit Esterase	BCA, Inhibition	Luciferin-MultiCYP (Ester)

* BCA: Biochemischer Assay; ZBA: Zellbasierter Assay.

P450-Glo™ CYP450 Screening Systems

Biochemisch

Anwendung

Screening von Wirkstoffen zur Bestimmung der Regulationsfähigkeit der CYP450-Aktivität.

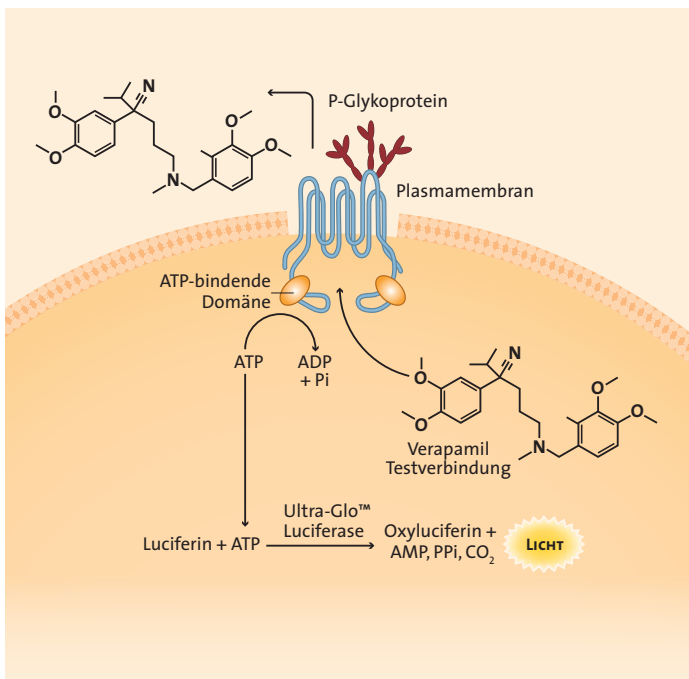
Assay-Beschreibung

Die P450-Glo™-Screening-Systeme beinhalten zusätzlich zum jeweiligen Cytochrom P450-Assay eine Membranpräparation

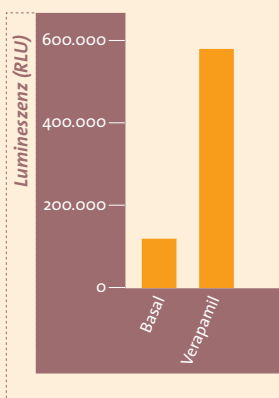
mit rekombinantem humanem Cytochrom-P450-Enzym, P450-Reduktase (bei CYP2C9 und CYP3A4 außerdem Cytochrom b5), sowie als Negativkontrolle eine Membranfraktion ohne P450-Aktivität. Damit sind alle Komponenten für einen kompletten Assay enthalten. Das Screeningsystem ist für folgende humanen CYP450-Isoformen erhältlich: CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6, CYP2C19, CYP3A4.

P-Glykoprotein ATPase Phase I

P-Glykoprotein (Pgp) ist ein 170 kDa großes integrales Plasmamembranprotein, das als ATP-abhängige Effluxpumpe (ABC-Transporter) xenobiotische Stoffe aktiv zurücktransportiert. Pgp, das auch als MDR1 oder ABCB1 bekannt ist, spielt eine wichtige Rolle bei Mehrfachresistenzen gegen Zytostatika (sog. Multi-Drug-Resistenzen, MDR) und Medikamentenwechselwirkungen. Verschiedene Verbindungen interagieren mit Pgp und bewirken eine Stimulation oder eine Inhibition seiner ATPase-Aktivität.



Stimulation der Pgp-ATPase-Aktivität



In der Abbildung ist die Zunahme der Pgp-Aktivität nach Stimulation mit Verapamil im Vergleich zur Basalaktivität dargestellt.

Pgp-Glo™ Assay Systems

Biochemisch

Anwendung

Screening von Wirkstoffen zur Stimulation und Inhibition der P-Glykoprotein ATPase-Aktivität.

Assay-Beschreibung

Das **Pgp-Glo™ Assay System** enthält alle erforderlichen Reagenzien zur Durchführung des lumineszenten P-Glykoprotein-ATPase-Nachweises. Der Assay wird bei Pharma- und Wirkstoffscreenings und bei der Untersuchung verschiedener Faktoren auf die P-Glykoprotein-Enzymaktivität eingesetzt.

Assay-Prinzip

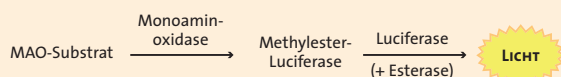
Der Assay basiert auf der ATP-abhängigen Reaktion der Firefly Luciferase, wodurch der direkte Umsatz von ATP gemessen wird. Im ersten Schritt wird eine behandelte/unbehandelte Pgp Membranfraktion mit dem Pgp-Glo™ Assay Puffer und einer nicht-limitierenden Konzentration an ATP (5 mM) inkubiert. Im zweiten Schritt wird die Pgp-ATPase-Reaktion nach Zugabe des ATP-Detektionspuffers gestoppt und das verbliebene ATP als Luciferase-abhängiges Lumineszenz-Signal nachgewiesen. Die Signalreduktion ist proportional zur Pgp-Aktivität. Substanzen, die die Pgp-ATPase-Aktivität stimulieren, erzeugen somit signifikant geringere Lumineszenz-Signale als Proben, die keinen oder einen negativen Einfluss auf die Pgp-ATPase-Aktivität haben.

Assay-Merkmale

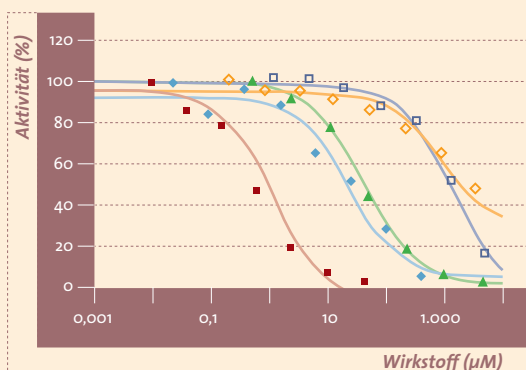
Assay-Typ	Lumineszent (Glow-Type)
Marker	Pgp-Aktivität
Anwendung	Bestimmung der P-Glykoprotein ATPase-Aktivität
Probenmaterial	Native und rekombinante Membranfraktionen
Durchführung	Homogen, 2-Schritt-Assay
Zeitbedarf	40–50 Minuten

Monoaminoxidasen – Phase I

Neben CYP450-Enzymen sind Monoaminoxidasen (MAO) die zweitwichtigsten Phase I Biotransformationsenzyme. MAOs katalysieren die oxidative Desaminierung einer Vielzahl biogener und xenogener Amine. Die direkte Messung der MAO-Aktivität ist essentiell für die Überprüfung potenzieller Wirkstoffe in Bezug auf ihre Hemmung der Monoaminoxidase. Der MAO-Glo™ Assay bietet eine zusätzliche Sicherheit bei der Auswahl neuer Wirkstoffkandidaten.



Messung der MAO-B-Aktivität



- Clorgylin
- ◆ Phenylethylamin
- ◇ Deprenyl
- Dopamin
- ▲ Serotonin

Mikrosomen mit MAO-B wurden mit verschiedenen Konzentrationen bekannter Substrate und Inhibitoren für 1 Stunde inkubiert. Nach der Zugabe von 50 µl Luciferin-Detektionsreagenz wurden die Proben mit einem GloMax™ 96 Microplatten Luminometer ausgelesen. (Siehe Technical Bulletin #TB345).

MAO-Glo™ Assay Systems

Zellbasiert & Biochemisch

Anwendung

Bestimmung der nativen und rekombinanten MAO-Aktivität; Screening von Wirkstoffen zur Regulation der MAO-Aktivität in nativen und rekombinanten Fraktionen.

Assay-Beschreibung

Der **MAO-Glo™ Assay** ist eine Lumineszenz-basierte homogene Methode zur Quantifizierung der Monoaminoxidasen-Aktivität (MAO) und ersetzt zeitintensive Analyseverfahren wie z. B. HPLC. Durch die sehr hohe Sensitivität des Lumineszenzsignals wird weniger MAO-Enzym benötigt als bei HPLC oder fluoreszenzbasierten Methoden. Weiterhin wird eine mögliche Fluoreszenz-Interferenz von Beginn an ausgeschlossen.

Assay-Prinzip

Im ersten Schritt des MAO™ Assays werden das MAO-Enzym und die Testsubstanz mit dem luminogenen MAO-Substrat inkubiert. Das Substrat ist ein Derivat des Luciferins, das durch die selektive MAO-Aktivität in Methylester-Luciferin umgesetzt wird. Durch Zugabe des Luciferin-Detektionsreagenzes wird die MAO-Reaktion gestoppt und das umgesetzte Methylester-Luciferin durch die im Reagenz enthaltene Esterase in Luciferin umgewandelt. Das Lumineszenz-Signal ist direkt proportional zur MAO-Aktivität.

Der Assay enthält ein luminogenes MAO-Substrat und zwei Reaktionspuffer zur Bestimmung der Monoaminoxidase-A (MAO-A) und der Monoaminoxidase-B (MAO-B).

Der **MAO-Glo™ Assay** mit MAO-A enthält zusätzlich humanes, rekombinantes Monoaminoxidase-A-Enzym zur selektiven Aktivitätsbestimmung.

Assay-Merkmale

Assay-Typ	Lumineszent (Glow-Type)
Marker	MAO-A- und MAO-B-Enzym
Anwendung	Bestimmung der MAO-Aktivität
Probenmaterial	Native und rekombinante Fraktionen
Durchführung	Homogen, 2-Schritt-Assay
Zeitbedarf	40–50 Minuten
Automatisierbar	Sehr guter Z'-Faktor auch im 384-Well-Format

UDP-Glucuronosyltransferase – Phase II

Die UDP-Glucuronosyltransferase (UGT) ist ein wichtiges Mitglied der Familie der humanen Phase-II-metabolisierenden Enzyme und findet sich vor allem in der Leber. Die UGT überträgt Glucuronosyl-Gruppen der UDP-Glucuronsäure (UDPGA) auf kleine und hydrophobe Moleküle. Die UGT-vermittelte

Reaktion wandelt so xenobiotische und endogene Substanzen in besser lösliche und damit einfacher auszuscheidende Stoffe um. UGTs modifizieren viele pharmazeutische Wirkstoffe und können so an Medikamentenwechselwirkungen beteiligt sein.

UGT-Glo™-Assay

Biochemisch

Anwendung

Screening von Wirkstoffen für die Regulation der UGT-Aktivität in nativen und rekombinanten Fraktionen.

Assay-Beschreibung

Der **UGT-Glo™ Assay** wird für den Aktivitätsnachweis von Transferasen aus verschiedenen Quellen, z. B. aus UGT-Mikrosomen oder UGT-Fractionen aus Säugetier-Gewebe, eingesetzt. Der Assay eignet sich u.a. zur Untersuchung der Inhibierung von UGT durch Chemikalien und pharmazeutische Wirkstoffe. Der **UGT-Glo™ Assay** enthält zwei verschiedene ProLuciferin-Substrate. Zum einen das UGT-Multienzym-Substrat, das mit vielen UGTs kompatibel ist. Zum anderen das UGT1A4-Substrat. Letzteres reagiert spezifisch mit der UGT-Isoform UGT1A4. Die UGT-Glo™ Screening Systeme enthalten zusätzlich UGT1A4 oder UGT2B7 Mikrosomen und Kontrollmembranen.

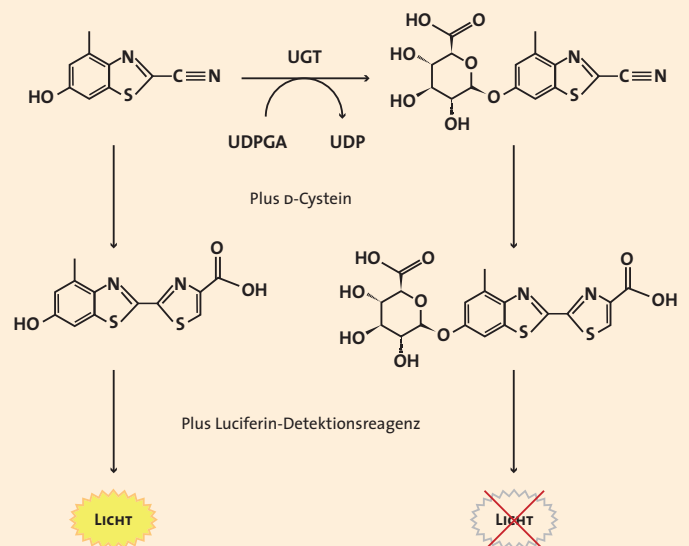
Assay-Prinzip

Durch die UGT-Aktivität wird ein ProLuciferin-Substrat mit UDP konjugiert. Verbleibendes unkonjugiertes ProLuciferin zyklisiert unter Zugabe von D-Cystein zu Luciferin, welches dann durch die Luciferase in Licht umgesetzt wird. UGT-konjugiertes ProLuciferin reagiert nicht mit D-Cystein und trägt so nicht zur Lumineszenz bei. Höhere UGT-Aktivität führt folglich zu einer stärkeren Abnahme der Lumineszenz.

