
TINCIÓ AMB IODUR DE PROPIDI PER A L'ESTUDI DE LA QUANTITAT D'ADN MITJANÇANT CITOMETRIA DE FLUX

La tinció d'ADN amb iodur de Propidi requereix condicionament de les cèl·lules (permeabilització) previ al marcatge ja que no és permeable.

El iodur de propidi s'uneix tant a ADN com a ARN, de manera que haurem de tractar les cèl·lules amb Ribonucleasa A. El iodur de Propidi s'excita a 536 nm (llum visible) i emet a 617 nm.

1. Permeabilització

1. Tripsinitzar les cèl·lules, rentar-les dues vegades amb PBS i resuspendre-les en 0.9 mL de PBS-EDTA (1×10^6 cèl·lules) en un tub de citometria.
2. Permeabilitzar-les afegint 2.1 mL d'etanol (100%) (a -20°), gota a gota mentre la suspensió cel·lular s'agita suaument en un vòrtex. (concentració final d'etanol 70%).
3. Mantenir les cèl·lules fixades 30 minuts a -20°C .

Nota: Les cèl·lules així permeabilitzades poden guardar-se a 4°C varies setmanes.

2. Tinció

1. Centrifugar les cèl·lules permeabilitzades (fer un pols a màxima velocitat) fent dos rentats amb PBS per eliminar l'etanol.
2. Resuspendre les cèl·lules en 1 mL de Solució d'Anàlisi acabada de preparar.
3. Incubar els tubs 37°C durant 30 minuts o bé a 4°C tota la nit.
4. Adquirir i analitzar per citometria de flux.

Reactius

Iodur de Propidi:	Molecular Probes (P-1304) Pes molecular 668.4
Ribonucleasa A:	(Sigma R-5503)
PBS-EDTA:	Solució de PBS amb EDTA 5 mM.
Solució A:	Citrat sòdic 38 mM Iodur de propidi 500 µg/mL (Solució stock estable a 4°C , en H_2O) (Aquesta solució es pot fer alternativament amb Bromur d'etidi)
Solució B:	Ribonucleasa A (Sigma R-5503) 10 mg/mL (Solució stock aliquidada estable a -20°C , en PBS)
Solució d'anàlisi:	Per cada mL de solució d'anàlisi: 940 µL de PBS 30 µL de solució A 30 µL de solució B (Aquesta solució s'ha de preparar just abans d'utilitzar-la).
