

Analisi del ciclo cellulare

DAPI

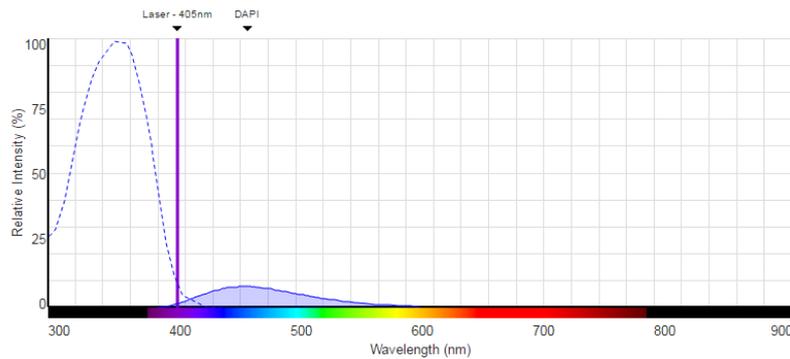
Eccitazione/Emissione:

Ex. (in teoria 350) 405nm

Em. 461nm

DAPI si lega alle regioni del DNA ricche di A-T emettendo a 461nm.

In teoria lega blandamente anche l'RNA ma in questo caso l'emissione ha uno shift intorno ai 500nm.



Reagenti:

- *EtOH 80%* (conservare a -20°C)
- *Triton X-100* soluzione stock 1%
- *DAPI* soluzione stock 1 mg/ml in acqua (conservare a -20°C)

Preparazione della soluzione DAPI/TX-100:

- **9ml** di PBS
- **1 ml** di *Triton X-100* (x ottenere una diluizione finale 0.1%)
- **10 ul** di DAPI (x ottenere una diluizione finale 1ug/ml)

NB: Preparare la soluzione fresca ogni volta.

Protocollo:

- Mantenere le cellule in ghiaccio prima della fissazione.
- Disporre 2×10^6 cellule in un tubo da FACS.
- Lavare le cellule 2 volte con PBS a 4°C.
- Eliminare il sovrnatante del lavaggio e risospendere bene il pellet prima di aggiungere l'etanolo.
- Risospendere le cellule in 1 ml di EtOH 80% gelato vortexando.
- Incubare in ghiaccio per 30'. (*le cellule possono essere conservate a 4°C in EtOH anche per una settimana*).
- Centrifugare a circa 2000rpm per 5' ed eliminare il sovrnatante
- Lavare le cellule 2 volte con PBS a 4°C.
- Risospendere le cellule in 1 ml di soluzione DAPI/TX-100 e incubare 30' a T_{amb} .
- Subito prima dell'analisi filtrare il campione per eliminare gli aggregati.



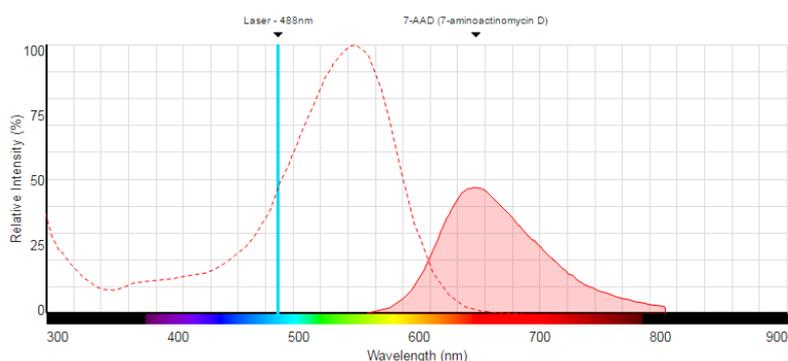
7AAD

Eccitazione/Emissione:

Ex. 488nm (picco massimo a 546nm)

Em. 647nm

7AAD è un intercalante forte del DNA si lega alle regioni del DNA ricche di G-C emettendo a 461nm.



