

# AF488 Annexin V/PI

Набор для детекции апоптоза

Cat# SSK002

Количество: 50 тестов

Lot# 48-001

Хранить в защищенном  
от света месте при температуре 2-8 °C.  
Не замораживать.

*Данный продукт предназначен только для использования  
в исследовательских целях. Данный продукт не предназначен для  
терапевтических или диагностических процедур у людей и животных.*

## Инструкция к набору реагентов для детекции апоптоза



[www.sci-store.ru](http://www.sci-store.ru)

e-mail: [info@sci-store.ru](mailto:info@sci-store.ru)

+7 499 393 35 60

Cat# SSK002

## Набор для детекции апоптоза

При работе с различными клетками и индукторами апоптоза/некроза может потребоваться дополнительная оптимизация стандартного протокола.

### Состав набора (50 тестов)

- › 5X buffer – 2 x 10 мл
- › Propidium iodide (PI), 1мг/мл – 50 мкл
- › AF488 Annexin V – 250 мкл

### Не входит в набор

- › Индуктор апоптоза
- › Деионизованная вода
- › Фосфатно-солевой буфер, pH= 7.4
- › Лабораторный пластик

### Необходимое оборудование

1. Проточный цитофлуориметр. Рекомендуемые каналы:  $\lambda_{ex} = 488$  нм,  $\lambda_{em} = 530$  нм (AF488 Annexin V) и  $\lambda_{ex} = 561$  нм,  $\lambda_{em} = 610$  нм (PI).
2. Центрифуга

### Стандартный протокол

1. Индуцируйте апоптоз в клетках, выбранным методом. Подготовьте отрицательный контроль, инкубируя клетки в отсутствие индуктора.
2. Подготовьте 1X buffer. Например, для 10 анализов добавьте 2,5 мл 5X buffer к 10 мл деионизированной воды.
3. Подготовьте рабочий раствор Propidium iodide (PI) с концентрацией 100 мкг/мл, разбавив 5 мкл стока PI (1мг/мл) в 45 мкл 1X buffer. Неиспользованный остаток рабочего раствора можно хранить в темном месте при температуре 4°C для последующих экспериментов.
4. Соберите клетки после инкубации и промойте в холодном фосфатно-солевом буфере.



5. Осадите клетки центрифугированием, отбросьте супернатант и ресуспендируйте клетки в 1X buffer.

6. Посчитайте клетки и разведите в 1X buffer до  $\sim 1 \times 10^6$  клеток/мл. Отберите 100 мкл в отдельную пробирку.

7. Добавьте 5 мкл AF488 Annexin V и 1 мкл рабочего раствора PI 100 мкг/мл (подготовленного на шаге 3) к 100 мкл клеточной суспензии (шаг 6).

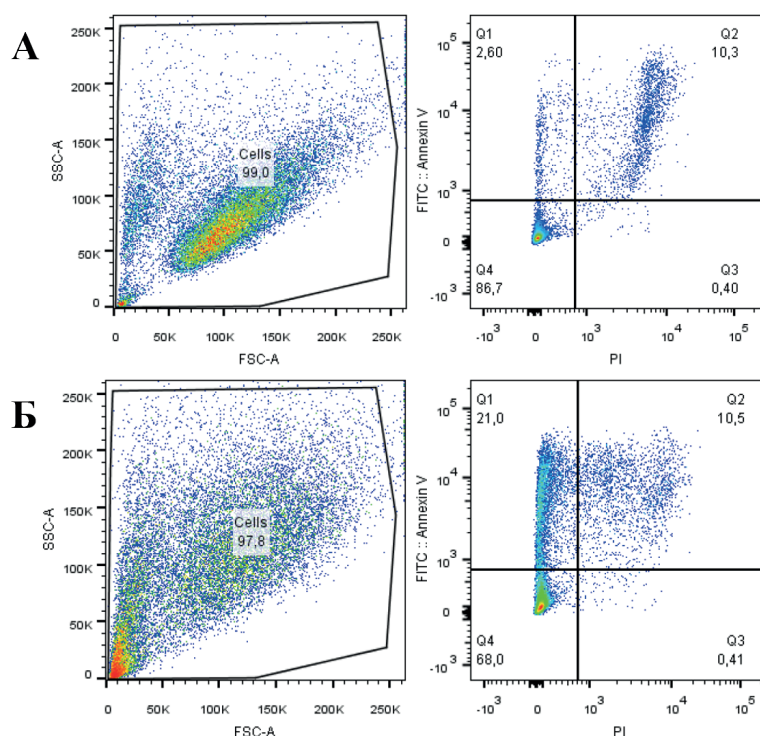
8. Инкубируйте клетки при комнатной температуре в течение 15 минут.

9. После инкубации добавьте 400 мкл 1X buffer, аккуратно перемешайте и храните образцы на льду.

10. Как можно скорее проанализируйте окрашенные клетки методом проточной цитометрии, детектируя эмиссию в канале 530 нм, при длине волны возбуждения 488 нм (AF488 Annexin V) и в канале 610 нм, при длине волны возбуждения 561 нм (PI). Допускается использование близких каналов, рекомендуемых производителем оборудования.

11. При необходимости, подтвердите результаты проточной цитометрии, рассмотрев клетки под флуоресцентным микроскопом с использованием фильтров, соответствующих флуоресцеину (FITC) и тетраметилродамину (TRITC) или красителю Texas Red™.

### Рекомендации по гейтированию



**Рисунок 1.** Фибробласты дермы человека (банк клеточных линий МГУ им. М.В. Ломоносова (номер коллекции MSU\_FB)), культивированные на DMEM с низким содержанием глюкозы, 10% фетальной бычьей сыворотки и 1% пенициллина-стрептомицина без добавления (А) или (В) с добавлением 100 мкг/мл блеомицина на 72 ч. Полученные образцы в виде суспензии клеток инкубировали в 1x buffer с добавлением 5 мкл AF488 Annexin V и 1 мкл (100 мкг/мл) PI на 100 мкл суспензии в соответствии с инструкцией. Анализ флуоресценции методом проточной цитофлуориметрии при длинах волн возбуждения 488 для AF488 (фильтр 530/30) и 561 для PI (фильтр 610/20). Данные получены на приборе BD FACS Aria III в Лаборатории репарации и регенерации тканей ИРМ МНОЦ МГУ им. М.В. Ломоносова.

При проведении эксперимента, необходимо 2 контрольных образца:

**Отрицательный контроль** – образец клеток, не обработанный индуктором апоптоза и исследуемыми веществами, но окрашенный AF488 Annexin V и PI аналогичным способом. Результаты измерения данного образца определяют положение гейтов (рис. 1А). При сборе образца на проточном цитофлуориметре, отрегулируйте настройки каналов таким образом, чтобы основная масса клеток оказалась в сегменте Q4 цитограммы AF488 Annexin V / PI. Отрицательный контроль может содержать некоторое количество клеток в состоянии апоптоза и некроза.

**Положительный контроль** – образец клеток, обработанный известным индуктором апоптоза, окрашенный AF488 Annexin V и PI. Результаты измерения данного образца необходимы для валидации метода (рис. 1Б). В зависимости от выбранной клеточной модели могут использоваться различные индукторы и концентрации.

