

ANEXINA V FITC

Kit Detección de apoptosis

Fluorocromo	Referencia	Test
FITC	ANXVKF-100T	100 test



Referencia	Línea de excitación (nm)	Pico Max. Excitación (nm)	Pico Max. Emisión (nm)	Banda paso filtro recomendada (nm)
ANXVF-200T	488 Blue Laser	495	519	530/30
PI	488,532,561 Blue Laser	351	617	585/42

INTRODUCCIÓN.

La apoptosis es un proceso de muerte celular regulada que se produce durante el desarrollo embrionario, así como en el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos. La desregulación de la apoptosis está implicada en diferentes estados de enfermedad, tales como las enfermedades neurodegenerativas y el cáncer. El proceso de la apoptosis se caracteriza por cambios morfológicos, incluyendo la pérdida de asimetría de la membrana plasmática, la descondensación del citoplasma y el núcleo, y la compactación y la fragmentación de la cromatina nuclear. En células normales y viables, existe una asimetría en la distribución de los fosfolípidos con colina, así fosfatidilcolina y esfingomiélin, abundan en la monocapa externa, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina (PS) y distintos fosfatidilinositoles se observan predominantemente en la monocapa interna hacia el citosol.

La exposición de PS en la superficie externa de la membrana celular se ha descrito en las células apoptóticas, esto ocurre en las primeras fases de la muerte celular apoptótica, durante la cual la membrana celular permanece intacta. En la apoptosis de leucocitos, la PS en la superficie externa de la célula, marca o identifica la célula para su reconocimiento y fagocitosis por parte de los macrófagos. El anticoagulante vascular humano, anexina V (35-36 kDa), es una proteína dependiente de Ca^{2+} para su unión con alta afinidad por la PS, mostrando una unión mínima a la fosfatidilcolina y esfingomiélin. Los cambios en la asimetría de PS, que se analizan mediante la medición de la unión de la anexina V a la membrana de la célula, se detectan antes de que se produzcan cambios morfológicos asociados con la apoptosis y antes de la pérdida de la integridad de la membrana. La Anexina V marcada con FITC (fluorescencia verde) puede identificar y cuantificar las células apoptóticas a nivel de célula.

El marcaje celular simultáneo con Anexina V FITC y yoduro de propidio (PI) colorante no vital (fluorescencia roja) permite (análisis bivariable) la discriminación de las células intactas (Anexina V-FITC negativo, negativo PI), células en apoptosis temprana (Anexina V-FITC positivo, PI negativo) y células en apoptosis o necrosis PI (Anexina V-FITC positivo, PI positivo).

MATERIALES

Anexina V-FITC, 100 determinaciones, recomendada para su uso en técnicas de citometría de flujo. El conjugado se suministra en formato líquido, PBS, pH 7,2.

Solución marcaje Yoduro de Propidio (PI). 100 test in PBS (pH 7,4)

Tampón de unión de Anexina V, 10 X, 50 ml. 0,1M Hepes/NaOH (pH 7,4) 1,4 M NaCl, 25 mM $CaCl_2$.

