

Flowzytometrische Analyse des Ploidiegrades und der Genomgröße bei Pflanzen und anderen Organismen

Xtra | Ausgabe Frühling 2015 | Nr. 04

Einführung

Eine der ersten in der Durchflusszytometrie verwendeten Methoden war die Analyse der quantitativen Veränderungen des Genmaterials in dysplastischen Zellen. Diese Methode stellt in der Pflanzenbiologie auch weiterhin das Referenzverfahren für die Beurteilung der Genomgröße und des Ploidiegrades dar.

Versuchsablauf

Die Zellkerne werden in Gegenwart eines Extraktionspuffers mechanisch aus einem 1 cm² großen (oder 20 mg schweren) Gewebstück gewonnen. Nach Filtration werden die Zellkerne mit CyStain[®]-Lösungen von Sysmex Partec gefärbt, die entweder Propidiumjodid (PI) oder 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) enthalten (Abb. 1). Dieses Präparat wird anschließend mit einem CyFlow[®] Durchflusszytometer analysiert, welches mit einer oder mehreren Lichtquellen (grün oder blau (PI), ultraviolett (DAPI)) für die Anregung von Fluoreszenzfarbstoffen im entsprechenden Farbbereich ausgestattet ist.

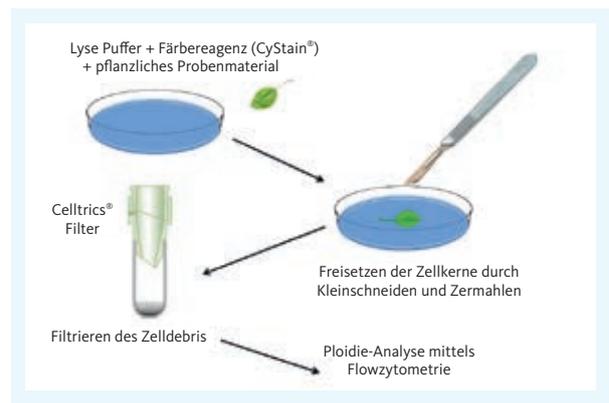


Abb. 1 Präparation einer Pflanzenprobe zur Ploidie-Analyse

Zellzyklus

Unter physiologischen Bedingungen zeigen Zellen ein DNA-Profil, das einem Zellzyklus mit seinen verschiedenen Phasen entspricht (Abb. 2 und 3):

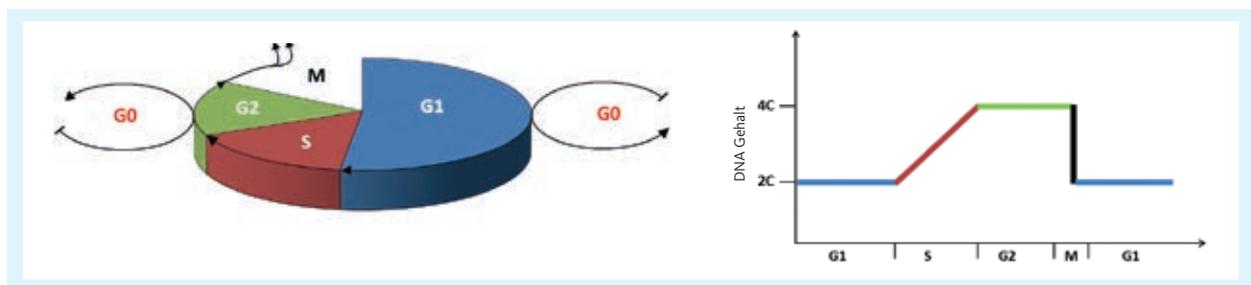


Abb. 2 Zellzyklus. Legende: G0 = Ruhe-Phase, G1 = erste Gap-Phase, S = DNA Synthese-Phase, G2 = zweite Gap-Phase, M = Mitose-Phase

Suspension der Zellkerne

Während der Filtration werden die bei der Freisetzung der Zellkerne entstehenden Gewebsreste entfernt. Dennoch können kleine Zellbestandteile, die durch die Filtration nicht beseitigt werden, wie z. B. Chloroplasten, Mitochondrien und lösliche Phenolverbindungen sowie DNasen und RNasen, die Qualität der Analyse beeinträchtigen.

