

Annexin V-AF488 Apoptosis Detection Kit manual

Lumiprobe Corporation. All rights reserved.

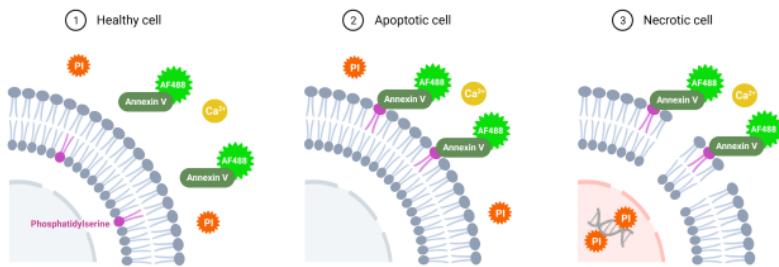
Contents

English: Annexin V-AF488 Apoptosis Detection Kit manual	3-7
Deutsch: Handbuch für das Annexin V-AF488 Apoptose-Kit	8-12
Русский: Инструкция к набору для определения апоптотических клеток с помощью аннексина V-AF488	13-18

Annexin V-AF488 Apoptosis Detection Kit manual

Annexin V (or Annexin A5) is a member of the phospholipid-binding annexin family of intracellular proteins. In flow cytometry and fluorescent microscopy, Annexin V is commonly used to detect apoptotic cells by its ability to specifically bind to phosphatidylserine (PS) in a calcium-dependent manner. The method was first reported by Koopman et al. (1994) [1].

In healthy cells, PS is normally retained in the inner leaflet of the plasma membrane. The early stage of apoptosis is accompanied by the loss of membrane phospholipid asymmetry, resulting in the exposure of PS at the cell surface. This translocation is mediated by the activation of Xkr8 scramblase after its cleavage by effector caspase-3. In conjunction with vital dyes such as Propidium Iodide (PI), fluorochrome-labeled Annexin V can distinguish between healthy (Annexin⁻PI⁻), apoptotic (Annexin⁺PI⁻), and necrotic (Annexin⁺PI⁺) cells [2], and conduct a quantitative analysis of cell death as a result of apoptosis and/or necrosis.



AF488 is bright, photostable, and hydrophilic sulfonated rhodamine fluorophore. The dye emits in the green (FITC) channel. Its absorption max. is at 495 nm, the emission max. is at 519 nm.

Propidium Iodide is a membrane-impermeable DNA stain allowing to differentiate necrotic, apoptotic, and healthy cells based on membrane integrity. After DNA binding, the dye emits in the orange-red channel. Its absorption max. is at 535 nm, the

emission max. is at 617 nm.

This **Apoptosis Detection Kit** for 50 tests contains all necessary reagents for labeling apoptotic and necrotic cells with AF488-conjugated Annexin V and Propidium Iodide.

Kit components

Kit component	Count	
	11172 10 assays	21172 50 assays
11515, Annexin V-AF 488 conjugate, 1 ug	1	—
21515, Annexin V-AF 488 conjugate, 5 ug	—	1
19010, Propidium Iodide solution, 0.1 mg/ml, 100 uL	1	1
83215, Annexin V Binding Buffer, 5x, 15 mL	1	1

Transportation: at room temperature for 1 week. Store at -20°C.

Shelf life 9 months.

Recommended final concentrations of Annexin V-AF488 are 2 to 5 µg/mL, depending on the studied cell culture. Before the experiment, it is necessary to test different dilutions of Annexin V-AF488 to determine the optimal concentration.

Staining with Propidium Iodide is *optional*. This step can be skipped if there is no need to investigate necrosis.

Important! *Annexin V can only be used as a marker of apoptosis in cells with an intact plasma membrane. If the integrity of the plasma membrane is violated, Annexin V can bind to PS inside the cell and give a false positive result.*

Preparation of solutions

1. Dissolve the content of the **Annexin V-AF488 lyophilized conjugate (11172)** tube in 50 µL of deionized water. / Dissolve the content of the **Annexin V-AF488 lyophilized conjugate (21172)** tube in 250 µL of deionized water.

Important! *The dissolved conjugate should be stored protected from light at 2-8°C. In solution, the conjugate is stable for a month. For longterm use, it is recommended to prepare aliquots and store them at -20°C. Avoid re-freezing!*
2. Prepare the required volume of 1x Binding Buffer by mixing 1 part of **5x Binding Buffer** with 4 parts of deionized water.

