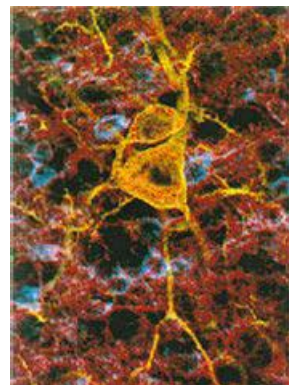
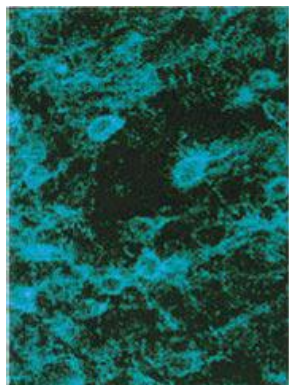
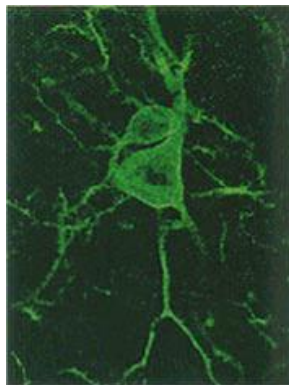


Immunologie: Sekundärantikörper

Farbstoffempfehlungen für Doppel- und Dreifachmarkierungen



Rhodamine- Red X

Rhodamine Red-X (RRX) ist wegen seiner spektralen Eigenschaften ein nahezu ideales Fluorochrom für Dreifachmarkierungen, die durch konfokale Laserscanningmikroskopie ausgewertet werden kann.

Rhodamine Red-X, Cy5 und Cy2 zeigen fast keine Überlappung ihrer Spektren und können daher alle ohne relevanten Empfindlichkeitsverlust detektiert werden.

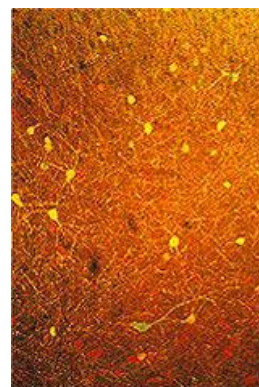
Besonders geeignet ist Rhodamine Red-X für Doppelmarkierungen mit dem stark grün fluoreszierenden Carbocyanin Cy2 und anschließende konventionelle Fluoreszenzmikroskopie. Möglich ist auch der simultane Einsatz Rhodamine Red-X-gekoppelter Antikörper für die Visualisierung des ersten Antigens und von blau fluoreszierenden AMCA-Konjugaten für die Markierung des zweiten Antigens.

Hersteller der Rhodamine RedX Farbstoffe ist die Fa. Molecular Probes Inc., USA



Ü Darstellung des Kalzium-bindenden Proteins Calretinin im parietalen Cortex der Ratte mit einem Kaninchen-Antiserum und Rhodamine Red-X-konjugierten Ziege-anti-Kaninchen IgG.

Ü Doppelmarkierung der Kalzium-bindenden Proteine Parvalbumin und Calbindin in priformen Cortex der Ratte. Darstellung von Calbindin mittels Rhodamine Red-X Ziege-anti-Maus IgG (rot) und von Parvalbumin mit Cy2-Ziege-anti-Kaninchen IgG (grün). Zellen, die beide Kalzium-bindenden Proteine enthalten, erscheinen gelb.



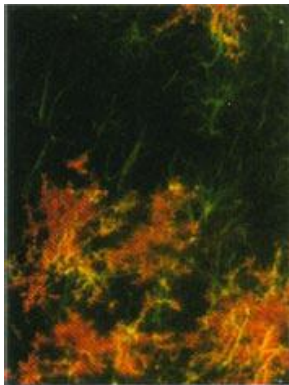
Carbocyanine - erste Wahl für die Immunfluoreszenz

Cy3: Im Vergleich zu den klassischen Fluoreszenzfarbstoffen wie Tetramethylrhodamin und Texas Red erweist sich das rot fluoreszierende Carbocyanin 3 (Cy3) als extrem leuchtintensiv und photostabil.