Die Zugabe von Antioxidantien (Bisulfit, 2-Mercaptoethanol), Tanninbindemittel (PVP), die Lyse von Chloroplasten (Triton) und RNA (RNasen) sowie die Aufbereitung im Eisbad können den Einfluss unerwünschter Substanzen weitestgehend vermindern.

Verwendung einer internen Referenz

Um den DNA-Gehalt einer Probe exakt bestimmen zu können, wird empfohlen eine Referenz aus Zellkernen einer Spezies zu verwenden, deren Genomgröße der der zu analysierenden Probe weitestgehend entspricht. Das Referenzmaterial wird zeitgleich mit dem Probenmaterial vorbereitet, um den Einfluss unterschiedlicher Präparationen möglichst gering zu halten. Durch den Vergleich der Peakposition der Referenz mit der Peakposition der Probe wird eine genaue Bestimmung des DNA-Gehaltes der Probe ermöglicht. Ist der DNA-Gehalt des Referenzmaterials in Pikogramm (pg) oder die Anzahl der Basenpaare (bp) bekannt, kann folgende Gleichung aufgestellt werden:

$$\text{DNA-Gehalt (bp)} \\ = 0,978 \times 10^9 \times \text{DNA-Gehalt (pg)}$$

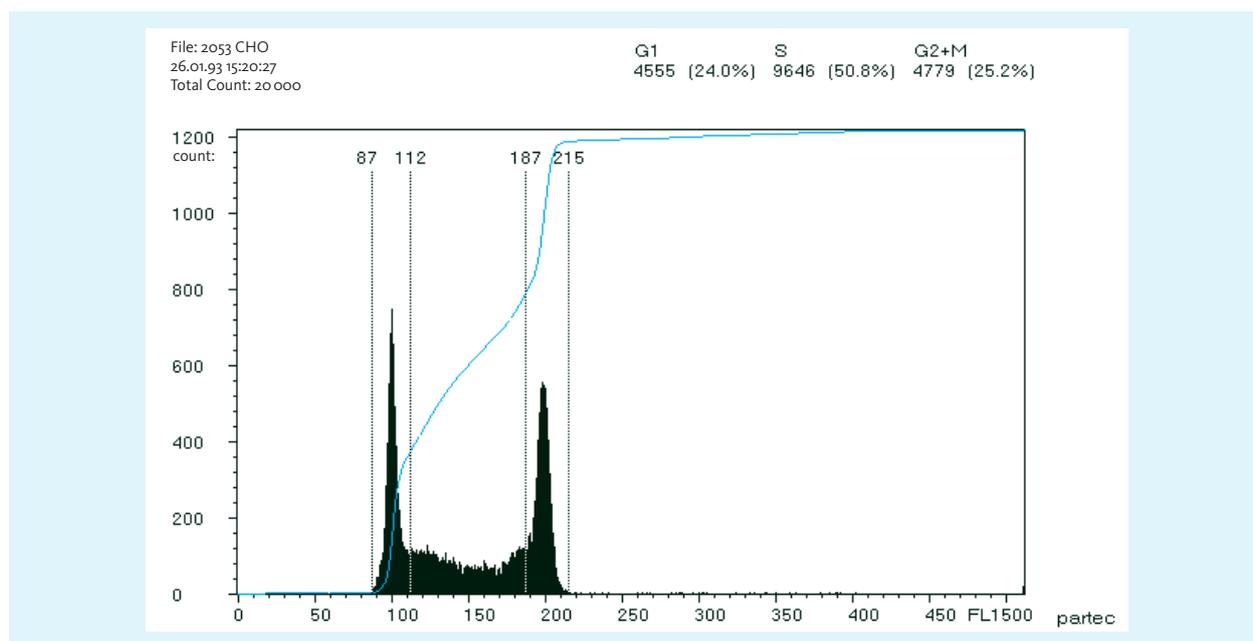


Abb. 3 Durchflusszytometrische Analyse des Zellzyklus

Analyse mittels Durchflusszytometrie

Zur Beseitigung der Gewebsreste, die sich trotz Filtration noch in der Probe befinden, wird in der durchflusszytometrischen Analyse eine bestimmte Gating-Strategie verwendet. Hierzu wird mittels Auftragung eines Fluoreszenzparameters (Fluoreszenz »DAPI oder PI«) und des Seitwärtsstreulichts »SSC« (entspricht der Granularität bzw. Komplexität des gemessenen Partikels) in einem Dotplot ein »Gate« über die entsprechende Population gelegt. (Abb. 4A und 4B).

