

CODE No. 4700



Revised: March, 2022 ver. 3

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

For the sensitive detection and quantification of early-stage apoptosis

MEBCYTO

Apoptosis Kit (Annexin V-FITC Kit)

CODE No. 4700 100 tests

CONTENTS

1. Intended Use -----	1
2. Summary and Explanation-----	1
3. Principle -----	1
4. Materials provided -----	2
5. Storage -----	2
6. Expiration -----	2
7. Materials and equipment required -----	2
8. Precautions -----	2
9. Procedure -----	2
10. References -----	4

Before use, thoroughly read these Instructions.

Intended Use

The **MEBCYTO Apoptosis Kit (Annexin V-FITC Kit)** is intended for the detection of early stage of apoptotic cells in research samples. **For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.**

Summary and Explanation

Apoptosis, a term that describes regulated cell death, is fundamental feature of many biological processes including normal development, homeostasis, and disease. Early during the process of apoptosis, cells lose their phospholipids membrane asymmetry and expose phosphatidylserine (PS) at the cell surface. This process can be monitored by using Annexin V which is a Ca^{2+} dependent, phospholipids-binding protein with high affinity for PS, and is useful for identifying apoptotic cells with exposed PS.

Translocation of PS to the external cell surface is not unique to apoptosis, but occurs also during cell necrosis. The difference between these two forms of cell death is that during the initial stage of apoptosis the cell membrane remains intact, while at the very moment that necrosis occurs the cell membrane loses its integrity and becomes leaky. Therefore, necrotic cells easily stained with Propidium Iodide (PI) as well as Annexin V, where as Apoptotic cells stained only with Annexin V.

The MEBCYTO Apoptosis Kit (Annexin V-FITC Kit) can identify cells in an earlier stage of apoptosis than assays based on DNA fragmentation.

Principle

When staining the cells with Annexin V-FITC and Propidium Iodide (PI), it can be used in a bivariate analysis to distinguish between cells undergoing apoptosis (PI negative) and those that are necrotic or dead (PI positive).

Materials provided

Each kit contains:

Name	Materials	Quantity (for 1 kit)
Annexin V-FITC	FITC conjugated Annexin V (ready-for-use)	1.0 mL × 1 vial
Propidium Iodide (PI)	Propidium Iodide (PI) (100 µg/mL) (ready-for-use)	0.5 mL × 1 vial
Binding Buffer	Binding buffer (ready-for-use)	50 mL × 1 bottle

These reagents are sufficient for 100 tests.

Storage

All kit components must be stored at 2-8°C.

Expiration

Please see the label of this kit.

Materials and equipment required

- Phosphate buffered saline (PBS)
- Adequate test tube
- Adjustable micropipette
- Fluorescence activated cell sorter

Precautions

1. **Annexin V-FITC** contains sodium azide (0.09%) as preservative. Azide may react with copper or lead in plumbing system to form explosive metal azide. Therefore, always flush with plenty of water into a drain when disposing materials containing azide.
2. **Propidium Iodide (PI)** is highly toxic. Handle with care.
3. This kit is intended for research use only. Not for use in diagnostic procedures.

Procedure

◆ Preparation of Reagents

All reagents are ready for use.

◆ Assay procedure

Since apoptosis is a very rapid and dynamic process, we recommend that you perform analysis immediately after staining.

STEP A. (Sample Staining)

- 1) Induce apoptosis by desired method.
- 2) Wash the cells (2.0×10^5 cells) to be used for staining once with PBS.

Note

For adherent cells, trypsinize and gently wash cells once with serum-containing medium followed by wash once with PBS.

- 3) Resuspend the cells in 85 μ L of **Binding Buffer**.
- 4) Add 10 μ L of **Annexin V-FITC** and 5 μ L of **Propidium Iodide** to 85 μ L cell suspension prepared as given by **STEP A.-3**.
- 5) Mix well and incubate at room temperature (20-25°C) for 15 minutes in the dark.

STEP B. (Analyzing the stained cells by Flow Cytometry)

- 1) After incubation (**STEP A.-5**), add 400 μ L of **Binding Buffer**.
- 2) Measure the cell sample by Flow Cytometry using a single laser emitting excitation light at 488 nm.

Note

The signal generated by Annexin V-FITC can be detected in the FITC signal detector (usually FL1). The signal generated by Propidium Iodide can be monitored by the detector for phycoerythrin emissions (usually FL2 or FL3). In case the multicolor assay, careful calibration of the flow cytometer is needed to compensate for the overlapping emission.