Die relativ hydrophilen Cy3 konjugierten Nachweisreagenzien zeigen kaum unspezifische Bindung an biologische Gewebe. Da Cy3 ein Exzitationsmaximum von 550 nm aufweist und sein Emissionsmaximum bei 570 nm liegt, kann die Untersuchung Cy3-markierter Präparate ohne apparativen Mehraufwand mit einem konventionellen „Rhodaminfilter“ am Fluoreszenzmikroskop erfolgen. Alternativ ist die Analyse von Cy3-Markierungen am konfokalen Laserscanningmikroskop (CLSM) möglich, die sowohl nach Anregung mit einem Argonlaser (bei 514 oder 528 nm) als auch mit einem Helium-Neon-Laser (bei 543 nm) erfolgen kann. Nach Aufbewahrung Cy3-gefärbter Präparate in geeigneten organischen Eindeckmedien wie z.B. Entellan (Merck, Darmstadt) dunkel bei 4 Grad Celsius bleibt die Intensität oft jahrelang erhalten.

Cy2: Dieses grün fluoreszierende Carbocyanin ist dem klassischen Label Fluorescein in wesentlichen Parametern deutlich überlegen. Das betrifft vor allem die Leuchtintensität von Cy2, die Langzeitstabilität dieses Fluorophors nach Einbettung gefärbten Gewebes in organischen Medien sowie die geringe Tendenz von Cy2, auszubleichen. Mit einem Exzitationsmaximum bei 490 nm und einem Emissionsmaximum bei 508 nm weist Cy2 ähnliche Spektraleigenschaften wie Fluorescein auf und ist mit üblichen "FITC- (Fluoresceinisothiocyanat-) Filtern" kompatibel.

Cy2/Cy3- Doppelmarkierungen: Für die gleichzeitige Detektion zweier verschiedener Antigene im gleichen Gewebe sind Carbocyanin-Doppelmarkierungen oft die Methode der Wahl für konventionelle Fluoreszenzmikroskopie. Die gebräuchlichste Variante solcher Doppelmarkierungen beruht auf der Inkubation von Gewebe mit einem Cocktail aus zwei Primärantikörpern verschiedener Wirtsspezies (z.B. Kaninchen und Maus) gefolgt von ihrer zeitgleichen Visualisierung mit nicht kreuzreaktiven fluorchromierten Sekundärantikörpern (z.B. Cy2-Ziege-anti-Kaninchen IgG und Cy3-Ziege-anti-Maus IgG).



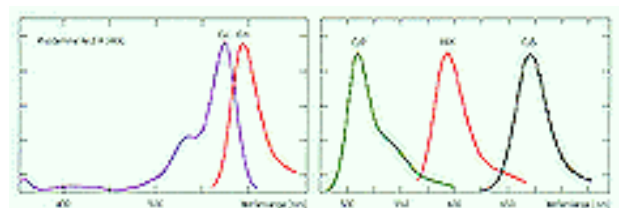
Ü Doppelmarkierung von GFAP (saures Gliafaserprotein) und Astrozyten (Cy2, grün) und Keratansulfat in Mikroglia (Cy3,rot). Hippocampus der Ratte.

Cy5: Dieses neuartige Fluorochrom zeichnet sich ebenfalls durch einen hohen Extinktionskoeffizienten aus. Cy5 wird bei 650 nm maximal angeregt und zeigt bei 674 nm das Emissionsmaximum. Cy5-markierte Präparate lassen sich optimal an konfokalen Laserscanning-Mikroskopen nach Anregung mit einem Krypton/Argon-Laser (bei 647 nm) analysieren. Weil die Fluoreszenz von Cy5 für das menschliche Auge kaum sichtbar ist, können Cy5-Markierungen mit konventionellen Fluoreszenzmikroskopen praktisch nicht untersucht werden. Ein besonderer Vorteil von Cy5 und seiner Anregung mit rotem Licht ist die resultierende niedrige Autofluoreszenz biologischer Proben.

