

Tabelle 3-4 Restriktionsanalyse pNF-κB/Neo - Fragmentlängen

RE	pd2EGFP-1	pNF-κB/Neo	pNF-κB-d2EGFP
<i>XbaI</i>	4265 bp, linear	4434 bp, zirkulär (DNS aus DH5α, <i>XbaI</i> -Schnittstelle methyliert)	4163 bp, linear (DNS aus SCS110, <i>XbaI</i> -Schnittstelle nicht methyliert)
<i>EcoRI</i>	4265 bp, linear	4301 bp 133 bp	4030 bp 133 bp
<i>PstI</i>	3422 bp 843 bp	4434 bp, linear	4163 bp, linear
<i>SacI</i>	4265 bp, linear	4434 bp, linear	4163 bp, linear

Die Spuren der scheinverdauten Plasmide weisen neben der Bande zwischen 3 und 4 kb (zirkuläres, „*supercoiled*“ Plasmid) Banden oberhalb von 10 kb auf, bei denen es sich um multimere Plasmide handelt, da sie beim Verdau mit *EcoRI* oder *PstI* geschwächt werden bzw. verschwinden (Abb. 3-5).

Die entstandenen Fragmente aus den Verdau der beiden Ligationsprodukte mit *EcoRI*, *XbaI* (Abb. 3-5A), *PstI* und *SacI* (Abb. 3-5B) entsprechen den Erwartungen für das rekombinante Plasmid pNF-κB/Neo (Tabelle 3-5). Die Ligationsprodukte wurden aus DH5α gewonnen und bleiben deshalb beim Verdau mit *XbaI* zirkulär und „*supercoiled*“, während pNF-κB-d2EGFP linearisiert wird (Verdau jedoch nicht vollständig), da die verwendete Minipräparation aus SCS110 stammt und die *XbaI*-Schnittstelle somit nicht methyliert ist.

Der Verdau von pNF-κB-d2EGFP mit *PstI* ist unvollständig, da neben dem linearem Plasmid (4 kb) „*supercoiled*“ Plasmids (zwischen 2,5 und 3 kb) auftritt (Abb. 3-5B). pNF-κB-d2EGFP wurde auch durch *SacI* unvollständig verdaut.

Die Abgrenzung des neuen Plasmids pNF-κB/Neo von pd2EGFP-1, das das Vektorrückgrat des neuen Plasmid bildet, ist durch die Existenz der 133 bp-Bande bei Verdau der Ligationsprodukte mit *EcoRI* eindeutig. Sie ist jedoch aufgrund der geringen Länge des Fragments nur sehr schwach.

