



Handbuch für das Apoptose-Kit
zur Ermittlung des
Mitochondrien-Membranpotentials

Contents

Deutsch: Handbuch für das Apoptose-Kit zur Ermittlung des Mitochondrien-Membranpotentials	3-7
--	-----

Handbuch für das Apoptose-Kit zur Ermittlung des Mitochondrien-Membranpotentials

Das Mitochondrien-Membranpotential-Apoptose-Kit ist ein gebrauchsfertiges Kit zur schnellen und effizienten Analyse von zwei Apoptosemarkern: Externalisierung von Phosphatidylserin (mittels Annexin V-AF 488) und Veränderungen des mitochondrialen Membranpotentials (mittels LumiTracker® Mito Red CMXRos).

Annexin V (oder Annexin A5) gehört zur Familie der intrazellulären, Phospholipid-bindenden Annexine. Aufgrund seiner Fähigkeit, spezifisch an Phosphatidylserin (PS) zu binden, das in frühen Stadien der Apoptose von der inneren auf die äußere Seite der Plasmamembran transloziert, wird Annexin V häufig zur Identifizierung apoptotischer Zellen eingesetzt. Dieses Kit enthält rekombinantes Annexin V, konjugiert mit AF 488, einem hellen und photostabilen grünen Fluorophor mit spektralen Eigenschaften ähnlich denen von FITC.

LumiTracker® Mito Red CMXRos ist ein kationischer roter Fluoreszenzfarbstoff, der passiv durch die Plasmamembran diffundiert und sich abhängig vom mitochondrialen Membranpotential selektiv in aktiven Mitochondrien anreichert. Gesunde Zellen weisen ein hohes mitochondriales Membranpotential auf; dessen Abfall gilt als Marker eines frühen Apoptosestadiums.

Nach der Färbung mit Annexin V-AF 488 und LumiTracker® Mito Red CMXRos zeigen lebende Zellen eine schwache grüne und eine intensive rote Fluoreszenz, während apoptotische Zellen eine starke grüne und eine schwache rote Fluoreszenz aufweisen. Diese Zellpopulationen lassen sich mittels Durchflusszytometrie eindeutig unterscheiden. Beide Farbstoffe werden durch die 488-nm-Linie eines Argon-Ionen-Lasers angeregt.

Das Kit enthält alle notwendigen Reagenzien zur Markierung apoptotischer Zellen mit Annexin V-AF 488 sowie zur Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials mit LumiTracker® Mito Red CMXRos.

Bestandteile

Komponente	Anzahl
	21372
	50 assays
21515, Annexin V-AF 488-Konjugat, 5 ug	1
83215, Annexin-V-Bindungspuffer, 5×, 15 mL	1
15050, DMSO (Dimethylsulfoxid), Markierungsgüte, 1 mL	1
2251-50ug, LumiTracker® Mito Red CMXRos, 50 ug	3

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

Haltbarkeit: 9 Monate.

Vor Arbeitsbeginn

- Die üblicherweise eingesetzte Konzentration von LumiTracker® Mito Red CMXRos zur Zellfärbung liegt im Bereich von 25–500 nM. Die optimale Arbeitsverdünnung hängt vom Zelltyp und der Zelldichte ab und sollte experimentell bestimmt werden.
- Die empfohlenen Konzentrationen von Annexin V-AF betragen 2–10 µg/ml, abhängig von der untersuchten Zellkultur. Vor Beginn des Experiments sollten verschiedene Verdünnungen von Annexin V-AF getestet werden, um die optimale Konzentration zu ermitteln.

Wichtig! Annexin V kann nur als Apoptosemarker in Zellen mit intakter Plasmamembran verwendet werden. Ist die Plasmamembran permeabilisiert, bindet Annexin V an intrazelluläres Phosphatidylserin, was zu falsch-positiven Ergebnissen führt.

