



CellCycleFlowEx[®] Kit

(200 tests / testů / testov)

Cat. No. / Kat. č.: ED7069

ENGLISH

1. Intended use

CellCycleFlowEx[®] Kit is intended for cell cycle analysis using flow cytometry. The kit is suitable for testing suspensions of isolated cells, such as leukocytes isolated from peripheral blood (PBMC) or cells from tissue culture.

2. Introduction

Proliferating cells duplicate their DNA during the cell cycle. The DNA is subsequently segregated equally into the daughter cells. Measurement of cellular DNA content within a proliferating cellular population recognizes the cells in S phase (actively duplicating their DNA), G2/M phase (having double the amount of DNA than resting cells) and G0/G1 phase (the same amount of DNA as resting cells) of the cell cycle. Analysis of the percentage of cells at different stages of the cycle according to their DNA content is used to assess the proliferative response to stimulation with mitogens (lymphocyte transformation test) or to monitor the effect of cell cycle inhibitors.

3. Test principle

The tested cells are washed and resuspended in a buffer to achieve a homogeneous suspension. Then the cells are fixed and permeabilized with 70% ethanol. Subsequently the cellular DNA is stained with propidium iodide, which passes through the permeabilized membrane and intercalates between the bases of nucleic acid. Propidium iodide binds to the DNA stoichiometrically, which means that the amount of bound propidium iodide is proportional to the amount of DNA within the cell. Labeling of DNA takes place in buffer with RNase which digests the contaminating cellular RNA. After laser excitation the cells emit fluorescence of which intensity is proportional to the DNA content. Flow cytometric analysis of the cell suspension distinguishes the cells in G0/G1, S and G2/M phase of the cell cycle.

4. Precautions

- For laboratory research only, not for drug, diagnostic or other use.
- Wear protective gloves.
- Do not use reagents after the expiration date.
- Avoid contamination of reagents.
- Protect the reagent Propidium Iodide from light.
- The flow cytometer should be calibrated on a routine basis using fluorescent microbeads to ensure stable sensitivity of detectors.
- Any deviation from the recommended procedure can affect the test results.

5. Reagents provided

- **ED7069-1 RNase A** – 2 vials, each contains 1 ml of RNase A solution. The amount of the reagent in each vial is sufficient for 100 tests. The solution is provided ready to use.
- **ED7069-2 Propidium Iodide** – 1 vial, contains 2 ml of propidium iodide solution. The amount of the reagent is sufficient for 200 tests. The solution is provided ready to use.
- **ED7069-3 10x Wash Buffer** – 2 bottles, each contains 30 ml of 10x concentrated solution. The amount of the reagent in each bottle is sufficient for 100 tests.

6. Necessary material not supplied

- Suitable 5 ml test tubes for cell staining (e.g. 12 × 75 mm)
- 70% ethanol at least of p.a. purity
- Ice bath / container with crushed ice
- Automatic pipettes with disposable tips
- Vortex
- Centrifuge with rotor suitable for test tubes
- Flow cytometer - blue laser excitation at 488 nm, light emission at 617 nm (PE)

7. Storage

CellCycleFlowEx[®] Kit consists of two parts:

- a) Box with 10x Wash Buffer and Propidium iodide. Store the box at 2-8 °C
- b) Resealable bag with RNase A vials. Store the bag with vials at -20 °C.

Expiration date is printed on each reagent label, on the box and the bag label.

8. Assay procedure

Preparation of reagents before the assay

1. Dilute **10x Wash Buffer** with deionized water (1 part of 10x Wash Buffer and 9 parts of deionized water) and keep it cold at 2-8 °C. Store the diluted solution (**1x Wash Buffer**) at 2-8 °C for up to 6 months.
10x Wash Buffer may contain precipitated salts. If present, place the bottle to room temperature or into a water bath set to 37°C and wait till the salts dissolve. Mix to ensure homogeneity before dilution.

2. Prepare **PI staining solution** (0,5 ml per test) according to the following formulation:

1x Wash Buffer	1 ml
Propidium iodide	0.02 ml
RNase A	0.02 ml

The solution may be stored up to 2 weeks at 2-8 °C.

