

Färbung von Zellen mit Hoechst-Farbstoffen

Hoechst (Bisbenzimid, HOE) ist eine Familie von zellpermeablen fluoreszierenden Farbstoffen, die stark an adeninthymineiche Regionen in der kleinen Furche der doppelsträngigen DNA binden. Obwohl Hoechst-Farbstoffe an alle Nukleinsäuren binden können, wird ihre Fluoreszenz durch AT-reiche dsDNA-Stränge erheblich verstärkt. Hoechst-Farbstoffe werden ausgiebig in der Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie verwendet, um Chromosomen und Zellkerne in lebenden und fixierten Zellen zu färben. Sie werden auch häufig verwendet, um kondensierte, pyknomorphe Zellkerne in apoptotischen Zellen zu unterscheiden und Zellen zu sortieren.

Die Hoechst-Familie enthält mehrere Farbstoffe — Hoechst 33342, Hoechst 33258, Hoechst 34580 und Hoechst S769121 (Nuclear Yellow). Die ersten drei Mitglieder sind blau-emittierende Farbstoffe, deren spektrale Eigenschaften leicht unterschiedlich sind. Die Anregungs-/Emissionsspektren der Hoechst-Farbstoffe sind in der Tabelle angegeben.

Spektrale Eigenschaften der Hoechst-Farbstoffe (im Komplex mit DNA)*

	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum
Hoechst 33342	351 nm	461 nm**
Hoechst 33258	351 nm	463 nm**
Hoechst 34580	380 nm	438 nm**
Hoechst S769121 (Nuclear Yellow)	360 nm	505 nm

*Die Fluoreszenzintensität der Hoechst-Farbstoffe nimmt mit dem pH-Wert des Lösungsmittels zu.

**Die ungebundenen Hoechst-Farbstoffe 33342, 33258 und 34580 fluoreszieren im Bereich von 510–540 nm. Die grüne Fluoreszenz des ungebundenen Farbstoffs kann beobachtet werden, wenn eine übermäßige Farbstoffkonzentration verwendet wird oder die Probe unzureichend ausgewaschen wurde.

Bevor Sie beginnen

- Hoechst-Farbstoffe werden durch Bromodesoxyuridin (BrdU) abgeschwächt. Wenn BrdU in die DNA eingebaut wird, soll das Brom die kleine Furche so verformen, dass Hoechst-Farbstoffe ihre optimale Bindungsstelle nicht erreichen können.
- Die üblicherweise verwendete Farbstoffkonzentration zur Färbung von Bakterien oder eukaryotischen Zellen beträgt 0,1–10 µg/mL. Die Arbeitsverdünnung der Hoechst-Farbstoffe hängt vom Zelltyp und der Zelldichte ab und sollte experimentell bestimmt werden.
- Die optimale Zelldichte und Färbungsdauer für die DNA-Gehalt-Analyse kann je nach Zelltyp variieren. Das Färbeprotokoll sollte in Vorversuchen optimiert werden, um die besten Ergebnisse zu erzielen.

Zubereitung der Stammlösung

1. Lösen Sie 10 mg Hoechst-Farbstoff in 1 mL destilliertem Wasser auf, um eine Stammlösung von 10 mg/mL zu erhalten.
2. Gut mischen, bis der Farbstoff vollständig gelöst ist.
3. Lagern Sie die Stammlösung in kleinen Aliquots bei -20 °C oder -80 °C, geschützt vor Licht. Vermeiden Sie wiederholte Gefrier-Auftau-Zyklen.

Zellfärbung

Färbung lebender Zellen zur Visualisierung von Zellkernen

1. Züchten Sie die Zellen auf einem sterilen Deckglas. Adhärenente Zellen können direkt auf dem Deckglas gefärbt werden.
2. Verdünnen Sie die Hoechst-Stammlösung unmittelbar vor Gebrauch auf 1-5 µg/mL im entsprechenden Medium.
3. Fügen Sie die Hoechst-Lösung zu jeder Probe hinzu und inkubieren Sie sie bei 37 °C für 30-60 Minuten.
4. Entfernen Sie die Färbelösung und waschen Sie die Zellen zweimal mit 1× PBS.
5. *(Optional)* Gefärbte Zellen können in 4% Formaldehyd für 2 Minuten bei 4 °C fixiert werden. Fixierte Zellen zweimal mit PBS waschen.
6. Für die Fluoreszenzmikroskopie montieren Sie die Zellen unter einem Deckglas mit einem [Einbettmedium](#).

