

Applikation Durchflusszytometrie

Calcium-Flux

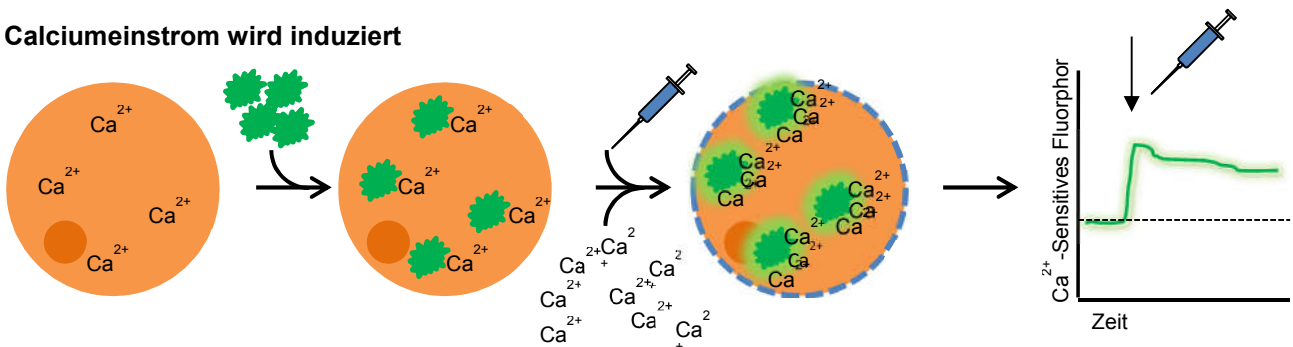
Calcium ist wichtiger *second messenger*, der eine Vielzahl von Signalwegen, insbesondere über GPCRs, reguliert. Veränderungen der intrazellulären Calcium-Konzentration führen unter anderem zur Initiierung von Apoptose, der Sekretion von Zytokinen oder der Veränderung der Expression von Oberflächenproteinen.

Um Calcium-Ströme zu messen, kommen Calcium-sensitive Fluoreszenzfarbstoffe, die nach Bindung an zytoplasmatischem Calcium fluoreszieren, zur Anwendung. Herkömmlich wird dieser Assay mikroskopisch durchgeführt. Inzwischen gibt es zahlreiche Farbstoffe auch für die durchflusszytometrische Analyse, deren Vorteil darin liegt, dass

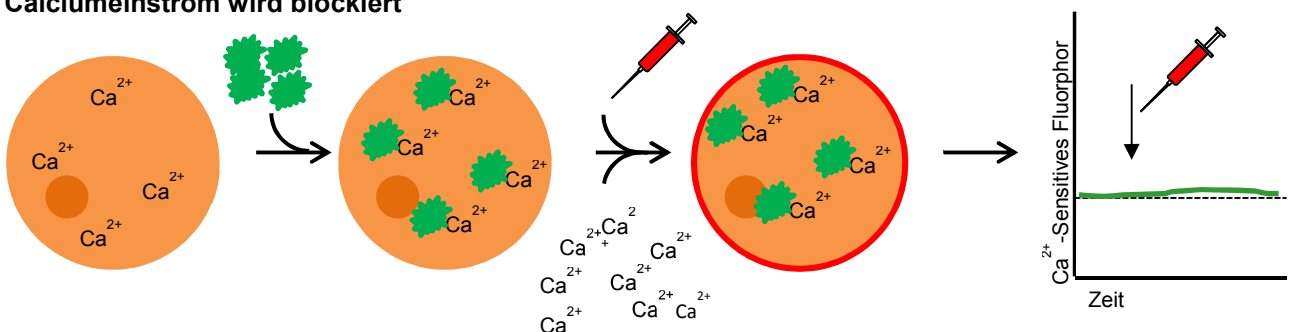
1. Subpopulationen in einem heterogenen Zellgemisch differenziert,
2. der Assay mit einer immunphänotypischen Charakterisierung kombiniert und
3. die Ströme anhand der Änderung der Fluoreszenzintensität quantifiziert werden können.

Dabei werden die Zellen mit dem Calcium-Indikator inkubiert, der Calcium-Strom über einen Agonisten induziert und die Änderung des Fluoreszenzsignals des Calcium-Indikators durchflusszytometrisch erfasst (s. Abbildung). Die Änderung wird entweder als Anstieg der Fluoreszenzintensität oder als Differenz zwischen Calcium-gebundenem und Calcium-ungebundenem Fluoreszenzfarbstoff (ratiometrisch) angegeben.

