

Applikation Durchflusszytometrie

Proliferations-Assay

Untersuchungen der zellulären Proliferation finden insbesondere im Rahmen der Charakterisierung des Zellzyklus in Anwesenheit toxischer Substanzen oder potenzieller Pharmaka Anwendung. Die zur Verfügung stehenden Methoden der durchflusszytometrischen Erfassung der Zellproliferation basieren auf dem Einbau von Nukleosid-Analoga in die DNA während der Replikation, der gleichmäßigen Verteilung intrazellulär gebundener Fluoreszenzfarbstoffe bei Zellteilung auf die Tochterzellen oder der Markierung Zellzyklus-assoziiierter Proteine. Nachfolgend sind gängige Assays dargestellt:

Prinzip	Methodik
Einbau von Nukleosid-Analoga	BrdU, IdU, CldU und EdU
Dye Dilution Assays	CFDA-SE, Cell Trace™ Violet und PHK26
Proliferationsmarker	Ki67 und PCNA

Nukleosid-Analoga

Prinzip

- Einbau des Thymidin-Analogons Bromdesoxyuridin (BrdU) in neu zu synthetisierende DNA lebender Zellen während der S-Phase der Replikation des Zellzyklus
- Eingebautes BrdU wird anschließend mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper detektiert

Protokoll

1. Zellen unter den gewünschten Bedingungen unter Zugabe von BrdU kultivieren
2. Zellen ernten und waschen

Optional: Markierung gewünschter Oberflächenantigene

3. Zellen fixieren, permeabilisieren und waschen
4. Denaturierung der DNA (Säure oder Hitze)
5. Inkubation mit Anti-Analogon-Antikörper

Optional: Einsatz von DNA-Farbstoffen (PI oder 7-AAD) für korrelierte Zellzyklus-Analyse

6. Durchflusszytometrische Analyse

Hinweise

Alternative Farbstoffe

- **IdU** (Ioddesoxyuridin)
- **CldU** (Chlordesoxyuridin)
- **EdU** (5-Ethynyl-2'-desoxyuridin)

Unbedingt die Angaben der Hersteller beachten.

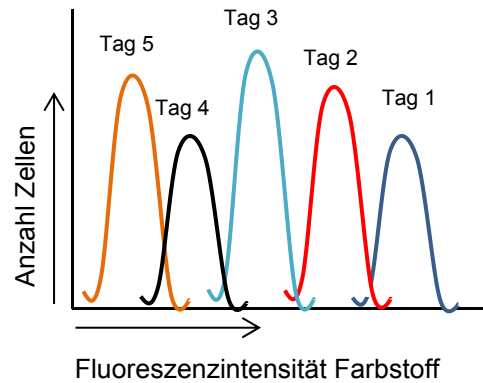
CFDA-Dye Dilution Assay

Prinzip

- Gleichmäßige Verteilung intrazellulär gebundener Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidylester (CFDA-SE) auf die Tochterzellen während der Zellteilung
- Fluoreszenzsignal halbiert sich mit jeder Zellteilung
- Anregung 492 nm (blauer Laser), Emission 517 nm (530/30 BP, 502 LP)

Protokoll

1. Zellen mit CFDA-SE 5-10 min inkubieren
 2. Zellen waschen
 3. Aliquot der Zellen entnehmen und Fluoreszenz zum Zeitpunkt $t = 0$ bestimmen
 4. Zellen wie gewohnt kultivieren
 5. Zellen ernten und waschen
- Optional:* Markierung gewünschter Oberflächenantigene
6. Proliferation zu beliebigen Zeitpunkten durchflusszytometrisch bestimmen



Hinweise

Alternative Fluoreszenzfarbstoffe:

- **CellTrace™ Violet:** Anregung mit violetterem Laser (Exzitation 405 nm, Emission 450 nm)
- **PHK26:** Inkorporation eines gelb-orange fluoreszierenden Farbstoffes in die Plasmamembran (Exzitation 551 nm, Emission 567 nm)

Herstellerangaben bzgl. der Konzentration und Inkubationsbedingungen beachten.

Proliferationsmarker (z.B. Ki67, PCNA)

Prinzip

- Nachweis Zellzyklus-assoziiertes Proteine, sogenannter Proliferationsmarker
- Expression ausschließlich von aktiv sich teilenden Zellen

Protokoll

1. Zellen fixieren, permeabilisieren und waschen
2. Inkubation mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppeltem Antikörper gegen diese Marker
3. Zellen waschen und durchflusszytometrisch untersuchen

Hinweise

Bekannte Marker:

- **Ki67:** vorrangig während der späten G1- sowie S-, G2- und M-Phase exprimiert
- **PCNA:** während der G1/S-Phase erhöht

Inkubationsdauer ist abhängig vom Zelltypen und der Applikation. Daher unbedingt die Angaben des Herstellers beachten.