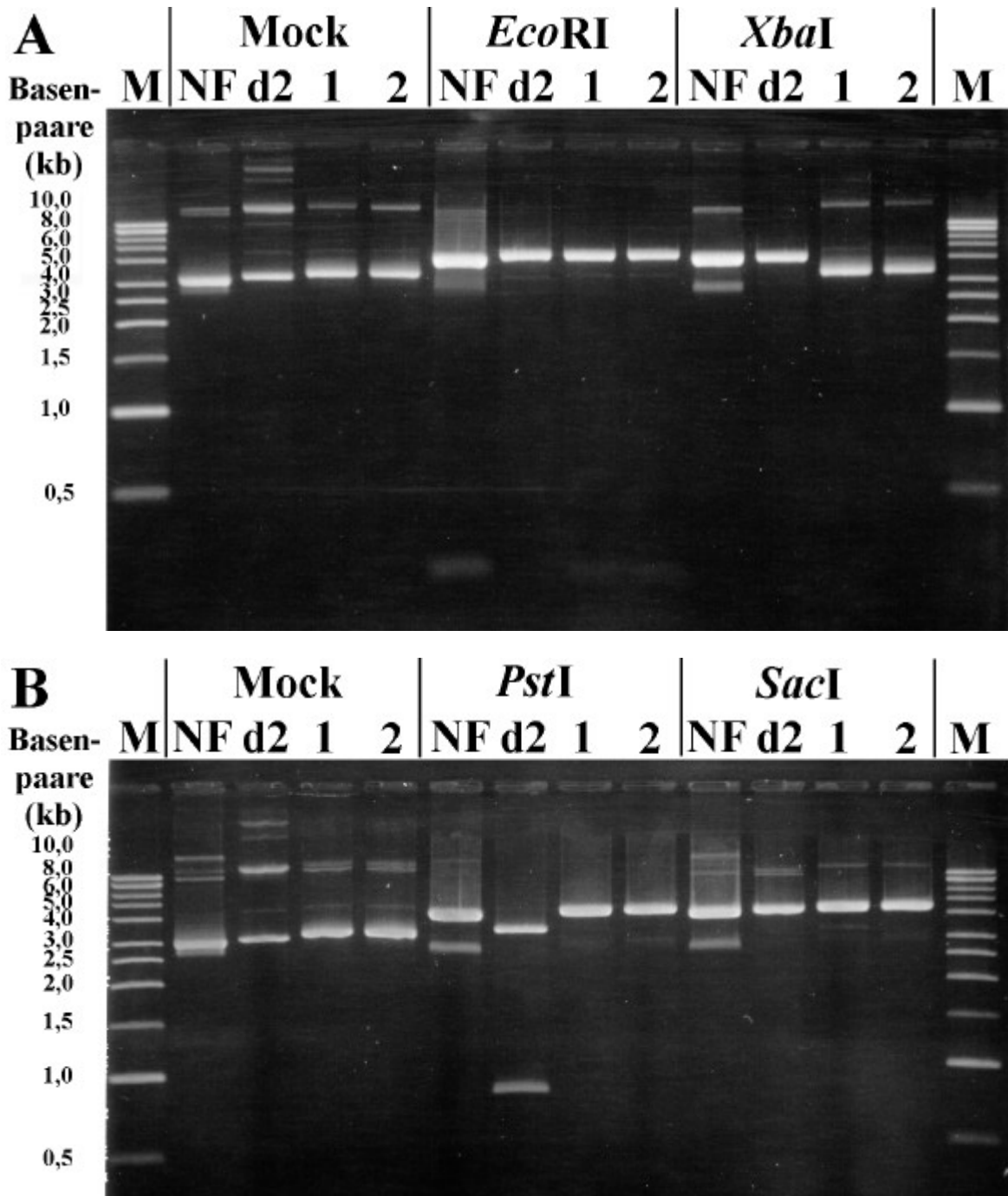


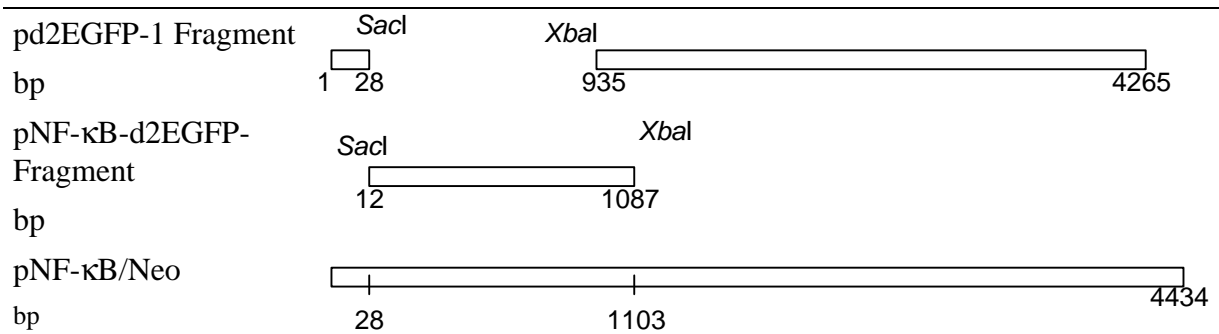
Abb. 3-5 Restriktionsanalyse des rekombinanten Plasmids pNF-kB/Neo

Agarose-Gelelektrophorese eines analytischen Verdau von zwei Ligationsprodukten. Aus den zwei Kolonien wurden DNS-Minipräparationen angefertigt und jeweils mit *EcoRI* bzw. *XbaI* (**A**) und mit *PstI* bzw. *SacI* (**B**) im Vergleich zu den Ausgangsplasmiden pNF-kB-d2EGFP (**NF**) und pd2EGFP-1 (**d2**, Vektorrückgrat des neuen Plasmids) verdaut, s. Beiblatt (Tabelle 3-5).

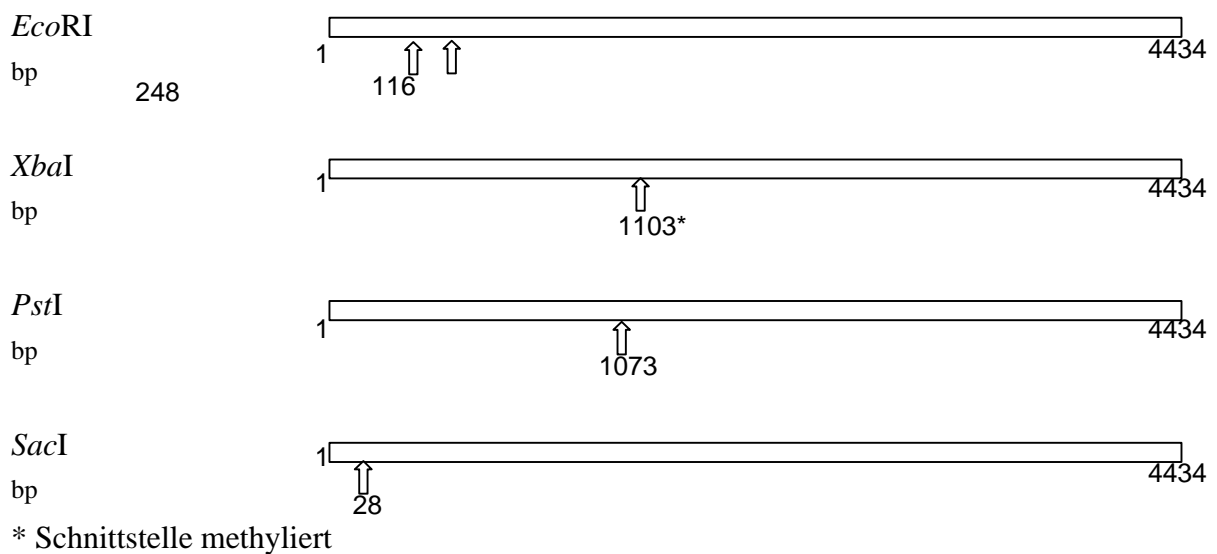
M Marker: KiloBase™

Spuren 1 und 2 Ligationsprodukte 1 und 2

Tabelle 3-5 Restriktionsanalyse pNF-κB/Neo - Schnittstellen



Schnittstellen in pNF-κB/Neo



3.2 VISUALISIERUNG UND QUANTIFIZIERUNG VON EGFP UND d2EGFP ALS REPORTERKOMPONENTE

Zur Visualisierung (Fluoreszenzmikroskop) und Quantifizierung der EGFP- und d2EGFP-Expression in CHO-Zellen wurden verschiedene Methoden (FACS-Analyse, Messung im Spektrofluorimeter und im MTP-Fluorimeter) erprobt und optimiert. Um diese Untersuchungen durchzuführen, wurden CHO-Zellen mit verschiedenen EGFP-Varianten transfiziert und stabile Zelllinien mit konstitutiver EGFP-Expression selektiert (s. 3.2.5, 3.2.6).