Calciumstrom wird induziert



Calciumstrom wird blockiert

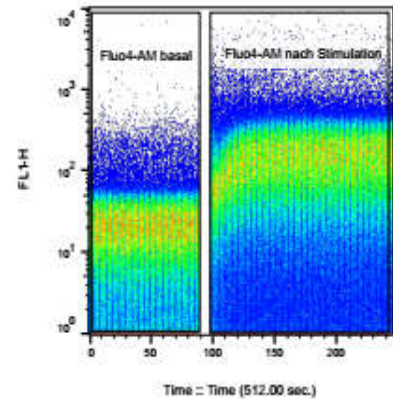


Farbstoff	Prinzip	Besonderheit
Fluo-AM	Anstieg der Fluoreszenzintensität	Sehr hell, viele Farben
Calbryte™	Anstieg der Fluoreszenzintensität	Gutes Signal-Rausch-Verhältnis
Indo-1	Ratiometrie	UV Laser benötigt
Fura-AM	Ratiometrie	Kombinierbar mit Fluo-AM
Rhod-AM	Anstieg der Fluoreszenzintensität	In Mitochondrien lokalisiert
Quin-2	Anstieg der Fluoreszenzintensität	Sehr sensitiv
NIR Farbstoffe	Anstieg der Fluoreszenzintensität	Optimal in Multifarben-Analysen

Änderung der Fluoreszenzintensität

Prinzip

- Zellpermeanter Calcium-sensitiver Fluoreszenzfarbstoff bindet an intrazelluläres Calcium
- Calcium-Agonisten induzieren Calciumstrom durch u.a.
 - Einstrom in die Zelle und/oder
 - Freisetzung aus intrazellulären Speichern in das Zytoplasma
- Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration bewirkt Anstieg der Fluoreszenzintensität des Farbstoff



Protokoll

1. Zellen ernten und in Medium aufnehmen
2. Inkubation mit Calcium-sensitivem Fluoreszenzfarbstoff

Optional Phänotypische Charakterisierung

3. Inkubation mit Calcium-Agonisten
4. Relative Fluoreszenzintensität vs. Zeit durchflusszytometrisch messen

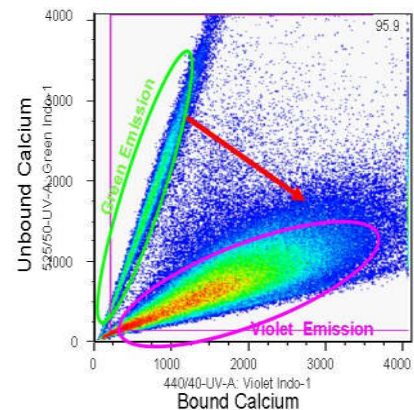
Hinweise

- Ionomycin, A23187 oder PMA als Referenz bzw. Positivkontrolle verwenden.
- Calcium-bindende Komplexbildner als Negativ-Kontrolle verwenden.

Änderung des Emissionsspektrums (Ratiometrie)

Prinzip

- Zellpermeanter Calcium-sensitiver Fluoreszenzfarbstoff bindet an intrazelluläres Calcium
- Calcium-Agonisten induzieren Calciumstrom durch u.a.
 - Einstrom in die Zelle und/oder
 - Freisetzung aus intrazellulären Speichern in das Zytoplasma
- Farbstoff ändert sein Emissionsspektrum, sobald er Calcium gebunden hat
- Verhältnis zwischen dem Calcium-gebundenen und ungebundenem Fluoreszenzfarbstoff wird gemessen



Protokoll

1. Zellen ernten und in Medium aufnehmen
2. Inkubation mit Calcium-sensitivem Fluoreszenzfarbstoff

Optional Phänotypische Charakterisierung

3. Inkubation mit Calcium-Agonisten
4. Ratio Fluoreszenzintensität des Calcium-gebundenem und ungebundenem Farbstoffes vs. Zeit durchflusszytometrisch messen

Hinweise

- Ionomycin, A23187 oder PMA als Referenz bzw. Positivkontrolle verwenden.
- Calcium-bindende Komplexbildner als Negativ-Kontrolle verwenden.