(Optional) Zellen können auch ohne Waschen analysiert werden, aber dies kann den Hintergrund durch ungebundenen Farbstoff erhöhen.

Färbung fixierter Zellen zur Visualisierung von Zellkernen

1. Züchten Sie die Zellen auf einem sterilen Deckglas. Adhärenente Zellen können direkt auf dem Deckglas gefärbt werden.
2. Fixieren und permeabilisieren Sie die Zellen nach Bedarf.
3. Verdünnen Sie die Hoechst-Stammlösung unmittelbar vor Gebrauch auf 0,5-2 µg/mL in 1× PBS.
4. Fügen Sie die Hoechst-Färbelösung zu jeder Probe hinzu und inkubieren Sie sie für mindestens 15 Minuten.
5. Entfernen Sie die Färbelösung und waschen Sie die Zellen zweimal mit 1× PBS.
6. Für die Fluoreszenzmikroskopie montieren Sie die Zellen unter einem Deckglas mit einem [Einbettmedium](#).

(Optional) Zellen können auch ohne Waschen analysiert werden, aber dies kann den Hintergrund durch ungebundenen Farbstoff erhöhen.

Färbung lebender Zellen zur DNA-Gehalt-Analyse durch Durchflusszytometrie

1. Erhalten Sie eine Einzelzell-Suspension.
2. Verdünnen Sie die Hoechst-Stammlösung unmittelbar vor Gebrauch auf 1-10 µg/mL im entsprechenden Medium.
3. Resuspendieren Sie die Zellen in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/mL in der Färbelösung.

Alternativ kann der Hoechst-Farbstoff direkt in die Zellkultur gegeben werden, ohne die Zellen abzupelletieren, wenn die Zelldichte 1×10^6 Zellen/mL nicht überschreitet.

4. Inkubieren Sie bei 37 °C für 15-60 Minuten.
5. Pelletieren Sie die Zellen durch Zentrifugation bei 400 g für 3-4 Minuten bei Raumtemperatur; entfernen Sie die Färbelösung.
6. *(Optional)* Wenn nach der DNA-Analyse eine RNA-Analyse (z. B. RNA-seq) durchgeführt werden soll, waschen Sie die Zellen 2-3 Mal in serumfreiem Puffer (z. B. $1 \times$ PBS), um restliche RNase im Zellkulturmedium vollständig zu entfernen.
7. Resuspendieren Sie die Zellen in $1 \times$ PBS und führen Sie die Analyse durch Durchflusszytometrie durch. Verwenden Sie eine niedrige Flussrate, um das beste Ergebnis zu erzielen. Erhöhte Flussraten können zu einem höheren % CV für jedes Zellzykluskompartiment im DNA-Histogramm führen.

Wichtig! Wenn die Zellen sortiert werden sollen, fügen Sie während der Akquisition Hoechst erneut in den Analysepuffer hinzu, um die Farbstoffextrusion während der Sortierung zu verhindern.

Färbung fixierter Zellen zur DNA-Gehalt-Analyse durch Durchflusszytometrie

1. Erhalten Sie eine Einzelzell-Suspension mit einer Zelldichte von $1-2 \times 10^6$ Zellen/mL.
2. Fixieren Sie die Zellen für 30 Minuten auf Eis mit 70-80 % eiskaltem Ethanol.
3. Waschen Sie die Zellen einmal mit $1 \times$ PBS.
4. Verdünnen Sie die Hoechst-Stammlösung unmittelbar vor Gebrauch auf 0,2-2 µg/mL in $1 \times$ PBS.
5. Färben Sie die Zellen für 15 Minuten bei Raumtemperatur.
6. Ein Waschen vor der Analyse ist nicht erforderlich. Fahren Sie mit der Analyse durch Durchflusszytometrie fort. Verwenden Sie eine niedrige Flussrate, um das beste Ergebnis zu erzielen. Erhöhte Flussraten können zu einem höheren % CV für jedes Zellzykluskompartiment im DNA-Histogramm führen.