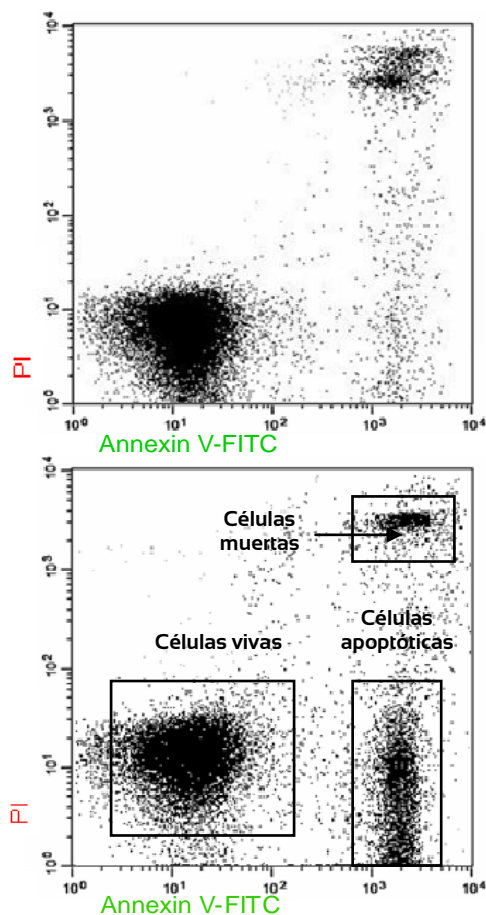


Figura 1. Células Jurkat (leucemia de células T, humano) tratamiento con 6 M de camptotecina durante cuatro horas (grafico de punto inferior) y sin tratar (gráfico de punto superior)

RECOMENDACIONES Y ADVERTENCIAS.

- a) Los reactivos contienen azida sódica. Bajo condiciones ácidas, se transforma en ácido hidrazónico, un compuesto extremadamente tóxico. Los compuestos de azida deben ser disueltos con agua corriente antes de ser desechados. Se recomiendan estas condiciones para evitar depósitos en las tuberías, donde se podrían desarrollar condiciones explosivas. La ficha de datos de seguridad (FDS) está disponible en la web www.immunostep.com

- b) Evitar contaminación microbiana del reactivo.
- c) Debe evitarse la exposición a la luz. Use luz tenue durante la manipulación, incubación con células y antes del análisis.
- d) No pipetear con la boca.
- e) En el caso de contacto con la piel lavar con abundante agua.
- f) Las muestras deben tratarse de la misma manera que aquellas que pudiesen transmitir infecciones. Debe disponerse de los métodos apropiados para su manejo.
- g) No usar después de la fecha de caducidad establecida en el vial.
- h) Desviaciones de los procedimientos recomendados podrían invalidar los resultados de los análisis.
- i) PARA DIAGNÓSTICO *IN VITRO*
- j) Sólo para uso profesional.
- k) Antes de adquirir las muestras se debe verificar que el citómetro de flujo está calibrado y compensado.

ALMACENAMIENTO

Almacenar en oscuridad a 2-8 °C. No utilizar después de la fecha de caducidad impresa en el vial. Si se observa un marcaje inesperado que no puede explicarse por variaciones en los procedimientos de laboratorio y se sospecha un problema con el producto, póngase en contacto con nuestro servicio técnico. tech@immunostep.com
NO CONGELAR. Proteger los conjugados fluorescentes de la luz.

PROTOCOLO DE MARCAJE CELULAR CON ANEXINA V FITC. CITÓMETRO DE FLUJO

1. Preparar Tampón de Unión: 10 mM Hepes/NaOH (pH 7,4) 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂.
2. Inducir la apoptosis en las células usando el método deseado. Preparar un control negativo no tratando las células, que se utilizará para definir el nivel basal de las células apoptóticas y necróticas o muertas.
3. Recolectar las células después de la inducción de la apoptosis y posterior lavado con solución salina tamponada con fosfato templada (PBS).
4. Lavar las células dos veces con PBS templado y volver a resuspender las células en Tampón de Unión Anexina – 1 X a una concentración de 1 x 10⁶ células/ml.
5. Añadir 5 µl de la anexina V-FITC y 5 µl de PI para una muestra de hasta 1x10⁵ células en 100 µl.
6. Se incuban las células a temperatura ambiente durante 15 minutos a temperatura ambiente (25°C) en la oscuridad.
7. Después de período de incubación, añadir 400 µl de tampón de unión Anexina - 1X. Analizar mediante citometría de flujo antes de una hora.