3.2.1 Visualisierung im Fluoreszenzmikroskop

Das Foto transient transfizierter Zellen zeigt einige EGFP-exprimierende AA8-Zellen in einem konfluenten Zellrasen (Abb. 3-6A). In einer Kolonie stabil transfizierter AA8-Zellen nach 14tägiger Kultivierung in G418-haltigem Selektionsmedium exprimieren alle Zellen EGFP, wobei sich das Protein sowohl im Zyto- als auch im Kernplasma befindet (Abb. 3-6B und C). HEK-pEGFP-N1-Zellen in einem knapp 50 % konfluenten Zellrasen zeigen eine intensive, homogene grüne Fluoreszenz in Zyto- und Nukleoplasma (Abb. 3-6D).

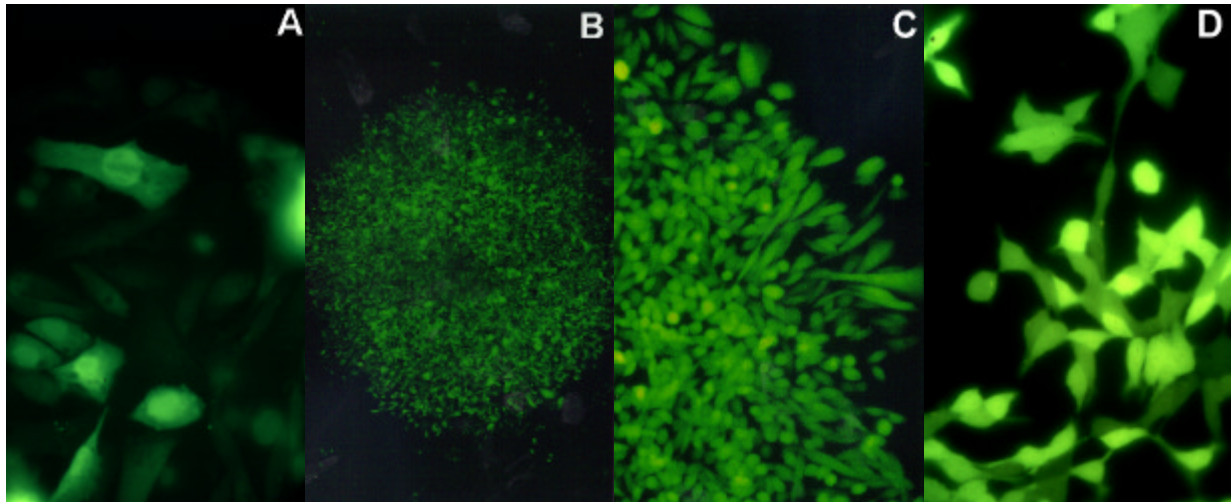


Abb. 3-6 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen EGFP-exprimierender Zellen

A Transiente (Vergrößerung 400fach) und **B** und **C** stabile Transfektion von AA8 mit pEGFP-N1, eine Kolonie und der Rand dieser Kolonie vergrößert, **D** stabile Transfektion von HEK mit pEGFP-N1, lebende Zellen in Medium in Petrischale (Vergrößerung 50fach in B, 200fach in C bzw. 400fach in A und D)

3.2.2 EGFP-Fluoreszenzspektrum

Anregungs- und Emissionsspektren von EGFP, exprimiert in AA8, werden in Abb. 3-7 gezeigt. Das Anregungsspektrum ist zweigipfelig. Bei der Zelllinie AA8-pEGFP-N1 1 liegt das erste Maximum bei 464 nm (Fluoreszenzintensität 12,5), das zweite bei 484 nm (Fluoreszenzintensität 11,7). Das Emissionsspektrum zeigt ein Maximum bei 508 nm (Fluoreszenzintensität 21,2) und läuft mit einer leichten Schulter bei 540 nm aus. Da zwischen Anregungsspitze und Emissionsmaximum nur ein Abstand von 24 nm besteht, konnte für die Aufnahme des Anregungsspektrums die Emission nicht auf das Maximum 508 nm festgelegt werden, sondern mußte auf 540 nm fixiert werden. Ebenso konnte für die Messung des Emissionsspektrums das Anregungslicht nicht auf eines der beiden Anregungsmaxima eingestellt werden, sondern es wurde auf 450 nm eingestellt, da sonst das Anregungslicht in den Spektralbereich der EGFP-Emission überstrahlt hätte.

Das Autofluoreszenzspektrum der untransfizierten AA8-Zellen zeigt unter diesen Meßbedingungen eine sehr schwache Anregungsspitze von 450 bis 470 nm und ein flaches Emissionsmaximum zwischen 520 und 550 nm (Fluoreszenzintensität bei beiden 0,3).

