



ApoFlowEx[®] FITC Kit

(100 tests / testů / testov)

Cat. No. / Kat. č.: ED7044

ENGLISH

1. Intended use

The ApoFlowEx[®] FITC Kit is intended for identification of early apoptotic, necrotic and viable cells.

2. Introduction

Apoptosis is a regulated cell death process characterized by morphological and biochemical features occurring at different stages. The translocation of phosphatidylserine (PS) from the inner side of the plasma membrane to the outer layer is one of many plasma membrane alterations during apoptosis. By this process PS becomes exposed on the external surface of the cell. Detection of such membrane changes by Annexin V binding to PS has been suggested as a suitable assay for early apoptotic cells.

3. Principle

Annexin V is a 35 kDa intracellular protein. It belongs to the family of proteins that bind to phosphatidylserine (PS) under a Ca²⁺-dependent conditions. Fluorescently labeled Annexin V can be applied, with appropriate buffer (Annexin V Binding Buffer), for direct quantification of apoptotic cells using suitable protocols.

Since PS membrane translocation also occurs during necrosis, Annexin V is not an absolute marker of apoptosis. It is often used simultaneously with appropriate viability evaluation dyes such as propidium iodide (PI) to counterstain dead cells. PI is an intercalating agent and a fluorescent molecule. When PI binds to nucleic acids, the fluorescence excitation maximum is 535 nm and the emission maximum is 617 nm.

Propidium iodide passes through the plasmatic membrane of late apoptotic cells and necrotic cells and bind to chromosomal DNA. Plasmatic membrane of viable and early apoptotic cells is impermeable for PI.

4. Precautions

- For laboratory research only, not for drug, diagnostic or other use.
- The flow cytometer should be calibrated on a routine basis using fluorescent microbeads to ensure stable sensitivity of detectors.
- Do not use reagents after expiration date stated on vial labels.
- Avoid contamination of the reagent.
- Avoid Annexin V – FITC (ED7044-1) prolonged exposure to light.

- Avoid Propidium Iodide (ED7044-2) prolonged exposure to light.
- Any non-performance of assay procedure may produce false results.

5. Reagents provided

- **ED7044-1 Annexin V-FITC** – 1 vial. 0.5 ml of Ready-to-Use solution. No reconstitution is necessary. Reagent is provided in stabilizing phosphate buffered saline (PBS) solution containing 15mM sodium azide. Sufficient for 100 tests.
- **ED7044-2 Propidium iodide** – 1 vial. 0.5 ml of Ready-to-Use solution in deionized water (0.1 mg/ml). Sufficient for 100 tests.
- **ED7044-3 Annexin V Binding Buffer (10x)** – 1 vial. 5 ml of 10x concentrated filter-sterilized solution (0.1M HEPES/NaOH, pH 7.4, 1.4M NaCl, 25mM CaCl₂). Dilute 10x in deionized water prior to use.

6. Necessary material not supplied

- Suitable 5 ml test tubes for cell staining (e.g. 12 × 75 mm)
- Ultrapure demineralized water
- PBS (*Phosphate Buffered Saline*)
- Automatic pipettes with disposable tips
- Vortex mixer
- Centrifuge with rotor suitable for test tubes
- Flow cytometer - blue laser excitation at 488 nm, light emission at 525 nm (FITC) and 617 nm (Propidium iodide)

7. Storage

Store the ApoFlowEx[®] FITC Kit in dark at 2-8 °C. Do not freeze. Avoid prolonged exposure to light. Do not use after expiration date stamped on vial label. Short-term exposure to room temperature should not affect the quality of the reagent. However, if the reagent should be stored under any conditions other than those specified, the conditions must be verified by the user. Expiration date is stated on a vial labels and on the box.

8. Assay procedure

Preparation of reagents before assay

1. The Annexin V Binding Buffer (10x) is a 10x concentrated and must be diluted with deionized water prior to use to prepare **1 x Annexin V Binding Buffer**. Use fresh solution for each experiment.