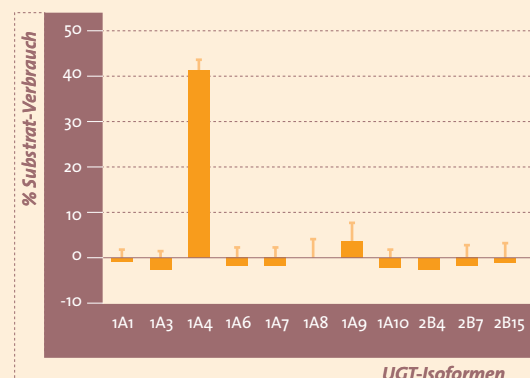
Assay-Merkmale

Assay-Typ	Lumineszent (Glow-Type)
Marker	UGT-Enzym
Anwendung	Bestimmung der UGT-Aktivität
Probenmaterial	Native und rekombinante Fraktionen
Durchführung	Homogen, 2-Schritt-Assay
Zeitbedarf	< 2 Stunden

Konversion des UGT Multi-Enzym-Substrats durch das UGT-Enzym



Hohe Spezifität der UGT-Substrate



VIII Protease-Assays

Proteasen übernehmen äußerst vielfältige Funktionen in Organismen. Sie sind beispielsweise innerhalb des Proteasom-Komplex in eukaryotischen Zellen für den Abbau fehlerhafter oder vorübergehend nicht benötigter Proteine zuständig. Die Protease Calpain ist an vielen Ca^{2+} -abhängigen Regulationsprozessen in der Zelle beteiligt. Deubiquinierende Proteasen spielen eine bedeutende Rolle in der Proteinregulation. Die Dipeptidyl Peptidase (DPPIV) ist eine Serin-Exopeptidase, die beispielsweise Funktionen im Immunsystem übernimmt und bei Krankheiten wie Krebs und Diabetes eine Rolle spielt. DPPIV ist bereits ein therapeutisches Target für die Behandlung von Diabetes Typ II.

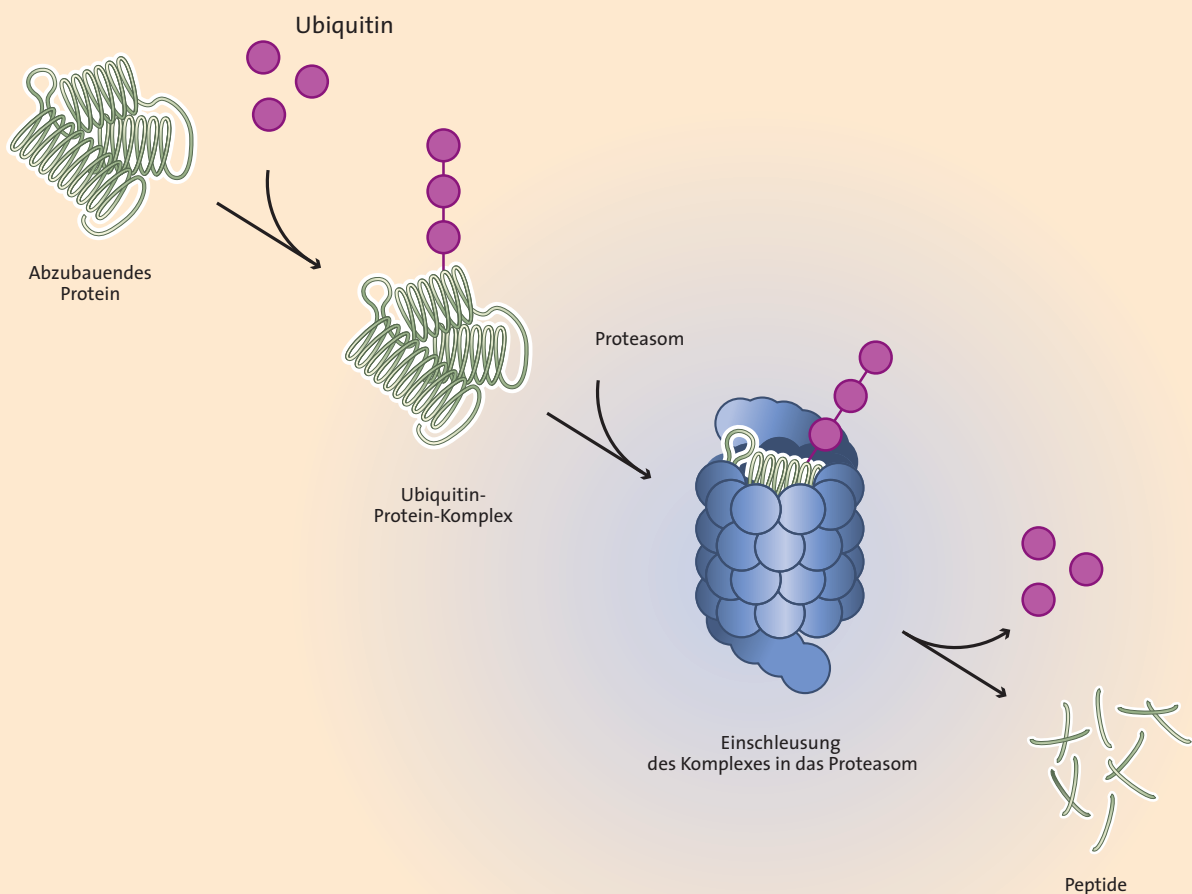
Cell-based Proteasome-Glo™ Assays

Proteasome-Glo™ Assays

Calpain-Glo™ Protease Assay

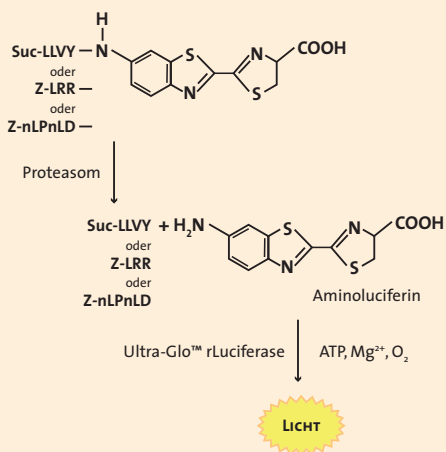
DUB-Glo™ Protease Assay (DUB/SENPNEDP)

DPPIV-Glo™ Protease Assay

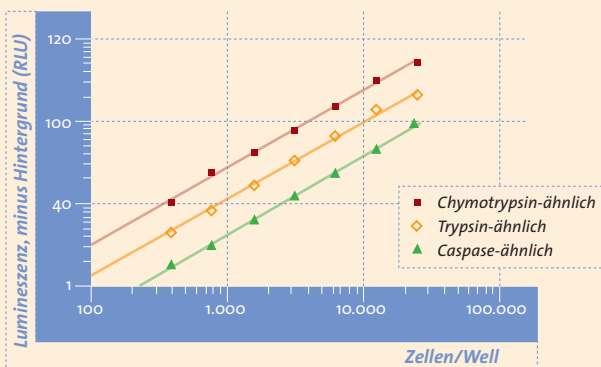


Das Proteasom

Das Proteasom ist die wichtigste extralysosomale Protease der eukaryotischen Zelle. Die 20S-Untereinheit enthält drei proteolytisch aktive Zentren mit einer Chymotrypsin-ähnlichen, einer Trypsin-ähnlichen und einer Caspase-ähnlichen Aktivität. Diese drei Aktivitäten sind von zentraler Bedeutung für die Homöostase der Zelle und für die Aufrechterhaltung des zellulären Metabolismus (Degradation von Tumorsuppressoren, Zellzyklus, etc.). Proteine, die abgebaut werden sollen, werden mit einer Polyubiquitin-Kette markiert, vom Proteasom erkannt und prozessiert. Der Einsatz von Proteasom-Inhibitoren führt bei einer Reihe von humanen Tumorzelllinien zur Wachstumshemmung und Apoptose und ist somit sehr interessant für die Entwicklung neuer Krebstherapien.



Die gemessene Lumineszenz ist proportional zur Zellzahl



Unter Verwendung des Proteasome-Glo™ Cell-Based Assays wurde in einer 96-Well-Platte eine Titration von unbehandelten U266 Zellen (humane Myelomzellen aus Blutplasma) durchgeführt. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe von U266 Zellen in Zellkulturmedium erstellt (100 µl/well), die Zellen für 1,5 Stunden bei 37°C inkubiert und die verschiedenen Proteasome-Glo™ Cell-Based Assays durchgeführt. 10 Minuten nach der Reagenzien-Zugabe wurde das Lichtsignal im Luminometer gemessen. Die detektierten Lichteinheiten sind proportional zur Protease-Aktivität des Proteasoms in den Zellen.

Cell-Based Proteasome-Glo™ Assay

Zellbasiert

Anwendung

Messung der Chymotrypsin-, der Trypsin- und der Caspase-ähnlichen Aktivität des Proteasoms in Zellen;
Screening von Substanz-Bibliotheken und Messung von Proteasom-reguliertem Protein-Abbau in Zellen.

Assay-Beschreibung

Der **Proteasome-Glo™ Cell-Based Assay** ist ein homogener Assay zur unabhängigen Messung der einzelnen, mit dem Proteasom-Komplex assoziierten, Protease-Aktivitäten in kultivierten Zellen. Der Assay basiert auf luminogenen Proteasom-Substraten. Mit dem einfachen „add-mix-measure“-Format kann das Reagenz direkt zu den Zellen gegeben werden.

Das Proteasome-Glo™ Cell-Based 3-Substrate System bietet die Möglichkeit, alle drei Proteasom-Aktivitäten in einem Ansatz zu messen.

Assay-Prinzip

Die im **Proteasome-Glo™ Cell-Based Assay-Reagenz** enthaltenen Peptidsubstrate zur Messung der Chymotrypsin-ähnlichen, Trypsin-ähnlichen und Caspase-ähnlichen Aktivitäten sind Suc-LLVY-Aminoluciferin (Succinyl-Leucin-Leucin-Valin-Tyrosin-Aminoluciferin), Z-LRR-Aminoluciferin (Z-Leucin-Arginin-Arginin-Aminoluciferin) und Z-nLPnLD-Aminoluciferin (Z-Norleucin-Prolin-Norleucin-Aspartat-Aminoluciferin). Die Proteaseaktivitäten können entweder einzeln, oder mit dem Proteasome-Glo™ Cell-Based 3-Substrate System in einem Ansatz gemessen werden.

Das entsprechende Reagenz wird direkt zu den Zellen gegeben und Aminoluciferin durch die spezifische Proteasom-Aktivität freigesetzt. In der anschließenden Luciferase-Reaktion wird nach 5 bis 10 Minuten ein stabiles Lumineszenz-Signal generiert, das mit der Enzym-Aktivität korreliert.

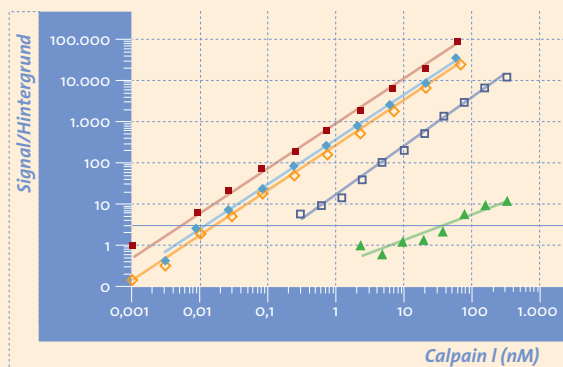
Assay-Merkmale

Assay-Typ	Lumineszent (Glow-Type)
Anwendung	Bestimmung der Chymotrypsin-, der Trypsin- und der Caspase-ähnlichen Aktivität des Proteasoms in Zellen.
Probenmaterial	Zelllinien
Durchführung	Homogen, 1-Schritt-Assay
Zeitbedarf	30 Minuten

Calpain

Calpaine gehören zur Familie der Ca^{2+} -aktivierten Cysteinproteasen. Sie modulieren die biologische Aktivität ihrer Substrate durch gezielte Proteolyse und sind an der Regulation vieler Ca^{2+} -abhängiger zellulärer Prozesse beteiligt. Allerdings ist ihre physiologische Rolle noch nicht ganz geklärt. Calpaine spielen eine Rolle bei der Entstehung verschiedener Krankheiten, wie z.B. Morbus Alzheimer oder bei verschiedenen Herz- und Hirnerkrankungen.

Sensitivität des Calpain-Glo™ Protease Assays verglichen mit fluoreszenten Calpain Assays



- Suc-LLVY-Aminoluciferin; 12 Minuten
- ◆ Suc-LLVY-Aminoluciferin; 30 Minuten
- ◇ Suc-LLVY-Aminoluciferin; 60 Minuten
- FRET Substrat; 30 Minuten
- ▲ Suc-LLVY-AMC; 60 Minuten

In einer 96-Well-Platte wurde eine Titration von Calpain I durchgeführt. Dabei wurde entweder der Calpain-Glo™ Protease Assay, ein Suc-LLVY-AMC Fluoreszenz-Substrat oder das FRET-basierte Substrat H-Lys-(FAM)-EYGMK(Dabcyl)-OH verwendet. Lumineszenz oder Fluoreszenz wurde zu verschiedenen Zeiten nach Reagenzien-Zugabe ermittelt. Die Ergebnisse wurden als Signal-Hintergrund-Verhältnis dargestellt. Das Detektionslimit wurde als Signal-Hintergrund-Verhältnis von > 3 bestimmt.

Der biolumineszente Assay hatte ein Detektionslimit von 5 pM innerhalb von 12 Minuten. Während der FRET-basierte fluoreszente Assay ein Detektionslimit von 200 pM nach 30 Minuten erreichte. Der Assay mit dem fluoreszenten Suc-LLVY-AMC-Substrat wies im Vergleich ein Limit von 30 nM nach 60 Minuten auf. Im Vergleich zu den fluoreszenten Assays ist beim Calpain-Glo™ Protease Assay keine Akkumulation des Calpain-Spaltprodukts nötig, um ein messbares Signal zu erhalten.

Calpain-Glo™ Protease Assay

Biochemisch

Anwendung

Screenings zur Messung von Calpain-Aktivitäten; Identifizierung von Calpain-Inhibitoren im Multiwell-Format.

