



BrdUFlowEx[®] FITC Kit

(100 tests / testů / testov)

REF ED7073

ENGLISH

1. Manufacturer

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
www.exbio.cz

2. Intended use

The BrdUFlowEx[®] Kit is designed for labeling and subsequent immunodetection of proliferating cells by flow cytometry. The kit can be used to analyze proliferation of human or mouse leukocytes and variety of human and murine cell lines.

3. Introduction

There are in principle four techniques how to assess cellular proliferation: (I) measurement the level of DNA synthesis; (II) fluorescence dilution assays; (III) detection of unique proliferation specific cellular markers; and (IV) measurement of cell biochemical activity.

Among the mentioned methods the most reliable and accurate assay available today is to quantify the newly synthesized DNA by incorporation of labeled nucleosides or nucleoside analogues.

BrdUFlowEx[®] FITC Kit labels cellular DNA in proliferating cells with the use of thymidine analogue 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU). The labeling can be performed *in vitro* by adding BrdU to culture medium or *in vivo* by exposing experimental animals to BrdU via intraperitoneal injections or drinking water. Long time exposures (several hours to overnight) are used for experiments with identification of cycling versus non-cycling populations, whereas short time exposures allow analysis of cell cycle kinetics (so called pulse-chase experiments). Once BrdU is incorporated within the double stranded DNA helix, it is masked by the pairing bases and inaccessible to anti-BrdU antibodies. There are several ways to unmask incorporated BrdU. Either the cellular DNA is exposed to denaturing agents or DNA cleaving enzymes are used to remove the masking bases. Stretches of single stranded DNA with exposed BrdU are incubated with fluorescently labeled antibody. Often the test is performed as bivariate analysis of BrdU detection and DNA content. Some protocols allow simultaneous detection of surface and intracellular molecules together with BrdU detection.

4. Test principle

BrdUFlowEx[®] FITC Kit unmasking method relies on oxidative attack at the deoxyribose moiety of DNA strand by copper (I) in the presence of oxygen. The unmasking principle so called "atomic scissors" was successfully used to detect BrdU by immunocytochemistry (Ligasova et al., 2012). The atomic scissors reaction causes mild DNA damage and allows simultaneous detection of other cellular nuclear proteins that are usually lost during other BrdU unmasking methods (e.g. PCNA-1). The reaction requires considerable oxygen supply which is achieved by shaking the reaction mixture. Following the DNA scission the cells are stained with fluorescently labeled BrdU specific antibody (Liboska et al., 2012). Test can be performed as bivariate analysis of BrdU incorporation and DNA content. 7-AAD is provided to stain the DNA. It allows the user to analyze BrdU incorporation and to assess amount of cellular DNA according to the 7-AAD staining intensity (cells in G0/1, S and G2/M phase of the cell cycle).

The method is compatible with the use of additional fluorescently labeled antibodies against other cell surface or intracellular molecules together with BrdU detection. The provided protocol was optimized for test tubes and 96-well plates.

5. Precautions

- For laboratory research use only, not for drug, diagnostic or other use.
- Wear protective gloves.
- Do not use reagents after their expiration date.
- Avoid contamination of reagents.
- The flow cytometer should be calibrated on a routine basis using fluorescent microbeads to ensure stable sensitivity of detectors.
- Any deviation from the recommended procedure can affect the results.

Warning:

BrdU component (ED7073-8) contains lyophilized 5-bromo-2-deoxyuridine.



DANGER

H phrases

H340 May cause genetic defects
H361 Suspected of damaging fertility or the unborn child.

P phrases

P201 Obtain special instructions before use.

P281 Use personal protective equipment as required.
P308 + P313 IF exposed or concerned: Get medical advice/ attention.
P501 Dispose of contents/container to authorized facility for dangerous wastes.

Fix and Lysing Solution component (ED7073-1) contains diethylene glycole; methanol and formaldehyde.



DANGER

H phrases

H302+312+332 Harmful if swallowed, in contact with skin or if inhaled.
H315 Causes skin irritation.
H317 May cause an allergic skin reaction
H319 Causes serious eye irritation.
H335 May cause respiratory irritation.
H351 Suspected of causing cancer
H371 May cause damage to organs.
H373 May cause damage to organs (kidney) through prolonged or repeated exposure if swallowed.

P phrases

P270 Do not eat, drink or smoke when using this product.
P280 Wear protective gloves / protective clothing / eye protection / face protection.
P301+P312 IF SWALLOWED: Call a POISON Center or doctor/physician if you feel unwell.
P302+P352 IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.
P305+P351 + P338 IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

6. Reagents provided

- **ED7073-1 Fix and Lysing Solution**
1 vial containing 10x concentrated fixation and erythrocyte lysing solution, the vial is intended for 100 reactions.
- **ED7073-2 Permeabilizing Solution**, 1 vial containing 30 ml of ready-to-use cellular membrane permeabilizing solution, the vial is intended for 100 reactions.
- **ED7073-3 AS Solution 1** (the abbreviation AS stands for atomic scissors), 4 vials containing lyophilized sodium ascorbate, 1 vial is intended for 25 reactions.
- **ED7073-4 AS Solution 2** (the abbreviation AS stands for atomic scissors), 1 vial containing 10 ml of ready-to-use copper (II) solution, the vial is intended for 100 reactions.
- **ED7073-5 AS Solution 3** (the abbreviation AS stands for atomic scissors), 2 vials containing 30 ml of ready-to-use buffer, one vial is intended for 50 reactions.
- **ED7073-6 Anti-BrdU FITC**, 1 vial containing 1 ml of ready-to-use solution containing FITC labeled anti-BrdU antibody (clone MoBu-1, IgG1), the vial is intended for 100 reactions.
- **ED7073-7 7-AAD**, 1 vial containing 2 ml of ready-to-use 7-aminoactinomycin D solution, the vial is intended for 100 reactions.
- **ED7073-8 BrdU**, 4 vials containing lyophilized 5-bromo-2-deoxyuridine, 1 vial is intended to prepare 2 ml of 10 mM BrdU solution.

7. Necessary material not supplied

- Deionized water (dH₂O)
- PBS (phosphate buffered saline), see recipe on page 4.
- Test tubes (12 × 75 mm) or 96-well plates
- Rack for the test tubes
- Centrifuge
- Laboratory shaker
- Automatic pipettes with disposable tips
- Vortex
- Flow cytometer - blue laser excitation 488 nm, light emission at 525 nm (FITC channel) and 675 nm (PerCP channel).
- 50 ml polypropylene tubes or glass bottles for diluting and storing the 1x Fix and Lysing solution

8. Storage and expiration

Store the BrdU FlowEx® FITC Kit at 2-8 °C. Expiration date is stated on vial labels and on the box.

9. Preparation of reagents before assay

Fix and Lysing Solution

Dilute Fix and Lysing Solution ten times with deionized water, i.e. mix 1 part of the Fix and Lysing Solution with 9 parts of deionized water (e.g. 5 ml of Fix and Lysing Solution and 45 ml of dH₂O).

Unused diluted Fix and Lysing solution may be stored up to 4 weeks either at room temperature or at 2-8 °C.

AS Solution 1

Reconstitute the content of the vial in 4 ml of PBS. Unused reconstituted AS Solution 1 may be frozen and stored up to 3 months at -20 °C or lower. The solution can be thawed and refrozen repeatedly.

BrdU

Reconstitute the content of the vial in 2 ml of dH₂O. The reconstituted BrdU stock solution is in 10mM concentration (3.07 mg/ml).

Unused reconstituted BrdU solution may be frozen and stored up to 12 months at -20 °C or lower. The solution can be thawed and refrozen repeatedly.

