

IncuCyte™ pHrodo® Red Cell Labeling Kit for Phagocytosis

Presentation, storage and stability

Phagocytosis 실험에 사용되는 IncuCyte™ pHrodo® Red Cell Labeling Kit 는 5×10^7 개의 target cell 을 labeling 하기에 충분한 양이 제공됩니다. IncuCyte pHrodo Red Cell Labeling Dye 는 동결건조된 고체 상태로 제공되며, -20°C 에서 6 개월 간 보관할 수 있습니다. 용해한 후에는 최대한 빨리 사용해야 하며, -20°C 에서 1 달 정도 보관할 수 있습니다. 제공되는 kit 에는 동결건조되어 있는 dye 를 용해하기에 충분한 DMSO 가 포함되어 있으며, cell 을 washing 하고 labeling 하는 buffer 도 포함되어 있습니다.

Background and intended use

IncuCyte pHrodo Red Cell Labeling Dye 는 cell 을 pH-sensitive fluorophore 로 labeling 하는 시약입니다. 이 같은 방법으로 labeling 된 cell 은 phagocytosis 를 관찰하는 데에 적합합니다.

: essenbioscience.com/phagocytosis

pHrodo®를 기반으로 한 system 은 phagosome 의 산성 환경을 이용하여 phagocytosis 를 정량화할 수 있습니다. IncuCyte pHrodo Red labelled cell 은 neutral extracellular solution (pH 7.4)상에서 형광을 띄지 않으며, phagocyte 에 의해 둘러 싸여 phagosome(pH 4.5 – 5.5)에 들어가면 형광의

증가가 관찰됩니다. Phagocyte 가 없는 조건에서는 IncuCyte pHrodo Red labelled cell 에서 형광이 증가하지 않으며, IncuCyte® ZOOM software 를 사용하여 background fluorescence 를 최소화할 수 있습니다. 이 시약은 다양한 cell type 에 사용할 수 있습니다. IncuCyte ZOOM live cell imaging platform 을 이용하여 genetic, environmental factor 뿐만 아니라 pharmacological agent 에 의한 phagocytic regulation 을 실시간으로 측정할 수 있습니다.

Recommended use

IncuCyte pHrodo Red Cell Labeling Dye 를 kit 에 포함되어 있는 DMSO 에 1mg/ml 로 녹여서 stock 을 준비한 후 suspension 형태로 IncuCyte pHrodo Red Cell Labeling Buffer 에 들어 있는 cell 에 직접 넣어 추가 dilution 을 하면 됩니다. Dye 가 protein 이나 cellular debris 에 존재하는 primary amine 과도 결합할 수 있기 때문에, a) IncuCyte pHrodo Red Cell Wash Buffer 를 이용하여 cell line 을 washing 하여 cell culture media 와 serum 을 제거하는 것을 추천 드리며, 각종 primary cell 의 경우 contamination 되지 않도록 유의하여 주시기 바랍니다.

Website 상의 관련 protocol 을 참조해 주십시오

: essenbioscience.com/pHrodo-protocols

Optimization Protocol

아래 제시된 protocol 을 이용하여 Jurkats, CCRF-CEM, neutrophils(extracted from blood) 등을 형광으로 label 할 수 있으며, 다른 cell type 에 대해서는 optimization 과정이 필요합니다.