Assay-Beschreibung

Der **Calpain-Glo™ Protease Assay** ist ein schneller und äußerst sensibler lumineszenter Assay zur Messung der Protease-Aktivitäten von Calpain I und II. Der Assay ist besonders für schnell autolysierende Enzyme wie Calpain geeignet. Aufgrund seiner außerordentlich hohen Reaktionsgeschwindigkeit und Sensitivität kann das Testsystem in Hochdurchsatz-Screenings nach Calpain-Aktivitäten und Calpain-Inhibitoren eingesetzt werden.

Assay-Prinzip

Der **Calpain-Glo™-Protease Assay** enthält ein luminogenes Succinyl-Calpain-Substrat (Suc-LLVY-Aminoluciferin) in einem für Calpain und Luciferase optimierten Puffersystem. Durch Proteolyse des Calpain-Substrats entsteht Aminoluciferin, das von der Ultra-Glo™-Luciferase umgesetzt wird. Das mit der Reaktion einhergehende stabile Lichtsignal ist proportional zur Calpain-Aktivität. Seine Sensitivität ist ungewöhnlich hoch, da sie nicht von einer Akkumulation des Calpain-Spaltprodukts abhängt. Aufgrund seiner unmittelbaren Umsetzung durch die Ultra-Glo™ Luciferase wird die maximale Sensitivität schon 5 bis 10 min nach der Inkubation mit Calpain erreicht.

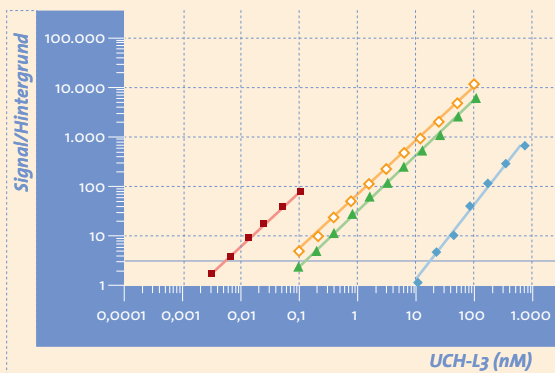
Assay-Merkmale

Assay-Typ	Lumineszent (Glow-Type)
Anwendung	Quantitative Bestimmung der Proteaseaktivitäten von Calpain I und II
Probenmaterial	Enzympräparationen
Linearität	Linear über 4 log-Stufen der Calpain-Konzentration
Sensitivität	1.000-fach sensibler als fluorometrische Assays (Detektion der Calpain I-Aktivität bei einer Konzentration < 5 pM)
Durchführung	Homogen, 1-Schritt-Assay
Zeitbedarf	10–30 Minuten

DUB-Proteasen

Diese Proteasen können Proteinmodifikationen durch Ubiquitin und Ubiquitin-ähnliche Proteasen wieder rückgängig machen und stellen daher einen wichtigen Bestandteil des komplexen Mechanismus der posttranslationalen Proteinregulation bei Eukaryoten dar.

DUB-Glo™ Protease Assay verglichen mit fluoreszenten Assays für UCH-L3



- Ub-AMC, 30 Minuten
- ◇ Z-RLRGG-Aminoluciferin, 30 Minuten
- ▲ Z-RLRGG-Aminoluciferin, 90 Minuten
- ◆ Z-RLRGG-AMC, 90 Minuten

In einer 96-Well-Platte wurde eine Titration von humanem rekombinarem UCH-L3 durchgeführt. Dabei wurde entweder der DUB-Glo™ Protease Assay, ein Ubiquitin-AMC Fluoreszenz-Substrat (250 nM) oder Z-RLRGG-AMC Fluoreszenz-Substrat (40 µM) verwendet. Lumineszenz oder Fluoreszenz wurde zu verschiedenen Zeiten nach Reagenzien-Zugabe ermittelt. Die Ergebnisse wurden als Signal-Hintergrund-Verhältnis dargestellt. Das Detektionslimit wurde als Signal-Hintergrund-Verhältnis von > 3 bestimmt. Das Detektionslimit des DUB-Glo™ Protease Assay liegt zwischen dem Ubiquitin-AMC Substrat (sensitiver) und dem Z-RLRGG-AMC Substrat (geringere Sensitivität).

DUB-Glo™ Protease Assay (DUB/SEN/P/NEDP)

Biochemisch

Anwendung

Screening von Inhibitoren der deubiquitinierenden (DUB) Proteasen;
Charakterisierung der Ubiquitinierung/Deubiquitinierung von Proteinen.

Assay-Beschreibung

Der **DUB-Glo™ Protease Assay (DUB/SEN/P/NEDP)** ist ein lumineszenter 1-Schritt-Assay, der die Aktivität einer Vielzahl von dekonjugierenden Enzymen misst. Dazu gehören beispielsweise deubiquitinierende (DUB), de-SUMOylierende (SEN) und de-neddylierende (NEDP) Proteasen.

Assay-Prinzip

Das DUB-Glo™ Protease Assay-Reagenz enthält ein luminogenes Z-RLRGG-Aminoluciferin Substrat, mit dem C-terminalen Pentapeptid RLRGG Ubiquitin. Dieses ist optimiert für die enzymgekoppelte Messung der Protease- und Luciferase-Aktivität. Nach der Zugabe des DUB-Glo™-Reagenz direkt zur Probe, wird das Substrat Z-RLRGG durch aktive Ubiquitin und Ubiquitin-ähnliche Proteasen von Aminoluciferin abgespalten. Das Spaltprodukt Luciferin wird in einer anschließenden Reaktion durch die Ultra-Glo™ Luciferase in ein stabiles Lichtsignal umgesetzt, das proportional zur DUB-, SEN- oder NEDP1-Aktivität ist.

Assay-Merkmale

Assay-Typ	Lumineszent (Glow-Type)
Anwendung	Quantitative Bestimmung der DUB/SEN/P/NEDP-Aktivität
Probenmaterial	Enzympräparationen
Durchführung	Homogen, 1-Schritt-Assay
Linearität	Linear über 2–3 log-Stufen an dekonjugierender Protease-Konzentration
Zeitbedarf	10–30 Minuten

DPPIV-Glo™ Protease Assay

Biochemisch

Anwendung

Bestimmung von DPPIV-Enzym-Aktivitäten;
Kinetische Studien von DPPIV-Inhibitoren.

Assay-Beschreibung

Der **DPPIV-Glo™ Protease Assay** ist ein lumineszenter 1-Schritt-Assay, der die Enzym-Aktivität der Serinprotease Dipeptidylpeptidase IV (DPPIV) misst. DPPIV schneidet N-terminale Di-peptide von Polypeptiden mit L-Prolin oder L-Alanin an der vorletzten Position. Der robuste und sensitive Assay wurde zur Anwendung von gereinigten Enzymen entwickelt.

Assay-Prinzip

Der **DPPIV-Glo™ Assay** enthält das prolumineszente DPPIV Substrat, Gly-Pro-Aminoluciferin, in einem für die DPPIV- und Luciferase-Aktivität optimierten Puffersystem. Nach Zugabe des DPPIV-Glo™-Reagenzes wird das Peptid-Substrat durch aktive DPPIV-Proteasen von Aminoluciferin abgespalten. Das hierbei entstehende Luciferin wird in einer anschließenden Luciferase-Reaktion in ein stabiles Lichtsignal umgewandelt. Das Lumineszenz-Signal ist direkt proportional zu der DPPIV-Aktivität.

Assay-Merkmale

Assay-Typ	Lumineszent (Glow-Type)
Anwendung	Quantitative Bestimmung der DPPIV-Aktivität
Probenmaterial	Enzympräparationen
Linearität	Linear über 3 log-Stufen an DPPIV-Aktivität
Durchführung	Homogen, 1-Schritt-Assay
Zeitbedarf	30 Minuten

IX Literatur

Zellviabilität/Proliferation

RealTime-Glo™ Metabolic Cell Viability Assay

Peer-Reviewed Publikationen

Sarah J. Duellman, Wenhui Zhou, Poncho Meisenheimer, Gediminas Vidugiris, James J. Cali, Prson Gautam, Krister Wennerberg, and Jolanta Vidugiriene; **Bioluminescent, Nonlytic, Real-Time Cell Viability Assay and Use in Inhibitor Screening**; *Assay Drug Dev Technol.* **2015** Oct 1; 13(8): 456–465.

CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay

Promega Artikel

CellTiter-Glo™ Assay: Flexible Luminescent Cell Viability Assay; Randy Hoffman, Natalie Betz and Michael Bjerke; *Promega Notes* **79**, 36–38; **2001**

Automating Promega Cell-Based Assays in Multiwell Formats; Tracy Worzella and Brad Larson; *Promega Notes* **85**, 25–27; **2003**

In Vitro Toxicology and Cellular Fate Determination Using Promega CellBased Assays; Randy Hoffman; *Promega Notes* **82**, 19–22; **2002**

CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay: Fast Sensitive and Flexible; Terry Riss¹, Rich Moravec¹, Michael Beck¹, Rita Hannah¹, Karen Wilson² and Robert Swanson³; *Promega Notes* **81**, 2–5; **2002**

Peer-Reviewed Publikationen

Gupta, P.B., Onder, T.T., Jiang, G., Tao, K., Kuperwasser, C., Weinberg, R.A. and Lander, E.S.; **Identification of selective inhibitors of cancer stem by high-throughput screening**. *Cell* **138**, 645–659; **2009**

Notes: The authors of this study describe a proof-of-concept screen to use mammary epithelial cells that have been induced to undergo an epithelial to mesenchymal transition (EMT) as model cells to identify agents that may be selectively toxic against „epithelial cancer stem cells“ (CSCs). They induced the transformed breast cancer cell line HMLER to undergo a mesenchymal transition using shRNA directed against the E-cadherin gene.

Hahn, C.K., Ross, K.N., Warrington, I.M., Mazitschek, R., Kanegai, C.M., Wright, R.D., Kung, A.L., Golub, T.R. and Stegmaier, K.; **Expression-based screening identifies the combination of histone deacetylase inhibitors and retinoids for neuroblastoma differentiation**; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 9751–9756; **2008**

Notes: The authors designed a high-throughput gene-expression screen to identify compounds that induce a neuroblastoma gene signature in BE(2)-C cells. They used the CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay in a 96-well format to assess the effects of ATRA and a variety of inhibitors of histone deacetylase on BE(2)-C cell viability.

Lin, H., Lee, E., Hestir, K., Leo, C., Huang, M., Bosch, E., Halenbeck, R., Wu, G., Zhou, A., Behrens, D., Hollenbogh, D., Linnemann, T., Qin, M., Wong, J.,

Chu, K., Doberstein, S.K. and Williams, L.T.; **Discovery of a cytokine and its receptor by functional screening of the extracellular proteome**; *Science* **320**, 807–11; **2008**

Notes: The authors of this study created a cDNA library representative of the extracellular proteome (secreted proteins and the extracellular domains of transmembrane proteins). Each cDNA was individually transfected into 293T cells. The CellTiter-Glo® Assay was used to screen for secreted factors from the cell lines expressing the cDNA that affected viability of twelve cell lines.

CellTiter-Glo® 2.0 Cell Viability Assay

Promega Artikel

A Novel Luminescent Cell Viability Assay with Greatly Enhanced Storage Stability; Kevin Kershner, Michael P. Valley, Dan F. Lazar, James Unch, Kevin R. Kupcho, Andrew L. Niles, Poncho L. Meisenheimer, and James J. Cali; **2013**

CellTiter-Glo® 3D Viability Assay

Promega Artikel

Validating Performance of Cytotoxicity Assays Applied to 3D Cell Culture Models; Terry L. Riss, Michael P. Valley, Andrew L. Niles, Kevin R. Kupcho, Chad A. Zimprich, Matt B. Robers, James J. Cali, Jens M. Kelm, Wolfgang Moritz, and Dan F. Lazar; Promega Corporation, Madison, WI. and 2InSphero AG, Zürich, Switzerland; **2013**

A Bioluminescent Cell Viability Assay Optimized for 3D Microtissues; Michael P. Valley, Chad Zimprich, James J. Cali, and Dan F. Lazar; Promega Corporation **2013**

Design and Validation of Bioluminescent Assays for 3D Cell Culture Models; Terry L. Riss, Michael P. Valley, Chad A. Zimprich, Andrew L. Niles, Kevin R. Kupcho and Dan F. Lazar; Promega Corporation **2013**

CellTiter-96® AQ_{ueous} One Solution Cell Proliferation Assay

Promega Artikel

A HTS System for Screening Antiviral Compounds Using the CellTiter® 96 AQ_{ueous} One Solution System; Thomas Fletcher, III¹, Roger Ptak¹, Stacy Bartram¹, Susan Halliday¹, Robert Buckheit, Jr.¹, Rich Moravec² and Terry Riss²; *Promega Notes* **75**, 13–16; **2000**

Technically Speaking: Cell Viability Assays; Robert Deyes; *Promega Notes* **81**, 32–33; **2002**

Citation Note: HaloTag® Technology, P450-Glo® CYP2C8 Assay, and Beta-Glo® Assay; Terri Sundquist; *Cell Notes* **21**, 17 and 27; **2008**

Monitoring Viability During Gene-Directed Enzyme Prodrug Therapy with the CellTiter-Glo Assay and Human Neural Progenitor Cells; Elizabeth E. Capowski and Clive N. Svendsen; *Cell Notes* **20**, 6–8; **2008**

The Predictive Nature of High-Throughput Toxicity Screening Using a Human Hepatocyte Cell Line; Norman L. Sussman¹, Monika Walterschild¹, Terolyn Bulter¹, James J. Cali², Terry Riss², and James H. Kelly¹; *Cell Notes* **3**, 7–10; **2002**

Peer-Reviewed Publikationen

Tonello, F., Seweso, M., Marin, O., Mock, M., and Montecucco, C.; **Screening inhibitors of anthrax lethal factor.** *Nature* **418**, 386; **2002**
Notes: This brief communication discusses substrates of anthrax lethal factor that can be used for high-throughput screening of potential inhibitors. The CellTiter[®] Aqueous Cell Proliferation Assay was used to assess the effect of selected inhibitors on cytotoxicity of lethal factor in RAW264.7 cells.

