

货号: IM3546

1/6



## ANNEXIN V - FITC 检测试剂盒（流式细胞仪法）说明书

### ANNEXIN A5-FITC 检测试剂盒-细胞凋亡检测试剂盒

**REF** IM3546 200 测试

仅供研究使用。不用于诊断程序。

#### 【产品名称】

通用名称: ANNEXIN V - FITC 检测试剂盒（流式细胞仪法）

英文名称: ANNEXIN A5 FITC KIT

#### 【试剂内容物】

	膜联蛋白 A5-FITC	10×浓缩结合缓冲液	碘化丙啶**警告: 碘化丙啶 (PI) 具有毒性
剂型	即用型液体	液体	红色粉末
体积	200 $\mu$ L	1.7 mL	250 $\mu$ g
瓶数	1 瓶	6 瓶	1 瓶

#### 【膜联蛋白 A5-FITC 特征】

FITC 标记的修饰人重组膜联蛋白。体外显示无可测量抗凝活性。

- F/P 比值: 1 (计量复合物)
- 纯度: 根据快速蛋白液相色谱法, 纯度>99%。
- 浓度: 25  $\mu$ g/mL。

注: 膜联蛋白 A5 在 1-5 mM 或更高游离  $Ca^{2+}$  浓度下与 PS 最佳结合。如介质含水量较少, 则通过添加  $CaCl_2$  调整浓度, 或用提供的 1×浓度的结合缓冲液代替介质。根据经验, RPMI1640 不太适合该测定。也可使用其他介质 (如 DMEM)。

#### 【荧光】

膜联蛋白 A5-FITC:

- 最大吸收: 492 nm
- 最大发射波长: 520 nm

碘化丙啶:

- 最大吸收: 370 nm、550 nm
- 发射范围: 560-680 nm

#### 【应用】

通过流式细胞术或荧光显微镜检测细胞凋亡。

## 【警告和注意事项】

1. 此 ANNEXIN A5-FITC 检测试剂盒含有碘化丙啶 (PI)，其为一种潜在突变剂。建议避免与皮肤和眼睛接触，穿戴合适防护服和手套，以及合适护目镜/面罩。还建议采用机械通风和呼吸防护设备。
2. 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予以处理，应采取适当的预防措施进行处置。
3. 切勿口吸移液，避免样本与皮肤和黏膜接触
4. 避免试剂发生微生物污染，否则可能出现错误结果。
5. 处理这些试剂时遵循药物非临床研究质量管理规范。

## 【GHS 危险等级分类】

碘化丙啶

警告



H315	引起皮肤刺激。
H319	造成严重眼睛刺激。
H335	可能造成呼吸道刺激。
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。
P304+P340	如不慎吸入：将受害人转移至新鲜空气处，并保持呼吸通畅的姿势休息。
P312	如果您感到不适，请致电毒物中心或医生。
P337+P313	如果眼部刺激持续存在：请就医。
P403+P233	储存于通风良好处。保持容器紧闭。
	碘化丙啶>95%

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

## 【储存、处理条件和稳定性】

这些试剂在 2-8°C 下避光储存时可在有效期内保持稳定。过期后不得使用。切勿冷冻。

## 【试剂制备】

- 用蒸馏水将 10x 浓缩结合缓冲液稀释 10 倍，并将稀释的缓冲液置于冰上。为预期测定数量制备足够数量缓冲液。
- 将 250 µg PI 溶解于 1 mL 1x 结合缓冲液中，并将 PI 溶液置于冰上。
- 使用后，溶液应储存在 2-8°C 下。

## 【步骤】

1. 用冰冷培养基或 PBS 清洗细胞样本，并在 4°C 下以 500xg 离心 5 分钟。丢弃上清液，并在冰冷 1x 结合缓冲液中重悬细胞团块至 5x10<sup>5</sup>-5x10<sup>6</sup> 个细胞/mL。将试管置于冰上。
2. 将 1 µL 膜联蛋白 A5-FITC 溶液和 5 µL 溶解的 PI 添加至步骤 1 中制备的 100 µL 细胞悬液中。轻轻混合。

