

## Application Note

# Ploidy- und Genom-Größenanalyse von Pflanzen mit dem CyStain OxProtect Kit

**Datum:** September 2019  
**Thema:** Flowzytometrie, Ploidy-Analyse, CyStain OxProtect Kit  
**Herausgeber:** Marketing  
**Nummer:** V1.0

---

## Warum ist die Oxidation von Pflanzenproben problematisch?

Bei der Messung des Ploidiegrades und der Genomgröße von Pflanzenproben sind genaue und reproduzierbare Messergebnisse von großer Bedeutung. Bei der Präparation des Probenmaterials können verschiedene Faktoren diese Messergebnisse stark beeinflussen, und somit zu Ungenauigkeiten oder sogar zu einer Fehlinterpretation der Messdaten führen. Einer dieser Einflussfaktoren ist die Oxidation des Probenmaterials, die häufig während der Probenpräparation stattfindet. Während der Präparation wird das Probenmaterial zunächst mit einer Rasierklinge fein gehackt, um danach mit Puffer und Färbelösung behandelt zu werden. Dabei werden oxidative Substanzen aus der Pflanzenzelle freigesetzt und kommen in direkten Kontakt mit dem nun freigelegten Zellkern. Die oxidativen Substanzen umfassen häufig sekundäre Metabolite wie zum Beispiel Polyphenole, organische Säuren oder Schleimstoffe, die den Färbeprozess des Probenmaterials stören können oder sogar den Zellkern angreifen und beschädigen. Die Folgen werden dann bei der Messung im Ploidy Analyser deutlich: Messkurven (sogenannte Peaks im Histogramm) verschieben sich und werden breiter; die Messung wird dadurch ungenau und teilweise fehlerhaft.

## Woran lässt sich die Oxidation erkennen?

Oftmals lässt sich die Oxidation des Probenmaterials bereits während der Probenvorbereitung an einer bräunlichen Verfärbung erkennen. Aus der Pflanzenzelle freigesetzte Enzyme initiieren weitere chemische Reaktionen: Polyphenole werden zu Flavonoiden umgesetzt und dadurch entsteht eine typische braune Färbung (siehe Abbildung 1).



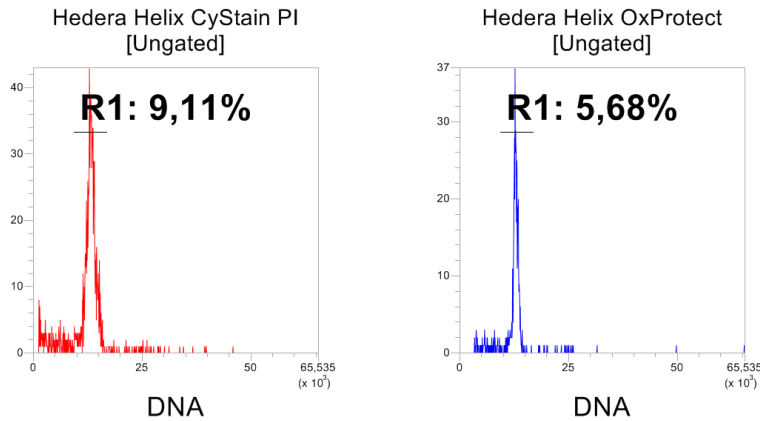
**Abb. 1 Sichtbare Anzeichen für Oxidation. Links:** Braunfärbung der Probe in Abwesenheit von Oxidations-Inhibitoren. **Rechts:** die gleiche Probe bei Nutzung des CyStain OxProtect Kits.

## Wie kann das OxProtect Kit helfen?

Das CyStain OxProtect Kit enthält reduzierende Substanzen sowie Chelatoren, die die chemische Oxidation hemmen. Dadurch wird eine gute Bindung des Farbstoffes an die DNA gewährleistet und die isolierten Zellkerne sind stabiler. Der Effekt zeigt sich direkt in geringeren CV-Werten (CV = Varianzkoeffizient) der Messkurven sowie einer längeren Haltbarkeit der Proben.

