

货号：B26976

1/7



## PerFix-EXPOSE 磷酸化表位固定破膜试剂盒说明书

**REF** B26976 75 测试-液体

仅供研究使用。不用于诊断程序。

### 【产品名称】

通用名称：PerFix-EXPOSE 磷酸化表位固定破膜试剂盒

英文名称：PerFix EXPOSE

### 【预期用途】

PerFix-EXPOSE 磷酸化表位固定破膜试剂盒是用于检测细胞信号转导的快速简便程序。该试剂盒由三种即用型试剂和一种使用前需要 20 倍稀释的溶液组成。目的是诱导白细胞或人细胞系胞质膜和核膜中的渗透性，以便通过染料或荧光色素结合抗体检测磷酸化胞内抗原决定簇。

PerFix EXPOSE 试剂盒用于制备生物样本，以便通过流式细胞仪进行分析。该试剂盒开发旨在提高大多数胞内磷酸化表位的信噪比，并简化样本制备所需的工作量。可准确检测胞内和胞外表位，同时：

- 整个程序仅需 2 个清洗步骤。
- 无需甲醇处理，因此无需冰孵育。
- 独特的程序可以应用于所有磷酸化表位的检测。
- 可一起添加几种表面标记物与胞内标记物并同时孵育。
- 程序的总持续时间和总工作量与当前表面染色程序相似（约 1 小时）。

### 【试剂】

PerFix-EXPOSE 磷酸化表位固定破膜试剂盒

75 测试-液体

### 【应用】

通过对外周全血或总骨髓中的人白细胞进行固定、红细胞溶解和透化，对多个胞内磷酸化表位和细胞表面标记物进行流式细胞计数分析。

还描述了不含或很少含红细胞（如外周血单核细胞（PBMC）或细胞系）的样本的特定程序。

PerFix EXPOSE 试剂盒已针对人样本的制备进行了优化。

### 【试剂盒组分】

PerFix EXPOSE 缓冲液 1，固定试剂：1 瓶（3.75 mL/瓶，液体）-PN B26977

PerFix EXPOSE 缓冲液 2，透化试剂：3 瓶（25 mL/瓶，液体）-PN B26978

PerFix EXPOSE 缓冲液 3，染色试剂：2 瓶（3.75 mL/瓶，液体）-PN B26979

PerFix EXPOSE 缓冲液 4，最终 20×溶液：1 瓶（26.25 mL/小瓶，液体，20×浓缩）-PN B26980

【警告和注意事项】

- 1. 缓冲液 1 含有甲醛。
- 2. 缓冲液 2 含有高氯酸钠和清洗剂。
- 3. 缓冲液 3 含有高氯酸钠和叠氮钠。
- 4. 缓冲液 4 含有甲醛和清洗剂。
- 5. 所有这些化合物具有潜在刺激性或有害。甲醛具有毒性和致敏性，被视为致癌物质。叠氮钠与无机酸接触时可能形成危险产物。
- 6. 生物危险：所有血液样本均可能含有潜在传染性病原体。在涉及血液或其衍生物的所有步骤中，必须采取普遍预防措施。特别是，与本试剂接触的标本、样本和所有材料均应视为具有潜在传染性。应采取适当预防措施处置这些材料。
- 7. 处理 PerFix EXPOSE 缓冲液和所有其他试剂时遵循药物非临床研究质量管理规范（GLP）。在通风良好的区域小心处理。切勿口吸移液，并避免接触皮肤、黏膜、眼睛和衣物（穿戴防护手套、护目镜和防护服）。
- 8. 切勿使用超过标签所示有效期的试剂。
- 9. 避免试剂发生微生物污染，否则可能出现错误结果。
- 10. 应根据当地相关要求处理试剂和废弃物。

【GHS 危险等级分类】

Perfix EXPOSE 缓冲液 1 危险  
：  
固定试剂



|                |                        |
|----------------|------------------------|
| H302           | 吞咽有害。                  |
| H312           | 与皮肤接触时可能导致伤害。          |
| H314           | 引起严重皮肤烧伤和眼睛损害。         |
| H317           | 可能引起皮肤过敏反应。            |
| H332           | 吸入有害。                  |
| H341           | 疑似导致遗传缺陷。              |
| H350           | 可致癌。                   |
| H370           | 引起器官损伤。                |
| P201           | 用前获取特殊说明。              |
| P261           | 避免吸入蒸气。                |
| P280           | 穿戴防护手套、防护服和护目镜/面部防护装置。 |
| P303+P361+P353 | 如皮肤（或头发）沾染：用水冲洗皮肤。     |
| P305+P351+P338 | 如进入眼睛：用水小心冲洗几分钟。如果佩    |