◆ Example of assay result

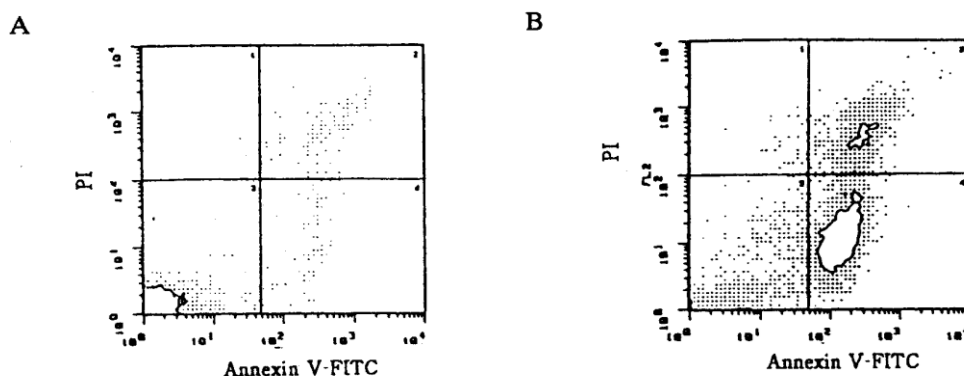


Fig. 1 Example of assay result

A: Viable Jurkat cells (negative control).

B: Flow Cytometry analysis of the Jurkat cells induced apoptosis by anti-Fas antibody (MBL; code no. SY-001).

References

- 1) Nakamura, K., *et al.*, *Ann. Onc.* **20**, 63-70 (2009)
- 2) Ohara, M., *et al.*, *Infect. Immune.* **76**, 4783-4791 (2008)
- 3) Oikawa, Y., *et al.*, *J. Biol. Chem.* **283**, 14242-14247 (2008)
- 4) Olmeda, D., *et al.*, *Cancer Res.* **67**, 11721-11731 (2007)
- 5) Orbach, A., *et al.*, *J. Immunol.* **179**, 7287-7294 (2007)
- 6) Ogawa, T., *et al.*, *Cancer Res.* **65**, 9771-9778 (2005)
- 7) Kimura, A., *et al.*, *Int. Immunol.* **16**, 991-999 (2004)
- 8) Kashio, Y., *et al.*, *J. Immunol.* **170**, 3631-3636 (2003)
- 9) Takahashi, A., *et al.*, *Clin. Cancer Res.* **7**, 74-80 (2001)
- 10) Kashii, Y., *et al.*, *Blood* **96**, 941-949 (2000)
- 11) van Engeland, M., *et al.*, *Cytometry* **24**, 131-139 (1996)
- 12) Vermes, I., *et al.*, *J. Immunol. Methods* **184**, 39-51 (1995)
- 13) Fadok, V. A., *et al.*, *J. Immunol.* **148**, 2207-2216 (1992)

For more information, please visit our web site.

<https://ruo.mbl.co.jp/>

Manufacture

MBL A JSR Life Sciences Company
MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD.
URL <https://ruo.mbl.co.jp> e-mail support@mbi.co.jp

はじめに

MEBCYTO Apoptosis Kit (Annexin V-FITC Kit) は、FITC 標識 Annexin V とヨウ化プロピジウム (Propidium Iodide: PI) を組み合わせ、フローサイトメトリー法により、早期の Apoptosis を検出するキットです。

Apoptosis の特徴のひとつに、細胞膜の構造変化があります。Apoptosis の早期には、細胞膜のリン脂質の非対称性が失われます。フォスファチジルセリン (PS) は、細胞膜を構成するリン脂質の一種で、通常は細胞膜内層に存在していますが、Apoptosis が誘導されると膜の構造は保ったままで細胞膜外に転移します。Annexin V は PS に高い親和性を持つ蛋白質で、カルシウムイオン存在下で、Apoptosis が誘導されて細胞膜外に露出した PS と結合します。

FITC 標識 Annexin V と PI を用いた場合、Apoptosis が起こった細胞では、Annexin V の結合は観察されますが、細胞膜は保たれているため、PI と DNA は結合しません。一方、Necrosis 及び後期の Apoptosis の場合には、細胞膜の構造が崩壊するため、Annexin V と PI の両方の結合が観察されることから、早期の Apoptosis を検出できます。

測定原理

MEBCYTO Apoptosis Kit (Annexin V-FITC Kit) は、FITC 標識 Annexin V とヨウ化プロピジウム (Propidium Iodide: PI) を組み合わせ、フローサイトメトリー法を用いて、早期の Apoptosis を検出するキットです。

キット構成

(100 tests)

Name	Materials	Quantity (for 1 kit)
Annexin V-FITC	FITC conjugated Annexin V (ready-for-use)	1.0 mL × 1 vial
Propidium Iodide (PI)	Propidium Iodide (PI) (100 µg/mL) (ready-for-use)	0.5 mL × 1 vial
Binding Buffer	Binding buffer (ready-for-use)	50 mL × 1 bottle

保存

2-8°C にて保存して下さい。

製品有効期限

キットに貼られているラベルを参照下さい。

準備するもの

- ・ リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)
- ・ 適当な試験管
- ・ マイクロピペット
- ・ フローサイトメーター

操作上の留意点

1. 本試薬の構成品のうち、**Annexin V-FITC** には 0.09%アジ化ナトリウム (NaN_3) を添加してあります。濃度は 0.09% ですので毒物には該当しませんが、誤って目や口に入ったり、皮膚に付着した場合は水で十分に洗い流すなどの応急処置を行い、必要があれば、医師の手当てを受けて下さい。また、アジ化ナトリウムは、配管中で爆発性のアジ化銅やアジ化鉛を形成することが報告されています。これらの物質の形成を防ぐため、アジ化ナトリウムを含んだ廃液は十分量の水で洗い流して下さい。
2. 本キットには構成品として **Propidium Iodide (PI)** が含まれています。使用の際には十分注意して取り扱って下さい。
3. 本試薬は研究用試薬です。ヒトの体内に用いたり、診断の目的に使用しないで下さい。