## Wie sehen die Messdaten nach Anwendung des OxProtect Kits aus?

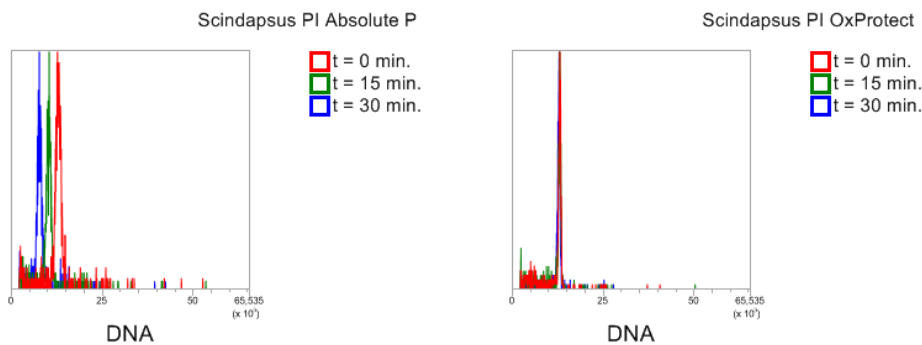
Im folgenden Beispiel wurde Probenmaterial von *Hedera Helix* (Gemeiner Efeu) mit CyStain PI Absolute P, und zum Vergleich mit dem neuen CyStain PI OxProtect Kit behandelt. Anschließend folgten Messung und Analyse mit dem CyFlow Ploidy Analyser. Abbildung 2 zeigt die entsprechenden Histogramme. Der gemessene Peak nach Verwendung des CyStain PI OxProtect Kit ist sichtbar schmaler und zeigt auch einen entsprechend kleineren CV-Wert als nach Verwendung des CyStain PI Absolute P Kit. Die Verwendung des CyStain PI OxProtect Kit ermöglicht in diesem Beispiel also eine genauere Messung des DNA-Gehaltes.



**Abb. 2 Messung und Analyse von *Hedera helix*.**  
**Links:** Probe mit *CyStain PI Absolute P* behandelt.  
**Rechts:** Probe mit *CyStain PI OxProtect* behandelt.

Durch Verwendung des CyStain OxProtect Kits lassen sich Oxidations-empfindliche Proben auch für längere Zeit deutlich stabilisieren.

Die Oxidation des Probenmaterials nimmt über die Zeit immer weiter zu. Dieses Problem ist bei einem großen Probenaufkommen besonders ausgeprägt. Bis letztlich alle Proben aufbereitet und nacheinander gemessen wurden, ist das Probenmaterial häufig längeren oder auch unterschiedlich langen Inkubationszeiten ausgesetzt – das Probenmaterial oxidiert also unterschiedlich stark. In Abbildung 3 wird dieser Effekt veranschaulicht. Proben von *Scindapsus aureum* wurden zu unterschiedlichen Zeiten nach der Präparation gemessen. Bei Verwendung des CyStain PI absolute P Kits verschiebt sich die Messkurve deutlich nach links. Je länger der Zeitraum nach der Präparation andauert, desto stärker verschiebt sich die Kurve. Mit der Verwendung des CyStain PI OxProtect Kits wird dieser Effekt verhindert und alle Messkurven sind auch noch nach 30 Minuten an der korrekten Position.



**Abb. 3 Messung und Analyse von *Scindapsus aureum*.** **Rechts:** Verschiebung der Peakposition über die Zeit nach Präparation mit *CyStain PI Absolute P*. **Links:** Stabile Peakposition über die Zeit nach Präparation mit *CyStain PI OxProtect*.

Diese Verschiebung der Messkurven wird leicht mit einer Ungenauigkeit des Ploidy Analysers in Zusammenhang gebracht, ist jedoch häufig dem Oxidationsprozess geschuldet.

Auch die Breite der Messkurve, also der CV, verschlechtert sich in Abhängigkeit der Zeit häufig auf Grund von Oxidationsprozessen. Am Beispiel von *Lantana camara* (Wandelröschen) zeigt sich bei einer Messung nach einer Stunde eine breitere Messkurve mit dem CyStain PI absolute P Kit (siehe Abbildung 4). Bei Verwendung des OxProtect Kit ist die Breite der Messkurve deutlich reduziert, der CV ist kleiner, sowie das Messergebnis genauer.