Assay procedure

1. Harvest cells intended for analysis by centrifugation (different cells may need different centrifugation conditions), discard supernatant. Resuspend cell pellet in cold PBS and wash cells by gentle shaking or by up-and-down mixing in a pipette tip. Re-centrifuge washed cells again and discard supernatant.
2. Resuspend cell pellet in **1 x Annexin V Binding Buffer** and adjust cell density to $2 - 5 \times 10^5$ cells/ml, preparing a sufficient volume of cell suspension (100 μ l per assay).
3. Add **5 μ l of Annexin V - FITC** and **5 μ l of Propidium iodide** to each 100 μ l of cell suspension and mix gently.
4. Incubate stained cells for 15 minutes in dark at room temperature.
5. After the incubation period, centrifuge cells and resuspend pellet in 100 μ l of **1 x Annexin V Binding Buffer** (or in an appropriate volume according to a method of sample acquisition)
6. Analyze the stained cells by flow cytometry as soon as possible.

9. Flow cytometric analysis

Analyze stained samples using flow cytometer. Acquire at least 5.000 – 10.000 cells per sample. Make compensation of fluorescent signals prior or after data acquisition if needed.

Visualize measured data from cells in the side-scatter (SSC) versus forward-scatter (FSC) dot-plot. Set the gate around cells as shown in figure 1. Then bring the gated cells to dot-plot diagram (shown in figure 2) where the X-axis represents fluorescence intensity in FITC channel (FL1) and Y-axis represents PI channel (FL4). Set appropriate gates to calculate the percentage of viable, apoptotic and necrotic cells. Apoptotic cells exhibit high intensity of fluorescence in FITC channel (histogram figure 3)

10. Interpretation of results

Evaluate the percentage of apoptotic cells according to fig. 2. Apoptotic cells exhibit high intensity of fluorescence in FITC channel. Necrotic and late apoptotic cells exhibit high intensity of fluorescence in FITC and PI channels.

1. Použití soupravy

Souprava ApoFlowEx® FITC Kit slouží k detekci časně apoptotických buněk a k oddělení apoptotických, nekrotických a živých buněk pomocí průtokové cytometrie.

2. Úvod

Apoptóza je regulovaná buněčná smrt charakterizovaná typickými morfologickými a biochemickými změnami buňky. Jedním z nich je translokace fosfatidylserinů (PS) z vnitřní strany plasmatické membrány na vnější stranu a jejich následná expozice na povrchu buňky. Pro detekci translokace PS lze využít fluorescenčně značený protein Annexin V, který se na povrchu buňky váže k PS vazbou závislou na přítomnosti Ca^{2+} iontů.

3. Princip

Annexin V je intracelulární protein o velikosti 35 kDa. Patří do skupiny proteinů, které se váží na fosfolipidy v přítomnosti Ca^{2+} iontů. Během apoptózy dochází k translokaci fosfatidylserinů z vnitřní strany plasmatické membrány na vnější stranu, kde jsou přístupné pro vazbu s Annexinem V.

Fluorescenčně značený Annexin V tedy slouží jako marker apoptotických buněk, na jejichž povrchu se váže na přítomný fosfatidylserin (PS).

Během buněčné nekrózy však dochází k porušení integrity buněčné membrány a PS, který se u živých buněk vyskytuje výhradně na vnitřní straně membrány, je i zde částečně zpřístupněn pro vazbu Annexinu V. Annexin V proto není absolutním markerem apoptózy.

Pro oddělení apoptotických a nekrotických buněk se současně s Annexinem V používají i jiné vhodné fluorochromy pro detekci viability, jako je například propidium iodid (PI). Toto interkalační činidlo a současně fluorescenční molekula prochází narušenou buněčnou membránou nekrotických buněk, zatímco membrána živých a časně apoptotických buněk je pro PI neprůchodná.

4. Upozornění

- Výrobek je určen pouze pro vědecké účely.
- Průtokový cytometr pravidelně kalibrujte pomocí fluorescenčních kuliček, aby byla zajištěna stabilní citlivost detektorů.
- Nepoužívejte reagentie po uplynutí doby použitelnosti.
- Reagencii Annexin V – FITC (ED7044-1) nevystavujte dlouhodobému působení světla.
- Reagencii Propidium Iodide (ED7044-2) nevystavujte dlouhodobému působení světla.
- Chraňte obsah vialek před kontaminací.
- Nedodržení doporučeného postupu analýzy může ovlivnit výsledky testů.
- Pracujte v ochranných rukavicích.