3. Prepare **70% ethanol** (not provided) in deionized water and keep it cool at -15 to -30° C.

Procedure

Washing the cells

1. Centrifuge the cells at 300 g for 5 minutes at laboratory temperature.
Remove the supernatant.
2. Resuspend the cells in 1 ml of cold 1x Wash Buffer (2-8 °C).
3. Centrifuge the cells at 300 g for 5 minutes at laboratory temperature.
Remove the supernatant.

Resuspend the cells in cold 1x Wash Buffer (2-8 °C) to concentration 2.5-10 x 10⁶ cells/ml.

For one test you need 200 µl of cell suspension.

Ethanol fixation

4. Pipet 200 µl of the cell suspension to a 5 ml test tube and place it on ice.
5. Add dropwise 2 ml of cold 70% ethanol (-15 to -30 °C) while continuously mixing (vortexing) the tube.
Then immediately place the tube back to ice.

The procedure may be stopped at this step. The fixed cells can be transported or stored at 2-8 °C for up to 2 weeks.

Staining of DNA

6. Centrifuge the cells at 300 g for 5 minutes at laboratory temperature.
Remove the supernatant.
7. Resuspend the cells in 1 ml of cold 1x Wash Buffer (2-8 °C).
8. Centrifuge the cells at 300 g for 5 minutes at laboratory temperature.
Remove the supernatant.
9. Resuspend the cells in 0.5 ml of PI staining solution and incubate for 30 minutes at room temperature in the dark.
10. Thoroughly vortex the samples and measure with flow cytometer within 4 hours.

The cells in PI staining solution form aggregates in time. They need to be resuspended by vortexing prior the flow cytometric analysis.

The level of DNA labeling increases in time thus the samples measured in 30 minutes time and those

measured in 4 hour time differ in their G1 peak mean fluorescence of about 10% and the latter have higher G2/G1 fluorescence ratio.

9. Flow cytometric analysis

Analyze stained samples using flow cytometer. Acquire at least 20,000 events per sample. For precise measurements we recommend setting the flow at the lowest rate. High speed of acquisition negatively affects the resolution of the populations.

Visualize the measured data in the side-scatter (**SSC**) versus forward scatter (**FSC**) dot-plot. Set a gate around the target cell population (gate in Figure 1). Display the target population in the PE-Width (**PE-W**) versus PE-Area (**PE-A**) and draw a gate containing singlets to eliminate cell aggregates from further analysis. Display singlets in the histogram, where the X axis represents the fluorescence intensity in PE channel in linear scale (Figure 3). Set the PMT in PE channel to ensure the G1 peak is positioned in at least one third of the scale, see Figure 3.

Set borderlines between the G0/G1, S and G2/M phases of cell cycle, as shown in Figure 3. Calculate the proportion of cells in each phase. Alternatively, use suitable software (e.g., FlowJo) that can provide cell cycle analysis automatically.

10. Limitations of the assay

1. Flow cytometer may produce false results if the device has not been regularly calibrated and maintained appropriately.
2. There is a risk of misinterpretation of the data if the singlet gate and the G0/G1, S and G2/M phase borderlines were not placed correctly.

1. Použití soupravy

Souprava CellCycleFlowEx® Kit je určena ke sledování buněčného cyklu pomocí průtokové cytometrie. Souprava je vhodná pro testování suspenze izolovaných buněk, např. leukocytů izolovaných z periferní krve (PBMC) nebo buněk tkáňové kultury.

2. Úvod

Proliferující buňky během buněčného cyklu zdvojují svoji DNA, která je poté rovnoměrně rozdělena mezi buňky dceřiné. V množící se populaci buněk lze měřením obsahu DNA odlišit zastoupení buněk v S fázi (aktivně replikující svoji DNA) a G2/M fázi (mají zdvojené množství DNA) od buněk v G0/G1 fázi (stejně množství DNA jako nedělící se buňky) buněčného cyklu. Analýza procentuálního zastoupení buněk v jednotlivých fázích cyklu podle obsahu DNA je využívána pro posouzení proliferace aktivity po stimulaci buněk mitogeny (test blastické transformace) či sledování účinku inhibitorů buněčného cyklu.

