



Handbuch für das Annexin V-AF Apoptose-Kits mit Propidiumiodid

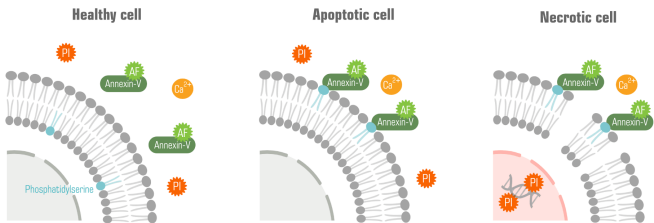
Contents

Deutsch: Handbuch für das Annexin V-AF Apoptose-Kits mit Propidiumiodid	3-7
--	-----

Handbuch für das Annexin V-AF Apoptose-Kits mit Propidiumiodid

Annexin V (oder Annexin A5) ist ein intrazelluläres Protein aus der Familie der Phospholipidbindenden Annexine. In der Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie wird Annexin V häufig verwendet, um apoptotische Zellen mithilfe seiner Fähigkeit zur calciumabhängigen Bindung an Phosphatidylserin (PS) nachzuweisen. Die Methode wurde zuerst von Koopman et al. (1994) [1] beschrieben.

In gesunden Zellen findet sich PS normalerweise auf der Innenseite der Plasmamembran. Die Anfangsphase der Apoptose wird von Verlust der Membranasymmetrie begleitet, was zur Exposition von PS an der Zelloberfläche führt. Dieser Transfer wird durch die Aktivierung der Scramblase Xkr8 nach ihrer Spaltung durch Effektorcaspase 3 ermittelt. Fluorchrommarkiertes Annexin V kann in Verbindung mit Vitalfarbstoffen wie Propidiumiodid (PI) zwischen gesunden (Annexin⁻PI⁻), apoptotischen (Annexin⁺PI⁻) und nekrotischen (Annexin⁺PI⁺) Zellen unterscheiden [2]. Der Zelltod als Folge von Apoptose und/oder Nekrose kann dadurch quantitativ bestimmt werden.



Propidiumiodid ist ein membranundurchlässiger DNA-Farbstoff, der eine Unterscheidung zwischen nekrotischen, apoptotischen und gesunden Zellen anhand ihrer Membranintegrität ermöglicht. Nach der Bindung an die DNA emittiert der Farbstoff orange-rotes Fluoreszenzlicht. Das Absorptionsmaximum beträgt 535 nm und das Emissionsmaximum liegt bei 617 nm.

Das vorliegende **Apoptose-Kit** enthält alle notwendigen Reagenzien für die Markierung von apoptotischen und nekrotischen Zellen mit **AF 488- oder AF 647-konjugiertem Annexin V** und Propidiumiodide.

Bestandteile

Komponente	Anzahl			
	11172 10 assays	21172 50 assays	14172 10 assays	24172 50 assays
11515, Annexin V-AF 488-Konjugat, 1 ug	1	—	—	—
21515, Annexin V-AF 488-Konjugat, 5 ug	—	1	—	—
12515, Annexin V-AF 647-Konjugat, 1 ug	—	—	1	—
22515, Annexin V-AF 647-Konjugat, 5 ug	—	—	—	1
19010, Propidiumiodid, 100 uL, 0.1 mg/mL in water	1	1	1	1
83215, Annexin-V-Bindungspuffer, 5x, 15 mL	1	1	1	1

Transport: bei Raumtemperatur bis zu eine Woche. Lagerungsbedingungen: bei -20 °C.

Haltbarkeit: 9 Monate.

Die empfohlene finale Konzentration von Annexin-V-AF beträgt 2 bis 5 µg/ml, abhängig von der untersuchten Zellkultur. Vor dem Experiment müssen verschiedene Verdünnungen von Annexin-V-AF getestet werden, um die optimale Konzentration zu bestimmen.

Die Färbung mit Propidiumiodid ist *optional*. Dieser Schritt kann übersprungen werden, wenn die Untersuchung auf Nekrose nicht erforderlich ist.

Wichtig! *Annexin V kann als Apoptosemarker nur in Zellen mit intakter Plasmamembran verwendet werden. Sobald die Integrität der Plasmamembran gestört*

wird, kann Annexin V an PS innerhalb der Zelle binden und dadurch ein falsches positives Ergebnis liefern.

Herstellung der Lösungen

1. Lösen Sie das lyophilisierte **Annexin-V-AF Konjugat (11515, 12515)** in 50 µl deionisiertem Wasser. / Lösen Sie das lyophilisierte **Annexin-V-AF Konjugat (21515, 22515)** in 250 µl deionisiertem Wasser.

Wichtig! Das aufgelöste Konjugat sollte vor Licht geschützt und bei 2–8 °C gelagert werden. In Lösung ist das Konjugat einen Monat lang stabil. Zur langfristigen Nutzung empfiehlt es sich, Aliquots herzustellen und bei -20 °C aufzubewahren, wobei Wiedereinfrieren vermeiden werden sollte.

