Lumiprobe
Life science solutions



Инструкция к наборам для определения апоптотических клеток с помощью аннексина V AF и йодистого пропидия

Lumiprobe Corporation. All rights reserved.

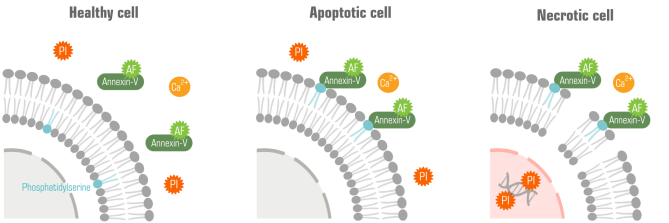
Contents

Русский: Инструкция к наборам для определения апоптотических клеток с помощью аннексина V AF и йодистого пропидия 3-8

RU

Инструкция к наборам для определения апоптотических клеток с помощью аннексина V AF и йодистого пропидия

Аннексин V (или Аннексин A5) принадлежит семейству аннексинов, внутриклеточных белков, связывающих фосфолипиды. Аннексин V обычно используется в проточной цитометрии и флуоресцентной микроскопии для определения апоптотических клеток, благодаря его способности специфически связываться с фосфатидилсерином (ФС) кальций-зависимым образом. Метод был впервые описан Koopman с соавт. (1994) [1].



Одним из ранних проявлений программируемой клеточной гибели (апоптоза) является нарушение асимметрии фосфолипидного бислоя. В здоровых клетках ФС содержится только с внутренней стороны плазматической мембраны. Во время апоптоза мембранная асимметрия исчезает, ФС перемещается на наружную сторону мембраны и становится доступным для связывания флуоресцентно меченным аннексином V. Данная транслокация опосредована активацией скремблазы Xkr8, после ее расщепления эффекторной каспазой-3. В сочетании с другими прижизненными красителями, такими как йодистый пропидий (PI), связывание аннексина V с ФС позволяет различать популяции здоровых (Аннексин$^-$PI$^-$), апоптотических (Аннексин$^+$PI$^-$) и некротических (Аннексин$^+$PI$^+$) клеток [2] и проводить количественный анализ клеточной гибели в результате апоптоза и/или некроза.

Йодистый пропидий (PI) — непроникающий через плазматическую мембрану ДНК-краситель, позволяющий различать популяции некротических, апоптотических и здоровых клеток на основе целостности мембраны. После связывания с ДНК краситель излучает в оранжево-красном канале. Максимум поглощения — 535 нм. Максимум эмиссии — 617 нм.

Наборы для определения апоптотических клеток содержат все необходимые реагенты для мечения апоптотических и некротических клеток с помощью аннексина V, конъюгированного с красителем AF 488 или AF 647, и йодистого пропидия.

Состав набора

Компонент набора	Количество			
	11172 10 assays	21172 50 assays	14172 10 assays	24172 50 assays
11515, Аннексин V, AF 488 конъюгат, 1 ug	1	—	—	—
21515, Аннексин V, AF 488 конъюгат, 5 ug	—	1	—	—
12515, Аннексин V, AF 647 конъюгат, 1 ug	—	—	1	—
22515, Аннексин V, AF 647 конъюгат, 5 ug	—	—	—	1
19010, Пропидия йодид, 100 uL, 0.1 mg/mL in water	1	1	1	1
83215, Буфер для связывания аннексина V, 5×, 15 mL	1	1	1	1

Транспортировка: до одной недели при комнатной температуре. Хранение: при -20°C.

Срок хранения 12 месяцев.

Рекомендуемые концентрации аннексина V AF — от 2 до 10 мкг/мл, в зависимости от исследуемой клеточной культуры. Перед экспериментом необходимо опробовать разные разведения аннексина V AF для определения оптимальной концентрации.

Окрашивание с помощью йодистого пропидия — *опционально*. Этот этап можно пропустить, если в задачах нет необходимости исследовать некроз.

Важно! *Аннексин V можно использовать в качестве маркера апоптоза только в клетках с интактной плазматической мембраной. При нарушении целостности плазматической мембраны аннексин V может связываться с ФС внутри клетки и давать ложноположительный результат.*

Приготовление растворов

1. Растворите содержимое пробирки с лиофилизированным **аннексином V AF (11515, 12515)** в 50 мкл деионизованной воды. / Растворите содержимое пробирки с лиофилизированным **аннексином V AF (21515, 22515)** в 250 мкл деионизованной воды.

   Важно! *Разведенный рекомбинантный белок необходимо хранить защищенным от света при температуре 2-8°C. В растворе коньюгат стабилен в течение месяца. При длительных экспериментах рекомендуется приготовить аликвоты и хранить их при температуре -20°C. Избегать повторного замораживания!*

2. Приготовьте необходимый объём 1× буфера для связывания, смешав 1 часть **5× буфера для связывания** с 4 частями деионизованной воды.