|                     |                                                                                     |              |                        |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------|------------------------|
|                     |                                                                                     |              | 戴有隐形眼镜，应在方便时将其取出。继续冲洗。 |
|                     | P308+P311                                                                           |              | 如果接触或担心接触：请就医。         |
|                     |                                                                                     | 甲醇 1-4%      |                        |
|                     |                                                                                     | 甲醛 10-15%    |                        |
| Perfix EXPOSE 缓冲液 2 | 警告                                                                                  |              |                        |
| :                   |                                                                                     |              |                        |
| 透化试剂                |                                                                                     |              |                        |
|                     | H316                                                                                |              | 引起轻度皮肤刺激。              |
|                     | P332+P313                                                                           |              | 如皮肤感到刺激：请就医。           |
|                     |                                                                                     | 十二烷基硫酸钠 1-2% |                        |
| Perfix EXPOSE 缓冲液 3 | 警告                                                                                  |              |                        |
| :                   |                                                                                     |              |                        |
| 染色试剂                |                                                                                     |              |                        |
|                     |    |              |                        |
|                     | H319                                                                                |              | 造成严重眼睛刺激。              |
|                     | P280                                                                                |              | 穿戴防护手套、防护服和护目镜/面部防护装置。 |
|                     | P337+P313                                                                           |              | 如果眼部刺激持续存在：请就医。        |
|                     |                                                                                     | 2-苯氧乙醇 1-2%  |                        |
| Perfix EXPOSE 缓冲液 4 | 危险                                                                                  |              |                        |
| :                   |                                                                                     |              |                        |
| 最终 20×溶液            |                                                                                     |              |                        |
|                     |  |              |                        |
|                     |  |              |                        |
|                     |  |              |                        |
|                     | H302                                                                                |              | 吞咽有害。                  |
|                     | H313                                                                                |              | 与皮肤接触可能有害              |
|                     | H314                                                                                |              | 引起严重皮肤烧伤和眼睛损害。         |
|                     | H317                                                                                |              | 可能引起皮肤过敏反应。            |
|                     | H341                                                                                |              | 疑似导致遗传缺陷。              |
|                     | H350                                                                                |              | 可致癌。                   |
|                     | H370                                                                                |              | 引起器官损伤。                |
|                     | P201                                                                                |              | 用前获取特殊说明。              |
|                     | P280                                                                                |              | 穿戴防护手套、防护服和护目镜/面部防护装置。 |

|                |                                           |
|----------------|-------------------------------------------|
| P303+P361+P353 | 如皮肤（或头发）沾染：用水冲洗皮肤。                        |
| P305+P351+P338 | 如进入眼睛：用水小心冲洗几分钟。如果佩戴有隐形眼镜，应在方便时将其取出。继续冲洗。 |
| P308+P311      | 如果接触或担心接触：请就医。                            |
| P362+P364      | 脱掉受污染的衣物，并在使用前进行清洗。                       |
|                | 甲醇 1-4%                                   |
|                | 甲醛 3-10%                                  |

|     |                                                                                            |
|-----|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| SDS | 化学品安全技术说明书提供于 <a href="http://beckmancoulter.com/techdocs">beckmancoulter.com/techdocs</a> |
|-----|--------------------------------------------------------------------------------------------|

**【储存条件和稳定性】**

在室温（18-25℃）下储存时，PerFix EXPOSE 缓冲液可在标签所示失效日期前保持稳定。切勿冷冻。如果 PerFix EXPOSE 缓冲液 2 或缓冲液 4 储存在 10℃以下，则可能出现结晶；如出现此情况，使其恢复至室温，并验证是否完全重新溶解。重新溶解完成后，轻轻混合。

**【试剂制备】**

PerFix EXPOSE 缓冲液 1、2 和 3 为即用型。需要去离子水稀释 20× PerFix EXPOSE 缓冲液 4（最终 20×溶液）：1 体积缓冲液 4 和 19 体积水。用前充分混合。推荐仅制备实验当日所需最终 1×试剂体积。尚未评价从缓冲液 4 中稀释的最终 1×试剂的稳定性。

**【内容物】**

叠氮钠防腐剂可在金属下水管道中形成易爆化合物。请参阅 NIOSH Bulletin: Explosive Azide Hazard (8/16/76)（美国国家职业安全与卫生研究所公报：易爆的叠氮化物危险品[76/8/16]）。