Cell staining

1. Carefully remove adherent cells from the growth surface in a suitable manner. With suspension cells, start work from the next step.
2. Wash cells once with cold PBS (pH7.4) and once with 1x Binding Buffer.
3. Resuspend cells in cold 1x Binding Buffer.
4. Collect 100 µL of cell suspension (1×10^5 to 1×10^6 cells/mL) in a 1.5-mL microcentrifuge tube. For flow cytometry, it is necessary to prepare additional tubes with appropriate controls (see description of controls below).
5. Add 2-5 µL of Annexin V-AF488 solution to each tube, and incubate for 10-15 min at room temperature, protected from light.
6. Without preliminary wash, add 400 µL of 1x Binding Buffer to each tube.
7. *(Optional)* Add 5 µL Propidium Iodide to each tube. Gently mix the contents of the tube and incubate for 5 min at room temperature, protected from light.

Important! *Do not wash the cells to remove Propidium Iodide. Propidium iodide must remain in the buffer during data collection.*
8. Stained cells should be stored at 2-8°C in a dark place until analysis.

Important! Quantitative analysis by flow cytometry or fluorescence microscopy must be conducted within 4 hours from the start of the staining due to the negative effect of Propidium Iodide on cell viability.

Flow cytometry

1. For cytofluorimetric analysis of apoptosis and necrosis, it is necessary to prepare the following controls: unstained cells (negative control for instrument setup); cells stained with Annexin V-AF488 only, and cells stained with Propidium Iodide only (to adjust compensation).
2. Analyze binding of Annexin V-AF488 using the FITC emission signal detector.
3. Analyze Propidium Iodide staining using the phycoerythrin emission signal detector.

Fluorescence microscopy

1. Transfer a drop of the stained cell suspension onto a glass slide. Cover the cells with a coverslip.
2. Alternatively, adherent cells can be stained directly on a coverslip. After staining, invert the coverslip onto the slide to place the cells between the slide and the coverslip.
3. *(Optional)* After staining with Annexin V, cells can be washed with 1x binding buffer and fixed in 2% paraformaldehyde before imaging. Do not fix cells prior to incubation with Annexin V-AF488, as any disruption of the cell membrane may cause non-specific binding of Annexin V to PS on the inner surface of the cell membrane.
4. Imaging of the cells with a fluorescent microscope is carried out with filter sets for FITC and rhodamine.

Staining result

- Early apoptotic cells having bound Annexin V-AF488 feature a green colored the plasma membrane.
- Necrotic cells are stained red as a result of the penetration of Propidium Iodide into the cell.
- Apoptotic cells with impaired membrane integrity due to secondary necrosis are stained red (Propidium Iodide) with a green halo (Annexin V-AF488) on the cell surface (plasma membrane).
- Viable cells remain unstained.

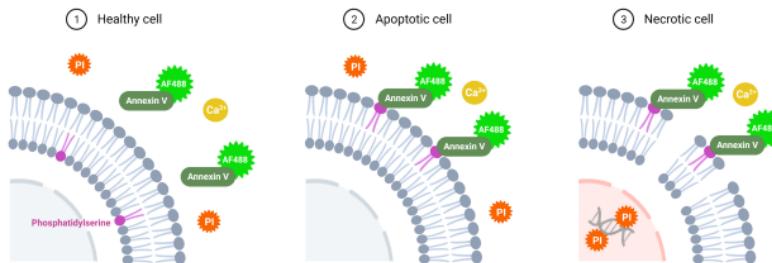
Links

- [1] Koopman G., Reutelingsperger C.P., Kuijten G.A., Keehnen R.M., Pals S.T., van Oers M.H. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*. 1994. 84(5). P.1415-20.
- [2] Martin S.J., Reutelingsperger C.P., McGahon A.J., Rader J.A., van Schie R.C., 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. *J Exp Med*. 1995. 182(5). P.1545-56.

Handbuch für das Annexin V-AF488 Apoptose-Kit

Annexin V (oder Annexin A5) ist ein intrazelluläres Protein aus der Familie der Phospholipidbindenden Annexine. In der Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie wird Annexin V häufig verwendet, um apoptotische Zellen mithilfe seiner Fähigkeit zur calciumabhängigen Bindung an Phosphatidylserin (PS) nachzuweisen. Die Methode wurde zuerst von Koopman et al. (1994) [1] beschrieben.

In gesunden Zellen findet sich PS normalerweise auf der Innenseite der Plasmamembran. Die Anfangsphase der Apoptose wird von Verlust der Membransymmetrie begleitet, was zur Exposition von PS an der Zelloberfläche führt. Dieser Transfer wird durch die Aktivierung der Scramblase Xkr8 nach ihrer Spaltung durch Effektorcaspase 3 ermittelt. Fluorochrommarkiertes Annexin V kann in Verbindung mit Vitalfarbstoffen wie Propidiumiodid (PI) zwischen gesunden (Annexin⁻PI⁻), apoptotischen (Annexin⁺PI⁻) und nekrotischen (Annexin⁺PI⁺) Zellen unterscheiden [2]. Der Zelltod als Folge von Apoptose und/oder Nekrose kann dadurch quantitativ bestimmt werden.