3. Princip

Pro test je třeba buňky testovaného materiálu promýt a rozmíchat v pufru tak, aby vznikla homogenní suspenze. Poté jsou buňky fixovány a permeabilizovány 70% ethanolem. Následně je buněčná DNA obarvena propidium jodidem, který projde permeabilizovanou membránou a interkaluje se mezi báze nukleové kyseliny. Značení DNA probíhá v pufru s RNase, která odstraňuje kontaminující RNA. Propidium jodide se váže na DNA stechiometricky, to znamená, že množství navázaného propidium jodidu odpovídá množství DNA přítomné v buňce. Buňky po ozáření laserem emitují záření, jehož intenzita je přímo úměrná obsahu DNA v buňkách. Analýzou suspenze buněk na průtokovém cytometru lze odlišit buňky v G0/G1, S a G2/M fázi buněčného cyklu.

4. Upozornění

- Souprava je určena pouze pro výzkumné účely.
- Pracujte v ochranných rukavicích.
- Nepoužívejte reagenty po uplynutí doby použitelnosti.
- Chraňte obsah vialek před kontaminací.
- Nevystavujte reagenty Propidium iodide dlouhodobému působení světla.
- Průtokový cytometr pravidelně kalibrujte pomocí fluorescenčních kuliček, aby byla zajištěna stabilní citlivost detektorů.
- Nedodržení doporučeného postupu analýzy může ovlivnit výsledky testů.

5. Obsah soupravy

- ED7069-1 RNase A – 2 vialky, každá obsahuje 1 ml roztoku RNase A. Množství reagenty v jedné vialce dostačuje pro provedení 100 testů. Určeno pro přímé použití.
- ED7069-2 Propidium iodide – 1 vialka, obsahuje 2 ml roztoku propidium jodidu. Množství reagenty dostačuje na provedení 200 testů. Určeno pro přímé použití.
- ED7069-3 10x Wash Buffer – 2 lahvičky, každá obsahuje 30 ml 10x koncentrovaného roztoku. Množství

reagenty v každé lahvičce dostačuje na provedení 100 testů.

6. Potřebné vybavení a materiál, který není dodáván

- Vhodné 5ml zkumavky pro barvení buněk (např. 12 × 75 mm)
- 70% ethanol, minimálně p. a. čistoty
- Ledová lázeň/nádoba s rozdrčeným ledem
- Sada automatických pipet s jednorázovými špičkami
- Vortex
- Centrifuga s rotorem pro příslušné zkumavky
- Průtokový cytometr - excitace modrým laserem 488 nm, emise záření při 617 nm (PE)

7. Skladování soupravy

Souprava CellCycleFlowEx® Kit se skládá ze dvou složek:

- a) Krabice s komponenty: 10x Wash buffer, Propidium iodide. Krabici uchovávejte při teplotě **2-8 °C**
- b) Uzavíratelný sáček: Dvě vialky s RNase A. Sáček s vialkami uchovávejte při teplotě **-20°C**.

Doba použitelnosti je vyznačena na etiketách jednotlivých reagentů, na sáčku a na krabici soupravy.

8. Postup testu

Příprava reagentů před testem

1. **10x Wash Buffer** před použitím naředte deionizovanou vodou (1 díl 10x Wash Buffer a 9 dílů dH₂O) a nechte vychladit na 2-8 °C. Naředěný roztok (1x Wash Buffer) je možné skladovat 6 měsíců, pokud je uchováván při teplotě 2-8 °C.

V roztoku 10x Wash Buffer se mohou během skladování vytvořit krystaly soli, v takovém případě ponechte lahvičky při laboratorní teplotě anebo zahřejte ve vodní lázni na 37°C a vyčkejte rozpuštění krystalů. Před použitím obsah lahvičky promíchejte.

2. Připravte **Barvicí roztok PI** (0,5 ml na test) o následujícím složení:

1x Wash buffer	1 ml
Propidium iodide	0,02 ml
RNase A	0,02 ml

Roztok je možné skladovat 2 týdny, pokud je uchováván při teplotě 2-8 °C.

