

Protokoll Durchflusszytometrie

Intrazelluläre Färbung

Die durchflusszytometrische Detektion von intrazellulären Proteinen wie Zytokine, Transkriptionsfaktoren oder phosphorylierten Proteine ist in Kombination mit der Färbung von Oberflächenstrukturen eine einzigartige Methode, um spezifische Zelltypen zu charakterisieren bzw. zu identifizieren.

Die Markierung von intrazellulären Proteinen ist abhängig von der Biologie des Zielproteins: Lokalisation, Stabilität oder Assoziation mit anderen Molekülen.

Die Sekretion von Zytokinen kann durch die Verwendung von Protein Transporter Inhibitoren (z.B. Monensin, Brefeldin A) geblockt werden. Diese akkumulieren dann im endoplasmatischen Retikulum oder im Golgi Apparat und können so durchflusszytometrisch gemessen werden.

Transkriptionsfaktoren oder phosphorylierte Proteine liegen oft im Zellkern vor und sind an DNA oder andere Proteine gebunden. Diese können durch Phosphatasen dephosphoryliert werden, sodass das Epitop durch den entsprechenden Antikörper demaskiert ist. Hier ist es notwendig, rasch zu fixieren und zu permeabilisieren.

Je nach Zielprotein kommen verschiedene Fixierungs- und Permeabilisierungsreagenzien zum Einsatz. Proteine des Zytoskeletts, virale Proteine oder Enzyme sollten mit einer hohen Konzentration an Azeton, Alkohol oder Formaldehyd fixiert werden, um optimale Ergebnisse zu erzielen.

Nachfolgend sind einige Reagenzien gelistet. Bitte die Hinweise beachten! KEINE Garantie auf Vollständigkeit.

Färbeprozedur (bitte Angaben der Hersteller, z.B. AK, beachten)

1. Zellkonzentration auf 1×10^6 Zellen/mL einstellen
2. Zellen stimulieren (z.B. anti-CD3, anti-CD28, LPS) unter Verwendung eines Protein Transporter Inhibitors (z.B. Brefeldin A: finale Konzentration $10 \mu\text{g/mL}$).
3. Inkubationszeit in Abhängigkeit der zu detektierenden intrazellulären Proteine wählen.
4. Zellen ernten, zweimal mit FACS Puffer waschen und evtl. Oberflächenfärbung.
5. Zellen mit FACS Puffer waschen und fixieren.
6. Zellen zweimal mit Permeabilisierungspuffer waschen.
7. Zellen mit Antikörper gegen intrazelluläres Protein (verdünnt im Perm.puffer) inkubieren.
8. Zellen zweimal mit Perm.puffer, einmal mit FACS Puffer waschen.
9. Pellet in FACS Puffer aufnehmen und messen.

Fixierung mit 0,01% Formaldehyd oder 4% Paraformaldehyd

Eigenschaften

- Wirkt quervernetzend.
- Nicht-permeabilisierend.
- 2-3 h stabil.
- Beeinflusst die Qualität der Durchflusszytometrie.

Rezept

0,01 % FA (w/v) bzw. 4% PFA (w/v) in 1x PBS

Protokoll

- 1-10x10⁶ Zellen/mL
- Inkubation 5-15 min bei 4° C oder auf Eis
- Waschen und evtl. permeabilisieren

Hinweise

- Vor Zugabe des Fixanz resuspendieren.
- Zwischendurch vortexen.
- Anschließend mit Detergenz permeabilisieren.

Fixierung mit Methanol

Eigenschaften

- Wirkt dehydrierend.
- Permeabilisierend.
- Stabil für Wochen bei 4° C.
- Nicht kompatibel mit fluoreszierenden Proteinen (z.B. GFP) und gleichzeitigem Markieren von Oberflächenmarkern.

Protokoll

- 1x-10x10⁶ Zellen/mL
- Eiskaltes 100% MetOH verwenden
- Inkubation 10 min bei -20° C

Hinweise

- Vor Zugabe des Fixanz resuspendieren
- Zwischendurch vortexen
- Anschließend mit Detergenz permeabilisieren

Fixierung mit Aceton

Eigenschaften

- Permeabilisierend

Protokoll

- 1x-10x10⁶ Zellen/mL
- Eiskaltes Aceton verwenden
- Inkubation 5-10 min bei -20° C

Hinweise

- Vor Zugabe des Fixanz resuspendieren
- Zwischendurch vortexen
- PS Gefäße sind nicht geeignet

Permeabilisierung mit TritonX oder NP-40

Eigenschaften

- Löst Zellkernmembran, daher für TF geeignet.

Rezept

1x PBS

0,1 % (v/v) TritonX-100

Protokoll

- Fixierte Zellen 30 min bei 4° C inkubieren
- Mit Permeabilisierungspuffer und anschließend FACS-Puffer waschen

Hinweise

- Antikörperverdünnungen IMMER in Permeabilisierungspuffer vornehmen.

Kombinierte Fixierung/Permeabilisierung

Eigenschaften

- Beinhalten formaldehyd-basiertes Fixanz und mildes Detergenz.
- Zu verwenden bei der kombinierten Analyse von Oberflächenproteinen und intrazellulären Proteinen.

Hersteller

BD Cytotfix/Cytoperm fixation/permeabilization solution, Cat.#55422

BioLegend Fixation buffer Cat.# 420801 und Permeabilization Wash Buffer, Cat.# 421002

Permeabilisierung mit Tween20, Saponin, Digitonin oder Leucoperm

Eigenschaften

- Generiert Poren in der Membran ohne diese komplett aufzulösen.
- Für zytoplasmatische Zielproteine, (innere) membranständige und lösliche nukleäre Proteine geeignet.

Rezept

1x PBS

2 mM EDTA

2 mM NaN₃

0,5-2 % FCS

0,1% (w/v) Saponin, o.ä.

Protokoll

- Fixierte Zellen 30 min bei 4° C inkubieren
- Mit Permeabilisierungspuffer und anschließend FACS-Puffer waschen

Hinweise

- Antikörperverdünnungen IMMER in Permeabilisierungspuffer vornehmen.