- 1) IncuCyte pHrodo Red Cell Labeling Buffer 에 1×10^6 cells/ml 로 cell 을 넣고 1ml 씩 분리하여 stock 을 만듦.
- 2) DMSO 100 μl 를 넣어 IncuCyte pHrodo Red Cell Labeling Dye 의 용해도를 높임.
- 3) DMSO 를 이용하여 IncuCyte pHrodo Red Cell Labeling Dye 의 serial dilution 수행.
 - a. Blood 나 tissue 에서 얻은 cell 의 경우, dye 를 1mg/ml-100 μg /ml 사이의 농도로 dilution.
 - b. Cultured cell line 의 경우, dye 를 100 μg /ml-10 μg /ml 사이의 농도로 dilution.
- 4) 1ml 의 cell suspension 에 dilution 된 각 농도의 dye 를 10 μl 씩 첨가
 - i.e. 1:100 dilution - final assay concentration 의 range
 - a. 10 μg /ml - 1 μg /ml,
 - b. 1 μg /ml - 100 ng/ml.
- 5) 37°C 에서 1h 동안 incubation. 7 분 동안 centrifugation 하여 cell 을 harvest 하고 1ml 의 complete media 로 resuspension.
 - a. 10 μl 를 제거하고 pH4.0 buffer 를 100 μl 첨가. 이 상태의 solution 100 μl 를 96-well plate 에 넣고 가라 앉은 상태에서 phase, red 형광 imaging. pH 4.0 에서 이 cell 의 형광은 크게 증가하며, labeling efficiency 를 확인할 수 있다. Red 형광의 수를 counting 하여 label 된 cell 의 percentage 를 확인할 수 있다.
 - b. Label 된 target cell 을 effector cell 에 첨가. 200 μl 의 1×10^6 target cells/ml 를 1×10^4 effector cells/well 에 첨가하여 target:effector cell ratio 를 20:1 로 조절. Red 형광으로 phagocytosis signal 을 관찰.

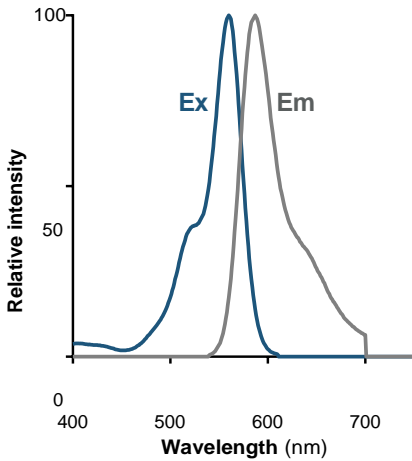


Figure 1. pH4.0 조건에서 IncuCyte™ pHrodo® Red Cell Labeling Dye fluorophore 의 excitation/emision spectra

Safety data sheet (SDS) information

Safety data sheet(SDS)는 website 에서 확인할 수 있습니다.

essenbioscience.com/phagocytosis

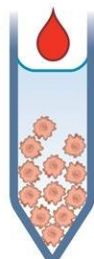
Quick guide

1 CULTURE TARGET CELLS & INDUCE APOPTOSIS (OPTIONAL)



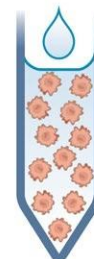
Target cells (e.g. Jurkat)을 cell culture 하고 cytotoxic agent (e.g. camptothecin)를 treat(Optional)하여 apoptosis 유도.

2 LABEL WITH INCUCYTE™ PHRODO® RED CELL LABELING KIT



Wash Buffer 로 cell 을 washing 한 후 apoptotic target cell 에 IncuCyte™ pHrodo® 첨가(e.g. Jurkats; 1x10⁶ cells/mL; 250ng/mL).

3 QUENCH AND REMOVE LABEL



Labeling Buffer 로 cell 을 washing 한 후 complete media 에 resuspension. 이 상태에서 phagocytosis assay 에 활용할 수 있음.

Figure 2. Overview of labeling protocol. Target cell(e.g. Jurkats)에 cytotoxic agent 를 첨가(Optional)하여 apoptosis 를 유도한 후 washing 하여 agent 를 제거. Labeling reagent 에서 1h 동안 incubation 한 후, media 로 washing 하고 unreacted dye 를 제거. 이 상태에서 cell 의 phagocytosis 를 확인하는 efferocytosis 를 수행할 수 있음.

