Lumiprobe
Life science solutions

Handbuch für das CFDA SE-Zellverfolgungskit

Lumiprobe Corporation. All rights reserved.

Contents

Deutsch: Handbuch für das CFDA SE-Zellverfolgungskit 3-8

DE

Handbuch für das CFDA SE-Zellverfolgungskit

Das CFDA SE Zellnachverfolgungs-Kit wird für die fluoreszierende Markierung und langfristige Verfolgung von Zellen verwendet. Jedes Kit enthält Einwegfläschchen mit trockenem Farbstoff und die erforderliche Menge hochwertigen wasserfreien DMSO. Es ermöglicht die Herstellung kleiner Volumina der Arbeitsfärbelösung, was praktisch ist für die Durchführung von Experimenten und deren Skalierung ohne unnötigen Verlust des Farbstoffs.

CFDA SE ((5,6)-Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidylester) ist ein stabiler, zellpermeabler Diacetat-Vorläufer von CFSE. Dieses Molekül ist nicht fluoreszierend, bis die Acetatgruppen durch intrazelluläre Esterasen gespalten werden, was zur Bildung eines stark fluoreszierenden Fluorophors CFSE mit Emission im grünen Spektralbereich führt (Absorptionsmaximum bei ~492 nm, Emissionsmaximum bei ~517 nm). CFSE reagiert über seine Succinimidylgruppen mit zellulären Aminen und markiert intrazelluläre Proteine kovalent. Die Farbstoff-Protein-Addukte verbleiben in den Zellen während der Entwicklung, Zellteilung oder Zellfusion und werden nicht auf benachbarte Zellen in einer Population übertragen.

CFDA SE wird häufig für die *in vivo* und *in vitro* Markierung von Zellen verwendet, um deren Proliferation zu analysieren, sowie für Zellverfolgungs- und Motilitätstests. Innerhalb der Zelle zeigt CFDA SE nur geringe Zytotoxizität und minimale Auswirkungen auf die proliferative Fähigkeit oder Biologie der Zelle. Während der Proliferation wird das Label ungefähr gleichmäßig unter den Nachkommen aufgeteilt, sodass die Zellteilung als sukzessives Halbieren der Fluoreszenzintensität durch mehrere generativen Teilungen verfolgt werden kann.

Bestandteile

Komponente	Anzahl	
	16231 3 vials	26231 15 vials
41615, CFDA SE, 500 ug	3	15
15050, DMSO (Dimethylsulfoxid), Markierungsgüte, 1 mL	1	2

Transport: bei Umgebungstemperatur bis zu 3 Wochen. Lagerungsbedingungen: bei -20 °C.

Haltbarkeit: 12 Monate.

Bevor Sie beginnen

Das folgende Protokoll beschreibt die Verfahren zur Färbung der Zellkulturen und deren Analyse mittels Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie.

Anpassungen an unseren vorgeschlagenen Ausgangsbedingungen können aufgrund von Unterschieden in Zelltypen, Kulturbedingungen und anderen Faktoren erforderlich sein. Die optimale Konzentration von CFDA SE für die Färbung wird je nach spezifischer Anwendung variieren; Wir empfehlen, mindestens einen zehnfachen Konzentrationsbereich zu testen. Typischerweise erfordern Langzeitfärbungen (über drei Tage) oder Arbeiten mit schnell teilenden Zellen 5–10 µM Farbstoff. Für kürzere Experimente wie Vitalitätsassays reicht eine niedrigere Farbstoffkonzentration (0,5–5 µM) aus. Anwendungen in der Mikroskopie können bis zu 25 µM CFDA SE benötigen. Um die normale zelluläre Funktion zu erhalten und potenzielle Artefakte durch übermäßigen Farbstoff zu minimieren, wird empfohlen, die niedrigstmögliche Farbstoffkonzentration zu verwenden.