5. Obsah soupravy

- **ED7044-1 Annexin V-FITC** – 1 vialka, obsahuje 0,5 ml roztoku Annexin V – FITC rozpuštěného v PBS a 15mM azidu sodném. Množství dostačuje na 100 testů. Roztok určený přímo k použití.
- **ED7044-2 Propidium Iodide** – 1 vialka, obsahuje 0,5 ml roztoku propidium iodidu rozpuštěného v deionizované vodě. (koncentrace PI je 0,1 mg/ml). Množství dostačuje na 100 testů. Roztok určený přímo k použití.
- **ED7044-3 Annexin V Binding Buffer (10x)** – 1 lahvička, obsahuje 5 ml 10x koncentrovaného Annexin V Binding Buffer (0,1M HEPES/NaOH, pH 7,4, 1,4M NaCl, 25mM CaCl₂). Před použitím naředte 10 x v demineralizované vodě.

6. Potřebné vybavení a materiál, který není dodáván

- Vhodné 5 ml zkumavky pro barvení buněk (např. 12 x 75 mm)
- Ultračistá demineralizovaná voda
- Pufr PBS (*Phosphate Buffered Saline*)
- Sada automatických pipet s jednorázovými špičkami
- Vortex
- Centrifuga s rotorem pro příslušné zkumavky
- Průtokový cytometr - excitace modrým laserem 488 nm, emise záření při 525 nm (FITC) a při 617 nm (PI)

7. Skladování soupravy

Soupravu ApoFlowEx® FITC Kit skladujte při teplotě 2-8 °C. Doba použitelnosti je vyznačena na jednotlivých reagentcích i na krabici soupravy.

8. Postup testu

Příprava reagentcí před měřením

1. **Annexin V Binding Buffer (10x)** před použitím naředte 10 x v demineralizované vodě a připravte tak **1 x Annexin V Binding Buffer**. Pro každý experiment používejte čerstvě namíchaný roztok.

Postup testu

1. Promytí buněk určených k testování: Buněčnou kulturu centrifugujte, odstraňte supernatant a peletu resuspendujte v chlazeném pufru PBS.
2. Buněčnou kulturu opět centrifugujte a odstraňte supernatant.
3. Buněčnou peletu resuspendujte v **1x Annexin V Binding Buffer** tak, aby hustota buněk dosahovala přibližně 2 – 5 x 10⁵ buněk/ ml. Na 1 test je potřeba **100 µl** takto připravených buněk.
5. Do každé zkumavky (se 100 µl buněčné suspenze) přidejte **5µl Annexin V-FITC** a **5µl Propidium Iodide** a jemně promíchejte.
6. Nechte inkubovat 15 min. v temnu při laboratorní teplotě.
7. Po uplynutí inkubace buňky centrifugujte, odstraňte supernatant a peletu resuspendujte ve **100 µl 1x Annexin V Binding Buffer**.

8. Takto připravené vzorky analyzujte na průtokovém cytometru v co nejkratší možné době.

9. Analýza průtokovým cytometrem

Obarvené vzorky analyzujte průtokovým cytometrem, přičemž změřte minimálně 5 000 -10 000 událostí od každého vzorku. V případě nutnosti proveďte kompenzaci pro fluorochromy FITC a PI. Naměřená data jednotlivých vzorků zobrazte v grafu side-scatter (SSC) versus forward-scatter (FSC). Ohraničte populaci intaktních buněk, jak je znázorněno na obrázku č. 1. Poté zobrazte ohraničené buňky v diagramu Annexin V FITC (FL1) vs. PI (FL4) a rozdělte na kvadranty (viz obr 2). Vhodně umístěnými regiony (gate) spočítejte procentuální zastoupení živých, nekrotických a apoptotických buněk. Apoptotické buňky vykazují intenzivní fluorescenci v kanálu pro FITC (obr. 3).