10. BrdU labeling and detection procedure

- **BrdU labeling:**
Expose cells to BrdU by diluting the BrdU stock solution (10 mM) into the culture medium in final concentration ranging from 10-60 μM. The exact protocol depends on the experiment design (pulse, long time labeling).
- **Harvesting the cells**
 - a. **Cells grown in dishes or flasks:**
Bring the *cells growing attached* to plastic to suspension by trypsinization. If *cells are grown in suspension* proceed directly to the next step. Centrifuge the cells at 300 g for 10 min, discard supernatant.
Wash the cells by resuspending the pellet in 10 ml of PBS (room temperature), centrifuge at 300 g for 5-10 min and discard supernatant.

Resuspend the cells at $\sim 1 \times 10^7$ cells /ml of PBS.
Dispense 0.1 ml of the cell suspension to test tubes.

b. Cells grown in 96-well plates (cells in suspension):

Centrifuge the plate with cells at 300 g for 5 minutes at room temperature, discard supernatant.

Add 200 μ l PBS (room temperature), centrifuge the plate with cells at 300 g for 5 minutes, discard supernatant.

Resuspend the pellets in 20 μ l PBS.

c. Whole blood cultures

Add 20mM EDTA/PBS solution (not provided) to the whole blood cultures to final concentration 2 mM EDTA.

Incubate for 15 min at room temperature.

Mobilize the cells by vortexing/tapping the tube/flask and proceed to centrifugation step as with the cells grown in suspension (above).

• Staining the cellular surface antigens

Add fluorescent antibodies to the test tubes/wells containing the harvested cells and mix.

Incubate for 15-30 minutes according to the specific requirements.

Wash the cells by adding 2 ml PBS to tubes / 200 μ l PBS to wells in plates.

Centrifuge at 300 g for 5 minutes and discard the supernatant.

• BrdU detection

Two following protocols are optimized either for reactions performed in **test tubes** or **96-well plates**. The protocols differ in reagent volumes used in the procedure.

BrdU detection in test tubes

1. Add 1 ml of the diluted Fix and Lysing Solution to the tubes containing 0,1 ml of cell suspension and mix (i.e. use the diluted Fix and Lysing Solution in volume that is equal to ten volumes of the resuspended cells).
2. Incubate the mixture for 30 minutes at room temperature.
3. Wash the cells by adding 2 ml of PBS, centrifuge the cells at 500 g for 5 minutes at room temperature and discard supernatant.
4. Resuspend the cells in 0.3 ml of Permeabilizing Solution.
5. Incubate for 15 minutes at room temperature.
6. Wash the cells by adding 2 ml of PBS, centrifuge the tubes at 500 g for 5 minutes at room temperature and discard supernatant.
7. Add 0.1 ml of PBS.
8. Add 0.1 ml of AS Solution 1 and mix by gentle vortexing.
9. Add 0.1 ml of AS Solution 2.
10. Place the tubes on a shaker and incubate at 400 rpm for 10 minutes at room temperature.
11. Add 0.4 ml of AS Solution 3.
12. Incubate at 400 rpm for another 10 minutes at room temperature.

13. Wash the cells by adding 2 ml of PBS, centrifuge the tubes at 500 g for 5 minutes at room temperature and discard the supernatant.
14. Resuspend the pellet in 0.1 ml of AS Solution 3.
15. Add 10 μ l of Anti-BrdU FITC.
Add other fluorescently labeled antibodies against intracellular antigens and vortex gently.
16. Incubate for 30 minutes at room temperature protected from light.
17. Wash the cells by adding 2 ml of PBS, centrifuge the tubes at 500 g for 5 minutes at room temperature and discard the supernatant.
18. Resuspend the pellet in 0.2 ml of the diluted Fix and Lysing Solution.
19. Add 20 μ l of 7-AAD to stain cellular DNA (optional).
20. Incubate for 20 minutes at room temperature in the dark.
21. Measure with flow cytometer.

BrdU detection in 96-well plates

1. Add 200 μ l of the diluted Fix and Lysing Solution to well containing the resuspended cells (i.e. use the diluted Fix and Lysing Solution in volume that is equal to ten volumes of the resuspended cells).
2. Incubate the mixture for 30 minutes at room temperature.
3. Centrifuge the cells at 500 g for 5 minutes at room temperature. Discard supernatant.
Wash by adding 200 μ l of PBS. Centrifuge the cells at 500 g for 5 minutes at room temperature and discard supernatant.
4. Add 50 μ l of Permeabilizing Solution. Mix gently by tapping the plate several times.
5. Incubate for 15 minutes at room temperature.
6. Wash by adding 200 μ l of PBS. Centrifuge the cells at 500 g for 5 minutes at room temperature and discard supernatant.
7. Add 30 μ l of PBS.
8. Add 30 μ l of AS Solution 1.
9. Add 30 μ l of AS Solution 2.
10. Place the plate on a shaker and incubate at 400 rpm for 10 minutes at room temperature.
11. Add 150 μ l of AS Solution 3.
12. Incubate at 400 rpm for 10 minutes at room temperature.
13. Centrifuge the cells at 500 g for 5 minutes at room temperature. Discard the supernatant.
Wash by adding 200 μ l of PBS. Centrifuge the cells at 500 g for 5 minutes at room temperature and discard supernatant.
14. Add 50 μ l of AS Solution 3.
15. Add 5 μ l of Anti-BrdU FITC.
Add other fluorescently labeled antibodies to intracellular antigens and mix the content by tapping the plate.
16. Incubate at 300~400 rpm for 30 minutes at room temperature protected from light.
17. Wash by adding 200 μ l of PBS. Centrifuge the cells at 500 g for 5 minutes at room temperature and discard supernatant.
18. Resuspend the pellet in 200 μ l of the diluted Fix and Lysing Solution.

19. Add 20 μ l of 7-AAD to stain cellular DNA (optional).
20. Incubate for 20 minutes at room temperature in the dark.
21. Measure with flow cytometer.

11. Flow cytometric analysis

Bivariate analysis of DNA and BrdU

1. Adjust the PMT of SSC and FSC parameters so that the cell populations are on scale.
2. Set the PerCP channel to linear scale and adjust the PMT so that cell populations are on scale.
3. Adjust the PMT in FITC channel so that the negative populations fall into the lower third of the scale.
4. Acquire 10 000 – 20 000 events per sample.
5. Draw a gate around the target cell population (as shown in Figure 1).
6. Display the gated cells in FSC-Height versus FSC-Area and draw a diagonal gate that excludes doublets and aggregates (as shown in Figure 2).
7. Display singlets in FITC vs PerCP dot plot and draw gates around the G0/G1, S and G2/M populations, as shown in Figure 3. The subG1 population sometimes seen in cellular cultures represents the apoptotic cells.
8. Calculate the proportion of cells in each subpopulation.

12. Limitations of the assay

The method relies on unmasking of the incorporated BrdU by oxidative damage to DNA. Oxidation sensitive proteins such as R-Phycoerythrin and tandem conjugates of R-Phycoerythrin are affected as well. Therefore antibodies labeled with R-Phycoerythrin or with tandem conjugates of R-Phycoerythrin should only be used after the atomic scissors reaction, simultaneously with the Anti-BrdU FITC staining (step 15 of BrdU detection protocol).

13. Appendix

Recipe for PBS (other recipes may be used as well)

Dissolve:

- 8.0 g of Sodium Chloride (NaCl)
- 0.2 g of Potassium Chloride (KCl)
- 2.0 g of Potassium Phosphate monobasic (KH₂PO₄)
- 1.42 g of Sodium Phosphate dibasic (Na₂HPO₄·2H₂O)

in 800 ml of deionized H₂O.

Adjust the pH to 7.4 with HCl.