2. Stellen Sie das erforderliche Volumen von 1x Bindungspuffer her, indem Sie 1 Teil der **5x Pufferlösung** mit 4 Teilen deionisierten Wassers verdünnen.

Anfärbung der Zellkerne

1. Adhärente Zellen in geeigneter Weise vorsichtig von der Kulturunterlage entfernen. Bei Suspensionszellen beginnen Sie die Arbeit mit dem nächsten Schritt.
2. Waschen Sie die Zellen einmal mit kaltem PBS (pH 7.4) und einmal mit 1x Bindungspuffer.
3. Resuspendieren Sie die Zellen in kaltem 1x Bindungspuffer.
4. Füllen Sie 100 µl Zellsuspension (1×10^5 bis 1×10^6 Zellen/ml) in ein 1,5-ml Mikrozentrifugenröhrchen. Für die Durchflusszytometrie sind zudem geeignete Kontrollen vorzubereiten (siehe Beschreibung der Kontrollen unten) erforderlich.
5. Fügen Sie jedem Röhrchen 2–5 µl Annexin-V-AF-Lösung hinzu und inkubieren Sie diese für 10–15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln. Vor Licht schützen.
6. Geben Sie ohne vorheriges Waschen 400 µl 1x Bindungspuffer in jedes Röhrchen.
7. (Optional) Geben Sie 5 µl Propidiumiodid in jedes Röhrchen. Mischen Sie

vorsichtig und inkubieren Sie 5 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur.

Wichtig! Waschen Sie das Propidiumiodid nicht aus der Zellsuspension. Propidiumiodid muss während der Messung im Puffer bleiben.

- Die gefärbten Zellen sollten bis zur Analyse bei 2–8 °C dunkel Ort gelagert werden.

Wichtig! Die quantitative Analyse mittels Durchflusszytometrie oder Fluoreszenzmikroskopie muss innerhalb von 4 Stunden nach Beginn der Färbung ausgeführt werden (wegen der Beeinträchtigung der Zellaktivität durch Propidiumiodid).

Durchflusszytometrie

- Für die zytofluorimetrische Analyse der Apoptose und Nekrose ist die Herstellung foldender Kontrollproben erforderlich: ungefärbte Zellen (Negativkontrolle zur Gerätekalibrierung), nur mit Annexin-V-AF gefärbte Zellen und nur mit Propidiumiodid gefärbte Zellen (für die Kompensationseinstellungen).
- Analysieren Sie die Bindung von Annexin-V-AF 488 mit dem Fluoreszenzdetektor für FITC. / Analysieren Sie die Bindung von Annexin-V-AF 647 mit dem Fluoreszenzdetektor für Cy5/Alexa Fluor 647.
- Analysieren Sie die Propidiumiodid-Färbung mit dem Fluoreszenzdetektor für Phycoerythrin.

Fluoreszenzmikroskopie

- Geben Sie einen Tropfen der gefärbten Zellsuspension auf einen Objektträger. Decken Sie die Zellen mit einem Deckglas ab.
- Alternativ können adhärente Zellen direkt auf einem Deckglas gefärbt werden. Legen Sie dieses so auf einen Objektträger, dass sich die Zellen zwischen dem Objektträger und dem Deckglas befinden.
- (optional) Mit Annexin-V gefärbte Zellen können mit 1x Bindungspuffer gewaschen

und vor der Bildgebung in 2% Paraformaldehyd fixiert werden. Fixieren Sie die Zellen nicht vor der Inkubation mit Annexin-V-AF, da eine Beschädigung der Zellmembran die unspezifische Bindung von Annexin-V an PS auf der Innenseite der Zellmembran verursachen kann.

4. Zur Bildgebung am Fluoreszenzmikroskop eignen sich Filtersätze, die für FITC/Cy5 und Rhodamin.

Färbungsergebnis

- Frühe apoptotische Zellen, die Annexin-V-AF 488/AF 647 gebunden haben, weisen eine grün/dunkelrote Färbung in der Plasmamembran auf.
- Nekrotische Zellen sind rot gefärbt als Ergebnis des Eindringens von Propidiumiodid in die Zelle.
- Apoptotische Zellen mit beeinträchtigter Membranintegrität aufgrund sekundärer Nekrose sind rot gefärbt (Propidiumiodid) mit grüner/dunkelroter Plasmamembran (Annexin-V-AF 488/AF 647).
- Gesunde Zellen bleiben ungefärbt.

Referenzen

[1] Koopman G., Reutelingsperger C.P., Kuijten G.A., Keehnen R.M., Pals S.T., van Oers M.H. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*. 1994. 84(5). P.1415-20.

[2] Martin S.J., Reutelingsperger C.P., McGahon A.J., Rader J.A., van Schie R.C., LaFace D.M., Green D.R. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med*. 1995. 182(5). P.1545-56.







22.09.509-QM
Issued by INSPECT



www.lumiprobe.com