10. Vyhodnocení výsledků

Vyhodnoťte procentuální zastoupení apoptotických buněk ve vzorku, jak je znázorněno na obrázku č. 2. Apoptotické buňky vykazují intenzivní fluorescenci v kanálu pro FITC. Pozdně apoptotické a nekrotické buňky vykazují intenzivní fluorescenci v kanálech pro FITC a pro PI.

1. Použitie súpravy

Súprava ApoFlowEx® FITC Kit slúži na detekciu včasne apoptotických buniek a na oddelenie apoptotických, nekrotických a živých buniek pomocou prietokovej cytometrie.

2. Úvod

Apoptóza je regulovaná bunečná smrť charakterizovaná typickými morfológickými a biochemickými zmenami bunky. Jednou z nich je translokácia fosfatidylserínov (PS) z vnútornej strany plazmatickej membrány na vonkajšiu stranu a ich následná expozícia na povrchu bunky. Na detekciu translokácie PS je možné využiť fluorescenčne označený proteín Annexin V, ktorý sa na povrchu bunky viaže na PS väzbou závislou na prítomnosti Ca^{2+} iónov.

3. Princíp

Annexin V je intracelulárny proteín s veľkosťou 35 kDa. Patrí do skupiny proteínov, ktoré sa viažu na fosfolipidy v prítomnosti Ca^{2+} iónov. V priebehu apoptózy dochádza k translokácii fosfatidylserínov z vnútornej strany plazmatickej membrány na vonkajšiu stranu, kde sú prístupné pre väzbu s Annexinom V. Fluorescenčne označený Annexin V slúži ako marker apoptotických buniek, na povrchu ktorých sa viaže na prítomný fosfatidylserín (PS).

U nekrotických buniek však dochádza k narušeniu integrity bunečnej membrány a PS, ktorý sa u živých buniek vyskytuje výhradne na vnútornej strane membrány, je v tomto prípade čiastočne sprístupnený pre väzbu s Annexinom V. Annexin V preto nie je absolútny marker apoptózy.

Na oddelenie apoptotických od nekrotických buniek sa súčasne s Annexinom V používajú aj vhodné fluorochromy stanovujúce viabilitu buniek, ako napríklad propidium iodid (PI). Toto interkalačné činidlo a súčasne fluorescenčná molekula prechádza narušenou bunkovou membránou nekrotických buniek, zatiaľ čo membrána živých a včasne apoptotických buniek je pre PI nepriechodná.

4. Upozornenie

- Výrobok je určený len na vedecké účely.
- Prietokový cytometer pravidelne kalibrujte pomocou fluorescenčných guľičiek, aby bola zaistená stabilná citlivosť detektorov.
- Nepoužívajte reagentie po uplynutí doby použiteľnosti.
- Reagenciu Annexin V – FITC (ED7044-1) nevystavujte dlhodobému pôsobeniu svetla.
- Reagenciu Propidium Iodide (ED7044-2) nevystavujte dlhodobému pôsobeniu svetla.
- Chráňte obsah fľaštičiek pred kontamináciou.
- Nedodržanie odporúčaného postupu analýzy môže ovplyvniť výsledky testov.
- Pracujte v ochranných rukaviciach.

5. Obsah súpravy

- **ED7044-1 Annexin V-FITC** – 1 fľaštička, obsahuje 0,5 ml roztoku Annexin V – FITC rozpusteného v PBS a 15mM azide sodnom. Množstvo postačuje na 100 testov. Roztok je pripravený na použitie.
- **ED7044-2 Propidium Iodid** – 1 fľaštička, obsahuje 0,5 ml roztoku propidium iodidu rozpusteného v demineralizovanej vode (koncentrácia PI je 0,1 mg/ml). Množstvo postačuje na 100 testov. Roztok je pripravený na použitie.
- **ED7044-3 Annexin V Binding Buffer (10x)** – 1 fľaštička, obsahuje 5 ml 10x koncentrovaného Annexin V Binding Buffer (0,1M HEPES/NaOH, pH 7,4, 1,4M NaCl, 25mM $CaCl_2$). Pred použitím roztok nariedte 10 x v demineralizovanej vode.