Add dH₂O to 1 liter.

Sterilize by autoclaving for 20 minutes at 15 psi or by filter sterilization.

Store at 2 - 8 °C.

1. Výrobce

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

www.exbio.cz

2. Použití soupravy

BrdUFlowEx® FITC Kit je určený pro značení proliferujících buněk a jejich následnou imunodetekci pomocí průtokové cytometrie. Pomocí kitu lze analyzovat proliferaci lidských a myších leukocytů anebo buněčných linií lidského a myšího původu.

3. Úvod

Principiálně lze rozlišovat čtyři metody, jak stanovit proliferaci buněk: (I) měřením úrovně syntézy DNA; (II) měřením úbytku fluorescenční značky; (III) detekcí proliferace specifických buněčných znaků a (IV) měřením buněčné biochemické aktivity.

Nejspolehlivější a nejpřesnější z výše uvedených v současnosti dostupných metod je měření množství nově syntetizované DNA skrze inkorporaci značených nukleosidů nebo nukleosidových analogů.

BrdUFlowEx® FITC Kit využívá pro označení buněčné DNA v proliferujících buňkách thymidinový analog 5-bromo-2-deoxyuridin (BrdU). Značení DNA lze provádět *in vitro* přidáním BrdU do kultivačního média anebo *in vivo* rozpuštěním BrdU do vody pro napájení experimentálních zvířat nebo intraperitoneální injekcí roztoku BrdU. Dlouhodobá expozice BrdU (několik hodin až dnů) se používá v experimentech s cílem odlišení proliferující a neproliferující populace buněk, naproti tomu krátkodobá expozice dovoluje podrobnější analýzu kinetiky buněčného cyklu (tzv. pulse-chase experimenty). Jakmile je BrdU inkorporován a zamaskován párujícími bazemi v dvoušroubovici DNA, stává se nepřístupným pro anti-BrdU protilátky. Používá se různých přístupů, jak inkorporovaný BrdU odhalit. Buď je buněčná DNA vystavena denaturujícím agens, která rozvolní dvoušroubovici, anebo jsou maskující báze odstraněny pomocí enzymů. Místa DNA s odhaleným BrdU jsou detekována fluorescenčně značenými protilátkami. Obvykle je test prováděn jako dvojparametrové měření, kdy se společně s detekcí BrdU měří i celkový obsah buněčné DNA. Některé postupy odhalení BrdU dovolují společně s měřením inkorporace BrdU i detekci dalších povrchových a intracelulárních molekul.

4. Princip testu

Metoda odhalení a detekce nukleosidového analogu BrdU pomocí BrdUFlowEx® FITC Kit spočívá v oxidačním narušení deoxyribózy v řetězci DNA pomocí iontů jednomocné mědi za přítomnosti kyslíku. Princip metody odhalení BrdU byl pojmenovaný "atomic scissors" a původně používaný pro mikroskopickou detekci BrdU (Ligasová et al., 2012). Reakce atomic scissors způsobuje

jmenné narušení DNA a dovoluje současně s BrdU i detekci buněčných jaderných proteinů, které jsou při použití ostatních metod odhalení BrdU nedetekovatelné (např. PCNA-1). Reakce je účinná pouze za dodávání kyslíku, čehož je dosaženo třepáním po celou dobu trvání reakce. Jakmile proběhne štěpení DNA, jsou buňky inkubovány s fluorescenčně značenou specifickou protilátkou proti BrdU (Liboska et al., 2012). Test může být prováděn jako dvojparametrové měření inkorporace BrdU a obsahu DNA. Pro obarvení DNA v buňkách je v kitu roztok 7-AAD. To dovoluje uživateli analyzovat signál inkorporovaného BrdU v závislosti na množství buněčné DNA, které je úměrné intenzitě nabarvení pomocí 7-AAD (buňky v G0/G1, S a G2/M fázi buněčného cyklu). Metoda je kompatibilní s imunodetekcí dalších povrchových a intracelulárních proteinů pomocí fluorescenčně značených protilátek. Postup detekce BrdU byl optimalizován pro provádění reakcí ve zkumavkách a v 96-ti jamkové destičce.

5. Upozornění

- Souprava je určena pouze pro výzkumné účely.
- Pracujte výhradně v ochranných rukavicích a při práci dodržujte správné postupy pro zacházení s potenciálně infekčním materiálem.
- Nepoužívejte reagenty po uplynutí doby použitelnosti.
- Chraňte obsah vialek před kontaminací.
- Průtokový cytometr pravidelně kalibrujte pomocí fluorescenčních kuliček, aby byla zajištěna stabilní citlivost detektorů.
- Nedodržení doporučeného postupu analýzy může ovlivnit výsledky testů.

Varování:

Komponenta **BrdU** (ED7073-8) obsahuje lyophilizovaný 5-bromo-2-deoxyuridin.



NEBEZPEČÍ

H věty

H340 Může vyvolat genetické poškození.
H361 Podezření na poškození reprodukční schopnosti nebo plodu v těle matky.

P věty

P201 Před použitím si obstarejte speciální instrukce.
P281 Používejte požadované osobní ochranné prostředky.
P308+313 PŘI expozici nebo podezření na ni: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.
P501 Odstraňte obsah/obal v autorizovaném místě sběru nebezpečných odpadů.

Komponenta **Fix and Lysing Solution** (ED7073-1) obsahuje diethylen glykol; methanol, formaldehyd.



NEBEZPEČÍ

H věty

H302+312+332 Zdraví škodlivý při požití, při styku s kůží a při vdechování
H315 Dráždí kůži.

H317 Může vyvolat alergickou kožní reakci.
H319 Způsobuje vážné podráždění očí.
H335 Může způsobit podráždění dýchacích cest.
H351 Podezření na vyvolání rakoviny.
H371 Může způsobit poškození orgánů.
H373 Může způsobit poškození ledvin při prodloužené nebo opakované expozici.

P věty

P270 Při používání tohoto výrobku nejezte, nepijte ani nekuřte.
P280 Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít.
P301+312 PŘI POŽITÍ: Necítíte-li se dobře, volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO nebo lékaře.
P302+352 PŘI STYKU S KŮŽÍ: Omyjte velkým množstvím vody a mýdlem.
P305+351+338 PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně vyplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, jsou-li nasazeny a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování.
P501 Odstraňte obsah/obal v autorizovaném místě sběru nebezpečných odpadů.

6. Obsah soupravy

- **ED7073-1 Fix and Lysing Solution**
1 vialka obsahující 10x koncentrovaný roztok fixačně-lyzačního činidla, vialka je určena pro 100 reakcí.
- **ED7073-2 Permeabilizing Solution**, 1 vialka obsahující 30 ml roztoku permeabilizačního činidla připraveného k použití, vialka je určena pro 100 reakcí.
- **ED7073-3 AS Solution 1** (AS je zkráceným vyjádřením pro atomic scissors), 4 kusy vialek obsahující lyofilizovaný askorbát sodný, 1 vialka je určena pro 25 reakcí.
- **ED7073-4 AS Solution 2** (AS je zkráceným vyjádřením pro atomic scissors), 1 vialka obsahující 10 ml roztoku měďnatých iontů, roztok je připravený k použití, vialka je určena pro 100 reakcí.
- **ED7073-5 AS Solution 3** (AS je zkráceným vyjádřením pro atomic scissors), 2 kusy vialek obsahující 30 ml roztoku připraveného k použití, 1 vialka je určena pro 50 reakcí.
- **ED7073-6 Anti-BrdU FITC**, 1 vialka obsahující 1 ml roztoku anti-BrdU protilátky označené fluoresceinem (klon MoBu-1, izotyp IgG1), roztok je připravený k použití, vialka je určena pro 100 reakcí.
- **ED7073-7 7-AAD**, 1 vialka obsahující 2 ml roztoku 7-aminoactinomycinu D, roztok je připravený k použití, vialka je určena pro 100 reakcí.
- **ED7073-8 BrdU**, 4 kusy vialek obsahující lyofilizovaný 5-bromo-2-deoxyuridin, 1 vialka je určena k přípravě 2 ml roztoku 10 mM BrdU.