AF488 ist ein heller, photostabiler und hydrophiler Rhodamin-Fluorophor. Der Farbstoff emittiert im grünen (FITC) Bereich des Spektrums. Das Absorptionsmaximum beträgt 495 nm und das Emissionsmaximum liegt bei 519 nm.

Propidiumiodid ist ein membranundurchlässiger DNA-Farbstoff, der eine Unterscheidung zwischen nekrotischen, apoptotischen und gesunden Zellen anhand

ihrer Membranintegrität ermöglicht. Nach der Bindung an die DNA emittiert der Farbstoff orange-rotes Fluoreszenzlicht. Das Absorptionsmaximum beträgt 535 nm und das Emissionsmaximum liegt bei 617 nm.

Das vorliegende **Apoptose-Kit** für 50 Tests enthält alle notwendigen Reagenzien für die Markierung von apoptotischen und nekrotischen Zellen mit **AF488-konjugiertem Annexin V** und Propidiumiodide.

Bestandteile

Komponente	Anzahl		
	11172	21172	
	10 assays	50 assays	
11515, Annexin V-AF 488-Konjugat, 1 ug	1	—	
21515, Annexin V-AF 488-Konjugat, 5 ug	—	1	
19010, Propidiumiodid-Lösung, 0,1 mg/ml, 100 uL	1	1	
83215, Annexin-V-Bindungspuffer, 5x, 15 mL	1	1	

Transport: bei Raumtemperatur bis zu eine Woche. Lagerungsbedingungen: bei -20 °C.

Haltbarkeit: 9 Monate.

Die empfohlene finale Konzentration von Annexin-V-AF488 beträgt 2 bis 5 µg/ml, abhängig von der untersuchten Zellkultur. Vor dem Experiment müssen verschiedene Verdünnungen von Annexin-V-AF488 getestet werden, um die optimale Konzentration zu bestimmen.

Die Färbung mit Propidiumiodid ist *optional*. Dieser Schritt kann übersprungen werden, wenn die Untersuchung auf Nekrose nicht erforderlich ist.

Wichtig! *Annexin V kann als Apoptosemarker nur in Zellen mit intakter Plasmamembran verwendet werden. Sobald die Integrität der Plasmamembran gestört*

wird, kann Annexin V an PS innerhalb der Zelle binden und dadurch ein falsches positives Ergebnis liefern.

Herstellung der Lösungen

1. Lösen Sie das lyophilisierte **Annexin-V-AF488 Konjugat (11172)** in 50 µl deionisiertem Wasser. / Lösen Sie das lyophilisierte **Annexin-V-AF488 Konjugat (21172)** in 250 µl deionisiertem Wasser.
Wichtig! Das aufgelöste Konjugat sollte vor Licht geschützt und bei 2–8 °C gelagert werden. In Lösung ist das Konjugat einen Monat lang stabil. Zur langfristigen Nutzung empfiehlt es sich, Aliquots herzustellen und bei -20 °C aufzubewahren, wobei Wiedereinfrieren vermeiden werden sollte.
2. Stellen Sie das erforderliche Volumen von 1x Bindungspuffer her, indem Sie 1 Teil der **5x Pufferlösung** mit 4 Teilen deionisierten Wassers verdünnen.

Anfärbung der Zellkerne

1. Adhärente Zellen in geeigneter Weise vorsichtig von der Kulturunterlage entfernen. Bei Suspensionszellen beginnen Sie die Arbeit mit dem nächsten Schritt.
2. Waschen Sie die Zellen einmal mit kaltem PBS (pH 7.4) und einmal mit 1x Bindungspuffer.
3. Resuspendieren Sie die Zellen in kaltem 1x Bindungspuffer.
4. Füllen Sie 100 µl Zellsuspension (1×10^5 bis 1×10^6 Zellen/ml) in ein 1,5-ml Mikrozentrifugenrörchen. Für die Durchfluszytometrie sind zudem geeignete Kontrollen vorzubereiten (siehe Beschreibung der Kontrollen unten) erforderlich.
5. Fügen Sie jedem Rörchen 2–5 µl Annexin-V-AF488-Lösung hinzu und inkubieren Sie diese für 10–15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln. Vor Licht schützen.
6. Geben Sie ohne vorheriges Waschen 400 µl 1x Bindungspuffer in jedes Rörchen.
7. (Optional) Geben Sie 5 µl Propidiumiodid in jedes Rörchen. Mischen Sie

vorsichtig und inkubieren Sie 5 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur.