6. Potrebné vybavenie a materiál, ktorý nie je dodávaný

- Vhodné 5 ml skúmavky pre značenie buniek (napr. 12 × 75 mm)
- Ultračistá demineralizovaná voda
- Roztok PBS (*Phosphate Buffered Saline*)
- Sada automatických pipiet s jednorazovými špičkami
- Vortex
- Centrifúga s rotorom pre príslušné skúmavky
- Prietokový cytometer - excitácia modrým laserom 488 nm, detekcia fluorescencie pri 525 nm (FITC) a 617 nm (Propidium Iodid)

7. Skladovanie súpravy

Súpravu ApoFlowEx® FITC Kit skladujte pri teplote 2-8 °C. Doba použiteľnosti je vyznačená na jednotlivých reagentiách a na obale od súpravy.

8. Postup testu

Priprava reagentii pred meraním

1. Annexin V Binding Buffer (10x) pred použitím nariedte 10x v demineralizovanej vode a pripravte tak **1x Annexin V Binding Buffer**. Pri každom experimente používajte čerstvo nariedený roztok.

Postup testu

1. Premytie buniek určených na test: Bunečnú kultúru centrifugujte, odstráňte supernatant a pelet resuspendujte v chladenom roztoku PBS.
2. Bunečnú kultúru opäť centrifugujte a odstráňte supernatant.
3. Pelet buniek resuspendujte v **1x Annexin V Binding Buffer** tak, aby hustota buniek dosahovala približne 2 – 5 × 10⁵ buniek/ ml. Na 1 test je potrebných **100 µl** takto pripravených buniek.
4. Do každej skúmavky (so 100 µl bunečnej suspenzie) pridajte **5µl Annexin V-FITC** a **5µl Propidium Iodidu** a jemne ju premiešajte.
5. Nechajte skúmavky inkubovať 15 min. v temne pri laboratórnej teplote.

6. Po uplynutí inkubačnej doby bunky centrifugujte, odstráňte supernatant a pelet resuspendujte v **100 µl 1x Annexin V Binding Buffer**.
7. Takto pripravené vzorky analyzujte pomocou prietokového cytometru v čo najkratšej možnej dobe.

9. Analýza prietokovým cytometrom

Označené vzorky analyzujte prietokovým cytometrom a pre každú vzorku zaznamenajte minimálne 5 000 -10 000 udalostí. V prípade nutnosti kompenzujte fluorescencie v kanáloch pre fluorochromy FITC a PI. Dáta namerané z jednotlivých vzoriek vyobrazte do grafu side-scatter (SSC) proti forward-scatter (FSC). Ohraničte populáciu intaktných buniek tak, ako je to znázornené na obrázku č. 1. Potom zobrazte ohraničené bunky v diagrame Annexin V FITC (FL1) proti PI (FL4) a rozdeľte graf na kvadranty (viz obr 2). Vhodne umiestnenými regiónmi (gate) spočítajte percentuálne zastúpenie živých, nekrotických a apoptotických buniek. Apoptotické bunky vykazujú intenzívnu fluorescenciu v kanáli pre FITC (obr. 3).

10. Vyhodnotenie výsledkov

Vyhodnoťte percentuálne zastúpenie apoptotických buniek vo vzorke tak, ako je to znázornené na obrázku č. 2. Apoptotické bunky vykazujú intenzívnu fluorescenciu v kanáli pre FITC. Bunky v neskorom štádiu apoptózy a nekrotické bunky vykazujú intenzívnu fluorescenciu v kanáli pre FITC a aj v kanáli pre PI.

13. Example of data analysis / Vzorové vyhodnocení / Vzorové vyhodnotenie

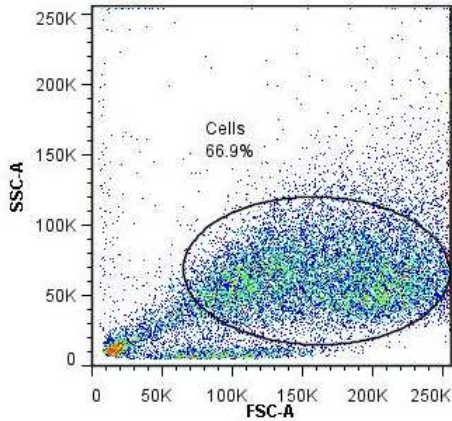


Fig. 1 Delimitation of cells.