7. Potřebné vybavení a materiál, který není dodáván

- Ultračistá demineralizovaná voda (dH₂O)
- Zkumavky (12 × 75 mm) nebo 96-ti jamková destička
- PBS (phosphate buffered saline), viz Appendix Příprava roztoku PBS na straně 7.
- Stojánek na zkumavky
- Centrifuga
- Laboratorní třepačka

- Sada automatických pipet s jednorázovými špičkami
- Vortex
- Průtokový cytometr - excitace modrým laserem 488 nm, emise záření při 525 nm (FITC) a při 675 nm (PerCP)
- 50 ml polypropylenové zkumavky nebo skleněné lahve pro naředění a skladování naředěného Fix and Lysing Solution.

8. Skladování soupravy

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

9. Příprava reagentců před měřením

Fix and Lysing Solution

Desetkrát naředte Fix and Lysing Solution demineralizovanou vodou, tj. smíchejte 1 díl koncentrovaného roztoku Fix and Lysing Solution a 9 dílů vody (např. 5 ml Fix and Lysing Solution a 45 ml dH₂O). Nespotřebované naředěné Fix and Lysing Solution je možné skladovat po dobu 4 týdnů při laboratorní teplotě nebo v lednici při 2-8 °C.

AS Solution 1

Obsah vialky rekonstituujte ve 4 ml PBS. Nespotřebovaný roztok je možné zamrazit a skladovat 3 měsíce při teplotě -20 °C nebo nižší. Roztok lze opakovaně rozmrazit a znovu zmrazit.

BrdU

Obsah vialky rekonstituujte ve 2 ml dH₂O, po rekonstituci je koncentrace BrdU v roztoku 10 mM (3,07 mg/ml). Nespotřebovaný roztok BrdU je možné zamrazit a skladovat 12 měsíců při teplotě -20 °C nebo nižší. Roztok lze opakovaně rozmrazit a znovu zmrazit.

10. Postup značení DNA a detekce BrdU

- **Značení DNA pomocí BrdU**
Naředte zásobní roztok BrdU (10 mM) do kultivačního media na konečnou koncentraci v rozsahu 10-60 μM. Přesné podmínky značení záleží na druhu experimentu (puls, dlouhodobá expozice).
- **Zpracování buněk**
 - a. Buňky pěstované na miskách nebo v kultivačních lahvích:
Adherentní buňky převedte do suspenze trypsinizací. Jestliže se jedná o **suspensní buňky**, přejděte rovnou k následujícímu kroku. Centrifugujte buňky při 300 g po dobu 10 min, odstraňte supernatant. Promyjte buňky resuspendováním sedimentu v 5-10 ml PBS (laboratorní teplota), centrifugujte při 300 g po dobu 5-10 min a odstraňte supernatant. Resuspendujte buňky v PBS na koncentraci ~ 1 × 10⁷ buněk/ml. Napipetujte 0,1 ml buněčné suspenze do zkumavek (12 x 75 mm).

- b. Buňky pěstované na 96-ti jamkové destičce (suspensní buňky)

Centrifugujte destičku s buňkami při 300 g po dobu 5 minut za laboratorní teploty a odstraňte supernatant.

Přidejte 200 μl PBS (laboratorní teplota), centrifugujte destičku s buňkami při 300 g po dobu 5 minut, odstraňte supernatant.

Resuspendujte sediment v 20 μl PBS.

- c. Plná krev

Přidejte ke kultuře roztok 20mM EDTA/PBS (není dodáván), aby byla konečná koncentrace EDTA 2 mM.

Nechte inkubovat 15 minut při laboratorní teplotě.

Uvolněte přisedlé buňky poklepáním na kultivační lahev nebo vortexováním kultivační zkumavky a dále postupujte jako by se jednalo o suspensní buňky.

- **Značení povrchových antigenů**

Přidejte do zkumavek/jamek obsahujících suspenzi buněk fluorescenčně značené protilátky a promíchejte obsah.

Nechte inkubovat 15-30 minut podle konkrétních instrukcí výrobce.

Promyjte buňky přidáním 2 ml PBS do zkumavek/ 200 μl PBS do jamek na destičce. Centrifugujte při 300 g po dobu 5 minut a odstraňte supernatant.

- **Detekce BrdU**

Následující dva protokoly jsou optimalizované pro provedení reakce **ve zkumavkách** anebo **v 96-ti jamkové destičce**. Protokoly se liší v objemech reagentců použitých během postupu.

Protokol pro detekci BrdU ve zkumavce

1. Přidejte 1ml naředěného Fix and Lysing Solution k 0,1 ml suspenze buněk a promíchejte (tj. použijte naředěné Fix and Lysing Solution v objemu, který je roven desetinásobku objemu suspenze buněk).
2. Nechte směs inkubovat 30 minut při laboratorní teplotě.
3. Promyjte buňky přidáním 2 ml PBS, centrifugujte při 500 g po dobu 5 minut a odstraňte supernatant.
4. Resuspendujte buňky v 0,3 ml Permeabilizing Solution.
5. Nechte inkubovat 15 minut při laboratorní teplotě.
6. Promyjte buňky přidáním 2 ml PBS, centrifugujte při 500 g po dobu 5 minut a odstraňte supernatant.
7. Přidejte 0,1 ml PBS.
8. Přidejte 0,1 ml AS Solution 1 a promíchejte obsah zkumavky na vortexu.
9. Přidejte 0,1 ml AS Solution 2.
10. Umístěte zkumavky ve stojánek na třepačku a nechte třepat při 400 rpm po dobu 10 minut při laboratorní teplotě.
11. Přidejte 0,4 ml AS Solution 3.
12. Nechte třepat při 400 rpm dalších 10 minut při laboratorní teplotě.

13. Promyjte buňky přidáním 2 ml PBS, centrifugujte při 500 g po dobu 5 minut a odstraňte supernatant.
14. Resuspendujte sediment v 0,1 ml AS Solution 3.
15. Přidejte 10 μ l Anti-BrdU FITC.
Přidejte další fluorescenčně značené protilátky proti intracelulárním antigenům a jemně promíchejte obsah na vortexu.
16. Nechte inkubovat 30 minut v temnu při laboratorní teplotě.
17. Promyjte buňky přidáním 2 ml PBS, centrifugujte při 500 g po dobu 5 minut a odstraňte supernatant.
18. Resuspendujte sediment v 0,2 ml naředěného Fix and Lysing Solution.
19. Přidejte 20 μ l 7-AAD kvůli obarvení buněčné DNA (volitelné).
20. Nechte inkubovat 20 minut v temnu při laboratorní teplotě.
21. Změřte v průtokovém cytometru.
17. Promyjte buňky přidáním 200 μ l PBS. Centrifugujte buňky při 500 g po dobu 5 minut při laboratorní teplotě a odstraňte supernatant.
18. Resuspendujte sediment v 200 μ l naředěného Fix and Lysing Solution.
19. Přidejte 20 μ l 7-AAD kvůli obarvení buněčné DNA (volitelné).
20. Nechte inkubovat 20 minut v temnu při laboratorní teplotě.
21. Změřte v průtokovém cytometru.