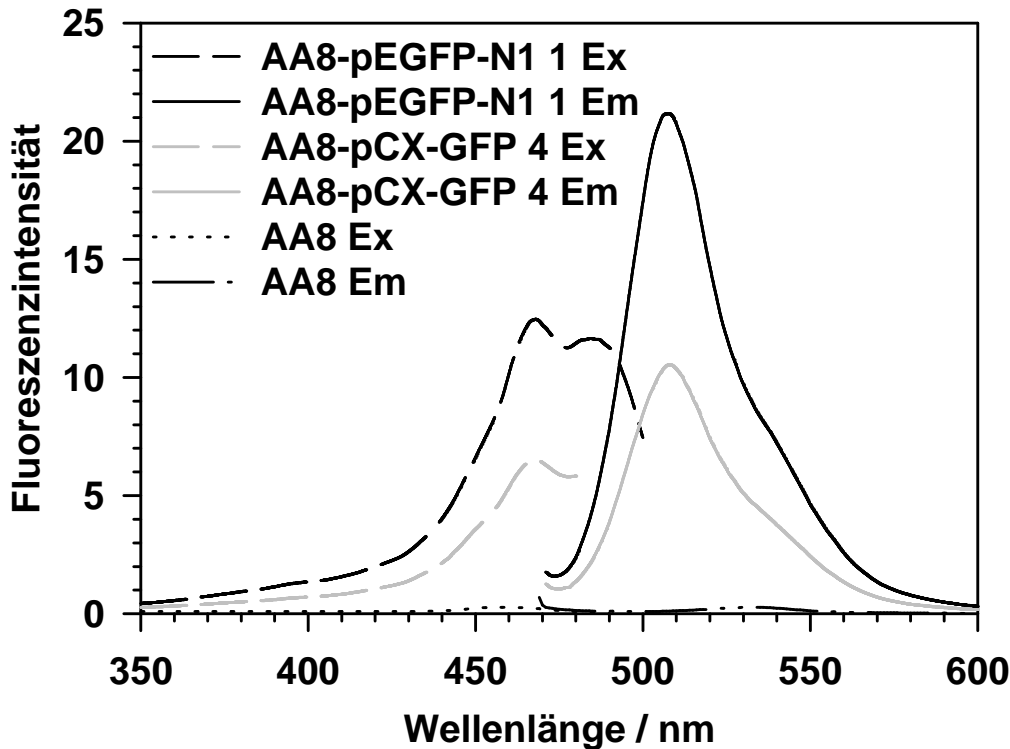


Abb. 3-7 EGFP-Fluoreszenzspektrum

Vergleich der Fluoreszenzspektren von EGFP, stabil und konstitutiv exprimiert in AA8 (Vektoren pEGFP-N1 und pCX-GFP) mit der Autofluoreszenz von AA8 (Formaldehyd-fixierte Zellen). Das Anregungsspektrum (Ex) wurde bei einer Emission von 540 nm gemessen, für das Emissionsspektrum (Em) wurde die Anregung bei 450 nm festgelegt (s. 2.4.3.1.).

3.2.3 Messung der EGFP- und d2EGFP-Fluoreszenz im FACS

Für die Quantifizierung der Fluoreszenz pro Zelle im FACS ist eine Fixierung der transfizierten Zellen, die die EGFP-Fluoreszenz nicht beeinträchtigt, wünschenswert. Abb. 3-8 zeigt, daß eine Fixierung von AA8-pCX-GFP mit 3,5 % Formaldehyd in PBS die Fluoreszenz im Vergleich zu lebenden AA8-pCX-GFP erhält, während mit 70 % Ethanol oder Methanol/Eisessig (3:1) fixierte Zellen ihre EGFP-Fluoreszenz fast vollständig verlieren und in ihrer Fluoreszenzintensität pro Zelle mit untransfizierten AA8 vergleichbar sind.

Eine Betrachtung der Zellen im Fluoreszenzmikroskop zwischen den einzelnen Fixierungsschritten zeigte, daß nach Behandlung mit eiskaltem 70 %igen Ethanol die EGFP-Fluoreszenz der Zellen abgeschwächt bis verschwunden ist und der Ethanolüberstand eine diffuse grüne Fluoreszenz aufwies. Nach einem PBS-Waschschritt nahm die grüne Fluoreszenz der Zellen weiter ab und die diffuse grüne Fluoreszenz war fast nicht mehr vorhanden, da die EGFP-Moleküle mit dem Ethanol abgesaugt wurden.

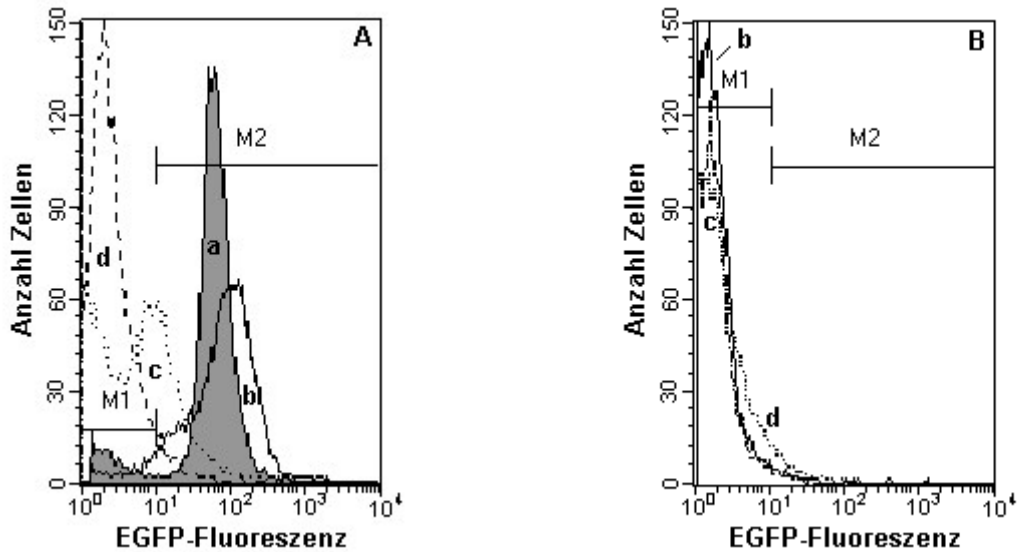


Abb. 3-8 FACS-Analyse EGFP-exprimierender und untransfizierter AA8-Zellen

Fixierung von AA8-pCX-GFP 4 (**A**) bzw. AA8 (**B**) mit Formaldehyd (**b**), Ethanol (**c**) oder Methanol/Eisessig (3:1, **d**) im Vergleich zu lebenden AA8-pCX-GFP 4 (**A, a**). M1, EGFP(-); M2, EGFP(+).