CellTiter-Blue[®] Cell Viability Assay

Promega Artikel

Automating Promega Cell-Based Assays in Multiwell Formats; Tracy Worzella and Brad Larson; *Promega Notes* **85**, 25–27; **2003**

Introducing the CellTiter-Blue[®] Cell Viability Assay; Terry Riss and Rich Moravec; *Promega Notes* **83**, 10–13; **2003**

The CellTiter-Blue[®] Cell Viability Assay: Monitoring Cell Viability Using a Fluorescent Redox Indicator Dye; Rich Moravec and Terry Riss; *Cell Notes* **5**, 12–14; **2003**

Peer Reviewed Publikationen

Nakagawa, T., Shimizu, S., Watanabe, T., Yamaguchi, O., Otsu, K., Yamagata, H., Inohara, H., Kubo, T., Tsujimoto, Y. (2005) **Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death;** *Nature* **434**, 652–658
Notes: In this study, the role of Cyclophilin-D (CypD) in the mitochondrial permeability transition (mPT) response was investigated using CypD-deficient mice. The CellTiter[™] Blue Cell Viability Assay was used to measure the viability of mouse embryonic fibroblasts (MEF) and hepatocytes isolated from normal and CypD-deficient mice after exposure to various apoptotic stimuli and H₂O₂.

Niles, A.L., Moravec, R.A. and Riss, T.L. (2009) **In vitro viability and cytotoxicity testing and same-well multi-parametric combinations for high-throughput screening;** *Current Chemical Genomics* **3**, 33–41
Notes: The authors review the use of in vitro cytotoxicity testing in drug discovery to characterize the toxic potential of new chemical entities (nce) at the earliest stages of profiling.

Cecchi, C., Pensalfini, A., Baglioni, S., Fiorillo, C., Caporale, R., Formigli, L., Liguri, G. and Stefani, M. (2006) **Differing molecular mechanisms appear to underlie early toxicity of prefibrillar HypF-N aggregates to different cell types.** *FEBS J.* **273**, 2206–2222.

Notes: The CellTiter-Blue[®] Cell Viability Assay was used to monitor viability of Hend murine endothelial cells and IMR90 fibroblasts in the presence of various concentrations (0.02, 0.2, 2.0 or 20 μm) of the N-terminal domain of the prokaryotic hydrogenase maturation factor (HypF-N).

CellTiter-Fluor[™] Cell Viability Assay

Peer-Reviewed Publikationen aus Protokoll

Niles, A.L. *et al.* (2007) **A homogeneous assay to measure live and dead cells in the same sample by detecting different protease markers;** *Anal. Biochem.* **366**, 197–206.

Zhang, J-H. *et al.* (1999) **A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high-throughput screening assays;** *J. Biomol. Screen.* **4**, 67–73.

BacTiter-Glo[™] Microbial Cell Viability Assay

Promega Artikel

BacTiter-Glo[™] Assay for Antimicrobial Drug Discovery and General Microbiology; Frank Fan, Braeden Butler, Terry Riss and Keith Wood; *Promega Notes* **89**, 25–27; **2005**

Quantitate Microbial Cells Using a Rapid and Sensitive ATP-Based Luminescent Assay; Frank Fan, Braeden Butler, Terry Riss and Keith Wood; *Promega Notes* **88**, 2–4; **2004**

Determining Microbial Viability Using a Homogeneous Luminescent Assay; Frank Fan, Braeden Butler, Terry Riss, and Keith Wood; *Cell Notes* **10**, 2–5; **2004**

ATP Measurement as a Means for Directly Estimating Active Biomass; Silvana Velten, Frederik Hammes, Markus Boller and Thomas Egli; *Promega Notes* **97**, 1–17; **2007**

Application of the BacTiter-Glo[™] Assay for Rapid Enumeration and Screening of Antimicrobial Compounds for Mycobacterium avium Complex Bacteria; Alice Yuroff¹, Frank Fan², Braeden Butler² and Michael Collins¹; *Promega Notes* **98**, 8–10; **2008**

Peer-Reviewed Publikationen

Bosshard, F., Berney, M. and Scheifele, M. (2009) **Solar disinfection (SODIS) and subsequent dark storage of Salmonella typhimurium and Shigella flexneri;** *J. Microbiology* **155**, 1310–17

Notes: In this study, the effect of solar disinfection on *Shigella flexneri* and *Salmonella typhimurium* in drinking water samples was evaluated. A variety of viability indicators were used to investigate the effectiveness of the disinfection method, including measurement of cellular ATP levels. The BacTiter-Glo Assay was used for ATP detection.

Martinez, A., Bradley, A.S., Waldbauer, J.R., Summons, R.E. and DeLong, E.F. (2007) **Proteorhodopsin photosystem gene expression enables photophosphorylation in a heterologous host;** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 5590–5595

Notes: Photorhodopsins (PRs), retinal-binding membrane proteins that catalyze light-activated proton efflux across the cell membrane, are found in many marine bacteria. These authors screened a fosmid library of planktonic DNA, looking for PR-expressing clones. The BacTiter-Glo[™] System was used to measure light-induced changes in ATP levels.

Berney, M., Weilenmann H.U., and Egli, T. (2006) **Flow-cytometric study of vital cellular functions in Escherichia coli during solar disinfection (SODIS);** *Microbiology* **152**, 1719–1729

Notes: The BacTiter-Glo[™] Microbial Cell Viability Assay was used to assess total ATP levels in *Escherichia Coli* strain K-12 MG165 cultures.

Zytotoxizität

CellTox[™] Green Cytotoxicity Assay

Promega Artikel

An Image-Based Method for Real-Time Monitoring of Cytotoxicity Using CellTox[™] Green Dye and the Essen Bioscience InCuCyte[™] FLR Live Content Imaging System; Tracy Worzella, Andrew Niles, Lyndsey Helley, Michael Conley and Terry Riss, **2013**

Events Using Multiplexed Assays; Alisha Truman and Brad Hook, *Promega Corporation*, **2013**

Gain More Informative Data by Multiplexing a Fluorescent Real-Time Cytotoxicity Assay with Luminescent, Fluorescent or Colorimetric Viability Assays; Brad Hook, Mark Bratz and Trista Schagat, **2013**

Real-Time Cytotoxicity Analysis; Tracy Worzella, Andrew Niles, Thomas Hengstl, Michael Fejtl, Christian Oberdanner and Jessica Merlino, **2013**

Measuring Cytotoxicity in Real Time with a Highly Stable Green Dye; Niles, A., Worzella, T., Zhou, M., McDougall, M. and Lazar, D., **2013**

Peer-Reviewed Publikationen

Lucius Chiaraviglio and James E. Kirb; **Evaluation of Impermeant, DNA-Binding Dye Fluorescence as a Real-Time Readout of Eukaryotic Cell Toxicity in a High Throughput Screening Format**; *Assay Drug Dev Technol.* **2014** May 1; 12(4): 219–228.

Cheree Fitzgibbon, Saleh Ihmaid, Jasim Al-Rawi, Terri Meehan-Andrews, and Christopher Bradley; **Chemo-sensitisation of HeLa cells to Etoposide by a Benzoxazine in the absence of DNA-PK inhibition**; *Invest New Drugs.* **2013**; 31(6): 1466–1475.

Rachel A. S. Smith, Aleksey Nabok, Ben J. F. Blakeman, Wei-Feng Xue, Benjamin Abell, and David P. Smith; **Analysis of Toxic Amyloid Fibril Interactions at Natively Derived Membranes by Ellipsometry**; *PLoS One.* **2015**; 10(7): e0132309

CytoTox-Fluor™ Cytotoxicity Assay

Promega Artikel

High-Throughput Automation of Multiplexed Cell-Based Assays for Viability and Cytotoxicity; Tracy Worzella¹, Michael Busch² and Andrew Niles¹; *Cell Notes* **20**, 26–29; **2008**

Using Protease Biomarkers to Measure Viability and Cytotoxicity; Andrew Niles, Michael Scurria, Laurent Bernad, Brian McNamara, Kay Rashka, Deborah Lange, Pam Guthmiller and Terry Riss; *Cell Notes* **19**, 16–20; **2007**

Peer-Reviewed Publikationen

Zhang *et al.* (1999) **A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high-throughput screening assays**; *J. Bio. Mol. Screen.* **4**, 67.73

CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay

Peer-Reviewed Publikationen

Niles, A.L. *et al.* (2007) **A homogeneous assay to measure live and dead cells in the same sample by detecting different protease markers**; *Anal. Biochem.* **366**, 197–206

Zhang, J.H., Chung, T.D. and Oldenburg, K. (1999) **A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high-throughput screening assays**; *J. Bio. Mol. Screen.* **4**, 67–73

CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay

Promega Artikel

Automating Promega Cell-Based Assays in Multiwell Formats; Tracy Worzella and Brad Larson; *Promega Notes* **85**, 25–27; **2003**

Introducing the CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay; Terry Riss and Rich Moravec; *Promega Notes* **82**, 15–18; **2002**

Frequently Asked Questions: CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay; Abigail Farfan and Trista Schagat; *Cell Notes* **6**, 19–20; **2003**

Introducing the CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay; Terry Riss and Rich Moravec; *Cell Notes* **4**, 6–9; **2002**

CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay: A Tool for Automated Cytotoxicity Research; Randy Hoffman; *Cell Notes* **4**, 10–11; **2002**

Peer-Reviewed Publikationen

Chen, J., Douglas, G.C., Thirkill, T.L., Lohstroh, P.N., Bielmeier, S.R., Narotsky, M.G., Best, D.S., Harrison, R.A., Natarajan, K., Pegram, R.A., Overstreet, J.W. and Lasley, B.L. (2003) **Effect of bromodichloromethane on chorionic gonadotrophin secretion by human placental trophoblast cultures**; *Toxicol. Sci.* **76**, 75–82

Notes: The effects of bromodichloromethane (BDCM), a byproduct of water disinfection processes, on trophoblast cells isolated from term human placentas were investigated. The CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay was used to assess cell membrane integrity and LDH release after trophoblasts were exposed to BDCM for 24 hours.

Cox, S., Cole, M., Mankarious, S., and Tawil, N. (2003) **Effect of tranexamic acid incorporated in fibrin sealant clots on the cell behavior of neuronal and nonneuronal cells**. *J. Neurosci. Res.* **72(6)**, 734–746

Notes: The CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay was used to assess the cytotoxic effects of tranexamic acid (t-AMCHA) on neural human normal progenitor (NHNP) or normal human dermal fibroblasts (NHDF) cells.

Kato, A., Okaya, T., and Lentsch, A.B. (2003) **Endogenous IL-13 protects hepatocytes and vascular endothelial cells during ischemia/reperfusion injury**; *Hepatology* **37(2)**, 304–312

Notes: Mouse hepatocytes (AML-12 cell line) were assayed for cytotoxicity to 1 mmol/L hydrogen peroxide with and without 20ng/mL IL-13 using the CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay. *assays; J. Bio. Mol. Screen.* **4**, 67–73

ViralTox-Glo™ Assay

Promega Artikel

Determine Viral-Induced Cytopathic Effect Using a Luminescent Assay; Andrew Niles, Jim Noah, Lynn Rasmussen and Dan Lazar, **2013**

Apoptose

Caspase-Glo® 3/7 Assay

Promega Artikel

Technically Speaking: Cell-Based Caspase Assays Analyzing the Data; Martha O'Brien; *Promega Notes* **87**, 33–36; **2004**

Correlation of Caspase Activity and ChemoResponse in Epithelial Ovarian Cancer Cell Lines; Ayesha B. Alvero and Gil Mor; *Promega Notes* **87**, 15–17; **2004**

Detecting UV Irradiation-Induced Apoptosis with the Caspase-Glo® 3/7 Assay; Ronald Lai; *Promega Notes* **85**, 19–20; **2003**

Automating Promega Cell-Based Assays in Multiwell Formats; Tracy Worzella and Brad Larson; *Promega Notes* **85**, 25–27; **2003**

Citation Note: HaloTag® Technology, P450-Glo® CYP2C8 Assay and Beta-Glo® Assay; Terri Sundquist; *Cell Notes* **21**, 17 and 27; **2008**

Peer-Reviewed Publikationen

Straszewski-Chavez, A., Visintin, I.P., Karassina, N., Los, G., Liston, P., Halaban, R., Fadiel, A. and Mor, G. (2007) **XAF1 mediates tumor necrosis factor- α -induced apoptosis and X-linked inhibitor of apoptosis cleavage by acting through the mitochondrial pathway**; *Journal of Biological Chemistry* **282**, 13059–13072.

Notes: The authors sought to determine the mechanism by which first-trimester trophoblasts resist FAS ligand-induced apoptosis but remain sensitive to TNF α -mediated apoptosis. First trimester trophoblasts express XAF1 [X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP)-associated factor 1], which may

be involved in regulating their response to proapoptotic signals. The authors created HaloTag™-XAF1 fusion constructs and transiently transfected the first trimester trophoblast cell line (3A). Cells were labeled with the HaloTag™ TMR ligand, and XAF1 was shown to localize to the cytoplasm. 3A cells transiently transfected with the fusion construct were also separated into cytoplasmic and mitochondrial fractions. The fractions were labeled with HaloTag™ TMR ligand. Expression of the fusion peaked at 48 hours after transfection in both mitochondrial and cytoplasmic fractions. TNF α -treatment of 3A cells induced translocation of endogenous XAF1 to the mitochondria. The authors used the Caspase-Glo® Assays to demonstrate activation of caspase-3 and caspase-9 in response to expression of XAF-1.

Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay

Promega Artikel

Apo-ONE™ Homogeneous Caspase 3/7 Assay: Rapid Apoptosis Detection in High-Throughput Applications; Jean Humpal-Winter, Andrew Niles and Michael Bjerke; *Promega Notes* **79**, 33–35; **2001**

Automate the Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay on the Eppendorf epMotion® 5075 TMX; Dagmar Bracht and Sylvia Baranowski; Eppendorf Instrumente GmbH, Hamburg, Germany; **2009**

Automating Promega Cell-Based Assays in Multiwell Formats; Tracy Worzella and Brad Larson; **2003**

In Vitro Toxicology and Cellular Fate Determination Using Promega CellBased Assays; Randy Hoffman; *Promega Notes* **82**, 19–22; **2002**

Technically Speaking: Cell Viability Assays; Robert Deyes; *Promega Notes* **81**, 32–33; **2002**

Peer-Reviewed Artikel

Niles, A.L., Moravec, R.A. and Riss, T.L. (2009) **In vitro viability and cytotoxicity testing and same-well multi-parametric combinations for high-throughput screening;** *Current Chemical Genomics* **3**, 33–41

Notes: The authors review the use of in vitro cytotoxicity testing in drug discovery to characterize the, D.C. (2004) **Argininosuccinate synthase expression is required to maintain nitric oxide production and cell viability in aortic endothelial cells;** *J. Biol. Chem.* **279(18)**, 18353–18360

Notes: In this study, the effect of argininosuccinate synthase (AS) on nitric oxide (NO) signaling was explored in bovine aortic endothelial cells. Expression of argininosuccinate synthase was knocked down using in-vitro transcribed siRNAs. Using the CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay and the Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay, it was found that reduction of AS leads to the induction of apoptosis.

Bruno, I.G., Jin, W., Cote, G.J. (2004) **Correction of aberrant FGFR1 alternative RNA splicing through targeting of intronic regulatory elements;** *Hum. Mol. Genet.* **13(20)**, 2409–20

Notes: Human U251 glioblastoma cell lines treated with antisense morpholino oligonucleotides were assessed for viability and apoptosis by multiplexing the CellTiter-Blue® Cell Viability and Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assays on single cell cultures. Cell viability was measured 4 hours after the addition of the CellTiter-Blue® Cell Viability Reagent to the cultures. Next, apoptosis measurements were performed on the same cell cultures by adding Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay reagent to the cultures. Caspase-3/7 activity was then measured 12 hours later.

CaspACE™ FITC-VAD-FMK in situ Marker

Promega Artikel

CaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Marker as a Probe for Flow Cytometry Detection of Apoptotic Cells; Francis Belloc, Olivier Garnier, Catherine Boyer and Francis Lacombe; *Promega Notes* **76**, 10–13; **2000**

CaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Marker for Apoptosis: Applications for Flow Cytometry; Matt Sylte¹, Martha O'Brien², Thomas J. Inzana³ and Chuck Czuprynski¹; *Promega Notes* **75**, 20–23; **2000**

CaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Marker as a Probe for Flow Cytometry Detection of Apoptotic Cells; Francis Belloc, Olivier Garnier, Catherine Boyer and Francis Lacombe; **2000**

A Herpes Simplex Virus Type 2 Protein (ICP10 PK) Inhibits Caspase-3 Activation in Hippocampal Neurons; D. Perkins, E.F.R. Pereira and L. Aurelian; *Cell Notes* **2**, 7–8; **2001**

Akt-Mediated Survival of Oligodendrocytes Induced by Neuregulins; Ana I. Flores and Wendy B. Macklin; **2001**

Peer-Reviewed Publikationen

Rouet-Benzineb, P., Rouyer-Fessard, C., Jarry, A., Avondo, V., Pouzet, C., Yanagisawa, M., Laboisie, C., Laburthe, M. and Voisin, T. (2004) **Orexins acting at native OX1 receptor in colon cancer and neuroblastoma cells or at recombinant OX1 receptor suppress cell growth by inducing apoptosis;** *J. Biol. Chem.* **279**, 45875–45886

Notes: Human colon cancer (HT29-D4) cells were analyzed for activated caspases using the CaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Marker. HT29-D4 cells (7 x 10⁵) were cultured in the presence or absence of 1 μ M orexins, peptide growth inhibitors. Cells were washed, and bound CaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Marker was visualized by confocal microscopy.

Qi, H., Li, T.-K., Kuo, D., Nur-E-Kamal, A., Liu, L.F. (2003) **Inactivation of Cdc13p triggers MEC-1-dependent apoptotic signals in yeast;** *J. Biol. Chem.* **278**, 15136–15141

Notes: Apoptosis in yeast cells was detected using the CaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ marker. Yeast cells were stained with the marker at room temperature, washed and resuspended. FACS analysis of cells was performed with excitation at 488nm and emission of 520–550nm.

Vaudry, D., Rousselle, C., Basille, M., Falluel-Morel, A., Pamantung, T.F., Fontaine, M., Fournier, A., Vaudry, H., and Gonzalez, B.J. (2002) **Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide protects rat cerebellar granule neurons against ethanol-induced apoptotic cell death;** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 6398

Notes: The effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACP) on ethanol induced caspase activation in cultured granule cells was measured using the CaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Marker.

Multiplexing

Multitox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay

Promega Artikel

Multiplexing Cell-Based Assays: Get More Biologically Relevant Data; Kyle Hooper; **2011**

Using Protease Biomarkers to Measure Viability and Cytotoxicity; Andrew Niles, Michael Scurria, Laurent Bernad, Brian McNamara, Kay Rashka, Deborah Lange, Pam Guthmiller and Terry Riss; *Cell Notes* **19**, 16–20; **2007**

Multiplexed Viability Cytotoxicity And Apoptosis Assays For Cell-Based Screening; Andrew Niles¹, Tracy Worzella¹, Michael Scurria², William Daily², Laurent Bernad², Pam Guthmiller¹, Brian McNamara¹, Kay Rashka¹, Deborah Lagne¹ and Terry L. Riss¹; *Cell Notes* **16**, 12–15; **2006**

MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay Technology; Andrew L. Niles¹, Richard A. Moravec¹, Michael Scurria², William Daily², Laurent Bernad², Brian McNamara¹, Anissa Moraes¹, Kay Rashka¹, Deborah Lange¹ and Terry L. Riss¹; *Cell Notes* **15**, 11–15; **2006**

Monitor the Ratio of Live and Dead Cells Within a Population MultiTox Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay; Andrew L. Niles, Richard A. Moravec, Michael Scurria, William Daily, Laurent Bernad, Brian McNamara,

Pam Guthmiller, Kay Rashka Deborah Lange, Michele Arduengo and Terry L. Riss; *Promega Notes* **94**, 22–26; **2006**

Peer-Reviewed Publikationen

Niles, A.L., Moravec, R.A. and Riss, T.L. (2009) **In vitro viability and cytotoxicity testing and same-well multi-parametric combinations for high-throughput screening**; *Current Chemical Genomics* **3**, 33–41

Notes: The authors review the use of in vitro cytotoxicity testing in drug discovery to characterize the toxic potential of new chemical entities (nce) at the earliest stages of profiling.

Grenier, A.L., Abu-Ihweij, K., Zhang, G., Ruppert, S.M., Boohaker, R., Slepov, E.R., Pridemore, K., Ren, J.J., Fliegel, L. and Khaled, A.R. (2008) **Apoptosis-induced alkalization by the Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1 is mediated through phosphorylation of amino**; *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **295**, C883–C896

Notes: The authors wanted to examine the role of plasma membrane protein Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1 (NHE1) in apoptosis. API cells, a NHE1-deficient Chinese hamster ovary cell line, was cotransfected with wild-type NHE1 or mutant NHE1 constructs and destabilized yellow fluorescent protein (YFP). Cells were plated at a density of 1 x 10⁴ cells/well in a 96-well plate with or without FBS. To induce apoptosis in the cells, serum was withdrawn for 24 hours. The ratio of dead-to-live cells was measured using the MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay. Cell death was also determined by examining the loss of YFP fluorescence under a microscope.

Niles, A.L., Moravec, R.A., Hesselberth, P.E., Scurria, M.A., Daily, W.J. and Riss, T.L. (2007) **A homogeneous assay to measure live and dead cells in the same sample by detecting different protease markers**; *Anal. Biochem.* **366**, 197–206

Notes: The authors of this paper describe an assay that uses protease biomarkers to assess cell viability and cell death simultaneously in a population of cells. The assay detects an ubiquitous protease activity that is associated with live cells and a second protease activity that is associated with cells that have lost membrane integrity. The readouts are either fluorescent or fluorescent and luminescent. The assay can be performed in multiplex with other assays, such as caspase assays, to gain additional information on the cell population, and it is amenable to high-throughput screening.

Multitox-Glo Multiplex Cytotoxicity Assay

Promega Artikel

High-Throughput Automation of Multiplexed Cell-Based Assays for Viability and Cytotoxicity; Tracy Worzella, Michael Busch and Andrew Niles; *Cell Notes* **20**, 26–29; **2008**

Using Protease Biomarkers to Measure Viability and Cytotoxicity; Andrew Niles, Michael Scurria, Laurent Bernad, Brian McNamara, Kay Rashka, Deborah Lange, Pam Guthmiller and Terry Riss; *Cell Notes* **19**, 16–20; **2007**

Measure Relative Numbers of Live and Dead Cells and Normalize Assay Data to Cell Number; Andrew Niles, Michael Scurria, Laurent Bernad, Brian McNamara, Kay Rashka, Deborah Lange, Pam Guthmiller, Tracy Worzella and Terry Riss; *Cell Notes* **18**, 15–20; **2007**

Measuring Cell Health and Viability Sequentially by Same-Well Multiplexing Using the GloMax[®]-Multi Detection System; Halina Zakowicz, Trista Schagat, David Yoder and Andrew Niles; *Promega Notes* **99**, 25–28; **2008**

Luminogenic Enzyme Substrates: The Basis for a New Paradigm in Assay Design; Poncho L. Meisenheimer¹, Martha A. O'Brien² and James J. Cali²; *Promega Notes* **100**, 22–26; **2008**

Peer-Reviewed Publikationen

Niles, A.L., Moravec, R.A. and Riss, T.L. (2009) **In vitro viability and cytotoxicity testing and same-well multi-parametric combinations for high-throughput screening**; *Current Chemical Genomics* **3**, 33–41

Notes: The authors review the use of in vitro cytotoxicity testing in drug discovery to characterize the toxic potential of new chemical entities (nce) at the earliest stages of profiling.

Niles, A.L., Moravec, R.A., Hesselberth, P.E., Scurria, M.A., Daily, W.J. and Riss, T.L. (2007) **A homogeneous assay to measure live and dead cells in the same sample by detecting different protease markers**; *Anal. Biochem.* **366**, 197–206

Notes: The authors of this paper describe an assay that uses protease biomarkers to assess cell viability and cell death simultaneously in a population of cells. The assay detects an ubiquitous protease activity that is associated with live cells and a second protease activity that is associated with cells that have lost membrane integrity. The readouts are either fluorescent or fluorescent and luminescent. The assay can be performed in multiplex with other assays, such as caspase assays, to gain additional information on the cell population, and it is amenable to high-throughput screening.

ApoLive-Glo[™] Multiplex Assay

Promega Artikel

Zakowicz, H. *et al.* (2008) **Measuring cell health and viability sequentially by samewell multiplexing using the GloMax[®]-Multi Detection System**; *Promega Notes* **99**, 25–8

Worzella, T., Busch, M. and Niles, A.L. (2008) **High-throughput automation of multiplexed cell-based methods for viability and cytotoxicity**; *Cell Notes* **20**, 26–9

Niles, A.L. *et al.* (2007) **Using protease biomarkers to measure viability and cytotoxicity**; *Cell Notes* **19**, 16–20

Niles, A.L. *et al.* (2007) **Measure relative numbers of live and dead cells and normalize assay data to cell number**; *Cell Notes* **18**, 15–20

Peer-Reviewed Publikationen

Niles, A.L. *et al.* (2007) **A homogeneous assay to measure live and dead cells in the same sample by detecting different protease markers**; *Anal. Biochem.* **366**, 197–206

Inglese, J. *et al.* (2006) **Quantitative high-throughput screening: A titration-based approach that efficiently identifies biological activities in large chemical libraries**; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 11473–8

Apotox-Glo[™] Triplex Assay

Promega Artikel

Multiplexing Cell-Based Assays: Get More Biologically Relevant Data; Kyle Hooper; **2011**

The Versatility of the GloMax[®]-Multi+ Detection System with Instinct Software; Doug Wiecezorek, Amanda Bychinski, Simon Allard and Trista Schagat; **2010**

Determining the Predictive Mechanism of Toxicity Using a Single-Well Multiplexed Assay; Sarah Shultz; **2009**

Peer-Reviewed Publikationen

Niles, A.L. *et al.* (2007) **A homogeneous assay to measure live and dead cells in the same sample by detecting different protease markers**; *Anal. Biochem.* **366**, 197–206

O'Brien, M.A. *et al.* (2005) **Homogeneous, bioluminescent protease assays: Caspase-3 as a model**; *J. Biomol. Screen.* **10**, 137–48

Inglese, J. *et al.* (2006) **Quantitative high-throughput screening: A titration-based approach that efficiently identifies biological activities in large chemical libraries**; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 11473–8

Niles, A.L., Moravec, R.A. and Riss, T.L. (2008) **Update on in vitro cytotoxicity assays for drug development**; *Expert Opin. Drug Discovery* **3**, 655–69

ONE-Glo™ + Tox Luciferase Reporter and Cell Viability Assay

Promega Artikel

Zakowicz, H. *et al.* (2008) **Measuring cell health and viability sequentially by samewell multiplexing using the GloMax®-Multi Detection System**; *Promega Notes* **99**, 25–8

Schagat, T. and Kopish, K. **Optimize Transfection of Cultured Cells**. 2009. Available from: http://www.promega.com/pubs/tpub_020.htm