11. Analýza průtokovým cytometrem

Dvouparametrová analýza obsahu DNA a inkorporace BrdU

1. Upravte napětí v SSC a FSC parametrech, aby se buněčné populace vyskytovaly v zobrazovaném rozsahu os.
2. Nastavte kanál PerCP na lineární zobrazení a upravte napětí tak, aby byly buněčné populace v zobrazovaném rozsahu osy.
3. Upravte napětí v kanálu FITC tak, aby negativní populace byly zobrazeny do jedné třetiny maximálního zobrazovaného rozsahu osy.
4. Změřte 10 000 – 20 000 událostí od každého vzorku.
5. Vytvořte region ohraničující cílovou populaci buněk, jak je ukázáno v příkladu na obrázku č. 1.
6. Zobrazte ohraničenou populaci buněk v FSC-Height (Peak) proti FSC-Area (Integral) a diagonálním regionem ohraničujícím singlety odstraňte doublety a agregáty z další analýzy, jak je ukázáno v příkladu na obrázku č. 2.
7. Zobrazte ohraničené singlety v grafu FITC proti PerCP a vytvořte regiony okolo populací G0/G1, S a G2/M, jak je ukázáno v příkladu na obrázku č. 3. V některých případech je pozorovatelná také subG1 populace, která představuje apoptotické buňky.
8. Spočítejte poměrné zastoupení buněk v jednotlivých subpopulacích.

12. Omezení metody

Metoda je založena na odhalení inkorporovaného BrdU pomocí oxidačního poškození. Proteiny citlivé na oxidaci, jako je R-Phycoerythrin a tandemové konjugáty R-Phycoerythrinu, jsou během reakce také ovlivněny. Proto používejte protilátky označené R-Phycoerythrinem a tandemovými konjugáty R-Phycoerythrinu výhradně až po proběhnutí reakce atomic scissors společně s barvením pomocí Anti-BrdU FITC (krok č. 15 v protokolu pro detekci BrdU).

13. Appendix

Příprava roztoku PBS (je možné použít i jiné předpisy pro přípravu PBS)

Nechte rozpustit:

8.0 g NaCl

0.2 g KCl

2.0 g KH_2PO_4

1,42 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

v 800 ml of demineralizované vody.

Upravte pH na 7,4 pomocí HCl.

Doplňte dH_2O do 1 litru.

Protokol pro reakce v **96-jamkové destičce**

1. Přidejte k buňkám 200 μ l naředěného Fix and Lysing Solution (tj. používejte naředěné Fix and Lysing Solution v objemu, který je desetinásobkem objemu suspenze buněk).
2. Nechte inkubovat 30 minut při laboratorní teplotě.
3. Centrifugujte buňky při 500 g po dobu 5 minut při laboratorní teplotě. Odstraňte supernatant. Promyjte buňky přidáním 200 μ l PBS. Centrifugujte buňky při 500 g po dobu 5 minut při laboratorní teplotě a odstraňte supernatant.
4. Přidejte 50 μ l Permeabilizing Solution. Promíchejte obsah jamek poklepáním na destičku.
5. Nechte inkubovat 15 minut při laboratorní teplotě.
6. Promyjte buňky přidáním 200 μ l PBS. Centrifugujte buňky při 500 g po dobu 5 minut při laboratorní teplotě a odstraňte supernatant.
7. Přidejte 30 μ l PBS.
8. Přidejte 30 μ l AS Solution 1.
9. Přidejte 30 μ l AS Solution 2.
10. Umístěte destičku na třepačku a nechte třepat při 400 rpm po dobu 10 minut při laboratorní teplotě.
11. Přidejte 150 μ l AS Solution 3.
12. Nechte třepat při 400 rpm po dobu 10 minut při laboratorní teplotě.
13. Centrifugujte buňky při 500 g po dobu 5 minut při laboratorní teplotě. Odstraňte supernatant. Promyjte buňky přidáním 200 μ l PBS. Centrifugujte buňky při 500 g po dobu 5 minut při laboratorní teplotě a odstraňte supernatant.
14. Přidejte 50 μ l AS Solution 3.
15. Přidejte 5 μ l Anti-BrdU FITC.
Přidejte další fluorescenčně značené protilátky proti intracelulárním antigenům a jemně promíchejte obsah jamek poklepáním na destičku.
16. Inkubujte na třepačce při 300–400 rpm po dobu 30 minut v temnu při laboratorní teplotě.

Nechte sterilizovať autoklávním po dobu 20 minút pri 15 psi alebo sterilizujte filtráci.
Skladujte v lednici pri 2 - 8 °C.

SLOVENSKY

1. 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
www.exbio.cz

2. Použitie súpravy

BrdUFlowEx® Kit je určený pre značenie proliferujúcich buniek a ich následnú imunodetekciu pomocou prietokovej cytometrie. Pomocou kitu je možné analyzovať proliferáciu ľudských a myších leukocytov alebo bunkových línií ľudského a myšieho pôvodu.

3. Úvod

Principiálne je možné rozlíšiť štyri metódy, ako stanoviť proliferáciu buniek: (I) meraním úrovne syntézy DNA; (II) meraním úbytku fluorescenčnej značky; (III) detekciou proliferačne špecifických bunkových znakov a (IV) meraním bunkovej biochemickej aktivity.

Najspoľahlivejšie a najpresnejšie z vyššie uvedených v súčasnosti dostupných stanovení je meranie čerstvo syntetizovanej DNA prostredníctvom detekcie zainkorporovaných označených nukleozidov alebo nukleozidových analógov.

BrdUFlowEx® FITC Kit používa pre označenie bunkovej DNA v proliferujúcich bunkách thymidinový analóg 5-bróm-2-deoxyuridin (BrdU). Značenie možno vykonávať *in vitro* pridaním BrdU do kultivačného média alebo *in vivo* rozpustením BrdU do vody pre napájanie experimentálnych zvierat alebo intraperitoneálnou injekciou roztoku BrdU. Dlhodobá expozícia BrdU (niekoľko hodín až dní) sa používa v experimentoch, ktoré majú za cieľ odlišiť proliferujúcu a neproliferujúcu populáciu buniek, oproti tomu krátkodobá expozícia dovoľuje detailnejšiu analýzu kinetiky bunkového cyklu (tzv. pulse-chase experimenty). Akonáhle je BrdU inkorporovaný a zamaskovaný párujúcimi bázami v dvojzávitnici DNA, stáva sa neprístupný pre anti-BrdU protilátky. Používa sa niekoľko rôznych prístupov, ako inkorporovaný BrdU odhaliť. Buďto je bunková DNA vystavená denaturujúcim agens, ktoré rozvoľnia dvojzávitnicu, alebo sú maskujúce bázy odstránené enzymaticky. Miesta na DNA s odhaleným BrdU sú detekované fluorescenčne značenými protilátkami. Zvyčajne je test vykonávaný ako dvojparametrové meranie, kedy sa spolu s detekciou BrdU meria aj obsah bunkovej DNA. Niektoré postupy odhalenia BrdU dovoľujú súčasne s meraním inkorporácie BrdU aj detekciu ďalších povrchových a intracelulárnych molekúl.

