

INTRACELL

Kit de Fijación y Permeabilización para Citometría de Flujo

Referencia	Tamaño
INTRA-50T	50 Test
INTRA-100T	100 Test
INTRA-200T	200 Test
INTRA-500T	500 Test



INTRODUCCIÓN

Se han ideado técnicas para el marcaje de antígenos intracelulares, a fin de que los anticuerpos puedan difundir en el interior de las células y acceder a los antígenos intracelulares. En pocas palabras, las células son fijadas con formol para preservar su morfología, y saponina, un detergente suave no iónico proveniente de una planta, se utiliza para generar poros de aproximadamente 8nm en la membrana de la célula por los cuales pueden atravesar moléculas de hasta un máximo de 200 kDa. Debido a la lenta difusión hacia dentro y hacia fuera de la célula, se hace necesario un protocolo de marcaje y varios lavados, la preparación de anticuerpos debe de ser de gran calidad, y el anticuerpo debe de estar correctamente titulado para reducir el marcaje inespecífico de fondo. Otros tratamientos pueden ser utilizados. Para la tinción de ácidos nucleicos, la fijación y la permeabilización con el alcohol y/o ácido acético reduce la degradación del ARN y ADN. Las células también pueden ser marcadas con anticuerpos frente a antígenos de superficie celular para un análisis multiparamétrico.

IntraCell está destinado a la fijación y permeabilización de células en suspensión para el análisis por citometría de flujo.

Estudios inmunológicos de detección de antígenos en las estructuras intracelulares como citoplasmáticas y / o enzimas nucleares, exigen la permeabilización de la membrana celular, a fin de permitir la interacción específica de los anticuerpos con su diana prevista. Con el fin de preservar la integridad celular después de permeabilización, es obligatorio un paso de fijación con enlaces cruzados o desnaturalización. Normalmente, esto se logra por un aldehído o alcohol fijación seguida de un detergente permeabilizante de la membrana celular.

El marcaje de antígenos de superficie con anticuerpos es posible antes del paso de fijación, permitiendo de manera simultánea el fenotipaje de los antígenos de superficie con la detección de la expresión de antígenos internos en un análisis de citometría multiparamétrico.

IntraCell está desarrollado para su uso con todos los citómetros y reactivos, manteniendo intacta la expresión de los antígenos de superficie y las propiedades FSC y SSC de la célula.

MATERIAL SUMINISTRADO

Solución de fijación

Solución de permeabilización

MATERIAL NO SUMINISTRADO

Solución de trabajo PBS. 1X solución salina tamponada (PBS) + 0,1 NaN3 + 4% BSA.

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.

PROTOCOLO DE PREPARACIÓN DE LA MUESTRA Y MARCAJE INTRACELULAR

1. Pipetear 50 µl de la suspensión celular a analizar (hasta 10⁶ células) en cada tubo.
2. Para cada muestra, añadir el volumen apropiado de anticuerpo conjugado dirigido contra el antígeno de superficie de interés y el control isotópico apropiado. Incubar 15 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. (Este paso sólo es necesario si se desea realizar un marcaje tinción de inmunofluorescencia directa para un antígeno de superficie celular).
3. Añadir 100 µl de la Solución A de IntraCell (Fijación), a cada tubo. Mezclar suavemente.
4. Incubar 15 minutos a temperatura ambiente.
5. Lavar una vez con 2 ml de la solución trabajo 1X PBS.

6. Centrifugar a 300xg, durante 5 minutos, después aspirar el sobrenadante, dejando aproximadamente 50 µl de fluido, resuspender las células, asegurando que el pellet celular esta en suspensión.
7. Añadir 100 µl de la Solución B de IntraCell permeabilización), en cada tubo. Añadir el volumen apropiado del anticuerpo conjugado específico del antígeno intracelular y del control isotópico apropiado.
8. Incubar 15 minutos en oscuridad y temperatura ambiente.
9. Lavar una vez con 2 ml de la solución de trabajo IX PBS. Centrifugar a 300xg, durante 5 minutos, después aspirar el sobrenadante, dejando aproximadamente 50 µl de fluido, resuspender las células, asegurando que el pellet celular esta en suspensión.
10. Resuspender el pellet celular en 0,5 ml de una solución 1% de paraformaldehído o en una solución apropiada para adquisición en el citómetro y almacenar en oscuridad entre 2-8 °C. Las células fijadas deben de ser analizadas dentro de las siguientes 24 horas.