Vorbereitung der Reagenzien

1. Lösen Sie den Inhalt des Röhrchens mit lyophilisiertem **Annexin V-AF (21515)** in 250 µl deionisiertem Wasser.

Wichtig! Das verdünnte rekombinante Protein muss lichtgeschützt bei 2–8 °C gelagert werden. In Lösung ist das Konjugat bis zu einem Monat stabil. Für Langzeitexperimente wird empfohlen, Aliquots herzustellen und bei -20 °C zu lagern. Mehrfaches Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden!

2. Bereiten Sie das erforderliche Volumen an 1× Bindepuffer vor, indem Sie 1 Teil **5× Bindepuffer** mit 4 Teilen deionisiertem Wasser mischen.
3. Bereiten Sie eine 10 mM Stammlösung von LumiTracker® Mito Red CMXRos vor, indem Sie 9,4 µl **DMSO (15050)** zu dem Röhrchen mit **LumiTracker® Mito Red CMXRos (2251-50 µg)** hinzufügen. Nicht verwendete Anteile der Stammlösung können für bis zu 1 Monat bei ≤ -20 °C gelagert werden.
4. Bereiten Sie eine 10 µM Arbeitslösung von LumiTracker® Mito Red CMXRos vor, indem Sie 1 µl der 10 mM Stammlösung in 1000 µl Medium pipettieren.

Zellfärbung

1. Induzieren Sie die Apoptose in den Zellen mit der gewünschten Methode. Bereiten Sie eine Negativkontrolle vor, indem Sie Zellen ohne Induktionsmittel inkubieren. Bereiten Sie eine positive Nekrosekontrolle vor, indem Sie die Zellen 4 h bei 37 °C mit 2 mM Wasserstoffperoxid inkubieren.
2. Lösen Sie adhärente Zellen vorsichtig mithilfe einer geeigneten Methode von der Wachstumsoberfläche. Bei Suspensionszellen fahren Sie direkt mit dem nächsten Schritt fort.
3. Überführen Sie je 1 ml Zellsuspension (1×10^5 bis 1×10^6 Zellen/ml) in 1,5-ml-Mikrozentrifugenröhrchen. Für die Durchflusszytometrie sind zusätzlich Röhrchen mit geeigneten Kontrollen vorzubereiten: (1) ungefärbte Zellen (Negativkontrolle für die Geräteeinstellung); (2) nur mit Annexin V-AF gefärbte Zellen; (3) nur

mit LumiTracker® Mito Red CMXRos gefärbte Zellen (für die Kompensationseinstellung); sowie Röhrrchen (4) mit den experimentellen Zellen (doppelt gefärbt mit Annexin V-AF und LumiTracker® Mito Red CMXRos).

