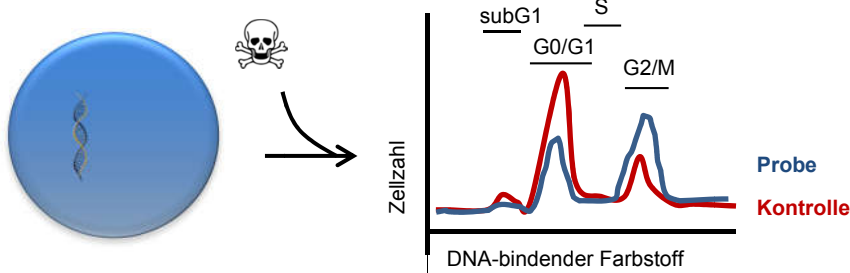


Applikation Durchflusszytometrie Zellzyklus

Die Analyse des Zellzyklus gibt Aufschlüsse über zelluläre Dysfunktionen, die durch Mutationen oder durch äußere Stimulationen (Toxikologie, Pharmakologie) induziert werden können. Der Zellzyklus besteht aus zwei Hauptphasen, erstens der Mitose, bei der sich die Mutterzelle in zwei genetisch identische Tochterzellen teilt und zweitens die Interphase. Die Interphase ihrerseits ist in die G0/G1-, die S- und die G2-Phase unterteilt, in denen die Zelle wächst, ihre DNA synthetisiert und repliziert, um dann in der sich anschließenden Mitose-Phase auf zwei Zellen aufgeteilt zu werden. In der Durchflusszytometrie gibt es zahlreiche Farbstoffe, mit deren Hilfe DNA-Gehalt, Proliferationsrate und der Gehalt neu-synthetisierter DNA bestimmt werden können.

Experimentell werden die Zellen ggf. mit Antikörpern gegen Oberflächenmoleküle gefärbt, ggf. stimuliert, fixiert, permeabilisiert und mit dem jeweiligen Nukleinsäure-bindenden Farbstoff inkubiert.



Im Durchflusszytometer lässt sich ein charakteristisches Histogramm darstellen, aus dem sich der Anteil der Zellen in den entsprechenden Phasen des Zellzyklus ermitteln lässt.

Nachfolgend sind einige Farbstoffe und deren Eigenschaften gelistet, jedoch nur ausgewiesene genauer erläutert. Bitte unbedingt die Herstellerangaben zur Konzentration und zum Protokoll beachten.

Farbstoff	Markierung	Anregung/Emission	Beschreibung
PI	tote Zellen	535 nm/ 617 nm	s.u.
7-AAD	tote Zellen	546 nm/ 647 nm	s.u.
DAPI	tote Zellen	358 nm/ 461 nm	s.u.
Hoechst33342	lebende Zellen	360 nm / 600 nm	s.u.
Hoechst33258	lebende Zellen	350 nm / 461 nm	-
Hoechst S769121	lebende Zellen	355 nm/ 495 nm	-
TO-PRO-3	tote Zellen	642 nm/ 661 nm	-
DRAQ™5	alle Zellen	646 nm/ 681 nm	-
DRAQ™7	tote Zellen	599 nm/ 678	-

Fixierung und Permeabilisierung mit 70% Ethanol

Eigenschaften

- EtOH zerstört Wasserstoffbrückenbindungen und entfernt die Hydrathülle von Proteinen, das Zellwasser wird ersetzt, Proteine können koagulieren
- Löst Phospholipide aus der Zellmembran
- Zellmembran wird permeabel für DNA-bindenden Farbstoff

Protokoll

- 1×10^6 Zellen in Protein- und $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS aufnehmen
- Bei 350 g für 5 min zentrifugieren
- Zellen mit eiskaltem 70% EtOH fixieren

Achtung: EtOH tropfenweise dazu geben, während die Zellen gevortext werden

- 30-60 min bei 4° C inkubieren
- 2x mit hohem Volumen an PBS (Ca-, Mg-frei!) waschen (Zentrifugation 5min bei 850-1000 g)

Achtung: Zellen in EtOH sind schwer zu pelletieren. Daher gut mit PBS verdünnen.

Nukleinsäure-bindende Farbstoffe

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
- Färbt auch dsRNA, daher Probe mit RNase behandeln

Protokoll

- Zellen mit RNase und PI für 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubieren
- Direkt messen

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

Protokoll

- Zellen mit 7-AAD für 5-10 min im Dunkeln bei 4° C oder auf Eis inkubieren
- Direkt messen

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)

Protokoll

- EtOH-fixierte Zellen mit DAPI bei 4°C oder auf Eis inkubieren
- Direkt messen

Hinweis

- Funktioniert auch bei PFA-fixierten Zellen

Hoechst33342

Eigenschaften

- Dringt in lebende Zellen, d.h. tote Zellen sind negativ
- Bindet an AT-reiche Regionen von dsDNA, permeant
- Anregung 350 nm (violetter Laser 405 nm), Emission 461 nm (450/40 BP)

Protokoll

- Kann in Medium verdünnt direkt auf die Probe gegeben werden
- 30-60 min bei 37° C im Dunkeln inkubieren
- Zellen ernten und direkt messen

Achtung

- Bei phenol-haltigem Medium Zellen ernten, waschen, Pellet in Färbepuffer aufnehmen und messen

Hinweis

Hoechst NICHT in PBS lösen, sondern in Wasser.

Hinweise für die Messung am Durchflusszytometer

- Unbedingt Dublettenausschluss durchführen, um falschpositive Zellen in G2-Phase auszuschließen: FSC-H vs. FSC-W/A und/ oder SSC-H vs. SSC-W/A
- Im linearen Modus messen!
- Um akkurate Ergebnisse und schmale Peaks zu erhalten, Flussrate so wählen, dass mit max. 400 Events/s gemessen wird.