Окрашивание клеток

1. Адгезированные клетки аккуратно снимите с поверхности роста подходящим способом. С суспензионными клетками начинайте работу со следующего пункта.
2. Промойте клетки один раз охлаждённым PBS (pH7,4) и один раз 1× буфером для связывания.
3. Ресуспензируйте клетки в холодном 1× буфере для связывания.
4. Отберите 100 мкл суспензии клеток (от 1×10^5 до 1×10^6 клеток/мл) в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл. Для проточной цитометрии необходимо заготовить дополнительные пробирки с соответствующими контролями (см. описание контролей ниже).
5. Добавьте 5-10 мкл раствора аннексина V AF в каждую пробирку, инкубируйте в течение 10-15 мин при комнатной температуре в защищенном от света месте.
6. Без предварительной отмывки добавьте 400 мкл 1x буфера для связывания в каждую пробирку.
7. *(Опционально)* Добавьте 0,5-1 мкл йодистого пропидия в каждую пробирку с клетками. Аккуратно перемешайте содержимое пробирки и инкубируйте в течение 5 мин при комнатной температуре в защищенном от света месте.

   Важно! *Не промывайте клетки от йодистого пропидия. Йодистый пропидий должен оставаться в буфере во время сбора данных.*
8. Окрашенные клетки храните при температуре 2-8°C в защищенном от света месте до проведения анализа.

   Важно! *Количественное определение клеток методом проточной цитометрии или флуоресцентной микроскопии необходимо производить в течение 4 ч от начала окрашивания из-за негативного воздействия йодидистого пропидия на жизнеспособность клеток.*

Проточная цитометрия

1. Для цитофлуориметрического анализа апоптоза и некроза клеток с помощью аннексина V AF и йодистого пропидия помимо целевого окрашивания необходимо приготовить контроли: неокрашенные клетки (отрицательный контроль для настройки прибора); клетки, окрашенные только аннексином V AF, и клетки, окрашенные только йодистым пропидием (для настройки компенсации).
2. Анализ связывания аннексина V AF 488 проводят с использованием детектора сигнала FITC. / Анализ связывания аннексина V AF 647 проводят с использованием детектора сигнала Cy5/AF 647.
3. Анализ клеток, окрашенных йодистым пропидием, осуществляют с помощью детектора сигнала фикоэритрина.

Флуоресцентная микроскопия

1. Отберите каплю суспензии с окрашенными клетками и поместите ее на предметное стекло. Накройте клетки покровным стеклом.
2. В качестве альтернативы, адгезированные клетки можно окрашивать непосредственно на покровном стекле. После окрашивания переверните покровное стекло на предметное, так, чтобы клетки находились между предметным и покровным стёклами.
3. *(Опционально)* Клетки после окрашивания аннексином V, перед визуализацией можно промыть 1x буфером для связывания и зафиксировать в 2% параформальдегиде. Не фиксируйте клетки перед инкубацией с аннексином V AF, поскольку любое нарушение клеточной мембраны может вызвать неспецифическое связывание аннексина V с ФС на внутренней поверхности клеточной мембраны.
4. Исследование клеток под флуоресцентным микроскопом осуществляют, используя соответствующий набор фильтров.

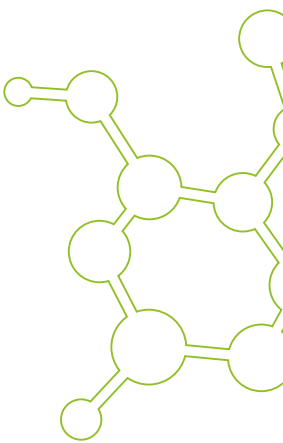
Результат окрашивания

- Ранние апоптотические клетки, связавшие аннексин V AF 488/аннексин V AF 647, окрашиваются в зеленый/дальний красный цвет в плазматической мембране.
- Некротические клетки в результате проникновения йодистого пропидия внутрь клетки будут окрашены красным.
- Апоптотические клетки с нарушенной в результате вторичного некроза целостностью мембраны будут иметь красное окрашивание (йодистый пропидий) и ореол зеленого/дальне-красного окрашивания (AF 488/AF 647) на клеточной поверхности (плазматическая мембрана).
- Здоровые клетки будут лишены окрашивания.

Ссылки

[1] Blood. 1994, 84, 5, 1415-1420. [2] J. Exp. Med. 1995, 182, 5, 1545-1556.

22.09.509-QM
Issued by INSPECT



www.lumiprobe.com