4. Princíp testu

Metóda odhalenia a detekcie nukleozidového analógu BrdU pomocou BrdUFlowEx® FITC Kit spočíva v oxidačnom narušení deoxyribózy v reťazci DNA pomocou iónov jednomocnej medi za prítomnosti kyslíka. Princíp tejto metódy zvané "atomic scissors" bol pôvodne použitý pre mikroskopickú detekciu BrdU (Ligasová et al., 2012). Reakcia spôsobuje jemné narušenie DNA a dovoľuje súčasnú detekciu bunkových jadrových proteínov, ktoré sú pri použití ostatných metód odhalenia BrdU nezistiteľné (napr. PCNA-1). Reakcia je účinná iba pri zásobovaní kyslíkom, čoho je dosiahnuté trepaním po dobu trvania reakcie. Akonáhle prebehne štiepenie DNA, sú bunky inkubované s fluorescenčne značenou špecifickou protilátkou proti BrdU (Liboska et al., 2012). Ak je test vykonávaný ako dvojparametrové meranie, je pre odhad obsahu DNA v bunkách použitá farbička 7-AAD dodávaná v kite. To dovoľuje užívateľovi analyzovať signál inkorporovaného BrdU v závislosti na množstve bunkovej DNA, ktoré je úmerné intenzite značenia pomocou 7-AAD (odlišuje bunky v G0/G1, S a G2/M fáze bunkového cyklu). Detekcia BrdU pomocou BrdUFlowEx® FITC Kit je kompatibilná s imunodetekciou ďalších bunkových povrchových a intracelulárnych proteínov pomocou fluorescenčne značených protilátok. Postup bol optimalizovaný na vykonávanie reakcií v skúmavkách a v 96-jamkovej doštičke.

5. Upozornenie

- Súprava je určená len pre výskumné účely.
- Pracujte výhradne v ochranných rukaviciach a pri práci dodržujte správne postupy zaobchádzania s potenciálne infekčným materiálom.
- Nepoužívajte reagencie po uplynutí doby použiteľnosti.
- Chráňte obsah fľaštičiek pred kontamináciou.
- Prietokový cytometer pravidelne kalibrujte pomocou fluorescenčných guľčiek, aby bola zaistená stabilná citlivosť detektorov.
- Nedodržanie odporúčaného postupu analýzy môže ovplyvniť výsledky testov.

Varovanie:

Komponenta **BrdU** (ED7073-8) obsahuje lyofilizovaný 5-bromo-2-deoxyuridin.



NEBEZPEČENSTVO

H vety

H340 Môže spôsobiť genetické poškodenie.
H361 Podozrenie na poškodenie plodnosti alebo plodu v tele matky.

P vety

P201 Pred použitím sa oboznáňte s osobitnými pokynmi.
P281 Používajte predpísané osobné ochranné prostriedky.
P308+313 PO expozícii alebo podozrení z nej: Vyhľadajte lekársku pomoc/starostlivosť.
P501 Zneškodnite obsah/nádobu do autorizovaného miesta sberu nebezpečných odpadov.

Komponenta **Fix and Lysing Solution** (ED7073-1) obsahuje diethylglykol; metanol, formaldehyd.



NEBEZPEČENSTVO

H vety

H302+312+332 Zdraviu škodlivý po požití, pri kontakte s pokožkou, pri vdýchnutí.

H315 Dráždi kožu.

H317 Môže vyvolať alergickú kožnú reakciu.

H319 Spôsobuje vážne podráždenie očí.

H335 Môže spôsobiť podráždenie dýchacích ciest.

H351 Podozrenie, že spôsobuje rakovinu.

H371 Môže spôsobiť poškodenie orgánov.

H373 Môže spôsobiť poškodenie obličiek pri dlhšej alebo opakovanej expozícii.

P vety

P270 Pri používaní výrobku nejedzte, nepite ani nefajčite.

P280 Noste ochranné rukavice/ochranný odev/ochranné okuliare/ochranu tváre.

P301+312 PO POŽITÍ: Pri zdravotných problémoch, volajte NÁRODNÉ TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÉ CENTRUM alebo lekára.

P302+352 PRI KONTAKTE S POKOŽKOU: Umyte veľkým množstvom vody a mydla.

P305+351+338 PO ZASIAHNUTÍ OČÍ: Niekoľko minút ich opatrne vyplachujte vodou. Ak používate kontaktné šošovky a ak je to možné, odstráňte ich. Pokračujte vo vyplachovaní.

P501 Zneškodnite obsah/nádobu do autorizovaného miesta sberu nebezpečných odpadov.

6. Obsah súpravy

- **ED7073-1 Fix and Lysing Solution**
1 fľaštička s obsahom 10x koncentrovaného fixačne-lyzačného roztoku, fľaštička je určená pre 100 reakcií.
- **ED7073-2 Permeabilizing Solution**, 1 fľaštička s obsahom 30 ml roztoku permeabilizačného činidla pripraveného na použitie, fľaštička je určená pre 100 reakcií.
- **ED7073-3 AS Solution 1** (AS je skráteným vyjadrením pre atomic scissors), 4 kusy fľaštičiek obsahujúcich lyofilizovaný askorbát, 1 fľaštička je určená pre 25 reakcií.
- **ED7073-4 AS Solution 2** (AS je skráteným vyjadrením pre atomic scissors), 1 fľaštička s obsahom 10 ml roztoku meďnatých iónov, roztok je pripravený na použitie, fľaštička je určená pre 100 reakcií.
- **ED7073-5 AS Solution 3** (AS je skráteným vyjadrením pre atomic scissors), 2 kusy fľaštičiek obsahujúcich 30 ml roztoku pripraveného na použitie, 1 fľaštička je určená pre 50 reakcií.
- **ED7073-6 Anti-BrdU FITC**, 1 fľaštička s obsahom 1 ml roztoku anti-BrdU protilátky označenej fluoresceínom (klon MoBu-1, Izotyp IgG1), roztok je pripravený na použitie, fľaštička je určená pre 100 reakcií.
- **ED7073-7 7-AAD**, 1 fľaštička s obsahom 2 ml roztoku 7-aminoactinomycínu D, roztok je pripravený na použitie, fľaštička je určená pre 100 reakcií.
- **ED7073-8 BrdU**, 4 kusy fľaštičiek obsahujúcich lyofilizovaný 5-bromo-2-deoxyuridine, 1 fľaštička je určená k príprave 2 ml roztoku 10 mM BrdU.

7. Potrebné vybavenie a materiál, ktorý nie je dodávaný

- Ultračistá demineralizovaná voda (dH₂O)
- Skúmavky (12 x 75 mm) alebo 96-jamková doštička
- PBS (phosphate buffered saline), viď Appendix Príprava roztoku PBS na strane 10.
- Stojan na skúmavky
- Centrifúga
- Laboratórna trepačka
- Sada automatických pipiet s jednorázovými špičkami
- Vortex
- Prietokový cytometer - excitácia modrým laserom 488 nm, emisia žiarenia pri 525 nm (FITC) a pri 675 nm (PerCP)
- 50 ml polypropylénové skúmavky alebo sklenené fľaše na nariadenie a skladovanie 1x Fix and Lysing solution

8. Skladovanie súpravy

BrdU FlowEx® FITC Kit skladujte pri teplote 2-8 °C. Doba použiteľnosti je vyznačená na jednotlivých reagenčiach aj na krabici súpravy.

9. Príprava reagencií pred meraním

Fix and Lysing Solution

Fix and Lysing Solution nariedte desaťkrát do demineralizovanej vody, tzn. zmiešajte 1 diel koncentrovaného roztoku Fix and Lysing Solution a 9 dielov vody (napr. 5 ml Fix and Lysing Solution a 45 ml dH₂O).

Nespotrebované nariadené Fix and Lysing Solution je možné skladovať po dobu 4 týždňov pri laboratórnej teplote alebo v chladničke pri 2-8 °C.

AS Solution 1

Obsah fľaštičky rozpustíte v 4 ml PBS.

Nepoužitý roztok je možné zamraziť a skladovať 3 mesiace pri teplote -20 °C alebo nižšej. Roztok je možné opakovane rozmraziť a znovu zmraziť.

BrdU

Obsah fľaštičky rekonstituujte v 2 ml dH₂O, po rozpustení je koncentrácia BrdU v roztoku 10 mM (3,07 mg / ml).

