

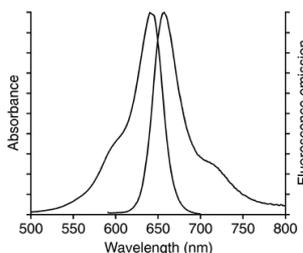


ANWENDUNG

AUSSCHLUSS TOTER ZELLEN MIT CYANIN-FARB-STOFFEN

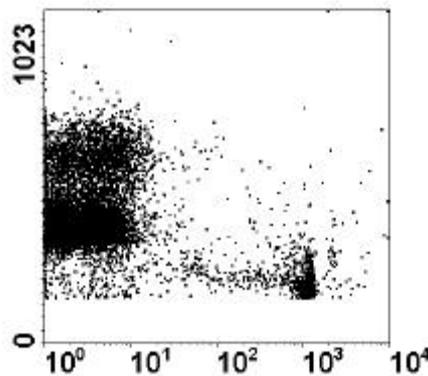
Muß man ältere Proben analysieren oder geht es um die Oberflächentypisierung von Gewebsbiopsien kann der Anteil toter Zellen durchaus einmal 80% oder mehr erreichen und die Analyse beträchtlich stören. Ein Ausschluß toter Zellen wird dann zwingend. Viele Labors verwenden Propidiumiodid (PI) um diese Zellen auszuschließen. Der Farbstoff hat 2 Nachteile: 1. braucht er den PE- oder PerCP-Kanal und 2. ist die Substanz mutagen. Als Alternative bieten sich die Cyanin-Farbstoffe der xO-PRO-Reihe an, von denen ich YO-PRO-1 und TO-PRO-3 am FACSCalibur ausprobiert habe.

TO-PRO-3



Besonders attraktiv ist die

Verwendung von TO-PRO-3 am 4-Farb Calibur, da es durch den 2. Laser angeregt wird und in FL4 gemessen werden kann (Anregungs- und Emissionsmaxima bei 642 und 661nm). Man hat damit immer noch die drei "üblichen" Kanäle frei. Die Kompensation ist nicht besonders problematisch, da ja die positiven (= toten) Zellen ohnehin ausgeschlossen werden. Wir haben TO-PRO-3 in einer Konzentration von etwa 0.01- 0.03 µmol/l verwendet (Endkonzentration in der analysierten PBS-Azid-Suspension, Analyse nach einer Inkubation von 10 Minu-



Dot-Plot FL4/TO-PRO-3 (x) gegen FSC (y). Die toten Zellen sind TO-PRO-3-positiv. Der FSC allein trennt die toten Zellen nur unvollständig.

ten bei RT). Da dies nicht in der Sättigung ist, sollte man diese Konzentration möglichst konstant halten. Eine Negativkontrolle braucht man eigentlich nicht, da die toten Zellen im FL4-FSC Diagramm meist eine gut abgrenzbare Population bilden. Ob die schwach Farbstoff-positiven Zellen apoptotische Zellen sind, wie eine Publikation behauptet (J.Immunol. Meth. 185:249-258, 1995),

NACHWEIS TOTER ZELLEN

Zur Markierung toter Zellen kann man Farbstoffe verwenden, die die intakte Membran einer lebenden Zelle nicht durchdringen können. Man setzt diese Farbstoffe meist unmittelbar vor der Analyse zu, inkubiert meist bei RT und analysiert danach *ohne* vorhergehendes Waschen. Man kann dies nach einer Ficoll-Trennung und/oder Antikörperfärbung und/oder Erythrozytenlyse tun. Sind die Zellen tot, kann der Farbstoff eindringen und mit der DNA einen fluoreszierenden Komplex bilden.

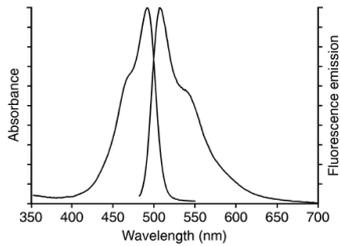
Diese Methode ist nur nach einer nicht-fixierenden Aufbereitung der Zellen anwendbar (Ficoll, Ammoniumchloridlyse, Ortho-Lyse) nicht aber nach fixierender Aufbereitung (Optilyse, FACSlyse, cytoplasmatische Färbungen), denn dabei werden alle Zellen mehr oder weniger durchlöchert.

ist m.E. noch nicht gut abgesichert.

YO-PRO-1

YO-PRO-1 kann man im FITC Kanal messen (Anregungs- und Emissionsmaxima bei 491 und 509nm). Damit verliert man den Kanal, für den die meisten konjugierten Antikörper erhältlich sind. Damit ist YO-

PRO-1 vielleicht etwas weniger attraktiv. Dafür kann man es auch auf 3-Farb Ge-



räten einsetzen und hat immer noch den Vorteil der geringen Mutagenität der Substanz. Auch hier wird die verwendbare Endkonzentration in der Suspension um 0.015µmol/l liegen (diese Konzentrationen sollen ein Anhaltspunkt sein. Die idealen Konzentrationen und Settings für die jeweilige Anwendung muß man natürlich ermitteln).

Hersteller

Die Substanzen kommen von Molecular Probes und werden als 1 millimolare Lösung in DMSO geliefert. Bis zum Erreichen der Arbeitskon-

zentration muß also hoch verdünnt werden, was wir in PBS-Azid tun. Die Restmenge DMSO scheint die Analyse nicht zu beeinflussen.

DNA-Analyse

Eine Gruppe hat TO-PRO-3 (in höherer Konzentration) zur DNA Analyse eingesetzt. Soll etwas höhere CVs liefern als mit PI. In meinen Händen waren diese CVs aber inakzeptabel hoch (bis zu 15%!) so daß ich das dann aufgegeben habe. Wenn jemand erfolgreich DNA mit TO-PRO-3 analysiert, würde es mich sehr freuen, von ihm zu hören. Eigentlich würde ich gerne von jedem hören, der das überhaupt ausprobieren hat, ob erfolgreich oder nicht. **W**

LAGERUNG

Originallösung aliquotieren und Aliquote bei -20°C lagern
In PBS verdünnte Lösung sicher 4 Wochen bei 4°C haltbar.

Beispiele für Settings (2 verschiedene FACS-Caliburs)

	YO-PRO-1	YO-PRO-1	TO-PRO-3
FL1	619	715	715
FL2	633	550	550
FL3	695	664	664
FL4			966
FL1-2	0.5	0.5	0.5
FL2-1	61.6	39.5	56.1
FL2-3	0.0	0.0	0.0
FL3-2	17.0	10.2	15.3
FL3-4			19.9
FL4-3			9.0