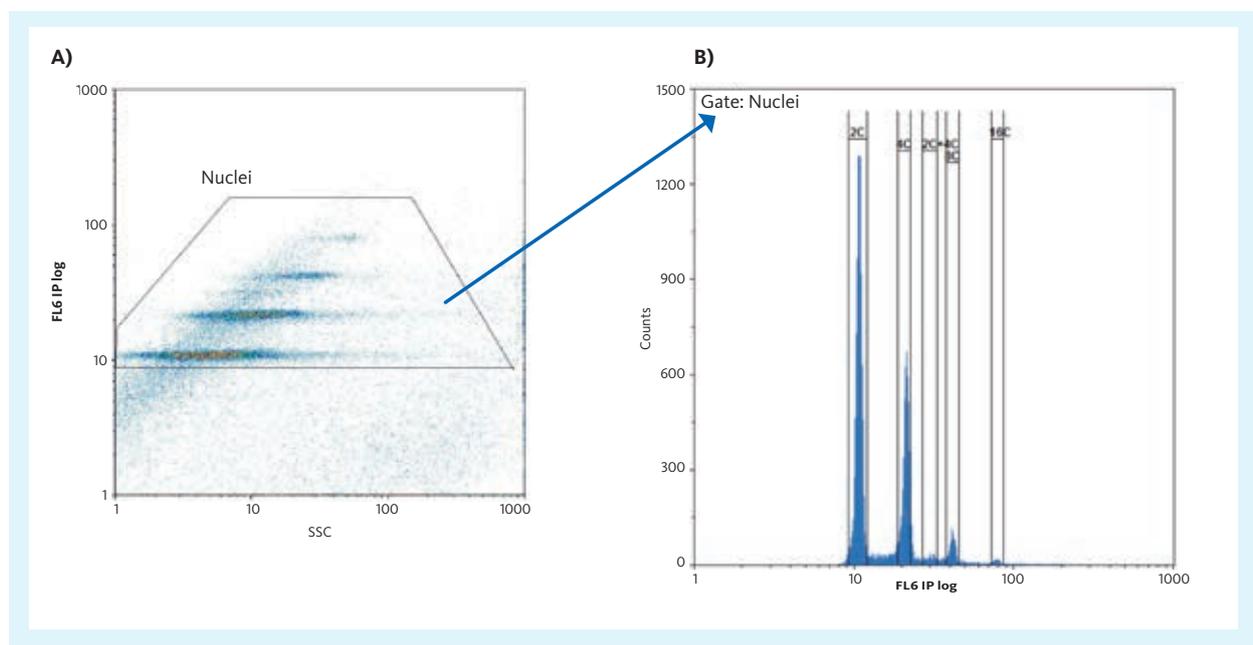


Abb. 4 Analyse der Ploidie einer Tomatenprobe (*Lycopersicon esculentum*); 4A: Dotplot, in dem die Granularität (SSC) gegen FL6 (PI) aufgetragen wurde, wobei das »Gate« auf Abb. 4B übertragen wird; 4B: Histogramm der in Abb. 4A gegateten Zellkerne zeigt die entsprechende Ploidieverteilung.

Auswertung des Endoreplikationsgrades

Das obige Beispiel (Abb. 4) einer Tomate (*Lycopersicon esculentum*) zeigt ein DNA-Profil nach Endoreplikation, also einer Mitose bei der lediglich die DNA repliziert wird, jedoch ohne Kern- und Zellteilung. Die Endoreplikations-Peaks überlagern die Peaks des klassischen Zellzyklus:

$$2C \rightarrow 4C \rightarrow 8C \rightarrow 16C$$

Durch die zeitgleiche Analyse der am häufigsten vorkommenden Kerne ergibt sich ein Peak-Artefakt »2C + 4C« (Abb. 5 und Tab. 1).