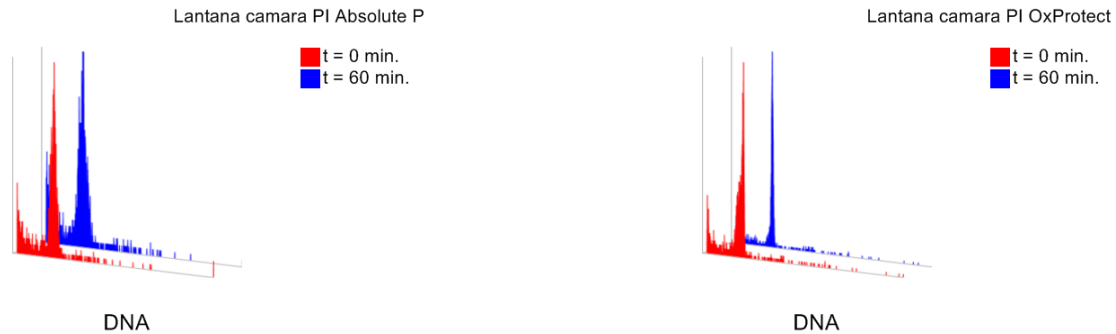


Abb. 4 **Messung und Analyse von *Lantana camara***. Links: Breiterer Peak nach 60 min bei Verwendung des *CyStain PI Absolute P*. Rechts: Schmäler Peak nach 60 min bei Verwendung des *CyStain PI OxProtect*.

## Tipps und Tricks

- Achten Sie auf eine braune Verfärbung des Probenmaterials, diese ist ein Hinweis auf Oxidationsprozesse.
- Variieren Sie ggf. die Inkubationsdauer. Während einer langen Inkubationsdauer können Oxidationsprozesse ablaufen.
- Variieren Sie ggf. die Temperatur. Eine Probenvorbereitung mit gekühlten Puffern und Färbelösungen hemmt zwar Enzyme und Oxidationsprozesse, jedoch wird auch die Bindung des Farbstoffes verlangsamt. Je nach Probenmaterial lassen sich bessere Ergebnisse mit einer Präparation auf Eis oder bei Raumtemperatur erzielen.
- Breite Messkurven können neben Oxidationsprozessen auch durch altes Probenmaterial bzw. ältere Pflanzenteile, stumpfe Rasierklingen und zu starkes/langes Hacken entstehen.
- Bei Messkurven mit hohen CV Werten (breite Peaks) oder „wandernden“ Messkurven wird die Nutzung des OxProtect Kits empfohlen, um Ihre Ergebnisse zu verbessern. Bei Pflanzenproben, die keine Oxidationsprozesse aufweisen, könnte das OxProtect Kit die Analyse jedoch negativ beeinflussen.

## Liste getesteter Pflanzen

Folgende weitere Pflanzen zeigten bei Tests mit dem OxProtect Kit gute Ergebnisse (Auszug):

- *Alliaria petiolata* (Knoblauchsrauke)
- *Allium ursinum* (Bärlauch)
- *Beta vulgaris* (Gemeine Rübe)
- *Dryopteris* (Wurmfarn)
- *Lavendula* (Lavendel)
- *Matriacaria recutita* (Kamille)
- *Oryza sativa* (Reis)
- *Rosmarinus officinalis* (Rosmarin)
- *Rumex acetosa* (Wiesen-Sauerampfer)
- *Salvia* (Salbei)
- *Thymus vulgaris* (Echter Thymian)
- *Zea mays* (Mais)

## Kontakt

- **Systemex Deutschland GmbH** · Bornbarch 1, 22848 Norderstedt, Germany ·  
Telefon +49 40 534102-0 · Fax +49 40 5232302 · info@systemex.de · www.systemex.de
- **Systemex Suisse AG** · Tödistrasse 50 · 8810 Horgen ·  
Telefon +41 44 718 38 38 · info@systemex.ch · www.systemex.ch ·  
**Systemex Austria GmbH** · Lienfeldergasse 31-33, 1160 Wien  
Telefon + 43 1 486 16 31 · Telefax: + 43 1 486 16 31 25 · office@systemex.at · www.systemex.at