Nachdem sich die Fixierung mit Formaldehyd als geeignet erwiesen hatte, um die EGFP-Fluoreszenz für die FACS-Analyse zu erhalten, wurde die FACS-Analyse auch zur Messung des destabilisierten EGFP (d2EGFP) erprobt. Dazu wurden die stabil transfizierten, konstitutiv EGFP- bzw. d2EGFP-exprimierenden Zelllinien AA8-pEGFP-N1 und AA8-pCMV-d2EGFP (s. 3.2.6) verwendet. Die FACS-Analyse von AA8-pEGFP-N1 und AA8-pCMV-d2EGFP (Abb. 3-9) zeigt die einheitliche EGFP- bzw. d2EGFP-Expression dieser Zelllinien. Die mittlere Fluoreszenz der d2EGFP-exprimierenden Zellen ist 60 mal geringer, verglichen mit AA8-pEGFP-N1 (Abb. 3-9A). Der Unterschied in der EGFP-Fluoreszenzintensität pro Zelle, der bei Betrachtung von AA8-pEGFP-N1 und AA8-pCMV-d2EGFP im Fluoreszenzmikroskop sichtbar war, konnte somit durch FACS-Analyse quantifiziert werden. Die entsprechenden stabil transfizierten HEK-Zellen zeigen vergleichbare Fluoreszenzintensitäten (Abb. 3-9B).

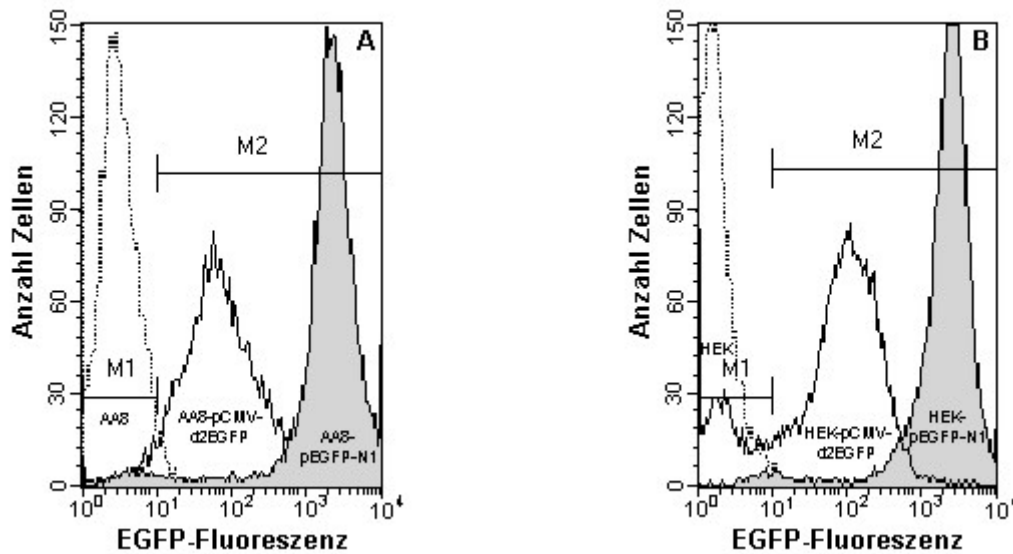


Abb. 3-9 FACS-Analyse d2EGFP-exprimierender Zellen

Fluoreszenzintensitäten von stabil mit pCMV-d2EGFP bzw. pEGFP-N1 transfizierten AA8- (A) bzw. HEK-Zellen (B) im Vergleich zu untransfizierten AA8- (A) bzw. HEK-Zellen (B), FACS-Analyse. Alle Zellen waren Formaldehyd-fixiert. M1, EGFP(-); M2, EGFP(+).

3.2.4 Messung im MTP-Fluorimeter und Optimierung der Meßbedingungen

Für die geplanten Genexpressionsstudien mit EGFP/d2EGFP als Reporter wurde die Eignung eines MTP-Fluorimeters für die Messung der Fluoreszenz untersucht. Dazu wurden die stabil transfizierten AA8-Zelllinien mit konstitutiver Expression von EGFP oder d2EGFP verwendet (AA8-pEGFP-N1, AA8-pCX-GFP und AA8-pCMV-d2EGFP). Zur Auswahl eines geeigneten Filterpaares für die Fluoreszenzmessung wurden die theoretischen Fluoreszenzerträge berechnet (s. 3.2.4.1) und die Detektionsschwellen für EGFP und d2EGFP ermittelt (s. 3.2.4.4). Die Ergebnisse dieser Optimierung wurden in HELLWEG *et al.* [2001] veröffentlicht.

Die Eignung des MTP-Fluorimeters für die EGFP-Fluoreszenzmessung wurde anhand der zellzahlabhängigen Fluoreszenz (s. 3.2.4.3) und der Bestimmung von Transfektionseffizienzen (s. 3.2.4.6) gezeigt.

3.2.4.1 EGFP-Fluoreszenzerträge mit zwei verschiedenen Filterkombinationen

Die Fluoreszenzerträge wurden für zwei verschiedene Anregungs-/ Emissionsfilterkombinationen ermittelt, die kommerziell für das MTP-Fluorimeter erhältlich sind:

- FITC-Filterkombination aus dem Anregungsfilter 485/20 und dem Emissionsfilter 530/20
- Kombination aus dem Anregungsfilter 460/40 und dem Emissionsfilter 508/20

Die Berechnungen ergaben, daß der Fluoreszenzertrag bei dem EGFP-spezifischen Filtersatz (460+508) ~ 3 mal höher ausfällt als beim FITC-Filtersatz (485+530), so daß mit dem

Filtersatz 460+508 8,4 % der gesamten EGFP-Fluoreszenz gemessen werden konnte [HELLWEG *et al.*, 2001].

Obwohl der Beitrag des Zellkulturmediums zur Hintergrundfluoreszenz bei der Filterkombination 460+508 höher ist [HELLWEG *et al.*, 2001], wurde dieser Filtersatz für weitere Messungen ausgewählt, da das Medium nur 2-5 % der gesamten Fluoreszenz ausmacht.

3.2.4.2 *Autofluoreszenz verschiedener MTP*

Neben dem Medium zeigen auch MTP eine Autofluoreszenz. Um die Fluoreszenzmessungen in MTP zu optimieren, wurden verschiedene MTP ohne Deckel mit den Filterkombinationen 485+530 und 460+508 gemessen. Unter den gewählten Meßbedingungen, bei denen Zellen in einer MTP in Medium mehrfach gemessen wurden, zeigte die Costar-MTP (schwarze Wände, klarer Boden) die geringste Autofluoreszenz bei beiden Filterkombinationen verglichen mit klaren MTP (Greiner und Sarstedt) [HELLWEG *et al.*, 2001] und wurde deshalb für alle Messungen im MTP-Fluorimeter eingesetzt.