Wichtig! Waschen Sie das Propidiumiodid nicht aus der Zellsuspension.
Propidiumiodid muss während der Messung im Puffer bleiben.

8. Die gefärbten Zellen sollten bis zur Analyse bei 2–8 °C dunkel Ort gelagert werden.

Wichtig! Die quantitative Analyse mittels Durchflusszytometrie oder Fluoreszenzmikroskopie muss innerhalb von 4 Stunden nach Beginn der Färbung ausgeführt werden (wegen der Beeinträchtigung der Zellaktivität durch Propidiumiodid).

Durchflusszytometrie

1. Für die zytofluorimetrische Analyse der Apoptose und Nekrose ist die Herstellung foldender Kontrollproben erforderlich: ungefärbte Zellen (Negativkontrolle zur Gerätekalibrierung), nur mit Annexin-V-AF488 gefärbte Zellen und nur mit Propidiumiodid gefärbte Zellen (für die Kompensationseinstellungen).
2. Analysieren Sie die Bindung von Annexin-V-AF488 mit dem.
3. Analysieren Sie die Propidiumiodid-Färbung mit dem Fluoreszenzdetektor für Phycoerythrin.

Fluoreszenzmikroskopie

1. Geben Sie einen Tropfen der gefärbten Zellsuspension auf einen Objektträger. Decken Sie die Zellen mit einem Deckglas ab.
2. Alternativ können adhärente Zellen direkt auf einem Deckglas gefärbt werden. Legen Sie dieses so auf einen Objektträger, dass sich die Zellen zwischen dem Objektträger und dem Deckglas befinden.
3. (optional) Mit Annexin-V gefärbte Zellen können mit 1x Bindungspuffer gewaschen und vor der Bildgebung in 2% Paraformaldehyd fixiert werden. Fixieren Sie die Zellen nicht vor der Inkubation mit Annexin-V-AF488, da eine Beschädigung der

Zellmembran die unspezifische Bindung von Annexin-V an PS auf der Innenseite der Zellmembran verursachen kann.

4. Zur Bildgebung am Fluoreszenzmikroskop eignen sich Filtersätze für FITC und Rhodamin.

Färbungsergebnis

- Frühe apoptotische Zellen, die Annexin-V-AF488 gebunden haben, weisen eine Grünfärbung in der Plasmamembran auf.
- Nekrotische Zellen sind rot gefärbt als Ergebnis des Eindringens von Propidiumiodid in die Zelle.
- Apoptotische Zellen mit beeinträchtigter Membranintegrität aufgrund sekundärer Nekrose sind rot gefärbt (Propidiumiodid) mit grüner Plasmamembran (Annexin-V-AF488).
- Gesunde Zellen bleiben ungefärbt.

Referenzen

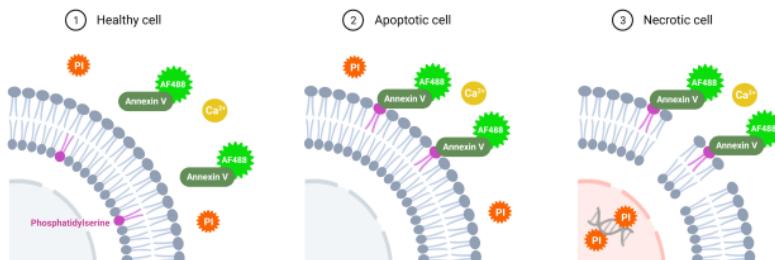
[1] Koopman G., Reutelingsperger C.P., Kuijten G.A., Keehnen R.M., Pals S.T., van Oers M.H. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*. 1994. 84(5). P.1415-20.

[2] Martin S.J., Reutelingsperger C.P., McGahon A.J., Rader J.A., van Schie R.C., 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. *J Exp Med*. 1995. 182(5). P.1545-56.

Инструкция к набору для определения апоптотических клеток с помощью аннексина V-AF488

Аннексин V (или Аннексин A5) принадлежит семейству аннексинов, внутриклеточных белков, связывающих фосфолипиды. Аннексин V обычно используется в проточной цитометрии и флуоресцентной микроскопии для определения апоптотических клеток, благодаря его способности специфически связываться с фосфатидилсерином (ФС) кальций-зависимым образом. Метод был впервые описан Коорман с соавт. (1994) [1].

Одним из ранних проявлений программируемой клеточной гибели (апоптоза) является нарушение асимметрии фосфолипидного бислоя. В здоровых клетках ФС содержится только с внутренней стороны плазматической мембранны. Во время апоптоза мембранные асимметрии исчезает, ФС перемещается наружную сторону мембранны и становится доступным для связывания флуоресцентно меченным аннексином V. Данная транслокация опосредована активацией скремблазы Xkr8, после ее расщепления эффекторной каспазой-3. В сочетании с другими прижизненными красителями, такими как йодистый пропидий (PI), связывание аннексина V с ФС позволяет различать популяции здоровых (Аннексин⁻PI⁻), апоптотических (Аннексин⁺PI⁻) и некротических (Аннексин⁺PI⁺) клеток [2] и проводить количественный анализ клеточной гибели в результате апоптоза и/или некроза.