Obr. 1 Ohraničení populace buněk.

Obr. 1 Ohraničenie populácie (analyzovaných) buniek

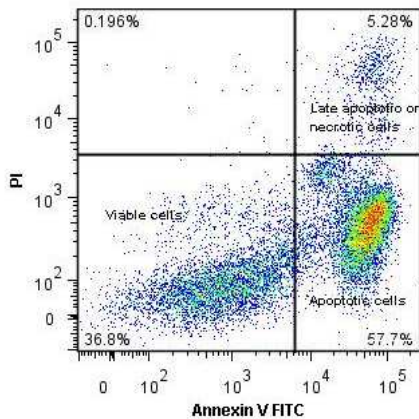


Fig. 2a Stained apoptotic cells (camptothecin treated)

Obr. 2a Značené apoptotické buňky (apoptóza indukovaná camptothecinem)

Obr. 2a Označené apoptotické buňky (apoptóza indukovaná camptothecinom)

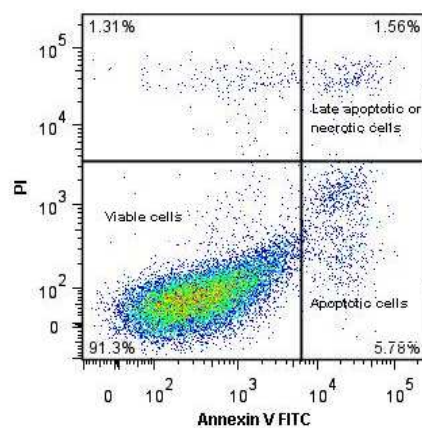


Fig. 2b Negative control – untreated and stained cells

Obr. 2b Negativní kontrola – neindukované značené buňky

Obr. 2b Negatívna kontrola - neindukované značené buňky

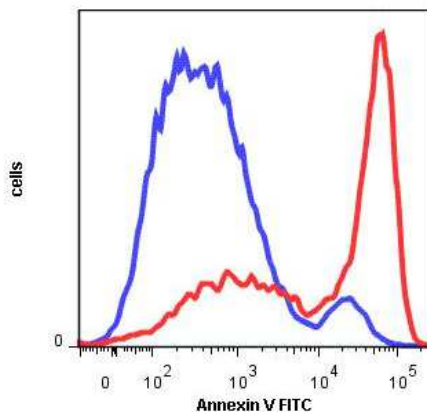


Fig. 3 Histogram of positive and negative cells.

Blue line – untreated and stained cells

Red line – CAMPTOTHECIN treated and stained cells

Obr. 3 Histogram populace negativních a pozitivních buněk.

Modrá křivka – neapoptotické značené buňky

Červená křivka – Značené apoptotické buňky (apoptóza indukovaná camptothecinem)

Obr. 3 Histogram populácie negatívnych a pozitívnych buniek.







Modrá krivka - neapoptotické označené buňky

Červená krivka - označené apoptotické buňky (apoptóza indukovaná camptothecinom)

15. References / Literatura / Literatúra

- 1) Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*. 1994; 84(5):1415-1420
- 2) Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*. 1995; 184(1):39-51
- 3) Zhang G, Gurtu V, Kain SR, Yan G. Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of annexin V. *Biotechniques*. 1997 Sep;23(3):525-31.

16. Explanation of symbols / Vysvětlení symbolů / Vysvetlenie symbolov

	Catalog number Katalogové číslo Katalógové číslo
	Manufacturer identification Výrobce Výrobca
	Consult the manual before use Viz návod k použití Vid' návod na použitie
	Store within temperature limits Rozmezí skladovacích teplot Rozmedzie skladovacích teplôt
	Batch code Číslo šarže
	Use by Použitelné do Použitelné do

17. Manufacturer / Výrobce / Výrobca

EXBIO Praha, a.s.
Nad Safinou II 341
252 42 Vestec, Czech Republic
Tel: +420 261 090 666
Fax: +420 261 090 660
E-mail: orders@exbio.cz
<http://www.exbio.cz>