3.2.4.3 *Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Zellzahl*

Für die Bestimmung des Detektionslimits bei verschiedenen Filterkombinationen wurden unterschiedliche Zellzahlen in Costar-96-*well* Platten als adhärenter Zellrasen gemessen. Der Vergleich der beiden Filterkombinationen zeigte, daß der EGFP-spezifische Filtersatz höhere Fluoreszenzwerte liefert als der FITC-Filtersatz, wie es durch die vorhergehenden Berechnungen erwartet wurde (s. 3.2.4.1). Messungen von unten resultierten in bis zu 3 mal höheren Fluoreszenzwerten der adhärenten und auch der suspendierten Zellen im Vergleich zur Messung von oben. Bei allen Meßbedingungen konnte eine lineare Abhängigkeit der Fluoreszenzintensitäten von der Zellzahl bei suspendierten und bei adhärenten Zellen (bis ~ 90 % Konfluenz) gezeigt werden, wobei bei adhärenten Zellen im Vergleich zu suspendierten Zellen (Messung von unten) die Fluoreszenzintensität fast auf das Doppelte steigt [HELLWEG *et al.*, 2001].

Bei Zellen, die d2EGFP konstitutiv exprimieren (AA8-pCMV-d2EGFP), sind bei allen Filterkombinationen sehr hohe Zellzahlen erforderlich, um deutlich vom Hintergrund zu unterscheidende Fluoreszenzintensitäten zu erhalten (45.000 Zellen pro Vertiefung). Unter diesen Bedingungen wachsen die ausgesäten Zellen innerhalb eines Tages zu einem konfluenten Zellrasen [HELLWEG *et al.*, 2001].

3.2.4.4 *Detektionslimits EGFP- und d2EGFP-exprimierender Zellen in MTP*

Die Detektionsschwelle für EGFP-exprimierende Zellen in einer Vertiefung einer MTP wurde als die Zellzahl definiert, deren Fluoreszenzmeßwert mindestens die zweifache Hintergrundfluoreszenz erreicht (s. 2.4.5.2). Bei Berücksichtigung der unveränderten Fluoreszenzmeßdaten beträgt die Detektionsschwelle 8.400 adhärente AA8-pEGFP-N1-Zellen pro Vertiefung für den FITC-Filtersatz bzw. für den EGFP-spezifischen Filtersatz für AA8-

pEGFP-N1-Zellen 11.400 Zellen pro Vertiefung bei Messung von unten. Subtraktion der MTP-Hintergrundfluoreszenz und Messung in PBS statt in Medium führt zu einem reduzierten Detektionslimit (1.800 Zellen bei AA8-pEGFP-N1).

Bei Zellen, die konstitutiv d2EGFP exprimieren (AA8-pCMV-d2EGFP), beträgt das Detektionslimit bei Messung in Medium mindestens $1,2 \times 10^5$ Zellen pro Vertiefung. Bei Messung in PBS und nach Subtraktion des Plattenhintergrunds fällt das Detektionslimit mit dem EGFP-Filterpaar auf ~ 18.000 Zellen pro Vertiefung.

Unter den gewählten Meßbedingungen (in Medium, Subtraktion der Plattenautofluoreszenz) war das Filterpaar 460+508 mit einem Detektionslimit von 5.100 AA8-pEGFP-N1-Zellen pro Vertiefung am besten geeignet [HELLWEG *et al.*, 2001] und wurde deshalb für alle EGFP-Messungen im MTP-Fluorimeter eingesetzt. d2EGFP-Messungen waren aufgrund des hohen Detektionslimits nur eingeschränkt möglich.

3.2.4.5 *Messung des Vermehrungsverhaltens EGFP-exprimierender Zellen im MTP-Fluorimeter*

Um mögliche Einflüsse der stabilen Transfektion und der konstitutiven EGFP-Expression auf das Vermehrungsverhalten von AA8-pEGFP-N1-Zellen aufzudecken und um zu untersuchen, ob eine schnelle Quantifizierung des Wachstums durch Messung der EGFP-Fluoreszenz im MTP-Fluorimeter möglich ist, wurden Wachstumskurven für die stabil transfizierte Zelllinie AA8-pEGFP-N1 1 und die Ausgangszelllinie AA8 ermittelt.

Das Wachstum wurde durch regelmäßige Zellzählung (Abb. 3-10A) und durch Fluoreszenzmessung im MTP-Fluorimeter bestimmt (Abb. 3-10B).

Die durch Zellzählung ermittelte Wachstumskurve zeigt die drei typischen Phasen des Zellwachstums, (i) die lag-Phase, (ii) die exponentielle Wachstumsphase und (iii) die stationäre Phase, in der so viele Zellen sterben wie durch Teilung nachgebildet werden (Abb. 3-10A).

Vergleicht man die direkte Zellzählung (Abb. 3-10A) mit der Fluoreszenzmessung (Abb. 3-10B), so ergeben sich zwei Unterschiede. Die Fluoreszenzkurve steigt deutlich verzögerter an (Beginn der Exponentialphase nach 22 h in A, nach 45 h in B) und der exponentielle Anstieg verläuft langsamer (Verdopplungszeit 16,4 h in A, ca. 34,2 h in B). Die stationäre Phase ist vergleichbar (Verhältnis Endwert/Ausgangswert 64,4 in A, 65,7 in B), wenn die Hintergrundfluoreszenz des Zellkulturmediums und der MTP von Endwert und Ausgangswert subtrahiert wird.