AF488 — сульфированный родамин, яркий, фотостабильный и гидрофильный флуорофор. Краситель излучает в зеленом (FITC) канале. Максимум поглощения — 495 нм. Максимум эмиссии — 519 нм.

Йодистый пропидий (PI) — непроницаемый через плазматическую мембрану ДНК-краситель, позволяющий различать популяции некротических, апоптотических и здоровых клеток на основе целостности мембранны. После связывания с ДНК краситель излучает в оранжево-красном канале. Максимум поглощения — 535 нм. Максимум эмиссии — 617 нм.

Данный набор для определения апоптотических клеток рассчитан на 50 тестов и содержит все необходимые реагенты для мечения апоптотических и некротических клеток с помощью аннексина V, конъюгированного с AF488, и йодистого пропидия.

Состав набора

Компонент набора	Количество	
	11172 10 assays	21172 50 assays
11515, Аннексин V-AF 488 конъюгат, 1 μg	1	—
21515, Аннексин V-AF 488 конъюгат, 5 μg	—	1
19010, Йодистый пропидий, водный раствор, 0.1 мг/мл, 100 μL	1	1
83215, Буфер для связывания аннексина V, 5x, 15 mL	1	1

Транспортировка: до одной недели при комнатной температуре. Хранение: при -20°C.

Срок хранения 9 месяцев.

Рекомендуемые концентрации аннексина V-AF488 — от 2 до 5 мкг/мл, в зависимости от исследуемой клеточной культуры. Перед экспериментом

необходимо опробовать разные разведения аннексина V-AF488 для определения оптимальной концентрации.

Окрашивание с помощью йодистого пропидия — *опционально*. Этот этап можно пропустить, если в задачах нет необходимости исследовать некроз.

Важно! Аннексин V можно использовать в качестве маркера апоптоза только в клетках с интактной плазматической мембраной. При нарушении целостности плазматической мембранны аннексин V может связываться с ФС внутри клетки и давать ложноположительный результат.

Приготовление растворов

1. Растворите содержимое пробирки с лиофилизированным **аннексином V-AF488 (11172)** в 50 мкл дейонизованной воды. / Растворите содержимое пробирки с лиофилизированным **аннексином V-AF488 (21172)** в 250 мкл дейонизованной воды.

Важно! Разведенный рекомбинантный белок необходимо хранить защищенным от света при температуре 2-8°C. В растворе коньюгат стабилен в течение месяца. При длительных экспериментах рекомендуется приготовить аликовты и хранить их при температуре -20°C. Избегать повторного замораживания!

2. Приготовьте необходимый объём 1x буфера для связывания, смешав 1 часть **5x буфера для связывания** с 4 частями дейонизированной воды.

Окрашивание клеток

1. Адгезированные клетки аккуратно снимите с поверхности роста подходящим способом. С суспензионными клетками начинайте работу со следующего пункта.
2. Промойте клетки один раз охлаждённым PBS (рН7.4) и один раз 1x буфером для связывания.

3. Ресуспензируйте клетки в холодном 1x буфере для связывания.
4. Отберите 100 мкл супензии клеток (от 1×10^5 до 1×10^6 клеток/мл) в микроцентрифужные пробирки объемом 1.5 мл. Для проточной цитометрии необходимо заготовить дополнительные пробирки с соответствующими контролями (см. описание контролей ниже).
5. Добавьте 2-5 мкл раствора аннексина V-AF488 в каждую пробирку, инкубируйте в течение 10-15 мин при комнатной температуре в защищенном от света месте.
6. Без предварительной отмычки добавьте 400 мкл 1x буфера для связывания в каждую пробирку.
7. *(Опционально)* Добавьте 5 мкл йодистого пропидия в каждую пробирку с клетками. Аккуратно перемешайте содержимое пробирки и инкубируйте в течение 5 мин при комнатной температуре в защищенном от света месте.
Важно! Не промывайте клетки от йодистого пропидия. Йодистый пропидий должен оставаться в буфере во время сбора данных.
8. Окрашенные клетки храните при температуре 2-8°C в защищенном от света месте до проведения анализа.
Важно! Количество определение клеток методом проточной цитометрии или флуоресцентной микроскопии необходимо производить в течение 4 ч от начала окрашивания из-за негативного воздействия йодидистого пропидия на жизнеспособность клеток.

