

FACS Protokoll für humane makro-/mikrovaskuläre Endothelzellen (HDMVEC)

- minst. 50.000 Zellen (besser) 100.000 Zellen pro Messpunkt (z.B. HUVEV, HDMVEC)

Protokoll:

- je T25 mit 2 ml PBS waschen
- 1.5 ml Accutase/T25 zugeben und ca. 2-15 min. inkubieren
- Zellen durch klopfen ablösen
- mit PBS/2% FCS nachspülen und in 15 ml Röhrchen überführen
- 1000 rpm, 5 min.
- Zellpellet mit 5 ml PBS/FCS waschen
- 1000 rpm, 5 min.
- Zellpellet in 2 ml PBS/FCS resuspendieren und nach Zellzahl (200 µl/well, Rundboden) in Microtiterschale aufteilen

Zugabe der Antikörper:

1. anti-LYVE-1 (**RT #102-PA50**); [c = 1000], rabbit polyAK; 1:1000
als 2. AK: anti-rabbit FITC (Dia nova);
2. anti-FLT-4 (mabc=860) mouse mab, 1:400
als 2. AK: anti-mouse PE, 1:300, 0.8 µl/well, Jackson Immuno Research 115-116-146
3. anti-Podoplanin, (**RT #101-M40**) biotiny. mouse mab, [c = 1380]; 1:500;
als 2. AK: Strep-APC, Pharmingen 554067, 1:2000
- 4: anti-KDR (**RT #101-M20**); mouse mab, [c=5000]; 1:1000
als 2. AK: anti-mouse FITC (Dianova)

Kontrollen: - nur Zellen ohne 1. AK
- jeweils nur 2. Antikörper

Note: Die Optimale Verdünnung muss für jeden Antikörper ausgetestet werden.

- 30 min auf Eis, abgedunkelt, nach ca. 15 min. resuspendieren
- 10 min. 1200 rpm
- Platte vorsichtig über Becken ausleeren (1x ruckartig)
- jedes Pellet mit 200 ul FACS-Puffer waschen, zentrifugieren leeren
- Zugabe der 2. Antikörper in 100 ul FACS Puffer (siehe oben!)
- 30 min auf Eis, abgedunkelt, zwischen durch 1x mischen
- 10 min. 12000 rpm,
- waschen, zentrifugieren

- Meßröhrchen vorbereiten: 400 µl FACS Puffer mit Propidiumiodid
(PI= 0.5 µl auf 500 µl Ges. Lsg.)
- Zellpellet in 100 µl FACS-Puffer resuspendieren, mit 400 µl vermischen, auf Eis , abgedunkelt
- Messung