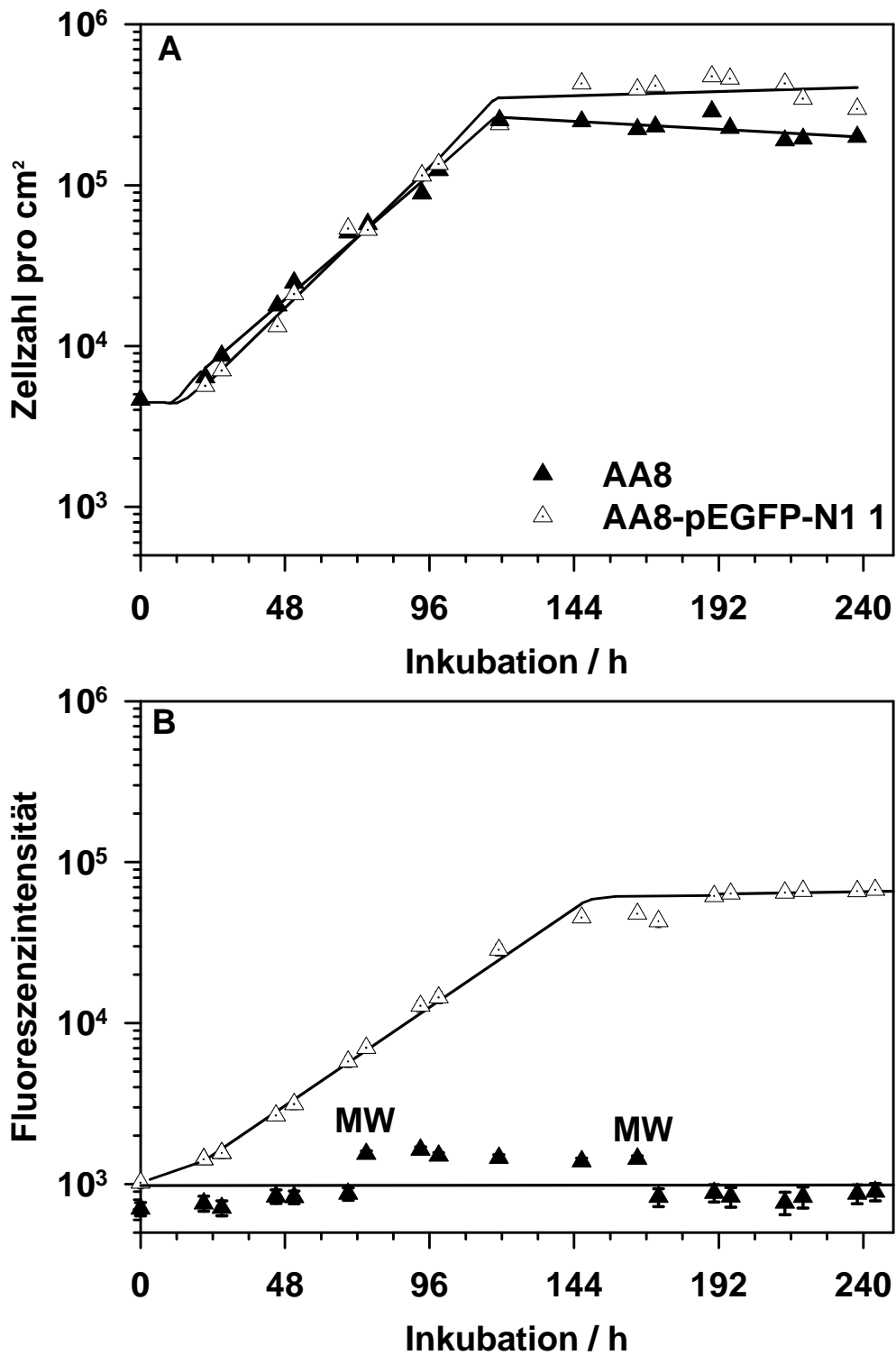


Abb. 3-10 Wachstumskurven EGFP-exprimierender AA8- und untransfizierter AA8-Zellen

A Zellzählung, **B** Fluoreszenzmessung im MTP-Fluorimeter, Filterpaar 460+508, Mittelwert und SD (n = 48), Hintergrundfluoreszenz von Zellkulturmedium und MTP subtrahiert, MW = Mediumwechsel.

3.2.4.6 Messung der Transfektionseffizienz im MTP-Fluorimeter

Stabile Transfektionen erfordern eine Wachstumsdauer von 2 bis 3 Monaten bis zur einsatzfähigen Zelllinie, so daß verschiedene Promotoren erst nach dieser Wartezeit getestet werden können. Um diesen Zeitraum zu verkürzen, kann transient transfiziert werden. Dazu und um auch bei der stabilen Transfektion hohe Ausbeuten zu erzielen, müssen die Transfektionsbedingungen optimiert werden, damit eine hohe Aufnahme der Plasmide in eine möglichst große Anzahl Zellen erreicht wird (s. 2.3.9.2).

Populationsbezogene Daten, mit dem MTP-Fluorimeter gemessen (Abb. 2-5), wurden mit Einzelzelldaten aus der FACS-Analyse verglichen (Tabelle 3-6). 48 h nach der Transfektion wurde die Fluoreszenzintensität im MTP-Fluorimeter gemessen und sofort danach wurden die Zellen durch Trypsinieren geerntet und für die FACS-Analyse fixiert.

Tabelle 3-6 Transfektionseffizienz, Vergleich der Messungen im MTP-Fluorimeter und im FACS.