3. Připravte **70% roztok etanolu** (není součástí soupravy) v deionizované vodě a nechte vychladit na -15 až -30° C.

Postup testu

Promytí buněk určených k testování

1. Buňky centrifugujte při 300 g po dobu 5 minut při laboratorní teplotě. Odstraňte supernatant.
2. Resuspendujte buňky v 1 ml vychlazeného 1x Wash Buffer (2-8 °C).
3. Centrifugujte buňky při 300 g po dobu 5 minut při laboratorní teplotě. Odstraňte supernatant.

4. Resuspendujte buňky ve vychlazeném 1x Wash Buffer na koncentraci $2,5 - 10 \times 10^6$ buněk/ml.

Pro jeden test je třeba minimálně 200 µl buněčné suspenze.

Fixace etanolem

5. Napipetujte 200 µl buněčné suspenze do 5ml zkumavky a umístěte na led.
6. Pomalu přikapejte k buňkám 2 ml 70% ethanolu vychlazeného na teplotu -15 až -30 °C a současně neustále promíchávejte obsah zkumavky (např. na vortexu). Poté ihned umístěte zkumavku zpátky na led.

V tomto kroku je možné experiment přerušit. Buňky fixované v ethanolu lze transportovat anebo skladovat chlazené po dobu 2 týdnů a poté dokončit test.

Barvení DNA

7. Buňky centrifugujte při 300 g po dobu 5 minut při laboratorní teplotě. Odstraňte supernatant.
8. Resuspendujte buňky v 1 ml vychlazeného 1x Wash buffer.
9. Centrifugujte buňky při 300 g po dobu 5 minut při laboratorní teplotě. Odstraňte supernatant.
10. Resuspendujte buňky v 0,5 ml Barvicího roztoku PI a nechte inkubovat 30 minut v temnu při laboratorní teplotě.
11. Vzorky promíchejte na vortexu a analyzujte na průtokovém cytometru během 4 hodin od obarvení.

Buňky v barvicím roztoku vytvářejí agregáty, které je třeba před analýzou v průtokovém cytometru resuspendovat na vortexu. S časem roste úroveň označení DNA propidium jodidem, a proto se vzorky měřené ihned a vzorky měřené s odstupem 4 hodin liší o přibližně 10% v intenzitě fluorescence pro G1 populaci a mají vyšší poměr fluorescence G2/G1 populace.

9. Analýza průtokovým cytometrem

Obarvené vzorky změřte na průtokovém cytometru. Najímejte minimálně 20.000 událostí od každého vzorku. Doporučujeme nastavit nízkou rychlost průtoku dle možností cytometru. Vyšší rychlost akvizice negativně ovlivňuje rozlišení populací. Naměřená data zobrazte v grafu side-scatter (**SSC**) versus forward-scatter (**FSC**) a ohraničte cílovou populaci buněk (gate na obrázku č. 1). Zobrazte cílovou populaci v grafu PE-Width (**PE-W**) versus PE-Area (**PE-A**) a ohraničte singlety, čímž vyloučíte z další analýzy shluky buněk. Zobrazte singlety v histogramu, kde na ose X je fluorescence v PE kanálu v lineární škále (obrázek č. 3). Nastavte napětí v kanálu PE tak, aby G1 populace byla přibližně v jedné třetině rozsahu osy X. Nastavte rozhraní mezi G0/G1, S a G2/M fázemi buněčného cyklu, jak je znázorněno na obrázku č. 3, a spočítejte zastoupení buněk v jednotlivých fázích. Případně použijte vhodný vyhodnocovací software (např. FlowJo), který dokáže fáze buněčného cyklu analyzovat automaticky.

10. Omezení metody

1. Průtokový cytometr může poskytovat špatné hodnoty, pokud není dobře seřízen a udržován.
2. Data mohou být nesprávně interpretována, pokud jsou ohraničení pro singlety a fáze buněčného cyklu umístěné nesprávně.

1. Použitie súpravy

Súprava CellCycleFlowEx® Kit je určená na sledovanie bunkového cyklu pomocou prietokovej cytometrie. Súprava je vhodná pre testovanie suspenzie izolovaných buniek, napr. leukocytov izolovaných z periférnej krvi (PBMC) alebo buniek tkanivovej kultúry.

