

Durchflusszytometrische Messungen von Pflanzenzellkulturen

Prinzip:

Die Durchflusszytometrie ist eine Hochdurchsatzanalyse zur Detektion molekularer und physikalischer Eigenschaften von Partikeln (u.a. Zellen), welche in einem Flüssigkeitsstrom vereinzelt und hydrodynamisch fokussiert einen Laserstrahl passieren.

In Abhängigkeit ihrer morphologischen Eigenschaften (Größe, Form, Granularität) verursachen die Partikel (u.a. Zellen) charakteristische Streulicht- sowie, nach spezifischer Fluorochrommarkierung, Fluoreszenzsignale, welche detektiert und rechnergestützt ausgewertet werden.



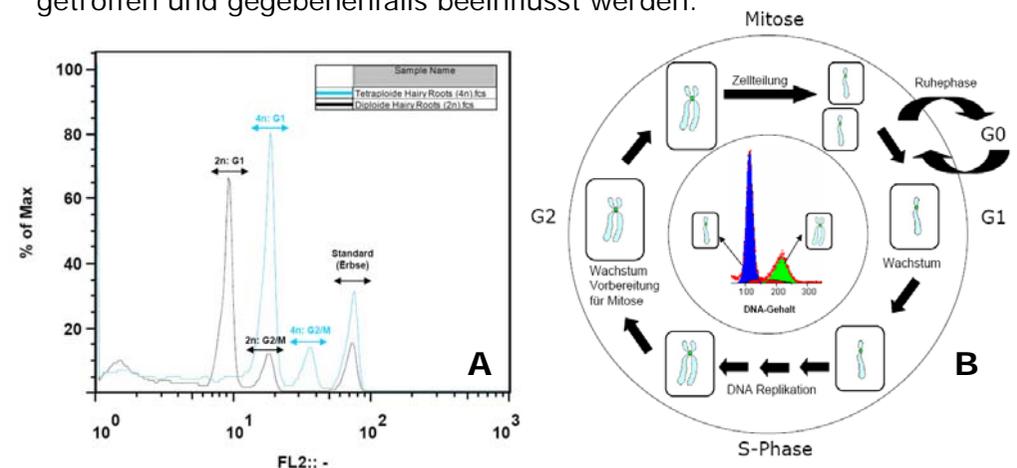
Durchflusszytometer CyFlow® SL der Firma Partec

Diese Methode wird für folgende Untersuchungen angewendet:

- Erfolgskontrolle der gezielten Polyploidisierung (Erhöhung der Chromosomensätze) von Hairy root Kulturen
- Ploidieüberwachung von Kallus Kulturen aufgrund der genetischen Instabilität durch den Einsatz von Phytohormonen
- Zellzyklusanalysen (ein- und zweiparametrische) zur Untersuchung des Proliferationsverhaltens der Zellkulturen

Zellzyklusanalyse:

Bei der Zellzyklusanalyse erfolgt das Anfärben der zellulären DNA mit einem DNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff. Die DNA-Menge der Einzelzelle ist dabei der Stärke des Fluoreszenzsignals proportional. Zellen mit einfachem Chromosomensatz (G1-Phase, blau) befinden sich in der Phase des Zellwachstums, Zellen mit doppeltem Chromosomensatz (G2/M-Phase, grün) in der Phase der Kern- und Zellteilung. Der Bereich dazwischen (S-Phase, rot) repräsentiert die Zellen in der Phase der DNA-Replikation. Mit Hilfe weiterer Parameter können Zellpopulationen, die aktiv den Zellzyklus durchlaufen, von nicht-proliferierenden Zellpopulationen (z.B. in der G₀-Phase) unterschieden werden. So können Aussagen über die Heterogenitäten innerhalb von Suspensionskulturen getroffen und gegebenenfalls beeinflusst werden.



Durchflusszytometrische Messungen: (A) Vergleich des Fluoreszenzsignals in Abhängigkeit des Ploidiegrades (Anzahl der Chromosomensätze) von *S. officinalis* Hairy root Suspensionskulturen (DNA Färbung mit Propidiumiodid), (B) Zellzyklusanalyse einer *Helianthus annuus* Suspensionskultur