为避免可能产生的叠氮化合物堆积，请在丢弃未经稀释的试剂后用水冲洗排污管。对叠氮钠的丢弃必须符合当地的相关规定。

**【需要但未提供的材料】**

检测标本：抗凝剂管中全血或骨髓。应尽快使用血液标本，以保存表位和细胞结构（24 小时内）。根据应用情况，可以对较旧标本进行分析。

PBMC 和细胞系（无论新鲜还是冷冻）均必须根据药物非临床研究质量管理规范进行制备，然后根据第 2 页所示的具体程序进行处理。

**设备：**

- 可移液 1 至 1,000 μL 的移液器
- 5 mL 塑料试管。
- 计时器
- 设置为 37℃的水浴。
- 自动搅拌器（旋涡型）
- 针对胞内表位和表面分子的荧光染料结合抗体
- 可变速离心机
- 流式细胞仪

**【程序】**

## 全血或全骨髓程序

1. 吸取 100  $\mu\text{L}$  标本到适当标记试管的底部。避免将标本溅到试管侧面上；否则将无法得到适当处理。
2. 如有必要，添加信号通路的活化剂或抑制剂；充分混合并在推荐温度（通常为 37°C）下孵育推荐时间。水浴优于干燥孵育器。
3. 用移液器将 50  $\mu\text{L}$  缓冲液 1（固定试剂）移至每个试管中，立即涡旋（1-2 秒），并在室温（18-25°C）下孵育 10 分钟。
4. 对固定标本进行短暂涡旋，并将 1 mL 缓冲液 2（透化试剂）加入每个试管中，立即涡旋（1-2 秒），并在 37°C 水浴中孵育 5 分钟。
5. 以 300  $\times g$  的离心力立刻离心 5 分钟使细胞沉淀，通过抽吸完全弃去上清液。（不适宜颠倒试管）。
6. 立即将 100  $\mu\text{L}$  缓冲液 3（染色试剂）加入每个试管，然后加入针对磷酸化表位、胞内表位和表面分子的荧光染料结合抗体（首选将抗体预混合至缓冲液 3 中，并将两种体积一起添加至细胞团块上）。
7. 立即涡旋（1-2 秒），并在室温下避光孵育 15-30 分钟。
8. 将 3 mL 从缓冲液 4（20 $\times$ 浓缩溶液）制备的最终 1 $\times$ 试剂（清洗试剂）加入每个试管中，立即涡旋（1-2 秒），以 300  $\times g$  离心细胞 5 分钟，并通过抽吸完全丢弃上清液。
9. 在 0.5 mL 最终 1 $\times$ 试剂中重悬细胞团块。样本现已准备好在流式细胞仪上进行分析。

**【PBMC 或细胞的特定程序】**

重要提示：用纯 FCS 或 FBS（胎牛/牛血清）2.10<sup>5</sup> 至 1.10<sup>6</sup> 个细胞/测试清洗细胞、离心并重悬细胞团块。

1. 将 100  $\mu\text{L}$  这种细胞悬液加注到适当标记试管的底部。避免将一些样本溅到试管侧面上；否则将无法得到适当处理。
2. 如有必要，添加信号通路的活化剂或抑制剂；充分混合并在推荐温度（通常为 37°C）下孵育推荐时间。水浴优于干燥孵育器。
3. 用移液器将 25  $\mu\text{L}$  缓冲液 1（固定试剂）移至每个试管中，立即涡旋（1-2 秒），并在室温（18-25°C）下孵育 10 分钟。
4. 再次涡旋固定细胞并加入 0.5 mL FCS 或 FBS。将 0.5 mL 缓冲液 2（透化试剂）加入每个试管中，立即涡旋（1-2 秒），并在 37°C 水浴中孵育 5 分钟。
5. 以 300  $\times g$  的离心力立刻离心 5 分钟使细胞沉淀，通过抽吸完全弃去上清液。（不适宜颠倒试管）。
6. 立即将 50  $\mu\text{L}$  缓冲液 3（染色试剂）加入每个试管，然后加入针对磷酸化表位、胞内表位和表面分子的荧光染料结合抗体（首选将抗体预混合至缓冲液 3 中，并将两种体积一起添加至细胞团块上）。
7. 立即涡旋（1-2 秒），并在室温下避光孵育 15-30 分钟。
8. 将 3 mL 从缓冲液 4（20 $\times$ 浓缩溶液）制备的最终 1 $\times$ 试剂（清洗试剂）加入每个试管中，立即涡旋（1-2 秒），以 300  $\times g$  离心细胞 5 分钟，并通过抽吸完全丢弃上清液。
9. 在 0.5 mL 最终 1 $\times$ 试剂中重悬细胞团块。

