

Applikation Durchflusszytometrie

Leben-Tot-Diskriminierung

Tote Zellen, insbesondere apoptotische Zellen, verändern ihre Größe und somit ihre Autofluoreszenz. Sie neigen ebenfalls dazu, diverse Reagenzien unspezifisch zu binden, sodass es in der durchflusszytometrischen Analyse zu falsch-positiven Ergebnissen kommt.

Um korrekte Ergebnisse zu produzieren, müssen tote Zellen in der zu untersuchenden Probe identifiziert und anschließend ausgeschlossen werden.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, tote von den lebenden Zellen zu diskriminieren. Die Wirkung kommerzieller Farbstoffe bzw. Reagenzien basiert auf der Desintegration der Zellmembran toter Zellen. Zellen, die einen entsprechenden Farbstoff ausschließen, gelten als lebend, wohingegen Zellen, die den Farbstoff aufnehmen, als tot erachtet werden. Hierbei wird weiterhin unterschieden zwischen Farbstoffen, die an Nukleinsäuren binden oder Farbstoffe, die an intrazelluläre Proteine binden, wobei nach Bindung die Fluoreszenzintensität um das bis zu 50-fache steigen kann.

Nachfolgend werden gängige Methoden der Lebend-Tot-Diskriminierung und ihre spezifischen Applikationen und Anforderungen an die Probe aufgeführt. (KEINE Garantie auf Vollständigkeit)

Propidium Iodid (PI)

Eigenschaften

- Dringt in Zellen mit kompromittierter Zellmembran ein, d.h. tote Zellen werden gefärbt.
- Anregung 535 nm (blauer Laser 488 nm), Emission 617 nm (610 LP).
- DNA interkalierend, impermeant.

Verwendung

- Apoptose
- Zellzyklus
- Zellviabilität

Protokoll

- 5-10 μL pro 1×10^6 Zellen/100 μL Puffer
- Gut resuspendieren
- 1-5 min im Dunkeln bei 4° C inkubieren
- Direkt messen am Durchflusszytometer

Hinweis

Die zu verwendende Konzentration an PI bitte den Angaben des Hersteller entnehmen und das entsprechende Protokoll beachten!

7-Aminoactinomycin (7-AAD)

Eigenschaften

- Dringt in Zellen mit kompromittierter Zellmembran ein, d.h. tote Zellen werden gefärbt.
- Anregung 546 nm (blauer Laser 488 nm), Emission 647 nm (630 LP).
- DNA interkalierend, semi-permeant.

Verwendung

- Apoptose
- Zellzyklus
- Zellviabilität

Protokoll

- 1×10^6 Zellen/mL Puffer
- Gut resuspendieren
- 5-10 min im Dunkeln bei 4° C inkubieren
- Direkt messen am Durchflusszytometer

Hinweis

Die zu verwendende Konzentration an 7-AAD bitte den Angaben des Hersteller entnehmen und das entsprechende Protokoll beachten!

4',6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI)

Eigenschaften

- Dringt in alle Zellen, aber für lebende Zellen ist eine höhere Konzentration notwendig!
- Bindet an dsDNA und RNA, impermeant.
- Anregung 358 nm (violetter Laser 405 nm), Emission 461 nm (450/40 BP).

Verwendung

- Zellzyklus
- Zellviabilität

Protokoll

- 3 μ M in 1×10^6 Zellen/mL Puffer
- Gut resuspendieren
- 15 min im Dunkeln bei RT inkubieren
- Direkt messen am Durchflusszytometer

Hinweis

Die zu verwendende Konzentration an DAPI bitte den Angaben des Hersteller entnehmen und das entsprechende Protokoll beachten! DAPI eignet sich besser bei PFA-oder EtOH-fixierten Zellen.

Hoechst33342

Eigenschaften

- Dringt in lebende Zellen, d.h. tote Zellen sind negativ.
- Interkalierend, permeant.
- Anregung 350 nm (violetter Laser 405 nm), Emission 461 nm (450/40 BP).

Verwendung

- Zellzyklus
- Zellviabilität

Protokoll

- Kann in Medium verdünnt direkt auf die Probe gegeben werden
- 30-60 min bei 37° C im Dunkeln inkubieren
- Waschen und Pellet in Puffer aufnehmen
- Am Durchflusszytometer messen

- **Hinweis**

Die zu verwendende Konzentration an Hoechst33342 bitte den Angaben des Hersteller entnehmen und das entsprechende Protokoll beachten!

Sytox™ Dead Cell Stain (Thermo Fisher Scientific)

Eigenschaften

- Dringt in Zellen mit kompromittierter Membran, d.h. tote Zellen erscheinen positiv.
- DNA-interkalierend.
- Mehrere Farbstoffe verfügbar.

Verwendung

- Zellviabilität

Protokoll

- 30nM auf 1×10^5 – 5×10^7 Zellen/mL
- Gut resuspendieren
- 20 min im Dunkeln bei RT oder 4-6° C inkubieren
- Direkt messen am Durchflusszytometer ohne Waschen oder Fixieren

Zombie Fixable Viability Dyes (BioLegend)

Eigenschaften

- Fixierbar, Amin-reaktiv
- Dringt in Zellen mit kompromittierter Membran und bindet an primäre Amine von Proteinen
- Mehrere Farbstoffe verfügbar

Verwendung

- Zellviabilität

Protokoll

- 1×10^6 Zellen pro 100 µL verdünnter Zombie Dye Lösung
- Gut resuspendieren
- 15 min im Dunkeln bei RT inkubieren
- Ggf. anschließende Fixierung/Permeabilisierung

Hinweis

Bitte die Herstellerangaben und das angegebene Protokoll befolgen.

Fixable Dead Cell Staines (Thermo Fisher Scientific od. BD Biosciences)

Eigenschaften

- Fixierbar (Applikation VOR Fixierung).
- Semi-permeant: Tote Zellen nehmen den Farbstoff auf (starke Fluoreszenzintensität) und lebende Zellen binden ihn an der Oberfläche (schwache Fluoreszenzintensität).
- Amin-reaktiv, bindet kovalent an primäre Amine von extra- und intrazellulären Proteinen.
- Anregung abhängig vom gewählten Farbstoff.

Verwendung

- Zellviabilität

Protokoll

- 1-10x10⁶ Zellen/mL
- Waschen, fixieren, waschen, evtl. färben
- Am Durchflusszytometer messen

Hinweis

Bitte die Angaben des Herstellers beachten beachten!

LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit (Thermo Fisher Scientific)

Eigenschaften

- Zwei-Farben-basiert
 - Esterase-Aktivität über die enzymatische Umwandlung von nicht-fluoreszierendem permeantem Calcein AM in grün fluoreszierendes Produkt
 - EthD-1 dringt in Zellen mit kompromittierter Zellmembran ein, d.h. tote Zellen werden gefärbt
- Ex/Em Calcein 495 nm/ 515 nm, Ex/Em EthD-1 495 nm/635 nm

Verwendung

- Zellviabilität
- Zytotoxizität

Protokoll

- 0,1-5x10⁶ Zellen/mL
- Bei RT oder auf Eis 30 min im Dunkeln inkubieren
- Waschen, fixieren, waschen
- Am Durchflusszytometer messen

Hinweis

Die zu verwendende Konzentration der beiden Komponenten bitte den Angaben von Thermo Fisher Scientific entnehmen und das entsprechende Protokoll beachten!