2. Úvod

Proliferujúce bunky počas bunkového cyklu zdvojnásobujú svoju DNA, ktorá je potom rovnomerne rozdelená medzi bunky dcérske. V množiacej sa populácii buniek je možné meraním obsahu DNA odlíšiť zastúpenie buniek v S fáze (aktívne replikujúce svoju DNA) a G2/M fáze (majú zdvojené množstvo DNA) od buniek v G0/G1 fáze (rovnaké množstvo DNA ako nedeliace sa bunky) bunkového cyklu. Analýza percentuálneho zastúpenia buniek v jednotlivých fázach cyklu podľa obsahu DNA je využívaná pre posúdenie proliferatívnej aktivity po stimulácii buniek mitogénmi (test blastikovej transformácie lymfocytov) či sledovanie účinku inhibítorov bunkového cyklu.

3. Princíp

Pre test je potrebné bunky testovaného materiálu premyť a rozmiešať v pufrí tak, aby vznikla homogénna suspenzia. Potom sú bunky fixované a permeabilizované 70% etanolom. Následne je bunková DNA odfarbená propidium jodidom, ktorý prejde cez permeabilizovanú membránu a interkaluje sa medzi báze nukleovej kyseliny. Značenie DNA sa uskutočňuje v pufrí s RNase, ktorá odstraňuje kontaminujúcu RNA. Propidium jodid sa viaže na DNA stechiometricky, to znamená, že množstvo naviazaného propidium iodidu zodpovedá množstvu DNA prítomnej v bunke. Bunky obsahujúce Propidium jodid po ožiarení laserom emitujú žiarenie, ktorého intenzita je priamo úmerná obsahu DNA v bunkách. Analýzou suspenzie buniek na prietokovom cytometri možno odlíšiť bunky v G0/G1, S a G2/M fáze bunkového cyklu.

4. Upozornenie

- Výrobok je určený len pre výskumné účely.
- Pracujte v ochranných rukaviciach.
- Nepoužívajte reagentie po uplynutí času použiteľnosti.
- Chráňte obsah fľaštičiek pred kontamináciou.
- Nevystavujte reagentiu Propidium Iodide dlhodobému pôsobeniu svetla.
- Prietokový cytometer pravidelne kalibrujte pomocou fluorescenčných guľčiek, aby bola zaistená stabilná citlivosť detektorov.
- Nedodržanie odporúčaného postupu analýzy môže ovplyvniť výsledky testov.

5. Obsah súpravy

- **ED7069-1 RNase A** – 2 vialky, každá obsahuje 1 ml roztoku RNase A. Množstvo reagentie v jednej vialke dosťahuje na vykonanie 50 testov. Roztok je určený pre priame použitie.
- **ED7069-2 Propidium Iodide** – 1 vialka, obsahuje 2 ml roztoku propidium iodidu. Množstvo reagentie dosťahuje

na vykonanie 200 testov. Roztok je určený pre priame použitie.

- **ED7069-3 10x Wash Buffer** – 1 fľaštička, obsahuje 100 ml roztoku. Množstvo reagentie dosťahuje na vykonanie 100 testov. Roztok je určený pre priame použitie.

6. Potrebné vybavenie a materiál, ktorý nie je dodávaný

- Vhodné 5ml skúmavky pre farbenie buniek (napr. 12 × 75 mm)
- 70% ethanol, minimálne p.a. čistoty
- ľadový kúpeľ/nádoba s rozdrveným ľadom
- Sada automatických pipiet s jednorázovými špičkami
- Vortex
- Centrifúga s rotorom pre príslušné skúmavky
- Prietokový cytometer - excitácia modrým laserom 488 nm, emisia žiarenia pri 617 nm (PE)

7. Skladovanie súpravy

Súprava CellCycleFlowEx® Kit sa skladá z dvoch zložiek:

- a) Krabica s 10x Wash Buffer a Propidium Iodide. Krabicu uchovávajte pri teplote **2-8 °C**
- b) Uzatvárateľný sáčok s dvomi mikroskúmavkami obsahujúcimi RNase A. Sáčok s mikroskúmavkami uchovávajte pri teplote **-20 °C**.