3. 将试管置于冰上，避光孵育 15 分钟。
4. 加入 400  $\mu\text{L}$  冰冷 1 $\times$ 结合缓冲液，轻轻混合。
5. 通过流式细胞术（或荧光显微镜）在 30 分钟内分析细胞制剂。

#### 【阳性对照】

1. 将细胞与含有 3%甲醛的 PBS 在冰上孵育 30 分钟。离心细胞，丢弃甲醛缓冲液，并在冰冷 1 $\times$ 结合缓冲液中将细胞团块重悬至  $5 \times 10^5$ - $5 \times 10^6$  个细胞/mL。从染色程序的步骤 2 开始进行染色。
2. 诱导 Fas/CD95 表达细胞（如人 Jurkat 细胞或小鼠胸腺细胞）的细胞凋亡。  
培养基中加入 100 ng/mL 纯化激动型抗-Fas/CD95 抗体，并在 37°C（5% CO<sub>2</sub>）下孵育细胞 4-24 小时。离心细胞，丢弃上清液，并在冰冷 1 $\times$ 结合缓冲液中将细胞团块悬浮至  $5 \times 10^5$ - $5 \times 10^6$  个细胞/mL。从染色程序的步骤 2 开始进行染色。

#### 【一般注释和预防措施】

将流式细胞仪优选设置为可使膜联蛋白 A5 阴性细胞群分布于 FITC 通道的第一个十进位中，且 PI 阴性细胞群分布于 PI 通道的第一个十进位中。可通过阳性对照定位最佳参数设置（见上文）。

应在冰上进行膜联蛋白 A5 与 PI 的孵育，以阻止细胞阶段进一步进展，即活性 $\Rightarrow$ 细胞凋亡 $\Rightarrow$ 继发性坏死。

对于大鼠胸腺细胞，当保存在冰上时，细胞群分布（存活、凋亡、继发性坏死）至少保持稳定 6 小时。

#### 【特异性】

ANNEXIN A5-FITC 检测试剂盒是一种基于膜联蛋白 A5 与磷脂酰丝氨酸（PS）的结合特性和碘化丙啶（PI）的 DNA 嵌入能力的细胞凋亡检测试剂盒。

根据细胞形态学变化，在组织中发现细胞凋亡（或程序性细胞死亡）<sup>(1)</sup>。细胞凋亡的形态学标准（如细胞收缩、核浓缩和固缩）逐渐与生物化学标准（如核小体之间的 DNA 切割）互补，导致 DNA 在琼脂糖凝胶上呈阶梯状出现<sup>(2)</sup>。直至最近，将此典型特征视为细胞凋亡标志。但并非所有处于细胞凋亡中的细胞似乎均在核小体之间切割其 DNA 链<sup>(3)</sup>，而那些切割 DNA 链的细胞仅在细胞凋亡途径晚期才进行此行为。

对细胞凋亡过程的新见解产生了新参数，可用于检测和测量细胞凋亡。其中一个参数存在于磷脂酰丝氨酸（PS）细胞表面，这是一种带负电荷的磷脂，通常位于质膜的内部小叶中。在细胞凋亡的早期阶段，细胞膜的完整性得到维持，但细胞失去了膜磷脂的不对称性<sup>(4,5,6,7)</sup>。PS 暴露在细胞表面，并形成巨噬细胞识别和去除凋亡细胞的特异性信号之一<sup>(5,8)</sup>。

膜联蛋白 A5 是一种 Ca<sup>2+</sup>依赖性磷脂结合蛋白，优先与 PS 结合，具有高亲和力。死亡细胞改变其形态并水解其 DNA 前，凋亡细胞被膜联蛋白 A5 染色<sup>(4,9,10,11,12)</sup>。鉴于 ANNEXIN A5-FITC 检测试剂盒的方案便于参考，细胞凋亡相关 PS 暴露的早期检测和普遍性使其成为研究细胞凋亡的有力工具<sup>(9,11,13,14)</sup>。

ANNEXIN A5-FITC 检测试剂盒利用了膜联蛋白 A5-FITC 在 Ca<sup>2+</sup>存在下对 PS 的亲和力。在 1:1 计量复合物中，膜联蛋白 A5 与 FITC 的结合不会改变膜联蛋白 A5 的自身磷脂结合特性。结合动力学显示，如果 PS 和 Ca<sup>2+</sup>可用，则膜联蛋白 A5-FITC 与磷脂膜快速结合。