DE

Wichtig! CFDA SE ist ein Amin-reaktiver Farbstoff. Verwenden Sie ihn nicht mit aminhaltigen Puffern oder Poly-L-Lysin-beschichteten Objektträgern.

Vorbereitung der Stammlösung

1. Lassen Sie das Produkt auf Raumtemperatur erwärmen, bevor Sie die Flasche öffnen.
2. Bereiten Sie eine 5 mM CFDA SE Stammlösung vor, indem Sie den Inhalt der Farbstoffflasche in 179 µL des bereitgestellten DMSO für die Markierung lösen.
3. Die vorbereitete Stammlösung kann aliquotiert und bei -20 °C eingefroren aufbewahrt werden.

Markierung von adhärenten Zellen

1. Zellen auf Objektträgern in einer Petrischale unter Verwendung des geeigneten Kulturmediums bis zur gewünschten Dichte wachsen lassen.
2. Die 5 mM CFDA SE Stammlösung in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) oder einem anderen geeigneten Puffer auf die gewünschte Arbeitskonzentration (0,5–25 µM) verdünnen.
3. Das Medium in der Schale durch eine auf 37 °C vorgewärmte CFDA SE Arbeitslösung ersetzen.
4. Die Zellen für 15 Minuten bei 37 °C mit der Beladungslösung inkubieren.
5. Die Beladungslösung durch frisches, vorgewärmtes Medium ersetzen und die Zellen für weitere 30 Minuten bei 37 °C inkubieren, um CFDA SE zu deacetylieren und in das fluoreszierende CFSE umzuwandeln.
6. Bei Bedarf können die Zellen fixiert und mit zusätzlichen Markern gefärbt werden.

Markierung von Zellsuspensionen

1. Die Zellen ernten, sie für 7 Minuten bei 500 g zentrifugieren und das Überstand entfernen.
2. Die Zellen in warmem (37 °C) 0,1% BSA/PBS auf eine Endkonzentration von 1 × 10^6 Zellen/mL resuspendieren.

   Wichtig! Um eine konsistente Markierung zu erreichen, eine Einzelzellsuspension ohne Aggregate färben. Die empfohlene Zellmenge für in vitro

   Markierungsexperimente liegt typischerweise im Bereich von 10^5 bis 10^6 Zellen, abhängig von der beabsichtigten Dauer des Zellwachstums nach der Markierung.

   Für adoptive Transfers Zellen von 1-5 × 10^7 markieren.

3. Pro Milliliter Zellen 2 µL der 5 mM Stammlösung von CFDA SE hinzufügen, um eine endgültige Arbeitskonzentration von 10 µM zu erreichen.

   Wichtig! Die optimale Arbeitskonzentration von CFDA SE sollte experimentell bestimmt werden. Hierzu einen Teil der CFDA SE Stammlösung vor der Färbung weiter in DMSO verdünnen. Die empfohlenen Arbeitskonzentrationen liegen im Bereich von 0,5–25 µM.

4. Die Zellen für 10 Minuten bei 37 °C mit der Beladungslösung inkubieren.
5. Den Färbeprozess durch Zugabe von 5 Volumina eiskaltem Kulturmedium zu den Zellen stoppen.
6. *Optional.* Die Zellen für 5 Minuten auf Eis inkubieren.
7. Die Zellen durch Zentrifugation pelletieren.
8. Die Zellen durch Resuspension des Pellets in frischem Medium waschen. Diesen Schritt insgesamt drei Mal wiederholen, um insgesamt drei Waschungen durchzuführen.
9. In-vitro-Zellkulturen unter geeigneten Bedingungen vorbereiten oder Zellen adoptiv übertragen.