Doba použiteľnosti je vyznačená na etiketách jednotlivých reagentií, na sáčku a na krabici súpravy.

8. Postup testu

Príprava reagentií pred testom

1. **10x Wash Buffer** pred použitím nariedte deionizovanou vodou (1 diel 10x Wash Buffer a 9 dielov dH₂O) a nechajte vychladiť na 2-8 °C. Nariadený roztok (1x Wash Buffer) je možné skladovať 6 mesiacov, ak je uchovávaný pri teplote 2-8 °C.
V roztoku 10x Wash Buffer sa môžu počas skladovania vytvoriť kryštály soli, v takom prípade ponechajte fľaštičky pri laboratórnej teplote alebo zahrejte vo vodnom kúpeli na 37 °C a počkajte na rozpustenie kryštálov. Pred použitím obsah fľaštičky premiešajte.
2. Pripravte **Farbiaci roztok PI** (0,5 ml na test) o nasledujúcom zložení:

1x Wash Buffer	1 ml
Propidium iodide	0,02 ml
RNase A	0,02 ml

Roztok je možné skladovať 2 týždne, ak je uchovávaný pri teplote 2-8 °C.
3. Pripravte **70% roztok etanolu** (nie je súčasťou súpravy) v deionizovanej vode a nechajte vychladiť na -15 až -30 °C.

Postup testu

Premytie buniek určených k testovaniu

1. Bunky centrifugujte pri 300 g po dobu 5 minút za laboratórnej teploty. Odstráňte supernatant.

2. Resuspendujte bunky v 1 ml vychladeného 1x Wash Buffer (2-8 °C).
3. Centrifugujte bunky pri 300 g po dobu 5 minút za laboratórnej teploty. Odstráňte supernatant.
4. Resuspendujte bunky vo vychladenom 1x Wash Buffer na koncentráciu 2,5 – 10 x 10⁶ buniek/ml.

Pre jeden test je potrebných minimálne 200 µl bunkovej suspenzie.

Fixácia ethanolom

5. Napipetujte 200 µl bunkovej suspenzie do 5ml skúmavky a umiestite na ľad.
6. Pomaly k bunkám prikvpajte 2 ml 70% ethanolu vychladeného na teplotu -15 až -30 °C a súčasne ustavične premiešavajte obsah skúmavky (napr. na vortexe). Nato ihneď umiestite skúmavku späť na ľad.

V tomto kroku je možné experiment prerušiť. Bunky fixované v ethanole je možno transportovať alebo skladovať chladené po dobu 2 týždňov a potom dokončiť test.

Farbenie DNA

7. Centrifugujte bunky pri 300 g po dobu 5 minút za laboratórnej teploty. Odstráňte supernatant.
8. Resuspendujte bunky v 1 ml vychladeného 1x Wash Buffer.
9. Bunky centrifugujte pri 1400 g po dobu 5 minút za laboratórnej teploty. Odstráňte supernatant.
10. Resuspendujte bunky v 0,5 ml farbivého roztoku PI a nechajte inkubovať 30 minút pri laboratórnej teplote v tme.
11. Vzorky premiešajte na vortexe a analyzujte na prietokovom cytometri behom 4 hodín od ofarbenia.

Bunky vo farbivom roztoku vytvárajú agregáty, ktoré je potrebné pred analýzou v prietokovom cytometri resuspendovať na vortexe.

S časom rastie úroveň označenia DNA propidium jodidom, a preto sa vzorky merané ihneď a vzorky merané s odstupom 4 hodín líšia o približne 10% v intenzite fluorescencie pre G1 populáciu a majú vyšší pomer fluorescencie G2/G1 populácií.

9. Analýza prietokovým cytometrom

Ofarbené vzorky zmerajte na prietokovom cytometri. Namerajte minimálne 20.000 udalostí z každej vzorky. Odporúčame nastaviť nízku rýchlosť akvizície buniek podľa možnosti cytometra. Vyššia rýchlosť akvizície negatívne ovplyvňuje rozlíšenie populácií.