ANNEXIN A5-FITC 方案旨在方便、快速地测量悬浮细胞样本中的细胞凋亡。细胞凋亡相关的 PS 暴露是哺乳动物和非哺乳动物物种的一种系统发育保守机制，且已证明膜联蛋白 A5 对其的检测适用于迄今为止试验的人类、小鼠、大鼠、仓鼠、小鸡和果蝇细胞类型<sup>(5,6,15,8,9,13,16,17,18)</sup>。

#### 【示例数据】

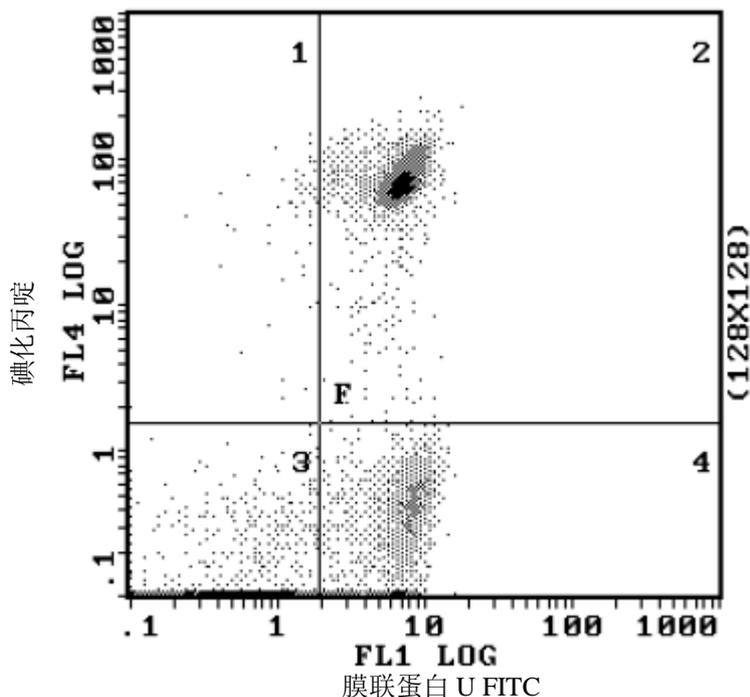
使用 ANNEXIN A5-FITC 检测试剂盒进行染色后，对凋亡 Jurkat 细胞进行流式细胞术分析（在 COULTER EPICS XL 流式细胞仪上进行此分析）。已用 100 ng/mL 激动型抗-Fas（CD95）抗体对 Jurkat 细胞处理 6 小

时。使用 XL System II 软件进行分析。双参数表示 (FL1vs FL4) 显示三个不同细胞群，i) 具有低水平 FITC 和低水平 PI 信号的活细胞，ii) 具有高水平 FITC 和低水平 PI 信号的凋亡细胞，iii) 具有高水平 FITC 和高水平 PI 信号的继发性坏死细胞 (见图)。根据细胞类型以及培养和离心条件，可以观察到对应于具有低水平 FITC 和高水平 PI 信号的受损活细胞的第四细胞群。

象限 2: 40.5% (继发性坏死细胞)

象限 3: 27.1% (活细胞)

象限 4: 31.4% (凋亡细胞)



**【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。

**【其他信息】**

欲获得其他信息，或收到破损产品，请致电 400 821 8935 与贝克曼库尔特客户服务部联系，或联系当地贝克曼库尔特代表。

[www.beckmancoulter.com](http://www.beckmancoulter.com)

**【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: B60205AC, 原文说明书生效日期: 2019 年 09 月;

中文说明书文档版本: B60205AC-CN, 中文说明书生效时间: 2024 年 4 月;