Проточная цитометрия

1. Для цитофлуориметрического анализа апоптоза и некроза клеток с помощью аннексина V-AF488 и йодистого пропидия помимо целевого окрашивания необходимо приготовить контроли: неокрашенные клетки (отрицательный контроль для настройки прибора); клетки, окрашенные только аннексином V-AF488, и клетки, окрашенные только йодистым пропидием (для настройки компенсации).

- Анализ связывания аннексина V-AF488 проводят с использованием детектора сигнала FITC.
- Анализ клеток, окрашенных йодистым пропидием, осуществляют с помощью детектора сигнала фикоэритрина.

Флуоресцентная микроскопия

- Отберите каплю суспензии с окрашенными клетками и поместите ее на предметное стекло. Накройте клетки покровным стеклом.
- В качестве альтернативы, адгезированные клетки можно окрашивать непосредственно на покровном стекле. После окрашивания переверните покровное стекло на предметное, так, чтобы клетки находились между предметным и покровным стеклами.
- (Опционально) Клетки после окрашивания аннексином V, перед визуализацией можно промыть 1x буфером для связывания и зафиксировать в 2% параформальдегиде. Не фиксируйте клетки перед инкубацией с аннексином V-AF488, поскольку любое нарушение клеточной мембранны может вызвать неспецифическое связывание аннексина V с ФС на внутренней поверхности клеточной мембрани.
- Исследование клеток под флуоресцентным микроскопом осуществляют, используя двойной набор фильтров для FITC и родамина.

Результат окрашивания

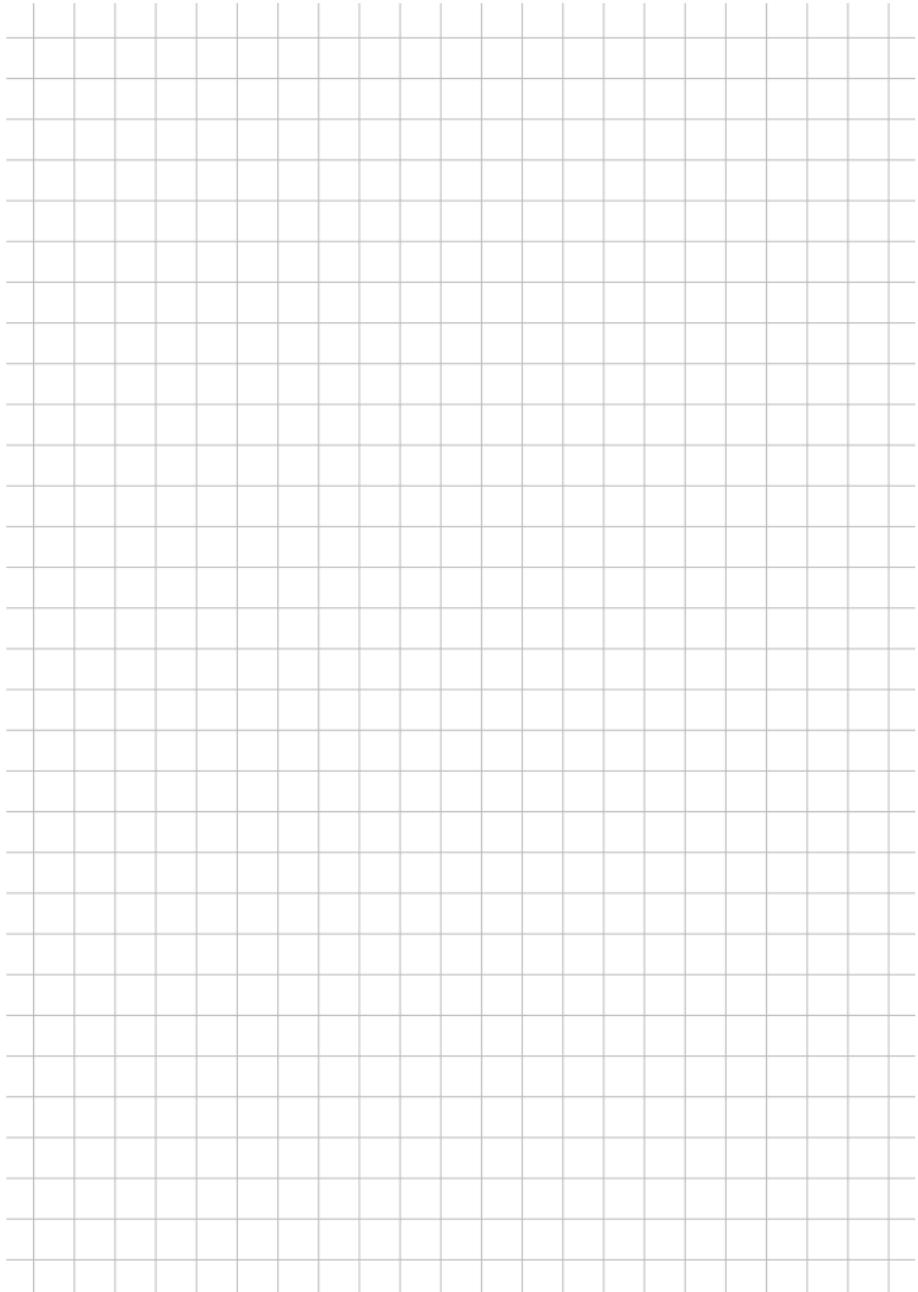
- Ранние апоптотические клетки, связавшие аннексин V-AF488, окрашиваются в зеленый цвет в плазматической мемbrane.
- Некротические клетки в результате проникновения йодистого пропидия внутрь клетки будут окрашены красным.
- Апоптотические клетки с нарушенной в результате вторичного некроза целостностью мембрани будут иметь красное окрашивание (йодистый