PROTOCOLO DE EJEMPLO PARA LA DETECCIÓN DE LA UNIÓN DE ANEXINA V EN LINFOCITOS SE SANGRE PERIFÉRICA DE APOPTOSIS

1. Las MN-Células (células mononucleares) han sido separados por Ficoll, a partir de sangre periférica.
2. Inducción de apoptosis en los leucocitos incubando con H₂O₂ 200µM durante 6 horas.

3. Recolectamos 1 millón de células después de la inducción de la apoptosis. Eliminar el sobrenadante por centrifugación.
4. Añadir 100uL de PBS y 20 ul de la CD19 APC (Ref CD19 APC - IMMUNOSTEP) e incubar 15 min.
5. Las células se lavan una vez con PBS templado y se resuspenden en 0,5 ml de 1 X Anexina-tampón de unión.
6. Añadir 5 µl de Anexina V-FITC y 5 µl de PI, para una muestra de hasta 1x10⁵ células en 100 µl.
7. Incubar las células durante 15 minutos a temperatura ambiente, y analizar por citometría de flujo.

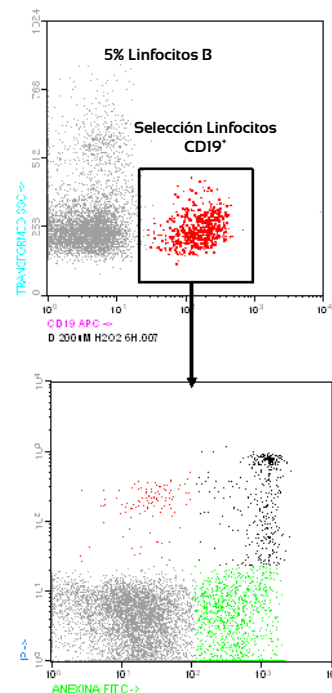


Figura 2. MN-Celulas Tretadas con H₂O₂ 200µM 6 horas.
Células vivas: 76%
Células apoptóticas: 16%
Células apoptóticas tardías o muertas: 6%
Necróticas Cells: 2%

CONTROLES PARA DETERMINAR LA COMPENSACIÓN DEL CITÓMETRO DE FLUJO Y LOS CUADRANTES

1. Células no marcadas.
2. Células marcadas con Anexina V-FITC (sin PI).
3. Células marcadas sólo con PI (sin Anexina V-FITC).

PRUEBAS DE RENDIMIENTO

Evaluación del funcionamiento con diferentes drogas inductoras de la apoptosis y en distintos tipos celulares:

A. Ensayo n°1

Tipo celular: HL-60 (Células de leucemia promielocítica humana).

Drogas:

- Citarabina (AraC)
- Camptotecina.
- Etoposido (VP-19)
- Metotrexato

Drogas	Cel. Apopt Media (%)	Cel. Apopt Max (%)	Cel. Apopt Min (%)	Des. Típica	n
AraC	27,59	31,62	25,74	2,16	6
Campotecina	44,70	48,23	40,51	2,67	6
VP-19	38,99	44,47	34,51	3,25	6
Metotrexato	2,38	2,96	2,00	0,38	6
No Tratadas	1,36	1,62	1,16	0,23	2

B. Ensayo n°2

Tipo celular: Jurkat (Linfoblastos de células T humanas)

Drogas:

- Citarabina (AraC)
- Camptotecina.
- Etoposido (VP-19)
- Metotrexato

Drogas	Cel. Apopt Media (%)	Cel. Apopt Max (%)	Cel. Apopt Min (%)	Des. Típica	n
AraC	4,87	5,45	4,20	0,49	6
Campotecina	25,62	27,95	23,88	1,81	25
VP-19	20,11	21,43	18,84	0,93	6
Metotrexato	2,18	2,82	1,80	0,34	6
No Tratadas	1,63	1,78	1,45	0,16	2

C. Ensayo n°3

Tipo celular: U266 (Línea celular de mieloma Humana)

Drogas: Zalypsis® a diferentes concentraciones de fármaco (5,10 y 50 nM) y tiempos de incubación (24, 48 horas).