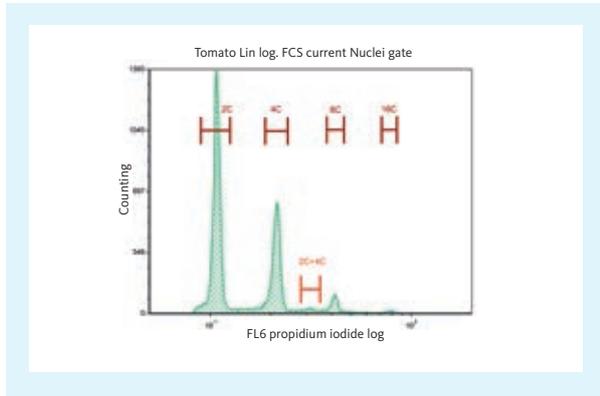


Abb. 5 Ploidie-Analyse einer Tomatenprobe (*Lycopersicon esculentum*) mit Endoreplikation

Region	Gate	%gegatet	Anzahl	MFI-X	CV-x %
2C	Nuclei	54,49	18.367	10,80	4,17
4C	Nuclei	26,64	9.648	21,23	3,76
8C	Nuclei	4,32	1.460	41,58	3,72
16C	Nuclei	0,74	260	78,68	3,87
2C+4C	Nuclei	1,95	649	30,40	5,55

Tab. 1 Statistische Auswertung der Regionen verschiedener Peaks nach Endoreplikation, MFI = mittlere Fluoreszenzintensität, CV = Varianzkoeffizient

Messung der Genomgröße

Für die mengenmäßige Bestimmung der DNA mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung einer internen Referenz ist eine Färbung erforderlich, welche nicht basenspezifisch, sondern DNA-interkalierend ist, damit die Genomgrößen so genau wie möglich gemessen werden können. Bei diesen interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen handelt es sich im Allgemeinen um Ethidiumbromid oder wie im folgenden Beispiel Propidiumjodid, wobei die Probe zuvor mit RNase behandelt wurde (Abb. 6).

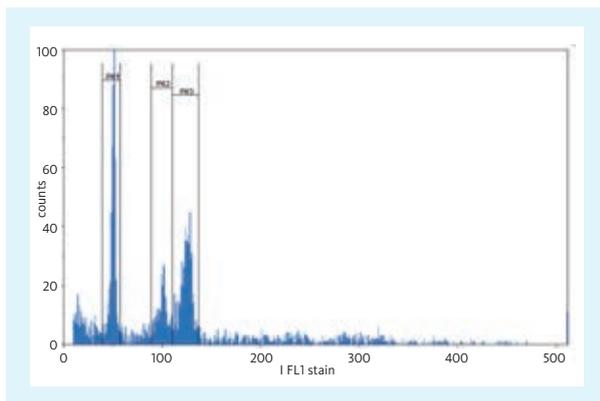


Abb. 6 Analyse des DNA-Gehalts einer Schachtelhalmprobe (*Equisetum sp.*) unter Verwendung von Knoblauchfragmenten (*Allium sativum*) mit bekanntem DNA-Gehalt als Referenz

Region	Anzahl	%gegatet	GMn-x	MFI-X	CV-x %
PK1	500	25,00	49,50	49,59	6,03
PK2	251	12,55	99,60	99,73	5,11
PK3	534	26,70	123,97	124,11	4,74

Die Bereiche PK1 und PK2 entsprechen den Peaks 2C bzw. 4C der als Referenz verwendeten Knoblauchfragmente (*Allium sativum*), wobei bekannt ist, dass 2C 34,80 pg entspricht. Der Bereich PK3 der Schachtelhalmprobe (*Equisetum sp.*) ermöglicht die Berechnung des DNA-Index im Vergleich zu PK1: $123,97/49,50 = 2,50$; enthält 2C von *Equisetum sp.* $2,50 \times 34,80 = 87,15$ pg DNA.

Messung des AT-GC-Verhältnisses

Dieses Messverfahren beruht auf der Verwendung eines DNA-Interkalators und eines Fluoreszenzfarbstoffs, der spezifisch für repetitive DNA-Elemente ist, z. B. 5 x AT für Hoechst 33342 und 3 x GC für Chromomycin.

Berechnung des AT-GC-Verhältnisses

$R_{PI} = \text{Fluoreszenzintensität}_{\text{Probe}} / \text{Fluoreszenzintensität}_{\text{Referenz}}$; gemessen mit Propidiumjodid oder

$R_{HO} = \text{Fluoreszenzintensität}_{\text{Probe}} / \text{Fluoreszenzintensität}_{\text{Referenz}}$; gemessen mit Hoechst 33342 oder

$R_{CA} = \text{Fluoreszenzintensität}_{\text{Probe}} / \text{Fluoreszenzintensität}_{\text{Referenz}}$; gemessen mit Chromomycin A3

$\text{AT-Gehalt}_{\text{Probe}} [\%] = \text{AT-Gehalt}_{\text{Referenz}} [\%] \times (R_{HO} / R_{PI})^{1/5}$ bzw.