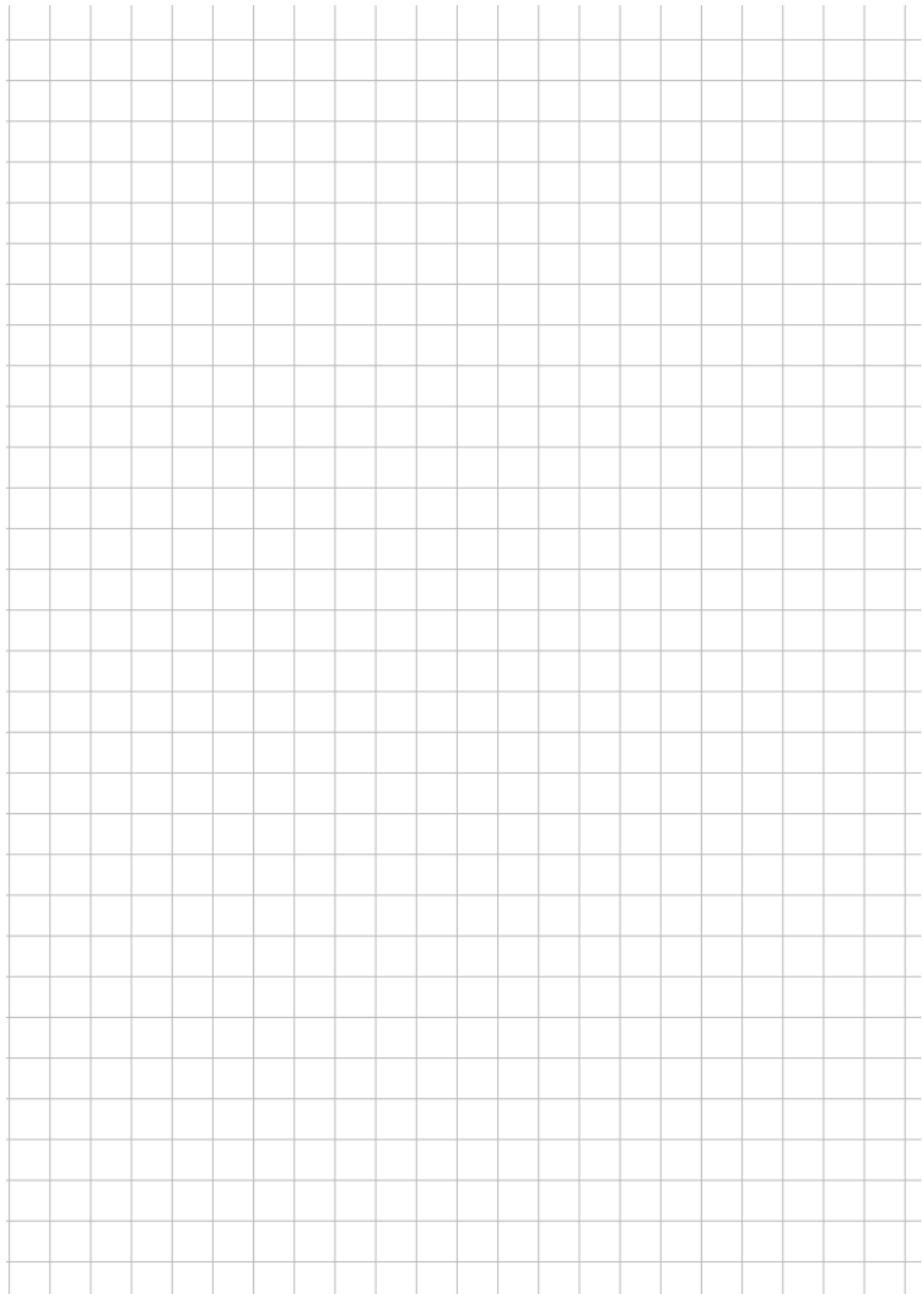
пропидий) и ореол зеленого окрашивания (AF488) на клеточной поверхности (плазматическая мембрана).