Nepoužitý roztok BrdU je možné zmraziť a skladovať 12 mesiacov pri teplote -20 °C alebo nižšej. Roztok možno opakovane rozmraziť a znovu zmraziť.

10. Postup značenia DNA a detekcie BrdU

- **Značenie DNA pomocou BrdU**
Zriedte zásobný roztok BrdU (10 mM) do kultivačného média na konečnú koncentráciu v rozsahu 10-60 μM. Presné podmienky značenia závisia od druhu experimentu (pulz, dlhodobá expozícia).
- **Spracovanie buniek**
 - a. Bunky pestované na miskách alebo v kultivačných fľašiach:
Adherentné bunky prevedte do suspenzie trypsinizáciou. Ak sa jedná o **suspenzné bunky**, prejdite rovno k nasledujúcejmu kroku. Centrifugujte bunky pri 300 g po dobu 10 min, odstráňte supernatant.

Opláchnite bunky resuspendovaním sedimentu v 5-10 ml PBS (laboratórna teplota), centrifugujte pri 300 g po dobu 5-10 min a odstráňte supernatant.

Resuspendujte bunky v PBS na koncentráciu ~ 1×10^7 buniek/ml.

Pipetujte 0,1 ml bunkovej suspenzie do skúmaviek (12 x 75 mm).

b. Bunky pestované v 96-jamkovej doštičke (suspenzné bunky):

Centrifugujte doštičku s bunkami pri 300 g po dobu 5 minút pri laboratórnej teplote a odstráňte supernatant.

Pridajte 200 μ l PBS (laboratórna teplota), centrifugujte doštičku s bunkami pri 300 g po dobu 5 minút, odstráňte supernatant.

Resuspendujte sediment v 20 μ l PBS.

c. Plná krv

Ku kultúre pridajte roztok 20mM EDTA/PBS (nie je dodávaný), aby bola konečná koncentrácia EDTA 2 mM.

Inkubujte 15 minút pri laboratórnej teplote.

Uvoľnite prisadnuté bunky poklepaním na kultivačnú fľašu alebo vortexovaním kultivačnej skúmavky a ďalej postupujte ako by sa jednalo o suspenzné bunky.

• Značenie povrchových antigénov

Do skúmaviek/jamiek obsahujúcich suspenziu buniek pridajte fluorescenčne značené protilátky a premiešajte obsah.

Inkubujte 15-30 minút podľa konkrétnych inštrukcií výrobcu.

Opláchnite bunky pridaním 2 ml PBS do skúmaviek/200 μ l PBS do jamiek na doštičke. Centrifugujte pri 300 g po dobu 5 minút a odstráňte supernatant.

Detekcia BrdU

Nasledujúce dva protokoly sú optimalizované pre vykonanie reakcie v **skúmavkách** alebo v **96-jamkovej doštičke**. Protokoly sa líšia v objemoch reagencií používaných počas postupu.

Protokol pre detekciu BrdU v **skúmavke**

1. Pridajte 1ml nariedeného Fix and Lysing Solution k 0,1 ml suspenzie buniek a premiešajte (tj. používajte nariedené Fix and Lysing Solution v objeme, ktorý je desaťnásobkom objemu suspenzie buniek).
2. Inkubujte zmes 30 minút pri laboratórnej teplote.
3. Opláchnite bunky pridaním 2 ml PBS, centrifugujte pri 300 g po dobu 5 minút a odstráňte supernatant.
4. Resuspendujte bunky v 0,3 ml Permeabilizing Solution.
5. Inkubujte 15 minút pri laboratórnej teplote.
6. Opláchnite bunky pridaním 2 ml PBS, centrifugujte pri 300 g po dobu 5 minút a odstráňte supernatant.
7. Pridajte 0,1 ml PBS.
8. Pridajte 0,1 ml AS Solution 1 a premiešajte obsah skúmavky na vortexe.
9. Pridajte 0,1 ml AS Solution 2.

10. Umiestnite skúmavky v stojane na trepačku a nechajte trepať pri 400 rpm počas 10 minút pri laboratórnej teplote.
11. Pridajte 0,4 ml AS Solution 3.
12. Nechajte trepať pri 400 rpm počas ďalších 10 minút pri laboratórnej teplote.
13. Opláchnite bunky pridaním 2 ml PBS, centrifugujte pri 500 g po dobu 5 minút a odstráňte supernatant.
14. Resuspendujte sediment v 0,1 ml AS Solution 3.
15. Pridajte 10 μ l Anti-BrdU FITC.
Pridajte ďalšie fluorescenčne značené protilátky proti intracelulárnym antigénom a jemne premiešajte obsah na vortexe.
16. Inkubujte 30 minút v tme pri laboratórnej teplote.
17. Opláchnite bunky pridaním 2 ml PBS, centrifugujte pri 500 g po dobu 5 minút a odstráňte supernatant.
18. Resuspendujte sediment v 0,2 ml nariedeného Fix and Lysing Solution.
19. Pridajte 20 μ l 7-AAD kvôli naznačeniu bunkovej DNA (voliteľné).
20. Inkubujte 20 minút v tme pri laboratórnej teplote.
21. Analyzujte pomocou prietokového cytometru.

Protokol pre detekciu BrdU v **96-jamkovej doštičke**

1. K bunkám pridajte 200 μ l nariedeného Fix and Lysing Solution (tj. používajte nariedené Fix and Lysing Solution v objeme, ktorý je desaťnásobkom objemu suspenzie buniek).
2. Inkubujte 30 minút pri laboratórnej teplote.
3. Centrifugujte bunky pri 500 g po dobu 5 minút pri laboratórnej teplote. Odstráňte supernatant. Opláchnite bunky pridaním 200 μ l PBS. Centrifugujte bunky pri 500 g po dobu 5 minút pri laboratórnej teplote a odstráňte supernatant.
4. Pridajte 50 μ l Permeabilizing Solution. Premiešajte obsah jamiek poklepaním na doštičku.
5. Inkubujte 15 minút pri laboratórnej teplote.
6. Opláchnite bunky pridaním 200 μ l PBS. Centrifugujte bunky pri 500 g po dobu 5 minút pri laboratórnej teplote a odstráňte supernatant.
7. Pridajte 30 μ l PBS.
8. Pridajte 30 μ l AS Solution 1.
9. Pridajte 30 μ l AS Solution 2.
10. Umiestíte doštičku na trepačku a nechajte trepať pri 400 rpm počas 10 minút pri laboratórnej teplote.
11. Pridajte 150 μ l AS Solution 3.
12. Nechajte trepať pri 400 rpm počas 10 minút pri laboratórnej teplote.
13. Centrifugujte bunky pri 500 g počas 5 minút pri laboratórnej teplote. Odstráňte supernatant. Opláchnite bunky pridaním 200 μ l PBS. Centrifugujte bunky pri 500 g po dobu 5 minút pri laboratórnej teplote a odstráňte supernatant.
14. Pridajte 50 μ l AS Solution 3.
15. Pridajte 5 μ l Anti-BrdU FITC.
Pridajte ďalšie fluorescenčne značené protilátky proti intracelulárnym antigénom a jemne premiešajte obsah jamiek poklepaním na doštičku.
16. Inkubujte na trepačke pri 300-400 rpm počas 30 minút v temnu pri laboratórnej teplote.

17. Opláchnite bunky pridaním 200 μ l PBS. Centrifugujte bunky pri 500 g po dobu 5 minút pri laboratórnej teplote a odstráňte supernatant.
18. Resuspendujte sediment v 200 μ l nariedeneho Fix and Lysing Solution.
19. Pridajte 20 μ l 7-AAD kvôli označeniu bunkovej DNA (voliteľné).
20. Inkubujte 20 minút v temnu pri laboratórnej teplote.
21. Analyzujte pomocou prietokového cytometru.

