
TINCIÓ AMB HOECHST 33342 PER A L'ESTUDI DE LA QUANTITAT d'ADN MITJANÇANT CITOMETRIA DE FLUX

La tinció d'ADN amb Hoechst 33342 té el gran avantatge de no necessitar condicionament de les cèl·lules (permeabilització) previ al marcatge.

La característica principal del Hoechst és la seva permeabilitat i afinitat per unir-se a AT (Adenina-Timina) selectivament, de manera que aquest marcatge es realitza directament sobre l'ADN de les cèl·lules en qüestió. El Hoechst 33342 s'excita a 343 nm (llum ultraviolada) i emet a 483 nm.

MÈTODE A

1. Afegir 10 µL de solució de treball de Hoechst 33342 (100X) per cada mL de medi de cultiu als flascons o plaques on creixen les cèl·lules (concentració final de 5 µg/mL \equiv 8 µM).
2. Mantenir 60 minuts es les condicions estàndards de cultiu.
3. Tripsinitzar les cèl·lules, rentar-les dues vegades amb PBS i resuspendre 1×10^6 cèl·lules en 1 mL medi complet o PBS (concentració 1×10^6 cèl·lules/mL) en un tub de citometria.

MÈTODE B

1. Tripsinitzar les cèl·lules, rentar-les dues vegades amb PBS i resuspendre 1×10^6 cèl·lules en 1 mL medi complet (concentració 1×10^6 cèl·lules/mL) en un tub de citometria.
2. Afegir 10 µL de solució de treball de Hoechst 33342 (100X) (concentració final de 5 µg/mL \equiv 8 µM).
3. Incubar durant 30 minuts en un bany a 37° C, tapat amb paper d'alumini.

Reactius

Hoechst 33342: Trihydrochloride, trihydrate
Molecular Probes (H-1399)
Pes molecular 615.99

Solució stock de Hoechst 33342

Preparar una solució 10 mg/mL de Hoechst 33342 amb H₂O destil·lada, corresponent a una solució 2000X.
(Solució stock estable a 4° C).

Solució de treball de Hoechst 33342 100X

Diluirem la solució stock (1/20) amb H₂O destil·lada.
(Solució estable a 4° C).