**【其他信息特别注释】**

1. 清洗缓冲液的体积：由于“PBMC 或细胞”程序建议仅使用缓冲液 1、2 和 3 推荐体积的一半，因此添加了一些额外的缓冲液 4，为执行“PBMC 和细胞”程序的用户提供了运行 **150 测试** 的可能性。
2. 用于胞内和胞外染色的所有结合抗体必须进行滴定以获得最佳结果。

3. 固定液和清洗剂的浓度可能对表面表位有害。在此情况下，建议选择另一种抗体克隆或另一种标志物，或在固定步骤前将抗体添加至标本中，从而在活化/抑制步骤之前或期间（验证该预孵育步骤不会干扰信号通路后）将其与样本一起进行预孵育。
4. 使用甲醛稳定最终 1×试剂中的细胞。尽管染色和细胞结构存在一些常见微小变化，但 24 小时后仍有可能对样本进行分析。随后建议将试管储存在 2–8°C 下。
5. 如可能，最好（和推荐）进行分批测试：
  - A. 在同一标本上的多次实验将受益于批次活化和固定（根据需要增加样本体积和缓冲液 1，然后在 10 分钟的孵育时间内（或如试管中已含有 1 mL 缓冲液 2，则在 10 分钟时间点）将 155 µL（100 µL 血液+5 µL 活化剂/抑制剂+50 µL 缓冲液 1）加注至试管中。
  - B. 下一步骤也可分批进行：增加缓冲液 2 的体积并将其加入至一批固定样本上，在 37°C 下孵育 5 分钟（确保均匀性），然后离心并将批次团块重悬在缓冲液 3 中，然后加注至含有各种抗体组合的多个试管中。
  - C. 在不同标本上的多次实验（但使用相同抗体混合液）将受益于缓冲液 3+抗体的批次制备。
6. 最后，当程序在实验室中优化且可再现时，并且当活化细胞与非活化细胞的信号比至少高于 3 时，可以将活化细胞和非活化细胞混合至一个试管中。此混合应出现在固定步骤结束时。其将确保在所有后续步骤中对两个样本进行完全相同的处理，并提高结果的准确度。

可以在固定开始后 7 至 10 分钟之间进行混合：混合前立即再次涡旋每份样本。然后继续进行此程序（步骤 4），保持每 100 µL 全血样本 1 mL 缓冲液 2（或每 100 µL PBMC 或细胞 500 µL 缓冲液 2）的比例。

批次和混合示例：在全血上滴定结合物（6 个滴定点）：

1. 用移液器在 2 个试管中移液 2×300 µL 全血样本，在第二个试管中加入活化剂，并在 37°C 下孵育两个试管。
2. 在两个试管中加入 150 µL 缓冲液 1，涡旋并孵育 7 分钟（见特殊注释 n°6）。
3. 混合：将试管 1 的 450 µL（300 µL 血液+150 µL 缓冲液 1）和试管 2 的 450 µL（+活化剂体积）全部转移至>7 mL 试管中，并孵育至 10 分钟固定终点。
4. 加入 6 mL 缓冲液 2，充分混合，在 37°C 下孵育 5 分钟，离心并吸出上清液。
5. 在 300 µL 缓冲液 3 中重悬团块，并将 6×50 µL 加注至 6 个试管中，每个试管含有 50 µL 缓冲液 3 和不同体积结合物。
6. 孵育 15-30 分钟，随后进行正常程序步骤 8-9。

如您在美国境内，请拨打 400 821 8935 了解其他信息。

如您在美国境外，请联系当地的贝克曼库尔特代表。

### 【商标】

Beckman Coulter、标志以及文中提及的贝克曼库尔特产品和服务标记均是贝克曼库尔特（美国）股份有限公司在美国和其他国家/地区的商标或注册商标。

### 【符号说明】

符号词汇表发布于 [beckman.com/techdocs](http://beckman.com/techdocs)（文件编号 B60062）

### 【说明书版本说明】

原文说明书文档版本：B59719AE，原文说明书生效日期：2019 年 09 月；

中文说明书文档版本： B59719AE-CN ， 中文说明书生效时间： 2024 年 4 月；  
中文说明书 B59719AE-CN 内容直接翻译自原文说明书 B59719AE。



免疫泰克有限公司 IMMUNOTECH S.A.S. (a Beckman Coulter Company) , 130, avenue de Lattre de  
Tassigny, BP 177, 13276 Marseille cedex 9, France, 33-491 172 727  
[www.beckman.com](http://www.beckman.com)