$\text{GC-Gehalt}_{\text{Probe}} [\%] = \text{GC-Gehalt}_{\text{Referenz}} [\%] \times (R_{CA} / R_{PI})^{1/3}$

Um die Berechnung zu überprüfen, kann kontrolliert werden, ob $\text{AT-Gehalt}_{\text{Probe}} [\%] + \text{GC-Gehalt}_{\text{Probe}} [\%] = 100\%$ ergibt.

Apomixis und Aneuploidie

Die Apomixis ist eine Form der ungeschlechtlichen Fortpflanzung, bei der im Gegensatz zur geschlechtlichen Fortpflanzung eine Samenbildung ohne Befruchtung erfolgt. Apomiktische Pflanzen sind in der Regel von Generation zu Generation genetisch identisch.

Die aufgrund der Embryo- und Endospermzellen gefundenen Peaks der Samenproben zeigen an, ob Apomixis vorhanden ist oder nicht und um welchen Apomixistyp es sich handelt (Abb. 7).

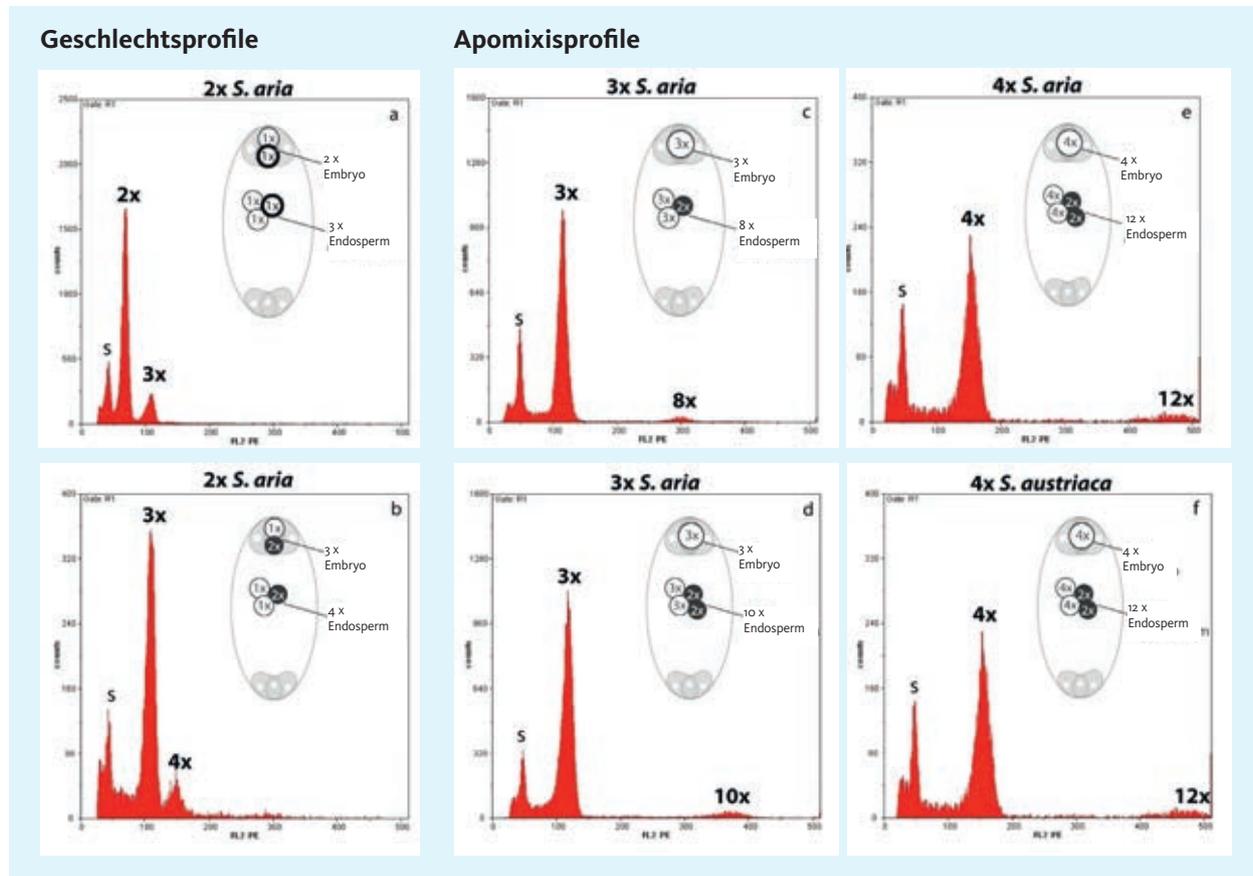


Abb. 7 Untersuchung der Fortpflanzungsmethoden anhand der Peakpositionen in den durch Durchflusszytometrie gewonnenen Fluoreszenzhistogrammen (Matz et al. 2000).