Reagenti:

- EtOH 70% (conservare a -20°C)
- 7AAD

Protocollo:

- Mantenere le cellule in ghiaccio prima della fissazione.
- Disporre 2×10^6 cellule in un tubo da FACS.
- Lavare le cellule 2 volte con PBS a 4°C.
- Eliminare il sovrantante del lavaggio e risospendere bene il pellet prima di aggiungere l'etanolo.
- Risospendere le cellule in 1 ml di EtOH 70% gelato vortexando.
- Incubare in ghiaccio per 30'. (le cellule possono essere conservate a 4°C in EtOH anche per una settimana).
- Centrifugare a circa 2000rpm per 5' ed eliminare il sovrantante
- Lavare le cellule 2 volte con PBS a 4°C.
- Risospendere le cellule in circa 300ml di PBS e aggiungere la 7AAD ad una concentrazione finale di 25ug/ml
- Subito prima dell'analisi filtrare il campione per eliminare gli aggregati.



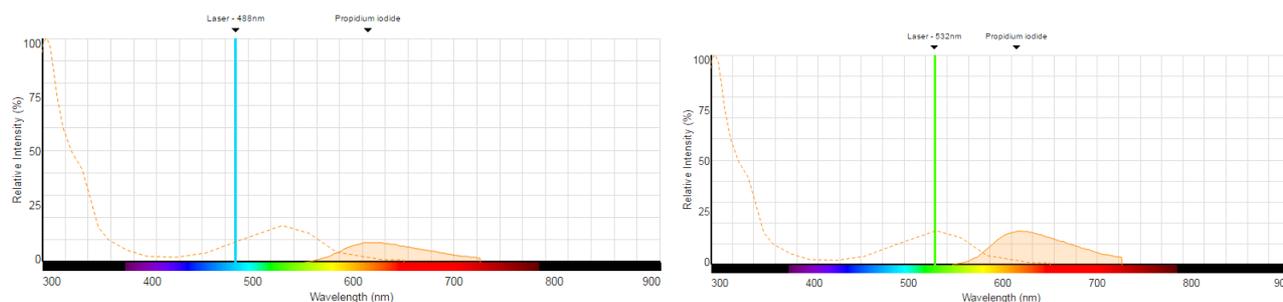
Propidium Iodide (PI)

Eccitazione/Emissione:

Ex. 488nm (picco massimo a 532nm)

Em. 617nm

PI si intercala stechiometricamente (1 molecola ogni 4-5 paia di basi) nella doppia elica sia del DNA che dell'RNA.



Reagenti:

- EtOH 70% (conservare a -20°C)
- RNase
- PI
- Buffer citrato

Protocollo:

- Mantenere le cellule in ghiaccio prima della fissazione.
- Disporre 2×10^6 cellule in un tubo da FACS.
- Lavare le cellule 2 volte con PBS a 4°C, eliminare il sovrnatante e risospendere bene il pellet.
- Risospendere le cellule in 1 ml di EtOH 70% gelato vortexando.
- Incubare in ghiaccio per 30'. (le cellule possono essere conservate a 4°C in EtOH anche per una settimana).
- Centrifugare a circa 2000rpm ed eliminare il sovrnatante
- Lavare le cellule 2 volte con PBS a 4°C.
- Risospendere le cellule aggiungere ioduro di propidio (20µg/mL) e RNase (100µg/mL) in una soluzione di citrato (citrato buffer) e incubare 30' a T_{amb}.
- Subito prima dell'analisi filtrare il campione per eliminare gli aggregati.



Altri staining per analisi citometrica del ciclo cellulare

	DRAQ5™	FxCycle™ Violet	FxCycle™ Far Red	SYTOX® AADvanced™
Basis of assay	Utilize fluorescent dyes to distinguish cells in G0/G1 phase versus S phase, G2, or polyploidy			
Readout	DNA content analysis using a cell permeable dye, which after binding double-stranded DNA when cells are alive, emits a fluorescent signal that is proportional to the DNA mass even after fixation.			
Excitation	488-647	405	633	488 or 532
Emission	679	358/461	660/20	695/40
RNase required	No	No	No	SI
Live/Fixed	Live	Fixed	Fixed	Fixed