Peer-Reviewed Publikationen

Niles, A.L. *et al.* (2007) **A homogeneous assay to measure live and dead cells in the same sample by detecting different protease markers**; *Anal. Biochem.* **366**, 197–206

Mitochondrial ToxGlo™ Assay

Peer-Reviewed Publikationen

Niles, A.L. *et al.* (2007) **A homogeneous assay to measure live and dead cells in the same sample by detecting different protease biomarkers**; *Anal. Biochem.* **366**, 197–206

Marroquin, L. D. *et al.* (2007) **Circumventing the Crabtree effect: Replacing media glucose with galactose increases susceptibility of HepG2 cells to mitochondrial toxicants**; *Toxicol. Sci.* **97**, 539–47

Rossignol, R. *et al.* (2004) **Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells**; *Cancer Res.* **64**, 985–93

Rodriguez-Enriquez, S. *et al.* (2001) **Multisite control of the Crabtree effect in ascites hepatoma cells**; *Eur. J. Biochem.* **268**, 2512–9

Zellmetabolismus

NAD(P)/NAD(P)H-Glo™ Assays

Promega Artikel

A Novel Bioluminescent HTS Method for Rapid NAD(P)/NAD(P)H Detection; Jolanta Vidugiriene, Donna Leippe, Mary Sobol, Wenhui Zhou, Gediminas Vidugiris, Troy Good, Laurent Bernad, Poncho Meisenheimer and James J. Cali; Promega Corporation **2013**

Novel Bioluminescent Cell Metabolism Assays Integration with HP D300 Digital Dispenser and Tecan Gas Controlled Module Equipped Infinite M200 Pro Reader; Gediminas Vidugiris, Donna Leippe, Mary Sobol, Sarah Duellman, Wenhui Zhou, Jolanta Vidugiriene, Jessica Merlino, Michael Reitman, Thomas Hengstl, Poncho Meisenheimer, Cristopher Cowan, James Cali; Promega Corporation, Madison, WI; Promega Biosciences, LLC, San Luis Obispo, CA; Tecan Schweiz, Männedorf, Switzerland; Tecan US, Morrisville, NC; Tecan Austria GmbH, Groedig; Austria, **2013**

Oxidativer Stress

GSH-Glo™ Glutathione Assay

Promega Artikel

Homogeneous Luminescence-Based Assay for Quantifying the Glutathione Content in Mammalian Cells; Christiane Scherer, Silvia Christofanon, Mario Dicato, and Marc Diederich; *Cell Notes* **22**, 7–9; **2008**

Detecting Toxicological Responses in Cells with the Bioluminescent GSH-Glo™ Glutathione Assay; Nancy Murphy, John Schultz, Wenhui Zhou and Keith V. Wood; *Cell Notes* **20**, 15–17; **2008**

Peer-Reviewed Publikationen

Tang, Y., Scheef, E.A., Wang, S., Sorenson, C.M., Marcus, C.B., Jefcoate, C.R. and Sheibani, N. (2009) **CYP1B1 expression promotes the proangiogenic phenotype of endothelium through decreased intracellular oxidative stress and thrombospondin-2 expression**; *Blood* **113**, 744–754

Notes: The authors tested if CYP1B1 removed cellular oxygenation products that induce oxidative stress and promote the release of antiangiogenic factors. The P450-Glo™ CYP1B1 Assay was used to determine CYP1B1 activity. The presence of glutathione was assessed using either 104 retinal endothelial cells or 50µl of mouse retinal extracts dispensed into each well of a 96-well plate with the GSH-Glo™ Glutathione Assay.

Reisman, S.A., Yeager, R.L., Yamamoto, M. and Klaassen, C.D. (2009) **Increased Nrf2 activation in livers from Keap1-knockdown mice increases expression of cytoprotective genes that detoxify electrophiles more than those that detoxify reactive oxygen species**; *Toxicol. Sci.* **108**, 35–47

Notes: In this study, the researchers wanted to determine the role of kelch-like ECH associated protein 1 knockdown (Keap1-kd) mice protein products, which are thought to protect against oxidative and electrophilic stress, and compare the hepatic phenotype with that of transcription factor nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)-null and wild-type mice. Microsomal suspensions from liver homogenates were prepared, and bile was collected from wild-type, Nrf2-null, and Keap1-kd mice. Reduced GSH was quantified using the GSH-Glo™ Glutathione Assay.

Jamaluddin, M.S., Wang, X., Wang, H., Rafael, C., Yao, Q. and Chen, C. (2009) **Eotaxin increases monolayer permeability of human coronary artery endothelial cells**. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **Sept 24**

Notes: Glutathione levels were assessed in human coronary artery endothelial cells (HCAECs) as a measure of oxidative stress. HCAECs were treated with either 100ng/ml eotaxin, a newly discovered chemokine, or pretreated with 2µmol/l MnTBAP for 30 minutes followed by eotaxin treatment for 45 minutes. Positive controls were treatment with 10µg/ml antimycin A and 2ng/ml TNF-α. Cellular glutathione was measured using the GSH-Glo™ Glutathione Assay.

GSH/GSSG-Glo™ Assay

Promega Artikel

Detecting Ozone-Induced Changes in Cellular Redox Balance via GSH/GSSG-Glo™ Assay; Madeleine Chalfant and Karen Bernd; **2011**

Peer-Reviewed Publikationen

Pompella, A. *et al.* (2003) **The changing faces of glutathione, a cellular protagonist**; *Biochem. Pharmacol.* **66**, 1499–1503

Ballatori, N. *et al.* (2009) **Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases**; *Biol. Chem.* **390**, 191–214

Rebrin, I. and Sohal, R.S. (2008) **Pro-oxidant shift in glutathione redox state during aging**; *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 1545–52

ROS-Glo™ H₂O₂ Assay

Promega Artikel

A New Luminescent Assay for Detection of Reactive Oxygen Species; Sarah Duellman, John Shultz, Gediminas Vidugiris, and James Cali, **2013**
www.promega.de/resources/scientific_posters/posters/ros-glo-h2o2-assay-a-luminescent-assay-for-detection-of-reactive-oxygen-species-poster/

Cell-Based Bioluminescent Hydrogen Peroxide Assay: Effects of Inducers and Generators with Cells; Hui Wang, Jean Osterman, Wenhui Zhou, Poncho Meisenheimer, John Shultz, Sarah Duellman, Jolanta Vidugiriene, Gediminas Vidugiris and James Cali, **2013**
www.promega.de/resources/scientific_posters/posters/cell-based-bioluminescent-hydrogen-peroxide-assay-effects-of-inducers-and-generators-poster/

Epigenetische Assays

HDAC-Glo™ I/II Assay

Peer-Reviewed Publikationen

Smith, E.R. *et al.* (2000) **The Drosophila MSL complex acetylates histone H4 at lysine 16, a chromatin modification linked to dosage compensation;** *Mol. Cell. Biol.* **20**, 312–8

Thorne, N. *et al.* (2010) **Apparent activity in high-throughput screening: Origins of compound-dependent assay interference;** *Curr. Opin. Chem. Biol.* **14**, 315–24

Auld, D. S. *et al.* (2008) **Characterization of chemical libraries for luciferase inhibitory activity;** *J. Med. Chem.* **51**, 2372–86

HDAC-Glo™ I/II Screening Systems

Siehe HDAC-Glo™ I/II Assay

SIRT-Glo™ Assays and Screening Systems

Peer-Reviewed Publikationen

Abraham, J. *et al.* (2000) **Post-translational modification of p53 protein in response to ionizing radiation analyzed by mass spectrometry;** *J. Mol. Biol.* **295**, 853–64

Thorne, N. *et al.* (2010) **Apparent activity in high-throughput screening: Origins of compound-dependent assay interference;** *Curr. Opin. Chem. Biol.* **14**, 315–24

Auld, D. S. *et al.* (2008) **Characterization of chemical libraries for luciferase inhibitory activity;** *J. Med. Chem.* **51**, 2372–86

Zellsignalwege

cAMP-Glo™ Assay

Promega Artikel

Monitor GPCR Modulation of Cellular cAMP with an HTS Bioluminescence-Based Assay; Said A. Goueli, Kevin Hsaio and Jolanta Vidugiriene; *Promega Notes* **97**, 24–27; **2007**

Monitoring the Activity of GPCR Modulated by Lipid or Free Fatty Acid Agonists; Said Goueli and Kevin Hsaio; *Cell Notes* **23**, 13–16; **2009**

Peer-Reviewed Publikationen

Kumar, M., Hsiao, K., Vidugiriene, J. and Goueli, S.A. (2007) **A bioluminescent-based, HTS-compatible assay to monitor G-protein-coupled receptor modulation of cellular cyclic AMP;** *ASSAY and Drug Development Technologies* **5**, 237–245

Notes: The authors of this paper introduce a luminescent assay to monitor changes in cellular cAMP concentration. The assay can be used to study the activity of G-protein coupled receptors that modulate adenylate cyclase activity. The assay is compatible with high-throughput screening in 96-, 384- and 1536-well formats.

ADP-Glo™ Kinase Assay

Promega Artikel

Screening and Profiling Kinase Inhibitors with a Luminescent ADP Detection Platform; Hicham Zegzouti, Juliano Alves, Tracy Worzella, Gediminas Vidugiris, Gregg Cameron, Jolanta Vidugiriene and Said Goueli; **2011**

Peer-Reviewed Publikationen aus Protokoll

Auld, D.S. *et al.* (2009) **A basis for reduced chemical library inhibition of firefly luciferase obtained from directed evolution;** *J. Med. Chem.* **52**, 1450–8

Zhang, J.H. *et al.* (1999) **A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays;** *J. Biomol. Screen.* **4**, 67–73

Kinase-Glo® Luminescent Kinase Assay

Promega Artikel

Introducing the Kinase-Glo® Luminescent Kinase Assay; Richard Somberg, Becky Pferdihert and Kevin Kupcho; *Promega Notes* **83**, 14–17; **2003**

Screen for Kinase Modulators in a High-Throughput Format with Promega Kinase Reagents; Michael Curtin; *Cell Notes* **20**, 21–24, *Correction published in Cell Notes* **22** (PDF file); **2008**

The Biology of Chemical Space; John Watson; *Cell Notes* **13**, 3–4; **2005**

Choosing the Best Kinase Assay to Meet Your Research Needs; Michael Curtin; *Cell Notes* **13**, 11–15; **2005**

Assay Virtually Any Kinase with Kinase-Glo® Plus Luminescent Kinase Assay: A Homogeneous High-Throughput Assay; Said Goueli and Kevin Hsaio; *Cell Notes* **12**, 8–12; **2005**

Peer-Reviewed Publikationen

Kannan, S., Audet, A., Huang, H., Chen, L.-J. and Wu, M. (2008) **Cholesterol-rich membrane rafts and Lyn are involved in phagocytosis during Pseudomonas aeruginosa infection;** *J. Immunology* **180**, 2396–2408

Notes: The authors of this study investigated the role of Lyn, a Src-family tyrosine kinase, in regulating the formation of the phagosome in alveolar macrophages in response to Pseudomonas aeruginosa (PA) infection. The Kinase-Glo® Assay was used to assess Lyn activity, using acid-denatured enolase as the substrate. The authors found that Lyn kinase activity was increased following infection with PA.

Wierenga, K.J., Lai, K., Buchwald, P. and Tang, M. (2008) **High-throughput screening for human galactokinase inhibitors;** *J. Biomol. Screen.* **13**, 415–423

Notes: The authors searched for small-molecule inhibitors of galactokinase (GALK). They developed an HTS assay using the Kinase-Glo® Assay System. The HTS assay used 15 μM ATP and α-D-galactose as the substrate and was performed in 384-well plates against 50,000 small molecules.

Two hundred compounds were identified from the primary screen as GALK inhibitors.

Baki, A., Bielik, A., Molnár, L., Szendrei, G. and Keserü, G.M. (2007) **A high throughput luminescent assay for glycogen synthase kinase-3 β inhibitors**; *Assay and Drug Development Technologies* **5**, 75–83

Notes: These authors used the Kinase-Glo[®] Luminescent Kinase Assay to perform a high-throughput screening assay for inhibitors of glycogen synthase kinase-3 β in 96-well plates.

AMP-Glo™ Assay

Peer-Reviewed Publikationen

Judith Wahrheit and Elmar Heinzle; **Sampling and quenching of CHO suspension cells for the analysis of intracellular metabolites**; *BMC Proc.* **2013**; 7(Suppl 6): P42

PDE-Glo™ Phosphodiesterase Assay

Peer-Reviewed Publikationen

Barad, M. *et al.* (1998) **Rolipram, a type IV-specific phosphodiesterase inhibitor, facilitates the establishment of long-lasting long-term potentiation and improves memory**; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 15020–5

Lehnart, S.E. *et al.* (2005) **Phosphodiesterase 4D deficiency in the ryanodine-receptor complex promotes heart failure and arrhythmias**; *Cell* **123**, 25–35

Metabolismus von Wirkstoffen – ADME Assays

P450-Glo™ CYP450 Assay Systems

Promega Artikel

Luminogenic Enzyme Substrates: The Basis for a New Paradigm in Assay Design; Poncho L. Meisenheimer, Martha A. O'Brien, and James J. Cali; *Cell Notes* **22**, 10–14; **2008**

Citation Note: HaloTag[®] Technology, P450-Glo[®] CYP2C8 Assay, and Beta-Glo[®] Assay; Terri Sundquist; *Cell Notes* **21**, 17 and 27; **2008**

Custom Enzyme Substrates for Luciferase-Based Assays; Neal Cosby¹, Mike Scurria², William Daily² and Tim Ugo²; *Cell Notes* **18**, 9–11; **2007**

In Vitro Compound Profiling in 384- and 1536-Well Formats Using Bioluminescent ADME Assays to Understand In Vivo Biology; Tracy Worzella¹, James Cali¹, Neal Cosby¹, Jean Shieh², Aoife Gallagher³, Kim Titus⁴, Gerlinde Zerza-Schnitzhofer²; *Cell Notes* **16**, 4–8; **2006**

P450Glo[®] CYP2C19 and CYP2D6 Assays and Screening Systems: The Method of Choice for in vitro P450 Assays; James J. Cali, Dongping Ma, Mary Sobol, Troy Good and David Liu; *Cell Notes* **14**, 20–24; **2006**

Peer-Reviewed Publikationen

Tang, Y., Scheef, E.A., Wang, S., Sorenson, C.M., Marcus, C.B., Jefcoate, C.R. and Sheibani, N. (2009) **CYP1B1 expression promotes the proangiogenic phenotype of endothelium through decreased intracellular oxidative stress and thrombospondin-2 expression**; *Blood* **113**, 744–754

Notes: The authors tested if CYP1B1 removed cellular oxygenation products that induce oxidative stress and promote the release of angiogenic factors. The P450-Glo™ CYP1B1 Assay was used to determine CYP1B1 activity. The presence of glutathione was assessed using either 104 retinal endothelial cells or 50 μ l of mouse retinal extracts dispensed into each well of a 96-well plate with the GSH-Glo™ Glutathione Assay.