Namerané dáta zobrazte v grafe side-scatter (**SSC**) versus forward-scatter (**FSC**) a ohraničte cieľovú populáciu buniek (gate na obrázku č 1). Zobrazte cieľovú populáciu v grafe PE-

Width (**PE-W**) versus PE-Area (**PE-A**) a orámujte singletové udalosti, čím vylúčíte z ďalšej analýzy zhľuky buniek. Zobrazte singlety v histograme, kde na osi X je fluorescencia v PE kanáli v lineárnej škále (obrázok č 3). Nastavte napätie v kanáli PE tak, aby G1 populácia bola približne v jednej tretine škály osi X. Nastavte rozhranie medzi G0/G1, S a G2 / M fázami bunkového cyklu, ako je znázornené na obrázku č 3, a spočítajte zastúpenie buniek v jednotlivých fázach. Prípadne použite vhodný hodnotiaci software (napr. FlowJo), ktorý dokáže fázy bunkového cyklu analyzovať automaticky.

10. Obmedzenia metódy

1. Prietokový cytometer môže poskytovať nesprávne hodnoty, pokiaľ nie je dobre nastavený a udržiavaný.
2. Dáta môžu byť nesprávne interpretované, pokiaľ sú ohraničenia pre singlety a fázy bunkového cyklu umiestené nesprávne.

11. Example of data analysis / Vzorové vyhodnocení / Vzorové vyhodnotenie

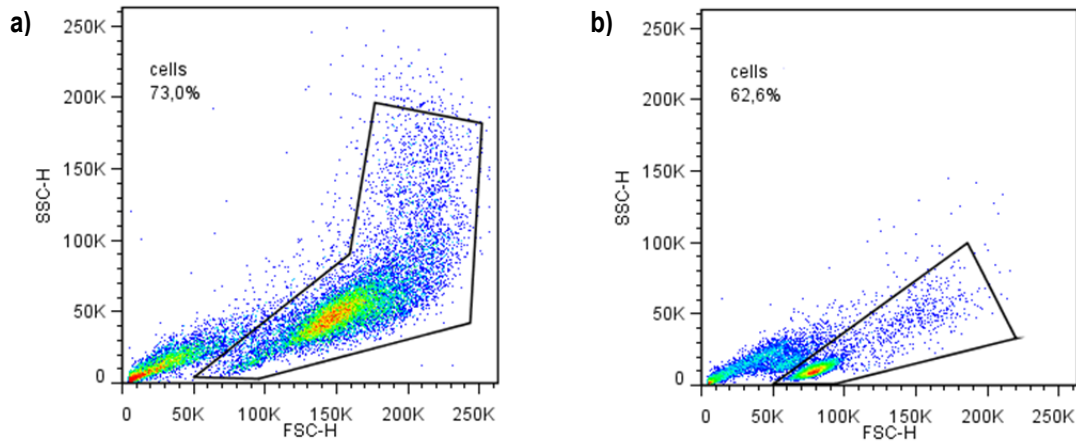


Fig. 1 Delimitation of the target cell population: a) PBMC stimulated with PHA (5 µg/ml) for 3 days and b) unstimulated controls

Obr. 1 Ohraničení cílové populace buněk: a) PBMC stimulované PHA (5 µg/ml) po 3 dny a b) nestimulované kontroly.

Obr. 1 Ohraničenie cieľovej populácie buniek: a) PBMC stimulované PHA (5 µg / ml) po 3 dni a b) nestimulované kontroly.