Mehrfachmarkierungen mit Cy5: Der von der Emissionswellenlänge anderer gebräuchlicher Fluorochrome deutlich getrennte Emissionspeak von Cy5 legt seine Nutzung für Mehrfachmarkierungen nahe. Dabei können die anderen eingesetzten Fluorophore z.B. Cy2 und Cy3 oder DTAF und Texas Red oder das neu entwickelte Rhodamine Red-X sein. Die Wahl der eingesetzten fluorchromierten Nachweisreagenzien ist vor allem von der Ausstattung des nachfolgend benötigten konfokalen Mikroskops abhängig.

Ü Absorptions- und Emissionsspektren von Cy5.

ÜÜ Emissionsspektren von Cy3, RRX und Cy5.



Extinktions- und Emissionsmaxima der wichtigsten Fluorochrome

		Absorption	Emission	Farbe
Cy2	Carbocyanin	490 nm	508 nm	Grün
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat	492 nm	520 nm	Grün
Cy3	Indocarbocyanin	550 nm	570 nm	Rot
TRITC	Tetramethyl Rhodamin-Isothiocyanat	550 nm	570 nm	Rot
RRX	Rhodamin RedX	570 nm	590 nm	Rot
TRSC	Tetramethyl Rhodamin-Sulfonylchlorid	596 nm	620 nm	Rot
Cy5	Indodicarbocyanin	650 nm	670 nm	Infrarot
AMCA	Aminomethylcoumarin-Acetat	350 nm	450 nm	Blau

Referenzen

Literatur zu Rhodamine Red-X

Lefevre, C. et al. (1996) Texas Red-X and Rhodamine Red-X, New Derivatives of Sulforhodamine 101 and Lissamine Rhodamine B with improved Labeling and Fluorescence Properties. Bioconjugate Chem. 7:482-489

Literatur zu Carbocyaninen

Wessendorf, M.W. & Brelje, T.C. (1992) Which fluorophore is brightest? A comparison of the staining obtained using fluorescein, tetramethylrhodamine, lissamine rhodamine, Texas Red, and cyanine 3.18.Histochemistry 98:81-85.

Mujumdar, R.B. et al. (1993) Cyanine Dye Labeling Reagents: Sulfoindocyanine Succinimidyl Esters. Bioconjugate Chem 4:105-111.

Cullander, C. (1994) Imaging in the far-red with electronic light microscopy: requirements and limitations. J. Microsc. 176:281-286.

Brismar, H. & Ulfhake, B. (1997) Fluorescence lifetime measurements in confocal microscopy of neurons labeled with multiple fluorophores. Nature Biotechnology 15:373-377.

Literatur zu Mehrfachmarkierungen mit Carbocyaninen

Fritschy, J.-M. & Mohler, H. (1995) GABA-Receptor Heterogeneity in the Adult Rat Brain: Differential Regional and Cellular Distribution of Seven Major Subunits. J. Comp. Neural. 359:154-194.

Härtig et al. (1996) Triple immunofluorescence labelling of parvalbumin, calbindin-D28k and calretinin in rat and monkey brain. J. Neurosci. Methods 67:89-95.

Härtig et al. (1997) Co-localization of β -amyloid peptides, apolipoprotein E and, glial markers in senile plaques in the prefrontal cortex of old rhesus monkeys. Brain Res. 751:315-322.

Ferri G.-L. et al. (1997) Quadruple Immunofluorescence: A Direct Visualization Method. J. Histochem.Cytochem. 45:155-158.

Wouterlood, EG. et al. (1998) Two-channel dual-immunofluorescence confocal laser scanning microscopy using Cy2- and Cy5-conjugated secondary antibodies for the unequivocal detection of co-localization of neuronal markers. Brain Res. Prot. 2:149-159.

Weiterführende Literatur

Hockfield, S. et al. (1993) Molecular Probes of the Nervous System, Vol. 1: Selected Methods for Antibody and Nucleic Acid Probes. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Starch, W.B. (1997) Immunfluoreszenzfibel. Grundlagen und neue Anwendungen in der klinischen Immunologie. Blackwell Wissenschafts- Verlag Berlin-Wien.