Zhang, W., Chen, M., West, D.B. and Purchio, A.F. (2005) **Visualizing Drug Efficacy In Vivo**; *Molecular Imaging* **4**, 88–90

Notes: The authors of this paper present proof-of-concept experiments showing that drug metabolism enzyme activity can be measured in whole animals (in vivo) in real time. Using a mouse that expresses a luciferase transgene at constitutively high levels in the liver, the authors evaluated CYP3A4 and CYP3A7 activity using a CYP3A P450 substrate (proluciferin substrate) that is converted into a luciferase substrate by CYP3A activity. The luciferase substrate produced by the P450 activity is then used by luciferase in a reaction that produces light. An increase in luminescence correlates with an increase in enzyme activity in this assay.

P450-Glo™ CYP450 Screening Systems

Promega Artikel

Luminogenic Enzyme Substrates: The Basis for a New Paradigm in Assay Design; Poncho L. Meisenheimer, Martha A. O'Brien, and James J. Cali; *Cell Notes* **22**, 10–14; **2008**

Rat Hepatocyte Culture Physiology Shows Enhanced Cytochrome P450 Activity on a Synthetic Extracellular Matrix; Mark E. Rothenberg¹, James J. Cali², Mary Sobol², Michael W. Briggs¹ and Todd Upton¹; *Cell Notes* **20**, 18–20; **2008**

Screen for Cytochrome P450 Activity Using a Luminescent Assay; James Cali, Mary Sobol, Dongping Ma; *Cell Notes* **13**, 8–10; **2005**

Selective Cytochrome P450 4A11 Enzyme Assay Using a Novel Bioluminescent Probe Substrate; Mary Sobol, Dongping Ma and James J. Cali; **2008**

Cytochrome P450 4F12 Enzyme Assay Using a Novel Bioluminescent Probe Substrate; Mary Sobol, Dongping Ma, Carolyn C. Woodrooffe and James J. Cali

Peer-Reviewed Publikationen

Cali, J.S. *et al.* (2006) **Luminogenic cytochrome P450 assays**; *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2**, 629–45

Pgp-Glo™ Assay

Promega Artikel

The Biology of Chemical Space; John Watson; *Cell Notes* **13**, 3–4; **2005**

High-Throughput Compound Profiling Using Tecan Instrumentation; Tracy Worzella and Brad Larson; *Promega Notes* **92**, 4–6; **2006**

Identify P-glycoprotein Substrates and Inhibitors with the Rapid HTS Pgp-Glo™ Assay System; Dongping Ma and James J. Cali; *Promega Notes* **96**, 11–14; **2007**

Peer-Reviewed Publikationen

Ambudkar, S.V. *et al.* (1999) **Biochemical, cellular and pharmacological aspects of the multidrug transporter**; *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **39**, 361–98

Litman, T. *et al.* (2003) **Pumping of drugs by P-glycoprotein: A two step process?** *J. Pharm. Exp. Ther.* **3F07(3)**, 846–853

Boulton, D.W. *et al.* (2002) **In vitro P-glycoprotein affinity for a typical and conventional antipsychotics**; *Life Sciences* **71**, 163–169

MAO-Glo™ Assay Systems

Promega Artikel

In Vitro Compound Profiling in 384- and 1536-Well Formats Using Bioluminescent ADME Assays to Understand In Vivo Biology; Tracy Worzella¹, James Cali¹, Neal Cosby¹, Jean Shieh², Aoife Gallagher³, Kim Titus⁴, Gerlinde Zerza-Schnitzhofer⁵; *Cell Notes* **16**, 4–8; **2006**

The MAO-Glo™ Assay: A Bioluminescent, Coupled Assay for Monoamine Oxidase Activity; Michael P. Valley, Erika M. Hawkins, John Shultz, Terry L. Riss, Keith V. Wood, Wenhui Zhou, Laurent Bernad, Troy Good, Dave Good and Dieter H. Klaubert; *Cell Notes* **14**, 4–7; **2006**

High-Throughput Compound Profiling Using Tecan Instrumentation; Tracy Worzella and Brad Larson; *Promega Notes* **92**, 4–6; **2006**

The MAO-Glo® Assay: A Bioluminescent, Coupled Assay for Monoamine Oxidase Activity; Michael P. Valley¹, Erika M. Hawkins¹, John Shultz¹, Terry L. Riss¹, Keith V. Wood¹, Wenhui Zhou², Laurent Bernad², Troy Good², Dave Good² and Dieter H. Klaubert²; *Promega Notes* **93**, 11–14; **2006**

Peer-Reviewed Publikationen

Fan, F. and Wood, K.V. (2007) **Bioluminescent assays for high-throughput screening;** *Assay Drug Dev. Technol.* **5**, 127–136

Notes: The authors of this paper review bioluminescent assay technologies, discussing HTS reporter, cell-based and luciferase biosensor assays. They divide luminescent assays into three basic categories: assays that measure ATP concentration (cell viability and kinase assays), assays that measure changes in luciferase levels (reporter assays, GPCR assays), and assays that measure changes in luciferin levels (protease [including caspase], P450 and MAO assays).

UGT-Glo™ Assay

References Protocol

Zhang, D. *et al.* (2005) **In vitro inhibition of UDP glucuronosyltransferases by atazanavir and other HIV protease inhibitors and the relationship of this property to in vivo bilirubin glucuronidation;** *Drug Metab. Disp.* **33**, 1729–39

Sakaguchi, K. *et al.* (2004) **Glucuronidation of carboxylic acid containing compounds by UDP-glucuronosyltransferase isoforms;** *Archives Biochem. Biophys.* **424**, 219–25

Uchaipichat, V. *et al.* (2004) **Human UDP-glucuronosyltransferases: Isoform selectivity and kinetics of 4-methylumbelliferone and 1-naphthol glucuronidation, effects of organic solvents, and inhibition by diclofenac and probenecid;** *Drug Metab. Dispos.* **32**, 413–23

Protease-Assays

Cell-based Proteasome-Glo™ Assays/Proteasome-Glo™ Assays

Promega Artikel Cell-based

New Bioluminescent Cell Based Assays to Measure All Three Proteasome Protease Activities; Rich Moravec, Martha O'Brien, Bill Daily, Mike Scurria, Laurent Bernad, Sandy Hagen, Alyssa TenHarmsel, Neal Cosby and Terry Riss; *Cell Notes* **21**, 10–12; **2008**

Monitoring Proteasome Activity with a Cell-Based Assay Using a Single-Addition Luminescent Method; Rich Moravec¹, Martha O'Brien¹, Bill Daily², Mike Scurria², Laurent Bernad², Brad Larson¹, Tracy Worzella¹, Kay Rashka¹, Jeri Culp¹, Brian McNamara¹ and Terry Riss¹; *Cell Notes* **15**, 4–7; **2006**

Peer-Reviewed Publikationen Cell-Based

Groll, M., Schellenberg, B., Bachmann, A.S., Archer, C.R., Huber, R., Powell, T.K., Lindow, S., Kaiser, M. and Duler, R. (2008) **A plant pathogen virulence factor inhibits the eukaryotic proteasome by a novel mechanism;** *Nature* **452**, 755–758

Notes: The authors of this study investigated the mechanism of action of syringolin A (SylA), which is secreted by virulent strains of the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. They show that SylA inhibits all three activities of the proteasome in vitro. They also used the Proteasome-Glo™ Chymotrypsin-Like Cell-Based Assay to show that SylA inhibits the chymotrypsin-like activity of the proteasome in SK-N-HS neuroblastoma cells.

Filimonenko, M., Stuffers, S., Railborg, C., Yamamoto, A., Malerod, L., Fisher, E.M.C., Isaacs, A., Brech, A., Stenmark, H. and Simonsen, A. (2007)

Functional multivesicular bodies are required for autophagic clearance of protein aggregates associated with neurodegenerative disease; *J. Cell Biol.* **179**, 485–500

Notes: Endosomal sorting complexes required for transport (ESCRTs) are necessary for sorting membrane proteins into the intraluminal vesicles of the multivesicular body for eventual degradation by the lysosome/vacuole. Mutations in at least one subunit of the ESCRTs are associated with frontotemporal dementia and ALS. In this study, the authors demonstrate that ESCRTs are required for autophagy and prevention of protein aggregation. They address the question of whether loss of ESCRTs might interfere with proteasome activity. Using the Proteasome-Glo™ Chymotrypsin-Like Cell-Based Assay, they show that proteasome activity is minimally affected in ESCRT-depleted cells.

Promega Artikel Proteasome GLO

Functional Proteomics Techniques to Isolate and Characterize the Human Proteasome; Brad Hook and Trista Schagat; **2011**

Luminescence Based Assay for Proteasome Activity in Tissue Extracts; **2010**

Measurement of Three Proteasome Proteolytic Activities Using Luminescent Assays; Martha O'Brien¹, Mike Scurria², Laurent Bernad², William Daily², James Unch², Kay Rashka¹, Sandra Hagen¹, Jeri Culp¹, Rich Moravec¹, Brian McNamara¹, and Terry Riss¹; *Promega Notes* **94**, 19–21; **2006**

Calpain-Glo™ Protease Assay

Promega Artikel

Screen for Calpain Inhibitors Using a Cell-Based, High-Throughput Assay; Katheleen Seyb^{1,2}, Jake Ni¹, Mickey Huang¹, Eli Schuman¹, Mary L. Michaelis² and Marcie A. Glicksman¹; *Cell Notes* **18**, 6–8; **2007**

A Bioluminescent Assay for Calpain Activity; Martha O'Brien¹, Mike Scurria², Kay Rashka¹, Bill Daily² and Terry Riss¹; *Promega Notes* **91**, 6–9; **2005**

Peer-Reviewed Publikationen

Seyb, K.I., Schuman, E.R., Ni, J., Huang, M.M., Michaelis, M.L. and Glicksman, M.A. (2008) **Identification of small molecule inhibitors of α -amyloid cytotoxicity through a cell-based high-throughput screening platform;** *J. Biomol. Screening* **13**, 870–878

Notes: This paper demonstrates use of a calpain assay in a cell-based format. (Calpain-Glo™ Assay).

Boehmerle, W., Zhang, K., Sivula, M., Heidrich, F.M., Lee, Y. Jordt, S-E. and Ehrlich, B.E. (2007) **Chronic exposure to paclitaxel diminishes phosphoinositide signaling by calpain-mediated neuronal calcium sensor-1 degradation;** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 11103–11108

Notes: Taxol-induced peripheral neuropathy is a common side-effect of treatment that has been associated with disturbed intracellular calcium homeostasis in neuronal cells. These authors investigated whether prolonged exposure to Taxol caused alterations in calcium signaling in human neuroblastoma and rat dorsal root ganglia. They found that expression of the inositol 1,4,5-triphosphate receptor modulator NCS-1 was reduced in Taxol-treated neuronal cells.

