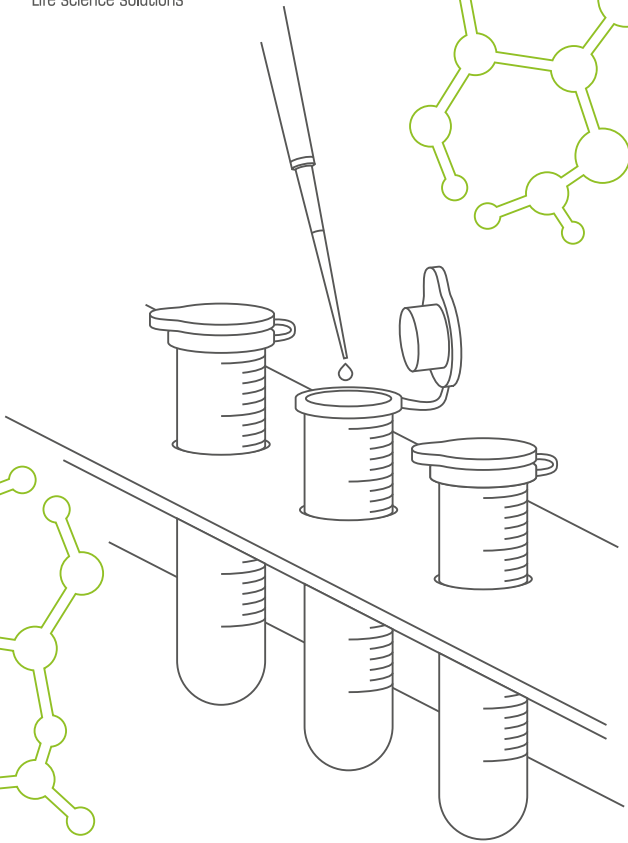
Lumiprobe
Life science solutions



Инструкция к набору для определения апоптоза и митохондриального мембранного потенциала

Lumiprobe Corporation. All rights reserved.

Contents

Русский: Инструкция к набору для определения апоптоза и митохондриального мембранного потенциала 3-7

RU

Инструкция к набору для определения апоптоза и митохондриального мембранного потенциала

Mitochondrial Membrane Potential Apoptosis Kit — готовый к работе набор, предназначенный для быстрого и удобного анализа двух ключевых показателей апоптоза: экстернализации фосфатидилсерина (с помощью аннексина V-AF 488) и изменений потенциала митохондриальной мембраны (с помощью LumiTracker® Mito Red CMXRos).

Аннексин V (или Аннексин A5) принадлежит семейству аннексинов, внутриклеточных белков, связывающих фосфолипиды. Аннексин V часто используется для определения апоптотических клеток, благодаря его способности специфически связываться с фосфатидилсерином (ФС), который на ранних стадиях апоптоза перемещается со внутренней стороны клеточной мембраны во внешнюю. Настоящий набор содержит рекомбинантный аннексин V, конъюгированный с AF 488, — ярким фотостабильным зеленым флуорофором со спектральными характеристиками, аналогичными FITC.

LumiTracker Mito Red CMXRos — катионный красный флуоресцентный краситель, который пассивно диффундирует через плазматическую мембрану и избирательно накапливается в активных митохондриях в зависимости от мембранного потенциала в них. Здоровые клетки обладают высоким митохондриальным мембранным потенциалом, и его снижение считают маркером ранней стадии апоптоза.

После окрашивания аннексином V-AF 488 и красителем LumiTracker® Mito Red CMXRos живые клетки будут иметь слабую зеленую и интенсивную красную флуоресценцию; апоптотические клетки, наоборот, будут обладать высокой зеленой и низкой красной флуоресценцией. Эти две популяции клеток легко различаются с помощью проточного цитометра, при этом оба красителя способны возбуждаться линией 488 нм аргоно-ионного лазера.

Набор содержит все необходимые реагенты для мечения апоптотичеких клеток коньюгатом аннексина V с AF 488 и определения митохондриального мембранного потенциала с помощью красителя LumiTracker® Mito Red CMXRos.