10. Bei Bedarf die Zellen ernten und sie für zusätzliche Marker färben.

Fixierung und Permeabilisierung

1. Spülen Sie die Zellen mit PBS oder einem anderen geeigneten Puffer vor der Fixierung.
2. Fixieren Sie die Zellen in einer aldehydhaltigen Fixierlösung (zum Beispiel 3,7% Formaldehyd) für 15 Minuten bei Raumtemperatur.
3. Spülen Sie die Zellen dreimal mit PBS.
4. Wenn die Zellen anschließend mit Antikörpern markiert werden sollen, permeabilisieren Sie sie, indem Sie sie für 10 Minuten in eiskaltem Aceton inkubieren. Nach der Permeabilisierung sollten die Zellen in PBS gespült werden.

Fluoreszenzmikroskopie

Die ungefähren Anregungs- und Emissionsmaxima von CFSE liegen bei 492 nm bzw. 517 nm. Verwenden Sie Standard-Fluorescein-Filtersets, um markierte Zellen unter Verwendung von Fluoreszenzmikroskopie zu visualisieren.

Durchflusszytometrie

Analysieren Sie die Zellen mit einem Durchflusszytometer mit 488 nm Anregungs- und Emissionsfiltern (Fluorescein-Kanal). Verwenden Sie unstained Zellen als Kontrolle.

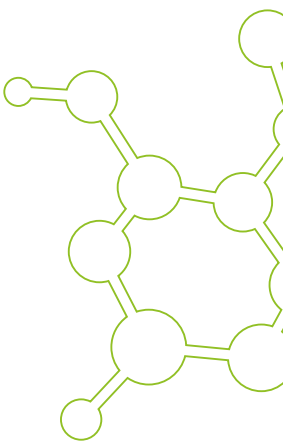
Markierte Zellen sollten mehrere Peaks zeigen, die auf ihre Proliferation hinweisen und die den Farbstoff zwischen Tochterzellen verdünnen.

Fehlerbehebung

Problem	Mögliche Ursachen	Empfohlene Lösungen
Kein Signal	Esteraseaktivität des Serums im Medium spaltet den Farbstoff vorzeitig auf und verhindert das Eindringen in die Zelle	- Verwenden Sie während des Markierungsschritts serumfreie Medien. - Inaktivieren Sie das Serum vor der Zugabe zu den Medien durch Inkubation für 40 Minuten bei 56 °C.
Schwaches Signal	A. Zellen sind nicht gesund B. Geringe Konzentration von CFDA SE C. Unzureichende Dauer der Markierung D. Phenolrot-Dämpfung der CFSE-Fluoreszenz während der Bildgebung	A. Verwenden Sie nur gesunde Zellen B. Führen Sie eine Titration durch, um die optimale Konzentration von CFDA SE zu erhalten C. Erhöhen Sie die Inkubationszeit mit dem Farbstoff D. Verwenden Sie Phenolrot-freie Medien für die Bildgebung
Zelltod	A. Die Konzentration von CFDA SE ist zu hoch B. Die Konzentration der experimentellen Verbindung ist zu hoch, was zu Zytotoxizität führt	A. Führen Sie eine Titration durch, um die optimale Konzentration des Farbstoffs zu erhalten. B. Verringern Sie die Konzentration der experimentellen Verbindung
Transfer des Farbstoffs zu benachbarten Zellen	Überlastung des Farbstoffs und Sättigung der zellulären Esterasen führen zu einem Auslaufen des ungespaltenen Farbstoffs zurück in das Medium	- Reduzieren Sie die Farbstoffkonzentration und/oder die Markierungszeit - Erhöhen Sie die Ruhezeit und die Waschzeit nach der Markierung
Breiter Peak des Farbstoffs im unstimulierten Kontrollversuch	A. Schlechtes Mischen von CFDA SE mit Zellen B. Mehrere Zelltypen mit unterschiedlicher Proliferationsaktivität in der Kultur	A. Mischen Sie die Zellen sofort nach der Zugabe gut mit CFDA SE B. Phänotypisieren Sie kultivierte Zellen mit typspezifischen Antikörpern

Ver. KKT46
#41615

22.09.509-QM
Issued by INSPECT



www.lumiprobe.com