Transfektion mit Liposom	Plasmid-DNS (ng)	Mittlere Fluoreszenz pro Vertiefung \pm SD (MTP-Fluorimeter) ^{a,c}	% EGFP(+)-Zellen \pm SD (FACS-Analyse) ^{b,c}
Tfx 10	0	8.162,2 \pm 76,6	0,41 \pm 0,14
	250	9.068,0 \pm 305,7	1,17 \pm 0,22
	500	10.070,0 \pm 206,7	1,75 \pm 0,44
	750	9.876,4 \pm 404,9	1,45 \pm 0,34
	1.000	9.779,2 \pm 328,4	2,02 \pm 0,72
Tfx 20	0	9.108,3 \pm 105,2	0,27 \pm 0,30
	250	11.096,0 \pm 92,1	3,20 \pm 0,92
	500	13.196,0 \pm 283,1	3,82 \pm 0,40
	750	12.728,0 \pm 330,7	3,47 \pm 0,59
	1.000	12.645,0 \pm 980,1	3,31 \pm 0,20
TransFast 2:1	0	8.672,2 \pm 63,9	0,31 \pm 0,29
	250	9.373,9 \pm 102,1	1,82 \pm 0,53
	500	13.902,0 \pm 299,6	5,15 \pm 0,48
	750	17.627,0 \pm 432,6	7,72 \pm 0,62
	1.000	27.988,0 \pm 2063,4	12,55 \pm 4,66
TransFast 1:1	0	8.678,3 \pm 98,9	0,08 \pm 0,02
	250	8.908,2 \pm 147,9	1,03 \pm 0,52
	500	10.923,0 \pm 303,6	5,32 \pm 0,55
	750	11.139,0 \pm 235,2	4,11 \pm 0,72
	1.000	17.203,0 \pm 659,5	13,51 \pm 1,85

^aUnveränderte MTP-Fluorimeterdaten ohne Subtraktion der Plattenautofluoreszenz

^bMarker für den Fluoreszenzkanal 1 im FACS wurden mit untransfizierten AA8-Zellen (EGFP(-)) und mit stabil transfizierten AA8-pEGFP-N1-Zellen (EGFP(+)) gesetzt.

^cMittelwerte und SD für je 5 wells

Die höchsten im MTP-Fluorimeter gemessenen Fluoreszenzintensitäten entsprechen ~ 13 % EGFP(+)-Zellen (Tabelle 3-6). Bei dieser starken EGFP-Expression in transient transfizierten Zellen konnten *wells* mit >7 % EGFP(+)-Zellen in einem konfluenten Zellrasen von der Kontrolle unterschieden werden (Abb. 2-5A, Tabelle 3-6), d.h. die Fluoreszenzintensität erreichte das Doppelte der Autofluoreszenz von Platte, Medium und Zellen (24-*well*-plate).

Die Kinetik der EGFP-Expression bei transients Transfektion von AA8-Zellen wurde im MTP-Fluorimeter gemessen. Die Fluoreszenzintensität steigt bei pEGFP-N1 wesentlich stärker an als bei pCMV-d2EGFP (Abb. 3-11). Eine Verdopplung der mittleren Fluoreszenz ist bei pEGFP-N1 nach 24 h zu verzeichnen, bei pCMV-d2EGFP erst nach 48 h.

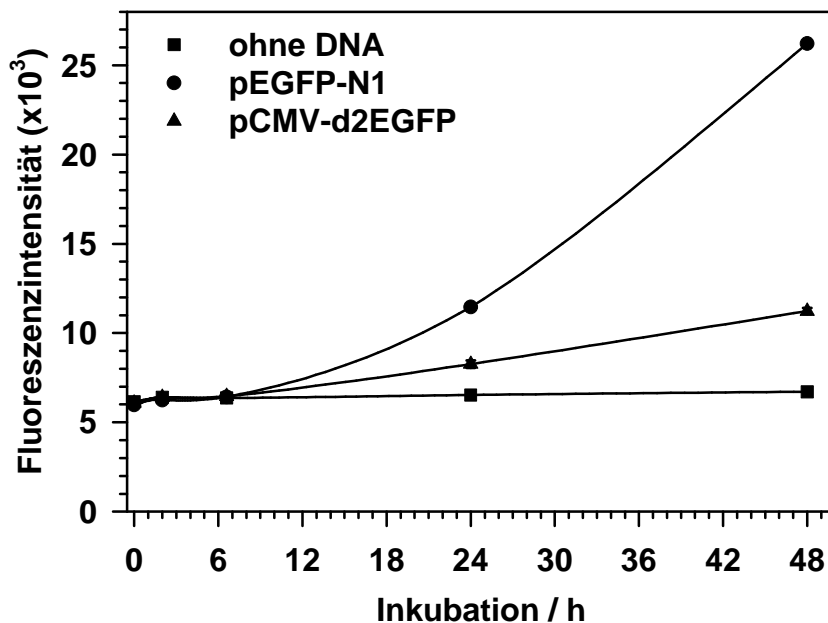


Abb. 3-11 Kinetik der EGFP-Expression in AA8-Zellen

Transiente Transfektion von AA8 mit den Plasmiden pEGFP-N1 und pCMV-d2EGFP (TransFast, Optimalbedingungen, α -Medium mit 5 % Serum). Die Fluoreszenz wurde im MTP-Fluorimeter gemessen (24-*well*-Platte, Mittelwert von 4 *wells*). Die Standardabweichungen (SD) sind geringer als die Höhe der Symbole.

3.2.5 Stabile Transfektion durch Cotransfektion eines Helferplasmids

EM9-Zellen wurden mit dem Plasmid pCX-GFP, in dem das EGFP-Gen durch den Promotor des β -Actin/ β -Globin-Gens des Huhnes gesteuert wird, und dem Helferplasmid pSV2*neo*, das die G418-Resistenz kodiert, stabil transfiziert (Tabelle 2-1, Abb. 2-1). Die durch Isolieren einzelner EGFP-exprimierender, G418-resistenter Kolonien gewonnenen Klone wurden mittels FACS-Analyse charakterisiert (Abb. 3-12). Der Prozentsatz EGFP(+)-Zellen und die mittlere Fluoreszenzintensität unterscheidet sich von Klon zu Klon. Es wurden nur Klone weiterverwendet, die mindestens 90 % EGFP(+)-Zellen mit einer hohen durchschnittlichen Fluoreszenz aufwiesen, dabei aber nicht in Zellwachstum und Anheftungseffizienz beeinträchtigt waren.