Состав набора

Компонент набора	Количество 21372 50 assays
21515, Аннексин V-AF 488 конъюгат, 5 ug	1
83215, Буфер для связывания аннексина V, 5×, 15 mL	1
15050, ДМСО (диметилсульфоксид) для мечения, 1 mL	1
2251-50ug, LumiTracker® Mito Red CMXRos, 50 ug	3

Транспортировка: при комнатной температуре в течение 1 недели. Хранить при -20°C 9 месяцев.

Срок хранения 9 месяцев.

Прежде чем начать

- Обычно используемая концентрация LumiTracker® Mito Red CMXRos для окрашивания клеток составляет 25–500 нМ. Рабочее разведение зависит от типа и плотности клеток и должно быть определено экспериментально.
- 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.

  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 (21515)** в 250 мкл деионизованной воды.

   Важно! *Разведенный рекомбинантный белок необходимо хранить защищенным от света при температуре 2-8°C. В растворе конъюгат 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.

3. Приготовьте 10 мМ стоковый раствор красителя LumiTracker® Mito Red CMXRos, добавив 9,4 мкл **ДМСО (15050)** в пробирку с красителем

   LumiTracker® Mito Red CMXRos (2251-50ug). Неиспользованную часть стокового раствора можно хранить при температуре ≤—20°C до 1 мес.

4. Приготовьте 10 мкМ рабочий раствор красителя LumiTracker® Mito Red CMXRos. Для этого добавьте пипеткой 1 мкл 10 мМ стокового раствора

   LumiTracker® Mito Red CMXRos в 1000 мкл среды.

Окрашивание клеток

1. Индуцируйте апоптоз в клетках необходимым способом. Подготовьте отрицательный контроль, инкубируя клетки в отсутствие индуцирующего агента. Подготовьте положительный контроль некроза, инкубируя клетки с 2 мМ перекисью водорода в течение 4 ч при 37°C.

2. Адгезированные клетки аккуратно снимите с поверхности роста подходящим способом. С суспензионными клетками начинайте работу со следующего пункта.

3. Отберите 1 мл 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: (1) неокрашенные клетки (отрицательный контроль для настройки прибора); (2) клетки, окрашенные только аннексином V-AF; (3) клетки, окрашенные только LumiTracker® Mito Red CMXRos (для настройки компенсации); а также пробирку (4) с экспериментальными клетками (двойная окраска аннексином V-AF и LumiTracker® Mito Red CMXRos).
4. В пробирки (3) и (4) добавьте по 4 мкл 10 мкМ раствора LumiTracker Mito Red CMXRos, хорошо перемешайте.
5. Инкубируйте клетки в темноте в течение 15–45 мин в условиях, необходимых для данного типа клеток.
6. Промойте клетки один раз охлаждённым PBS (pH 7,4) и один раз 1× буфером для связывания.
7. Ресуспензируйте клетки в 100 мкл холодного 1× буфера для связывания.
8. В пробирки (2) и (4) добавьте по 5-10 мкл раствора аннексина V-AF, инкубируйте в течение 10-15 мин при комнатной температуре в защищенном от света месте.
9. Без предварительной отмывки добавьте 400 мкл 1x буфера для связывания в каждую пробирку.
10. Окрашенные клетки храните при температуре 2-8°C в защищенном от света месте до проведения анализа.

Проточная цитометрия

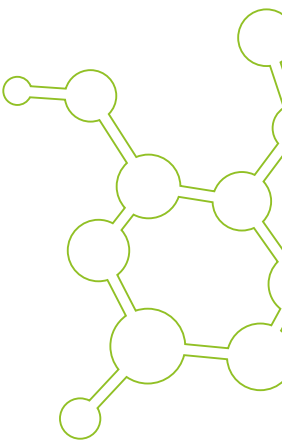
1. Для цитофлуориметрического анализа апоптоза клеток с помощью аннексина V-AF и LumiTracker® Mito Red CMXRos помимо целевого окрашивания необходимо приготовить контроли (см. выше).
2. Анализ связывания аннексина V-AF 488 проводят с использованием детектора сигнала FITC.
3. Анализ клеток, окрашенных LumiTracker® Mito Red CMXRos, осуществляют с помощью детектора сигнала фикоэритрина.
4. Для корректного разведения красителей по разными каналам детекции может потребоваться отдельная настройка компенсации.

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 и 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.

Ver. NON5P

22.09.509-QM
Issued by INSPECT



www.lumiprobe.com