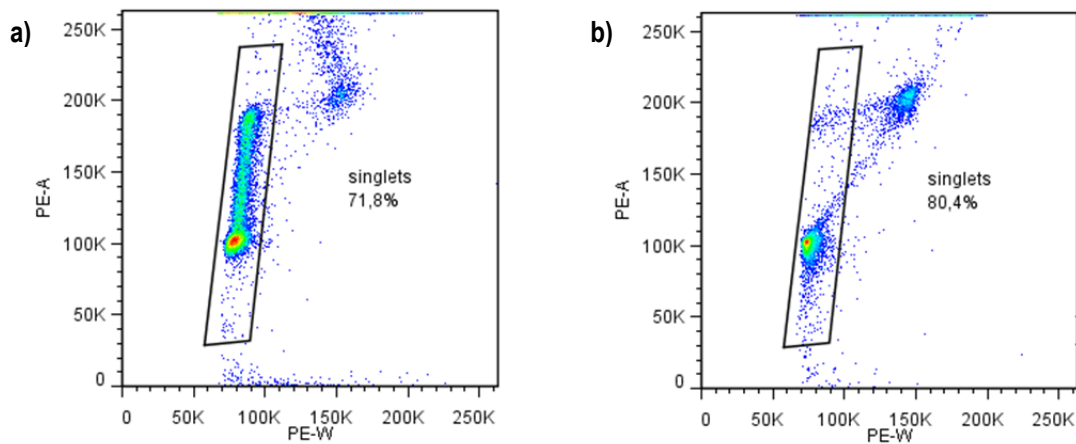


Fig. 2 Delimitation of singlets: a) stimulated PBMCs and b) controls.

Obr. 2 Ohraničení singletů: a) stimulované PBMC a b) kontroly.

Obr. 2 Ohraničenie singletov: a) stimulované PBMC a b) kontroly.

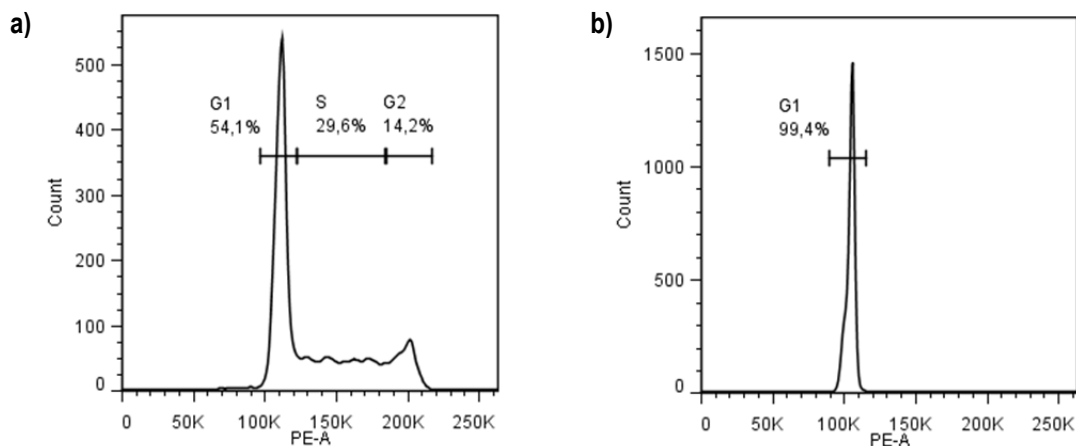


Fig. 3 Distribution of cells according to the DNA content into the G0/G1, S and G2 / M phases of the cell cycle : a) PHA stimulated PBMCs and b) controls.







Obr. 3 Rozdělení buněk podle obsahu DNA do G1/G0, S a G2/M fází buněčného cyklu: a) stimulované PBMC a b) kontroly.

Obr. 3 Rozdelenie buniek podľa obsahu DNA do G1/G0, S a S/G2-M fází bunkového cyklu: a) stimulované PBMC a b) kontroly.

12. References / Literatura / Literatúra

Pozarowski P, Darzynkiewicz Z. Analysis of cell cycle by flow cytometry. *Methods Mol Biol.* 2004;281:301-11.

13. Explanation of symbols / Vysvětlení symbolů / Vysvetlenie symbolov

	Catalog number Katalogové číslo Katalógové číslo
	Manufacturer identification Výrobce Výrobca
	Consult the manual before use Viz návod k použití Vid' návod na použitie
	Store within temperature limits Rozmezí skladovacích teplot Rozmedzie skladovacích teplôt
	Batch code Číslo šarže
	Use by Použitelné do Použitelné do

14. Manufacturer / Výrobce / Výrobca

EXBIO Praha, a.s.
Nad Safinou II 341
252 42 Vestec, Czech Republic
Tel: +420 261 090 666
Fax: +420 261 090 660
E-mail: orders@exbio.cz
<http://www.exbio.cz>