中文说明书 B60205AC-CN 内容直接翻译自原文说明书 B60205AC。

## 【参考文献】

1. Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R., "Apoptosis, a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics", 1972, *Br. J. Cancer*, 26, 239-245.
2. Wyllie, A.H., Morris, R.G., Smith, A.L., Dunlop, D., "Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis", 1984, *J. Pathol.*, 142, 67-77.
3. Oberhammer, F., Wilson, J.W., Dive, C., Morris, I.D., Hickman, J.A., Wakeling, A.E., Walker, P.R., Sikorska, M., "Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation", 1993, *EMBO J.*, 9, 12, 3679-3684.
4. Martin, S.J., Reutelingsperger, C.P.M., McGahon, A.J., Rader, J., van Schie, R.C.A.A., LaFace, D.M., Green, D.R., "Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus. Inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl", 1995, *J. Exp. Med.*, 182, 1545-1557.
5. Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L., Henson, P.M., "Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages", 1992, *J. Immunol.*, 7, 148, 2207-2216.
6. Diaz, C., Schroit, A.J., "Role of translocases in the generation of phosphatidylserine asymmetry", 1996, *J. Membrane Biol.*, 151, 1-9.
7. Homburg, C.H.E., de Haas, M., von dem Borne, E.G.Kr., Verhoeven, A.J., Reutelingsperger, C.P.M., Roos, D., "Human neutrophils lose their surface Fc $\gamma$ RIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis in vitro", 1995, *Blood*, 2, 85, 532-540.
8. Verhoven, B., Schlegel, R.A., Williamson, P., "Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes", 1995, *J. Exp. Med.*, 182, 1597-1601.
9. Vermes, I., Haanen, C., Reutelingsperger, C.P.M., "A novel assay for apoptosis: Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V", 1995, *J. Immunol. Methods*, 180, 39-52.
10. Castedo, M., Hirsch, t., Susin, S.A., Zamzami, N., Marchetti, P., Macho, A., Kroemer, G., "Sequential acquisition of mitochondrial and plasma membrane alterations during early lymphocyte apoptosis", 1996, *J. Immunol.*, 157, 512-521.
11. Aubry, J-P., Blaecke, A., Lecoanet-Henchoz, S., Jeannin, P., Herbault, N., Caron, G., Moine, V., Bonnefoy, J-Y., "Annexin V used for measuring apoptosis in the early events of cellular cytotoxicity", 1999, *Cytometry*, 37, 197-204.
12. Koopman, G., Reutelingsperger, C.P.M., Kuijen, G.A.M., Keehnen, R.M.J., Pals, S.T., van Oers, M.H.J., "Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis", 1994, *Blood*, 5, 84, 1415-1420.
13. Van Engeland, M., Ramaekers, F.C.S., Schutte, B., Reutelingsperger, C.P.M., "A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture", 1996, *Cytometry*, 24, 131-139.
14. Pepper, C., Thomas, A., Tucker, H., Hoy, T., Bentley, P., "Flow cytometric assessment of three different methods for the measurement of in vitro apoptosis", 1998, *Leukemia Res.*, 22, 439-444.
15. Homburg, C.H.E., de Haas, M., von dem Borne, E.G.Kr., Verhoeven, A.J., Reutelingsperger, C.P.M., Roos, D., "Human neutrophils lose their surface Fc $\gamma$ RIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis in vitro", 1995, *Blood*, 2, 85, 532-540.
16. Berthou, C., Michel, L., Soulié, A., Jean-Louis, F., Flageul, B., Dubertret, L., Sigaux, F., Zhang, Y., Sasportes, M., "Acquisition of granzyme B and Fas Ligand Proteins by human keratinocytes contributes to epidermal cell defense", 1997, *J. Immunol.*, 159, 5293-5300.
17. Van den Eijnde, S., Boshart, L., Reutlingsperger, C.P.M., De Zeeuw, C.I., Vermeij-Keers, C.,

"Phosphatidylserine plasma membrane asymmetry in vivo: a pan-cellular phenomenon which alters during apoptosis", 1997, Cell Death Differentiation, 4, 311-316.

18. Van den Eijnde, S.M., Boshart, L., Baehrecke, E.H., De Zeeuw, C.I., Reutelingsperger, C.P.M., Vermeij-Keers, C., "Cell surface exposure of phosphatidylserine during apoptosis is phylogenetically conserved", 1998, Apoptosis, 3, 9-16.



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