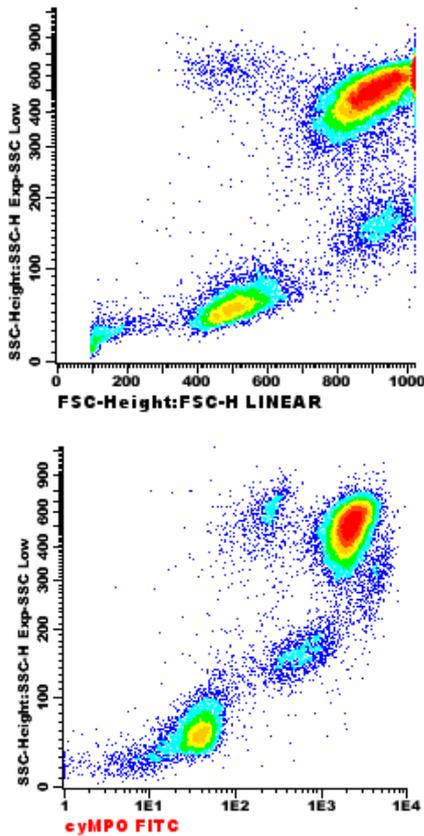


Figura1. Forward (FSC) frente side (SSC) scatter de una muestra de sangre periférica normal.

MARCADORES Y PROTEINAS INTRACELULARES EVALUADAS

Enzimas	Mieloperoxidasa, Carboxipeptidasa, Granzima B ³ , Perforina ³
Moléculas CD citoplasmáticas	CD3, CD13, CD22, CD62P, CD63, CD68, CD79a
Marcadores de proliferación nuclear	BrdU, Ki-67 ⁷ , PCNA, TdT
Oncoproteínas	Bcl-2, c-Myc, p53 ⁹
Citoqueratinas	CK19 ⁶
Caspasas	CASP3 ⁸
Citocinas y quimiocinas	IFN-γ, TNF-α, IL1-β, IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IL-13, IL-16, RANTES
Inmunoglobulinas	IgA, IgG, IgD, IgM, kappa, lambda
Otras moléculas	ZAP-70, ciclinas, células transfectadas, parásitos intracelulares ^{4,5,7} , Lamina A/C ⁷ , MDR (resistencia a múltiples fármacos) ¹

SENSIBILIDAD

La calidad de cada lote de IntraCell es determinada por la fijación y permeabilización de varias muestras de sangre periférica de donantes sanos con algunos de los marcadores mencionados anteriormente y la correspondiente comparación de las características de tamaño y complejidad de la preparación de leucocitos procesada.

SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

- a. La mayoría de los anticuerpos conjugados son adecuadas para su uso junto con IntraCell. Sin embargo, hay algunos determinantes antigénicos que son sensibles a la fijación con formaldehído. Un tiempo de fijación o una concentración de formaldehído deben de ser optimizados para cada anticuerpo conjugado.
- b. El Reactivos de fijación/permeabilización (INTRACELL) contiene formaldehído y sus propiedades de entrecruzamiento no permiten la extracción de ARN.
- c. En el procedimiento de marcaje, se debe prestar especial atención a los tiempos de incubación.

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

1. Castalta-Lopes J. et al. Efflux Pumps Modulation in Colorectal Adenocarcinoma Cell Lines: The Role of Nuclear Medicine. *Journal of Cancer Therapy*. Vol.2 No.3(2011), Article ID:6693.
2. Brito AF. Et al. Hepatocellular Carcinoma and Chemotherapy: The Role of p53. *Chemotherapy* 2012;58:381–386.
3. Alba Fernández-Sánchez, et al. DNA demethylation and histone H3K9 acetylation determine the active transcription of the NKG2D gene in human CD8+ T and NK cells. *Epigenetics*. 2013 Jan 1; 8(1): 66–78.
4. Nieves Ayllón, et al. *Anaplasma phagocytophilum* Inhibits Apoptosis and Promotes Cytoskeleton Rearrangement for Infection of Tick Cells. *Infect Immun*. 2013 Jul; 81(7): 2415–2425.
5. Victoria Naranjo, et al. Reciprocal Regulation of NF- κ B (Relish) and Subolesin in the Tick Vector, *Ixodes scapularis*. *PLoS One*. 2013; 8(6): e65915.
6. Ángela Santoro, et al. Relationship between CK19 expression, deregulation of normal keratinocyte differentiation pattern and high risk-human papilloma virus infection in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Infect Agent Cancer*. 2015; 10: 46.
7. Margarita Villar, et al. Identification and Characterization of *Anaplasma phagocytophilum* Proteins Involved in Infection of the Tick Vector, *Ixodes scapularis*. *PLoS One*. 2015; 10(9): e0137237.
8. José Mendes, et al. L744,832 and Everolimus Induce Cytotoxic and Cytostatic Effects in Non-Hodgkin Lymphoma Cells. *Pathology & Oncology Research*, April 2016, Volume 22, Issue 2, pp 301-309.
9. Rocío Navarro, et al. Role of nucleotide binding oligomerization domain 1 (NOD1) in pericyte mediated vascular inflammation. *J Cell Mol Med*. 2016 May; 20(5): 980–986.

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