Tiempo de incubación: 24 h

Concentración Zalypsis	%viables	%apoptóticas	%necróticas	n
Basal	68,84	24,19	5,82	1
5 nM	36,59	52,86	10,13	1
10 nM	12,82	76,53	10,62	1
50 nM	16,92	72,77	10,14	1

Tiempo de incubación: 48h

Concentración Zalypsis	%viables	%apoptóticas	%necróticas	n
Basal	77,17	16,41	2,86	1
5 nM	14,73	57,4	27,22	1
10 nM	6,34	62,08	30,21	1
50 nM	6,82	52,5	34,32	1

SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

- La ausencia de fluorescencia Anexina V-FITC: la apoptosis no fue inducida en las células.
- Elevado marcaje de Anexina V-FITC y/o PI: la apoptosis es un proceso continuo, por ello las células teñidas con Anexina V no deben mantenerse durante tiempos prolongados antes del análisis.
- Las células adherentes pueden ser recolectadas mediante el uso de tripsina. Las células tripsinizadas pueden ver afectada la integridad de la membrana plasmática⁵. En el caso de células adherentes una buena idea es eliminar el sobrenadante con células en suspensión y reemplazar el medio de cultivo antes de la adición de las drogas, o eliminar el medio de cultivo de las células, y utilizar sobre la superficie del frasco de cultivo IX PBS en frío (2-8 °C).
- Las células diana han sido marcadas con kit convencional Anexina V-FITC / PI y luego fijadas con PFA al 1% o metanol; que pueden dar una señal baja o "apagada". En este caso, probablemente, usted ha usado un excesiva dilución del tampón de unión, el método de fijación puede ser optimizado mediante el uso de la CaCl₂ 10 X en el tampón de unión a 25 mM (2,5 mM concentración final).

GARANTIA

Los productos de Immunostep tienen garantía en cuanto a la cantidad y el contenido indicado en la etiqueta del producto en el momento de la entrega al cliente. Immunostep renuncia a cualquier otra garantía. La responsabilidad de Immunostep se limita al remplazo de los productos o el reembolso del precio de compra.

REFERENCIAS

- D Herrero-Martín, D Osuna, JL Ordóñez, V Sevillano, AS Martins, C Mackintosh, M Campos, J Madoz-Gúrpide, AP Otero-Motta, G Caballero, AT Amaral, DH Wai, Y Braun, M Eisenacher, K-L Schaefer, C Poremba and E de Alava. Stable interferente of EWS-FLI1 in an Ewing sarcoma cell line impairs IGF-1/IGF-1R signalling and reveals TOPK as a new target. British Journal of Cancer (2009), I-II.

2. Koopman, G., Reutelingsperger, C. P., Kuijten, G. A. M., Keehnen, R. M. J., Pals, S. T., and van Oers, M. H. J. 1994. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 84: 1415.
3. Homburg, C. H., de Haas, M., von dem Borne, A. E., Verhoeven, A. J., Reutelingsperger, C. P., and Roos, D. 1995. Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis in vitro. *Blood* 85: 532.
4. Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., and Reutelingsperger, C. 1995. A novel assay for apoptosis - flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Meth.* 184: 39.
5. Fadok, V. A., Voelker, D. R., Campbell, P. A., Cohen, J. J., Bratton, D. L., and Henson, P. M. 1992. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol.* 148: 2207.
6. Darzynkiewicz Z, Bedner E, Traganos F. 2001. Difficulties and pitfalls in analysis of apoptosis. *Methods Cell Biol.* 2001;63:527-46.

FABRICADO POR:



Immunostep S.L

Avda. Universidad de Coimbra, s/n
Cancer Research Center (CIC)
Campus Miguel de Unamuno
37007 Salamanca (Spain)
Tel. (+34) 923 294 827
www.immunostep.com