Doplňte dH₂O do 1 litra.

Nechajte sterilizovať v autokláve po dobu 20 minút pri 15 psi alebo sterilizujte filtráciou.

Skladujte v chladničke pri 2-8 °C.

11. Analýza prietokovým cytometrom

Dvojparametrová analýza obsahu DNA a inkorporácie BrdU

1. Upravte napätie pre SSC a FSC parametre tak, aby boli bunkové populácie v zobrazovanom rozsahu osí.
2. Nastavte kanál PerCP na lineárne zobrazenie signálu a upravte napätie tak, aby boli bunkové populácie v zobrazovanom rozsahu osí.
3. Upravte napätie v kanáli FITC tak, aby negatívne populácie boli zobrazené do jednej tretiny maximálneho zobrazeného rozsahu osí.
4. Analyzujte 10 000 – 20 000 udalostí z každej vzorky.
5. Vytvorte región ohraničujúci cieľovú populáciu buniek, ako je to znázornené v príklade na obrázku č. 1.
6. Zobrazte ohraničenú populáciu buniek v dot-plote FSC-Height (Peak) proti FSC-Area (Integral) a diagonálnym regiónom ohraničujúcim singlety odstráňte dublety a agregáty z ďalšej analýzy, ako je to znázornené v príklade na obrázku č. 2.
7. Zobrazte ohraničené singlety v dot-plote FITC oproti PerCP a vytvorte regióny okolo populácií G0/G1, S a G2/M, ako je to znázornené na príklade na obrázku č. 3. V niektorých prípadoch je pozorovateľná tiež subG1 populácia, ktorá predstavuje apoptotické bunky.
8. Spočítajte pomerné zastúpenie buniek v jednotlivých subpopuláciách.

12. Obmedzenia metódy

Metóda je založená na odhalení inkorporovaného BrdU pomocou oxidačného poškodenia. Proteíny citlivé na oxidáciu, ako je R-Phycoerythrin a tandemové konjugáty R-Phycoerythrinu, sú počas reakcie tiež poškodené. Preto používajte protilátky označené R-Phycoerythrinom a tandemovými konjugátmi R-Phycoerythrinu výhradne až po prebehnutí reakcie atomic scissors spoločne s farbením pomocou Anti-BrdU FITC (krok č. 15 v protokole pre detekciu BrdU).

13. Appendix

Príprava roztoku PBS (je možné použiť aj iné predpisy pre prípravu PBS)

Nechajte rozpustiť:

8.0 g NaCl

0.2 g KCl

2.0 g KH₂PO₄

1,42 g Na₂HPO₄·2H₂O

v 800 ml demineralizovanej vody.

Upravte pH na 7,4 pomocou HCl.

14. Example of data / Vzorové vyhodnocení / Vzorové vyhodnotenie

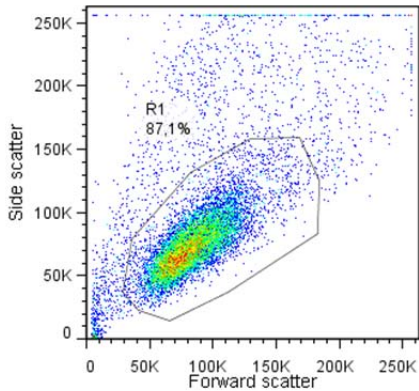


Fig. 1 Side scatter (SSC) vs forward scatter (FSC) dot-plot depicting the region (R1) that delimits the target cell population (Jurkat cells).

Obr. 1 Zobrazení side scatter (SSC) vs forward scatter (FSC) ukazující region (R1) ohraničující cílovou populaci buněk (buňky Jurkat).

Obr. 1 Zobrazenie side scatter (SSC) vs forward scatter (FSC) ukazujúce región (R1) ohraničujúci cieľovú populáciu buniek (bunky Jurkat).

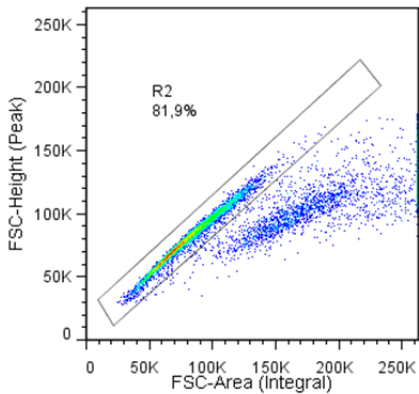


Fig. 2 FSC-Height (Peak) vs FSC-Area (Integral) dot-plot of the gated target cell population depicting the diagonal region (R2) that delimits singlets.

Obr. 2 Zobrazení FSC-Height (Peak) vs FSC-Area (Integral) s diagonálně položeným regionem (R2) ohraničujícím singlety.

Obr. 2 Zobrazenie FSC-Height (Peak) vs FSC-Area (Integral) s diagonálne položeným regiónom (R2) ohraničujúcim singlety.

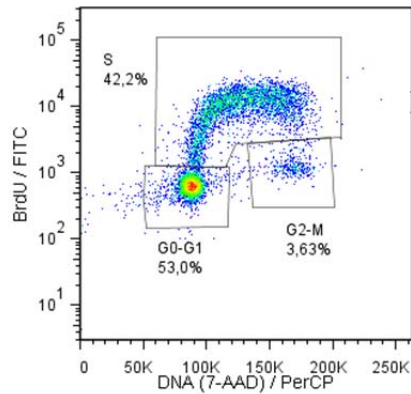


Fig. 3 Jurkat cells incubated with 10 μ M BrdU for 1 hour. FITC (BrdU signal) vs PerCP (7-AAD signal) dot-plot of the gated singlets shows BrdU incorporation in relation to the 7-AAD signal. 7-AAD signal is proportional to the cellular DNA content (G1/G0, G2/M and S phase gates).

Obr. 3 Buňky Jurkat inkubované po dobu 1 hodiny v mediu s 10 μ M BrdU. Zobrazení singletů v grafu FITC (signal BrdU) vs PerCP (signal 7-AAD) ukazuje vztah mezi inkorporací BrdU a signálem 7-AAD. Signál 7-AAD je přímo úměrný obsahu DNA v buňce (regiony pro G1/G0, G2/M a S fáze).




Obr. 3 Bunky Jurkat inkubované po dobu 1 hodiny v mediu s 10 μ M BrdU. Zobrazenie singletov v grafe FITC (signal BrdU) vs PerCP (signal 7-AAD) ukazuje vzťah medzi inkorporáciou BrdU a signálom 7-AAD. Signál 7-AAD je priamo úmerný obsahu DNA v bunke (regióny pre G1/G0, G2/M a S fázy).

15. References / Literatura/ Literatúra

Ligasova A, Strunin D, Liboska R, Rosenberg I, Koberna K. Atomic scissors: a new method of tracking the 5-bromo-2'-deoxyuridine-labeled DNA in situ. PLoS One. 2012;7(12)

Liboska R, Ligasová A, Strunin D, Rosenberg I, Koberna K. Most anti-BrdU antibodies react with 2'-deoxy-5-ethynyluridine -- the method for the effective suppression of this cross-reactivity. PLoS One. 2012;7(12)

16. Explanation of symbols / Vysvětlení symbolů / Vysvetlenie symbolov

REF	Catalog number Katalogové číslo Katalógové číslo
	Manufacturer identification Výrobce Výrobca
 2 °C	Store within temperature limits Rozmezí skladovacích teplot Rozmedzie skladovacích teplôt
LOT	Batch code Číslo šarže
	Use by Použitelné do Použitelné do