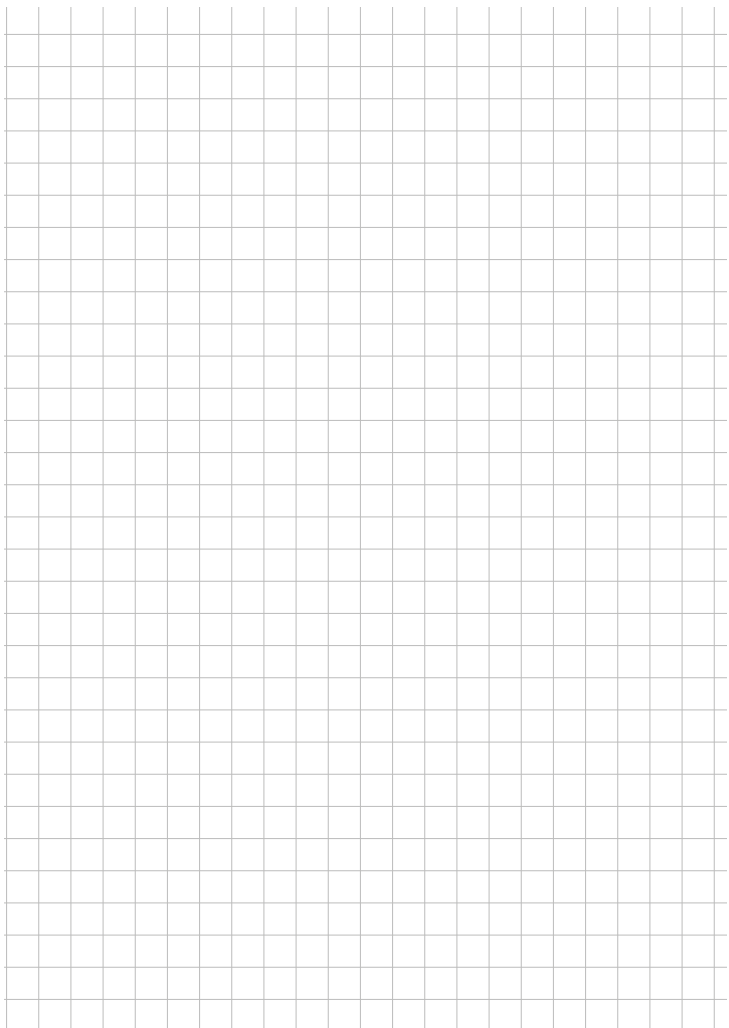
4. Fügen Sie 4 µl der 10 µM LumiTracker® Mito Red CMXRos-Arbeitslösung zu den Röhrrchen (3) und (4) hinzu und mischen Sie vorsichtig.
5. Inkubieren Sie die Zellen 15–45 Minuten lichtgeschützt unter für den jeweiligen Zelltyp geeigneten Bedingungen.
6. Waschen Sie die Zellen einmal mit kalter PBS (pH 7,4) und anschließend einmal mit 1× Bindepuffer.
7. Resuspendieren Sie die Zellen in 100 µl kaltem 1× Bindepuffer.
8. Fügen Sie 5–10 µl Annexin V-AF-Lösung hinzu und inkubieren Sie lichtgeschützt 10–15 Minuten bei Raumtemperatur.
9. Fügen Sie ohne vorheriges Waschen zu jedem Röhrrchen 400 µl 1× Bindepuffer hinzu.
10. Lagern Sie die gefärbten Zellen bis zur Analyse lichtgeschützt bei 2–8 °C.

Durchflusszytometrie

1. Für die durchflusszytometrische Analyse der Zellapoptose mittels Annexin V-AF und LumiTracker® Mito Red CMXRos sind zusätzlich zur Probenfärbung geeignete Kontrollansätze vorzubereiten (siehe oben).
2. Analysieren Sie die Bindung von Annexin V-AF 488 mithilfe des FITC-Signal-Detektors
3. Analysieren Sie die mit LumiTracker® Mito Red CMXRos gefärbten Zellen mithilfe eines Phycoerythrin-Signal-Detektors.
4. Für eine korrekte Trennung der Fluoreszenzsignale in den verschiedenen Detektionskanälen können separate Kompensationseinstellungen erforderlich sein.

Fluoreszenzmikroskopie

1. Geben Sie einen Tropfen der gefärbten Zellsuspension auf einen Objektträger. Bedecken Sie die Zellen mit einem Deckglas.
2. Alternativ können adhärente Zellen direkt auf dem Deckglas gefärbt werden. Nach der Färbung legen Sie das Deckglas mit der Zellsseite nach unten auf einen Objektträger, sodass sich die Zellen zwischen Objektträger und Deckglas befinden.
3. (*Optional*) Nach der Färbung und vor der Visualisierung können die Zellen mit $1\times$ Bindepuffer gewaschen und in einer 2%igen Paraformaldehyd-Lösung fixiert werden. Fixieren Sie Zellen nicht vor der Inkubation mit Annexin V-AF, da jede Schädigung der Zellmembran zu einer unspezifischen Bindung von Annexin V an PS auf der inneren Seite der Plasmamembran führen kann.
4. Untersuchen Sie die Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop mit einem geeigneten Filtersatz.







22.09.509-QM
Issued by INSPECT



www.lumiprobe.com