Bei der Aneuploidie wird die Position der Peaks beeinflusst und erscheint wie im folgenden Beispiel: Raps sämlinge (*Brassica napus*) mit $n=16$ und $n=19$ Chromosomen, die als Doppel-Peak erscheinen.

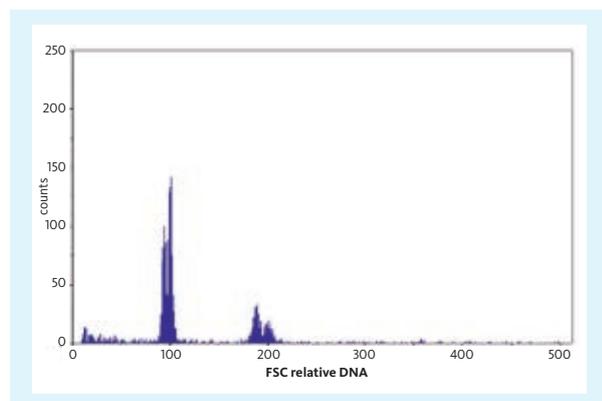


Abb. 8 Ploidie-Analyse einer Rapsprobe (*Brassica napus*) mit Darstellung eines Aneuploidieprofils, wobei die 2C- und 4C-Spitzen jeweils Doppel-Peaks zeigen.

Danksagungen:

Wir danken Mickaël Bourge (Cytometry Platform CNRS – FRC3115 – IMAGIF 91 118 Gif-sur-Yvette) für seine Unterstützung und seine Bereitschaft, diesen Beitrag zu überprüfen.

Literaturverweise

- [1] *Bennert W, Lubienski M, Körner S, Steinberg M. (2005): Triploidy in Equisetum subgenus Hippochaete (Equisetaceae, Pteridophyta) Annals of Botany 95: 807 – 815.*
- [2] *Brown SC, Catrice O, Siljak-Yakolev S, Mergaert P, Satiat-Jeunemaître B. (2010): Le cycle et l'endoréduplication chez les végétaux, Dans : Cycle cellulaire et cytométrie en flux. X. Ronot, & D. Grunwald, J-F. Mayol, (eds) Tec & Doc – Lavoisier, Paris, pp190 – 213 & 274 – 276.*
- [3] *Doležel J, Bartoš J, Voglmayr H, Greilhuber J. (2003): Nuclear DNA content and genome size of trout and human. Cytometry 51A: 127 – 128.*
- [4] *Godelle B, Cartier D, Marie D, Brown SC, Siljak-Yakolev S. (1993): Heterochromatin study demonstrating the non-linearity of fluorometry useful for calculating genomic base composition. Cytometry 14.6: 618 – 626. 0196 – 4763.*
- [5] *Marie D, Brown SC. (1993): A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for seventy species. Biology of the Cell 78: 41 – 51.*
- [6] *Matzk F, Meister A, Schubert I. (2000): An efficient screen for reproductive pathways using mature seeds of monocots and dicots. Plant Journal 21: 97 – 108.*
- [7] *Ochatt S. (2008): Flow Cytometry in Plant Breeding. Cytometry Part A 73A: 581 – 598.*



Sysmex Deutschland GmbH
Bornbarch 1, 22848 Norderstedt, Deutschland · Telefon +49 40 534102-0 · Fax +49 40 5232302 · info@sysmex.de · www.sysmex.de

Sysmex Austria GmbH
Odoakergasse 34-36, 1160 Wien, Österreich · Telefon +43 1 4861631 · Fax +43 1 486163125 · office@sysmex.at · www.sysmex.at

Sysmex Suisse AG
Tödistrasse 50, 8810 Horgen, Schweiz · Telefon +41 44 718 38 38 · Fax +41 44 718 38 39 · info@sysmex.ch · www.sysmex.ch