操作法

◆ 試薬の調製

試薬はすべて、そのままご使用下さい。

◆ 測定の手順

Apoptosis の過程は非常に速く進行しますので、染色後、すぐにフローサイトメーターによる測定を実施されることをお勧めします。

STEP A. <細胞染色>

- 1) 細胞にアポトーシスを誘導させ、サンプルとします。
- 2) 細胞 (2.0×10^5 cells) を PBS で 1 回洗浄します。
* 接着系の細胞の場合には、トリプシン処理をおこなった後、培養液で 1 回洗浄し、さらに PBS で 1 回洗浄します。
- 3) 細胞に、**Binding Buffer** を 85 μL 加え、懸濁します。
- 4) **STEP A-3** で準備した細胞懸濁液に、10 μL の **Annexin V-FITC** と、5 μL の **Propidium Iodide (PI)** を加え、よく混合します。
- 5) 暗所、室温 (20-25°C) で 15 分間反応させます。

STEP B. <フローサイトメトリー法による測定>

- 1) 反応後、400 μL の **Binding Buffer** を加えて懸濁します。
- 2) フローサイトメーターを用いて測定します。
* 大抵の場合、Annexin V-FITC のシグナルは FL1 で、PI のシグナルは FL2 あるいは FL3 で検出します。マルチカラーアッセイをおこなう場合は、コンペンセーションが必要になります。

◆ 測定例

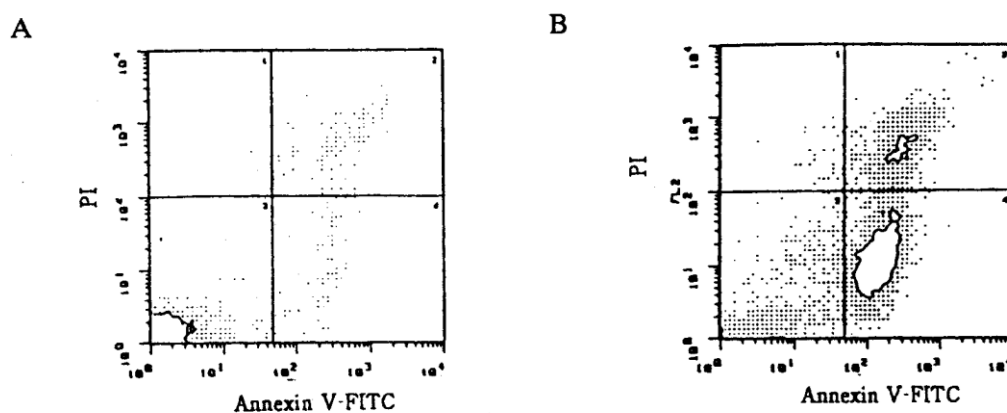


Fig. 1 Example of assay result

A: Viable Jurkat cells (negative control).

B: Flow Cytometry analysis of the Jurkat cells induced apoptosis by anti-Fas antibody (MBL; code no. SY-001).

参考文献

- 1) Nakamura, K., *et al.*, *Ann. Onc.* **20**, 63-70 (2009)
- 2) Ohara, M., *et al.*, *Infect. Immune.* **76**, 4783-4791 (2008)
- 3) Oikawa, Y., *et al.*, *J. Biol. Chem.* **283**, 14242-14247 (2008)
- 4) Olmeda, D., *et al.*, *Cancer Res.* **67**, 11721-11731 (2007)
- 5) Orbach, A., *et al.*, *J. Immunol.* **179**, 7287-7294 (2007)
- 6) Ogawa, T., *et al.*, *Cancer Res.* **65**, 9771-9778 (2005)
- 7) Kimura, A., *et al.*, *Int. Immunol.* **16**, 991-999 (2004)
- 8) Kashio, Y., *et al.*, *J. Immunol.* **170**, 3631-3636 (2003)
- 9) Takahashi, A., *et al.*, *Clin. Cancer Res.* **7**, 74-80 (2001)
- 10) Kashii, Y., *et al.*, *Blood* **96**, 941-949 (2000)
- 11) van Engeland, M., *et al.*, *Cytometry* **24**, 131-139 (1996)
- 12) Vermes, I., *et al.*, *J. Immunol. Methods* **184**, 39-51 (1995)
- 13) Fadok, V. A., *et al.*, *J. Immunol.* **148**, 2207-2216 (1992)

ここにご紹介する以外にも多数の文献がございます。

詳細は弊社 Web サイトをご覧ください。 <https://ruo.mbl.co.jp/>

製造元

MBL A JSR Life Sciences Company

株式会社 医学生物学研究所

URL <https://ruo.mbl.co.jp> e-mail support@mbi.co.jp