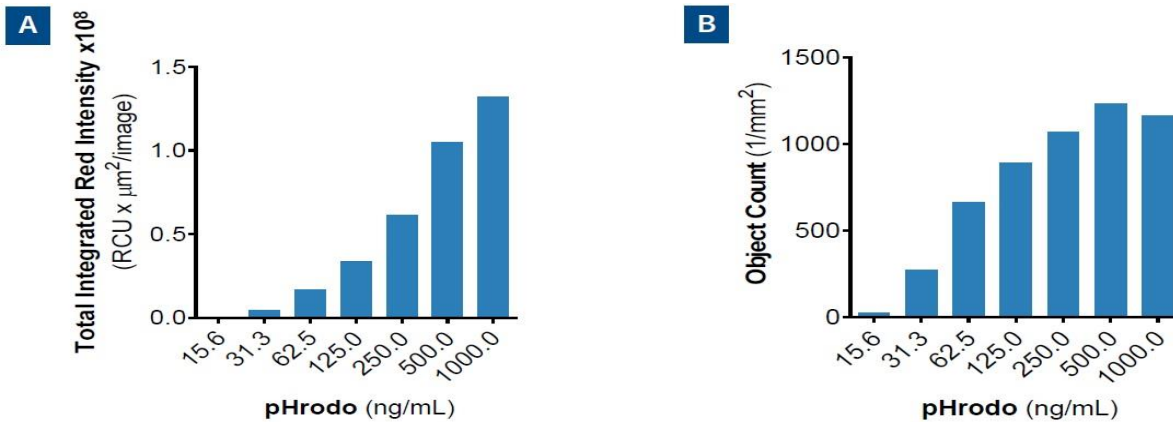


Figure 3. pH 4.0 에서 IncuCyte™ pHrodo® Red Cell Labeling Dye 증가에 따른 Jurkats 의 total integrated red intensity 증가(A). IncuCyte™ pHrodo® Red Cell Labeling Dye 의 증가에 따른 red object count 의 변화(B).

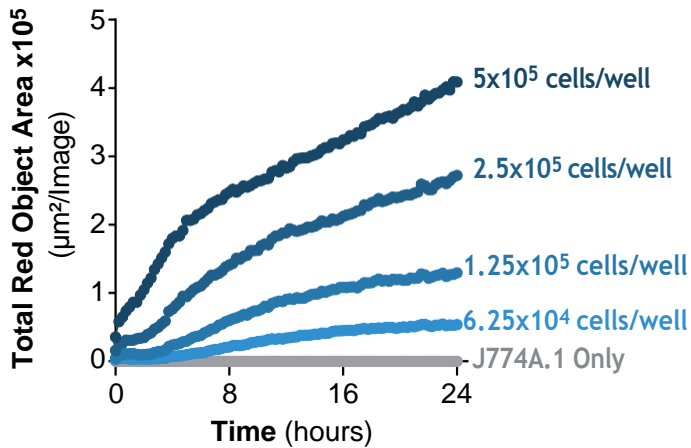


Figure 4. 10µg/ml 의 IncuCyte™ pHrodo® Red Cell Labeling Dye 를 이용하여 labeling 한 neutrophil 의 assay results. 1 x10⁴ cells/well 로 seeding 된 J774A.1 macrophage 에 neutrophil 을 넣고 incubation. IncuCyte® ZOOM 을 이용하여 phase, red fluorescence 채널로 imaging. Labeling 된 neutrophil 의 증가에 따라 red object area 의 증가가 관찰됨.

FOR RESEARCH USE ONLY. NOT FOR THERAPEUTIC OR DIAGNOSTIC USE.

IncuCyte™ pHrodo® Red Cell Labeling Kit (Cat No. 4649) Components	Component	Amount	Storage	Stability
IncuCyte™ pHrodo® Red Cell Labeling Dye	A	1 vial	-20 °C	6 months
Dimethyl sulfoxide (DMSO), anhydrous	B	150 µL	18 - 25 °C	6 months
IncuCyte™ pHrodo® Red Cell Wash Buffer	C	100 ml	18 - 25 °C	6 months
IncuCyte™ pHrodo® Red Cell Labeling Buffer	D	100 ml	18 - 25 °C	6 months

Product label licence

RESEARCH Field This product is provided under an intellectual property license from Life Technologies Corporation. The transfer of this product is conditioned on the buyer using the purchased product solely in research conducted by the buyer, excluding contract research or any fee for service research, and the buyer must not sell or otherwise transfer this product or its components for (a) diagnostic, therapeutic or prophylactic purposes; (b) testing, analysis or

screening services, or information in return for compensation on a per-test basis; (c) manufacturing or quality assurance or quality control, or (d) resale, whether or not resold for use in research. For information on purchasing a license to this product for purposes other than as described above, contact Life Technologies Corporation, 5791 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008 USA or outlicensing@lifetech.com.