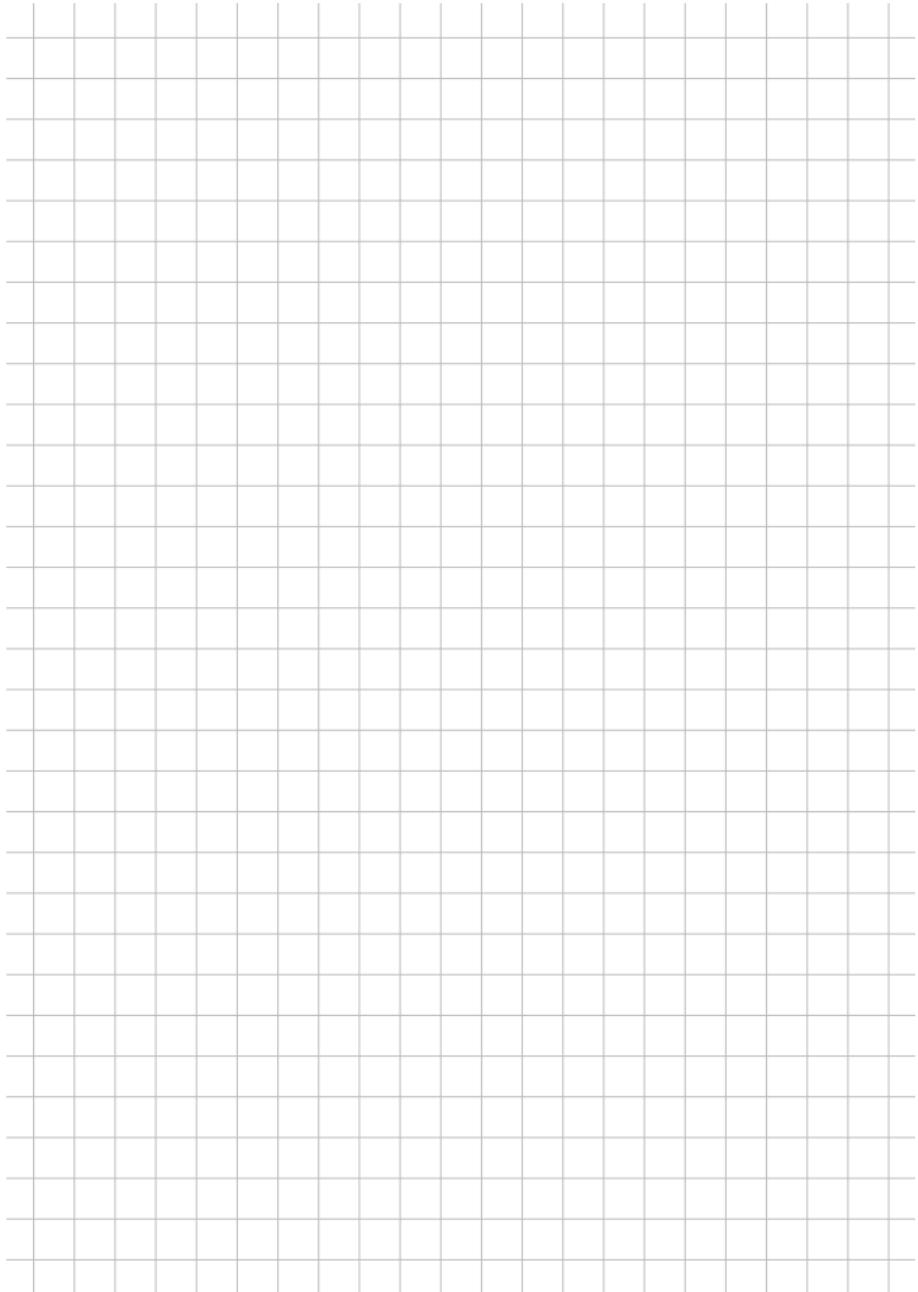
- Здоровые клетки будут лишены окрашивания.

Ссылки

- [1] Koopman G., Reutelingsperger C.P., Kuijten G.A., Keehnen R.M., Pals S.T., van Oers M.H. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*. 1994. 84(5). P.1415-20.
- [2] Martin S.J., Reutelingsperger C.P., McGahon A.J., Rader J.A., van Schie R.C., 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. *J Exp Med*. 1995. 182(5). P.1545-56.









22.09.509-QM
Issued by INSPECT



www.lumiprobe.com