DUB-Glo™ Protease Assay (DUB/SENP/NEDP)

Promega Artikel

Detecting the Deubiquitin Activity of SARS-CoV PLpro: Turning on the Light with the DUB-Glo™ Protease Assay; Yahira M. Baez-Santos¹, Andrew D. Mesecar¹ and Martha A. O'Brien²; **2009**

Peer-Reviewed Publikationen aus Protokoll

Love, K.R. *et al.* (2007) **Mechanisms, biology and inhibitors of deubiquitinating enzymes;** *Nature Chem. Biol.* **3**, 697-705

Hochstrasser, M. (2009) **Origin and function of ubiquitin-like proteins;** *Nature* **458**, 422

DPPIV-Glo™ Protease Assay

Promega Artikel

Detection of Dipeptidyl Peptidase Activity with DPPIV-Glo™ Assay; Joseph Alex Davis, Vamshi Krishna Tulasi Abhijit Ray and Pradip Bhatnagar; *Cell Notes* **23**, 6–9; **2009**

DPPIV-GLO™ Protease Assay: A More Sensitive Method For Measuring GLY-PRO Cleaving Activity In Serum; Martha O'Brien; *Cell Notes* **16**, 9–11; **2006**

Assay for DPPIV Activity Using a Homogeneous Luminescent Method; Martha O'Brien¹, Bill Daily², Mike Schurria¹, and Terry Riss¹; *Cell Notes* **11**, 8–11; **2005**

Peer-Reviewed Publikationen

Marguet, D. *et al.* (2000) **Enhanced insulin secretion and improved glucose tolerance in mice lacking CD26;** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 6874–9

Engel, M. *et al.* (2003) **The crystal structure of dipeptidyl peptidase IV (CD26) reveals its functional regulation and enzymatic mechanism;** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 5063–8

X Produktübersicht

Viabilität und Proliferation

Produkt	Menge	Katalog-Nr.
RealTime-Glo™ Metabolic Cell Viability Assay	100 Reaktionen	G9711
	10 x 100 Reaktionen	G9712
	1.000 Reaktionen	G9713
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	10 ml	G7570
	10 x 10 ml	G7571
	100 ml	G7572
	10 x 100 ml	G7573
CellTiter-Glo® Cell Viability 2.0 Assay	10 ml	G9241
	100 ml	G9242
	500 ml	G9243
CellTiter-Glo® 3D Viability Assay	10 ml	G9681
	10 x 10 ml	G9682
	100 ml	G9683
CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay	200 Assays	G3582
	1.000 Assays	G3580
	5.000 Assays	G3581
CellTiter-Blue® Cell Viability Assay	20 ml	G8080
	100 ml	G8081
	10 x 100 ml	G8082
CellTiter-Fluor™ Cell Viability Assay	10 ml	G6080
	5 x 10 ml	G6081
	2 x 50 ml	G6082
	10 ml	G8230
BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay	10 x 10 ml	G8231
	100 ml	G8232
	10 x 100 ml	G8233

Zytotoxizität

Produkt	Menge	Katalog-Nr.
CellTox™ Green Cytotoxicity Assay	10 ml	G8741
	100 ml	G8742
	500 ml	G8743
CellTox™ Green Express Cytotoxicity Assay	200 µl	G8731
CytoTox-Fluor™ Cytotoxicity Assay	10 ml	G9260
	5 x 10 ml	G9261
	2 x 50 ml	G9262
CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay	10 ml	G9290
	5 x 10 ml	G9291
	2 x 50 ml	G9292
CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay	200–800 Assays	G7890
	100–4000 Assays	G7891
CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay, HTP	1000–4000 Assays	G7892
Viral ToxGlo™ Assay	10 ml	G8941
	10 x 10 ml	G8942
	100 ml	G8943

Apoptose

Produkt	Menge	Katalog-Nr.
Caspase-Glo® 2 Assay	10 ml	G0940
	50 ml	G0941
Caspase-Glo® 3/7 Assay	2,5 ml	G8090
	10 ml	G8091
	10 x 10 ml	G8093
	100 ml	G8092
Caspase-Glo® 6 Assay	10 ml	G0970
	50 ml	G0971
Caspase-Glo® 8 Assay	2,5 ml	G8200
	10 ml	G8201
	100 ml	G8202
Caspase-Glo® 9 Assay	2,5 ml	G8210
	10 ml	G8211
	100 ml	G8212
Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay	1 ml	G7792
	10 ml	G7790
	100 ml	G7791
Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Buffer	100 ml	G7781
CaspACE™ FITC-VAD-FMK in situ Marker	50 µl	G7461
	125 µl	G7462

Inflammasom

Produkt	Menge	Katalog-Nr.
Caspase-Glo® 1 Inflammasome Assay	10 ml	G9951
	5 x 10 ml	G9952

Multiplexing

Produkt	Menge	Katalog-Nr.
Multitox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay	10 ml	G9200
	5 x 10 ml	G9201
	2 x 50 ml	G9202
Multitox-Glo Multiplex Cytotoxicity Assay	10 ml	G9270
	5 x 10 ml	G9271
	2 x 50 ml	G9272
ApoLive-Glo™ Multiplex Assay	10 ml	G6410
	5 x 10 ml	G6411
Apotox-Glo™ Triplex Assay	10 ml	G6320
	5 x 10 ml	G6321
ONE-Glo™ + Tox Luciferase Reporter and Cell Viability Assay	1 Platte	E7110
	10 Platten	E7120
Mitochondrial ToxGlo™ Assay	10 ml	G8000
	100 ml	G8001

Zellmetabolismus

Produkt	Menge	Katalog-Nr.
NADP/NADPH-Glo™ Assay	10 ml	G9081
	50 ml	G9082
NAD/NADH-Glo™ Assay	10 ml	G9071
	50 ml	G9072
NAD(P)H-Glo™ Detection System	10 ml	G9061
	50 ml	G9062

Oxidativer Stress – Glutathion Assays

Produkt	Menge	Katalog-Nr.
ROS-Glo™ H ₂ O ₂ Assay	10 ml	G8820
	50 ml	G8821
GSH-Glo™ Glutathione Assay	10 ml	V6911
	50 ml	V6912
GSH/GSSG-Glo™ Assay	10 ml	V6611
	50 ml	V6612

Epigenetische Assays

Produkt	Menge	Katalog-Nr.
HDAC-Glo™ 2 Assay	10 ml	G9590
HDAC-Glo™ Class IIa Assay	10 ml	G9560
HDAC-Glo™ I/II Assay	10 ml	G6420
	5 x 10 ml	G6421
	100 ml	G6422
HDAC-Glo™ I/II Screening Systems	10 ml	G6430
	5 x 10 ml	G6431
SIRT-Glo™ Assays	10 ml	G6450
	5 x 10 ml	G6451
	100 ml	G6452
SIRT-Glo™ Screening System	10 ml	G6470
	5 x 10 ml	G6471
SIRT-Glo™ Control Substrate	35 µl	G6460
UDP-Glo™ Glycosyltransferase Assay	200 Assays	V6961
	400 Assays	V6962
	4.000 Assays	V6963
UDP-Glo™ Glycosyltransferase Assay + UDP-GlcNAc	200 Assays	V6971
	400 Assays	V6972
UDP-Glo™ Glycosyltransferase Assay + UDP-GalNAc	200 Assays	V6981
	400 Assays	V6982
UDP-Glo™ Glycosyltransferase Assay + UDP-Glucose	200 Assays	V6991
	400 Assays	V6992
UDP-Glo™ Glycosyltransferase Assay + UDP-Galactose	200 Assays	V7051
	400 Assays	V7052
Ultra Pure UDP-GlcNAc, 100mM	50 µl	V7071
	250 µl	V7072
Ultra Pure UDP-GalNAc, 100mM	50 µl	V7081
UDP-GalNAc, 100mM	250 µl	V7082
Ultra Pure UDP-Glucose, 100mM	50 µl	V7091
	250 µl	V7092
Ultra Pure UDP-Galactose, 100mM	50 µl	V7171
	250 µl	V7172
HeLa Nuclear Extract	10 µl	G6570
Nicotinamide	30 µl	G6540

Zellsignalwege

Produkt	Menge	Katalog-Nr.
cAMP-Glo™ Max Assay	2 Platten	V1681
	20 Platten	V1682
	10 × 20 Platten	V1683
ADP-Glo™ Kinase Assay	1.000 Assays	V9101
	10.000 Assays	V9102
	100.000 Assays	V9103
ADP-Glo™ Max Assay	1.000 Assays	V7001
	10.000 Assays	V7002
Kinase-Glo® Luminescent Kinase Assay	10 ml	V6711
	10 x 10 ml	V6712
	100ml	V6713
	10 x 100 ml	V6714
Kinase-Glo® Max Luminescent Kinase Assay	10 ml	V6071
	10 x 10 ml	V6072
	100ml	V6073
	10 x 100 ml	V6074
Kinase-Glo® Plus Luminescent Kinase Assay	10 ml	V3771
	10 x 10 ml	V3772
	100ml	V3773
	10 x 100 ml	V3774
AMP-Glo™ Assay	1.000 Assays	V5011
	10.000 Assays	V5012
PDE-Glo™ Phosphodiesterase Assay	1.000 Assays	V1361
	10.000 Assays	V1362
GTPase-Glo™ Assay	1.000 Assays	V7681
	10.000 Assays	V7682

Metabolismus von Wirkstoffen – ADME Assays

Produkt	Menge	Katalog-Nr.
P450-Glo™ CYP3A4 Assay with Luciferin-IPA	50 ml	V9002
P450-Glo™ CYP2C9 Screening System	1.000 Assays	V9790
P450-Glo™ CYP2C9 Assay	50 ml	V8792
P450-Glo™ CYP3A4 Screening System with Luciferin-PPXE	1.000 Assays	V9910
P450-Glo™ CYP1A2 Induction/ Inhibition Assay	50 ml	V8422
P450-Glo™ CYP2C8 Assay	50 ml	V8782
P450-Glo™ CYP2C19 Assay	50 ml	V8882
P450-Glo™ CYP2D6 Assay	50 ml	V8892
P450-Glo™ CYP3A4 Screening System	1.000 Assays	V9800
P450-Glo™ CYP1A2 Screening System	1.000 Assays	V9770
P450-Glo™ CYP1A1 Assay	50 ml	V8752
P450-Glo™ CYP1B1 Assay	50 ml	V8762
P450-Glo™ CYP1A2 Assay	50 ml	V8772
P450-Glo™ CYP3A4 Assay	50 ml	V8802
P450-Glo™ CYP3A7 Assay	50 ml	V8812

Metabolismus von Wirkstoffen – ADME Assays (Fortsetzung)

Produkt	Menge	Katalog-Nr.
P450-Glo™ CYP3A4 Assay (Luc -PFBE) Cell-Based/Bio	50 ml	V8902
P450-Glo™ CYP3A4 Assay with Luciferin PPXE	50 ml	V8912
P450-Glo™ CYP3A4 Screening System with Luciferin-IPA	1.000 Assays	V9920
P450-Glo™ CYP2D6 Screening System	1.000 Assays	V9890
P450-Glo™ CYP3A4 Assay with Luciferin-IPA	10 ml	V9001
P450-Glo™ CYP2C9 Assay	10 ml	V8791
P450-Glo™ CYP3A7 Assay	10 ml	V8811
P450-Glo™ CYP1A1 Assay	10 ml	V8751
P450-Glo™ CYP1B1 Assay	10 ml	V8761
P450-Glo™ CYP1A2 Assay	10 ml	V8771
P450-Glo™ CYP3A4 Assay (Luc -PFBE) Cell-Based/Bio	10 ml	V8901
P450-Glo™ CYP2C19 Screening System	1.000 Assays	V9880
MAO-Glo™ Assay	200 Assays	V1401
UGT-Glo™ Assay	200 Assays	V2081
UGT-Glo™ Assay	1.000 Assays	V2082
Pgp-Glo™ Assay System with P-glycoprotein	10 ml	V3601

Protease-Assays

Produkt	Menge	Katalog-Nr.
Proteasome-Glo™ Chymotrypsin-Like Cell-Based Assay	10 ml	G8660
	5 x 10 ml	G8661
	2 x 50 ml	G8662
Proteasome-Glo™ Trypsin-Like Cell-Based Assay	10 ml	G8760
	5 x 10 ml	G8761
Proteasome-Glo™ Caspase-Like Cell-Based Assay	10 ml	G8860
	5 x 10 ml	G8861
Proteasome-Glo™ 3-Substrate Cell-Based Assay System	10 ml	G1180
	50 ml	G1200
Proteasome-Glo™ Chymotrypsin-Like Assay	10 ml	G8621
	50 ml	G8622
Proteasome-Glo™ Trypsin-Like Assay	10 ml	G8631
	50 ml	G8632
Proteasome-Glo™ Caspase-Like Assay	10 ml	G8641
	50 ml	G8642
Proteasome-Glo™ 3-Substrate System	10 ml	G8531
	50 ml	G8532
Calpain-Glo™ Protease Assay	10 ml	G8501
	50 ml	G8502
DUB-Glo™ Protease Assay (DUB/SENP/NEDP)	10 ml	G6260
	50 ml	G6261
DPPIV-Glo™ Protease Assay	10 ml	G8350
	50 ml	G8351

Die Promega-Produktwelt



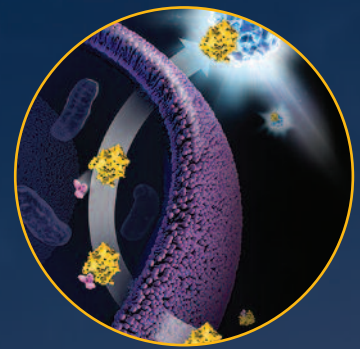
GENOMIC ESSENTIALS

Genomic Essentials

Nukleinsäure-Aufreinigung, Enzyme, RNase-Inhibitoren, Reverse Transkription, PCR, Real-Time PCR, Marker, Klonierungssysteme, Transfektion u. v. m.

Zelluläre und biochemische Analysen

Viabilität, Apoptose, Zytotoxizität, Oxidativer Stress, Signalwege, Kinasen, Epigenetik, Real Time Analysen, 3D-Assays, Zell- und Wirkstoffmetabolismus, Drug Discovery, Reporterassays

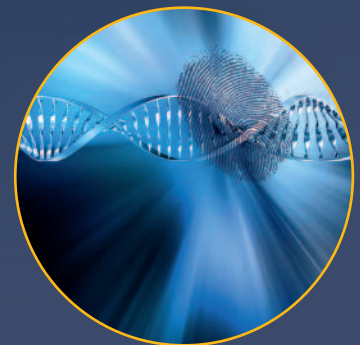


Proteinanalysen


Expression, Aufreinigung, Lebendzell-Markierung und -Imaging, Protein-Interaktionen, Antikörper-Markierung, -Aufreinigung und spezifische Spaltung, Western Blot, ELISA, Reagenzien für die Massenspektrometrie

Genetic Identity

Forensische Analysen, DNA-Spurenanalyse, DNA-Isolierung, humanspezifische DNA-Quantifizierung, Verwandtschaftsanalysen, STR Amplifikation



Geräte

- 
- Automatisierte Nukleinsäure-Aufreinigung mit dem Maxwell® System für molekulare Diagnostik, Forschung und Forensik
 - Multimode Detektionssysteme GloMax® Discover und Explorer zur Detektion von Lumineszenz, Fluoreszenz, Absorption, BRET und FRET
 - Konzentrationsmessung von Nukleinsäuren und Proteinen mit dem Quantus™ Fluorometer





Promega GmbH
High-Tech-Park
Schildkrötstraße 15 · 68199 Mannheim
Telefon +49 621 8501-0 · www.promega.com