

ЕВРОПЕЙСКИ СОЦИАЛЕН ФОНД 2007 – 2013
МИНИСТЕРСТВО НА ОБРАЗОВАНИЕТО И НАУКАТА
ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА „РАЗВИТИЕ НА ЧОВЕШКИТЕ РЕСУРСИ“



BG051PO001-3.3.06 -0059

ФУНДАМЕНТАЛНО И ПРИЛОЖНО ОБУЧЕНИЕ
НА ДОКТОРАНТИ, ПОСТДОКТОРАНТИ,
СПЕЦИАЛИЗАНТИ И МЛАДИ УЧЕНИ
В ИНТЕРДИСЦИПЛИНАРНИ БИОЛОГИЧНИ НАПРАВЛЕНИЯ
И ИНОВАЦИОННИ БИОТЕХНОЛОГИИ.

Бенефициент:

Институт по биология и имунология на размножаването "Акад. Кирил Братанов"

Партньори:

Софийски Университет „Св. Климент Охридски“, Биологически Факултет
Химикотехнологичен и металургичен университет, катедра „Биотехнология“
Проген ООД

Образец № 3

ДО ИБИР – БАН
бул. „Цариградско шосе“ № 73
гр. София

ТЕХНИЧЕСКА ОФЕРТА

За участие в открита процедура за възлагане на обществена поръчка с предмет:

«Доставка на материали /реактиви/ и консумативи по обособени позиции»

ЗА ОБОСОБЕНА ПОЗИЦИЯ № и име .

Обособена позиция № 3 - Китове за детекция на апоптоза

Настоящата оферта е подадена от: Ай Ви Ди България ООД/наименование на участника/
ЕИК/БУЛСТАТ 200123131;

УВАЖАЕМА ГОСПОЖО ДИРЕКТОР,

Заличени подписи - чл.2, ал.1 от
ЗЗЛД

Заличен печат - чл.37, ал1 от ЗЗК -
търговска тайна;
Заличен подпис - чл.2, ал.1 от
ЗЗЛД

Заличени подписи -
чл.2, ал.1 от ЗЗЛД

1. С настоящето представяме нашата техническа оферта за Обособена позиция № 3 - Китове за детекция на апоптоза.... (офертата се изготвя за всяка обособена позиция по отделно) от поръчката.

Предлагаме следните артикули за обособената позиция, по която участвуваме, като прилагаме попълнена таблица, доказваща съответствието на предлаганите от нас артикули с изискванията на Възложителя:

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
№ по ред	Номер от ОП	Наименование	Единица мярка	Количество	Предложение на участника, включващо технически характеристики на артикула, съобразно изискванията на техническата спецификация на Възложителя	Предложение на участника, включващо каталожен или партиден номер на артикула, даден от производителя на артикула и име на производителя на артикула (тази колона се попълва задължително само за обособени позиции № 1 – 38)
	ОП Р-3	Обособена позиция № 3 - Китове за детекция на апоптоза				

37	ОП Р-3-1	Кит за фиксация и пермеабилзация в една стъпка, съдържащ концентрат и разредител, подходящ за използване с антитела срещу цитокини, транскрипционни фактори и нуклеарни протеини; 100 мл	опак овка	2	Кит за фиксация и пермеабилзация в една стъпка, съдържащ концентрат и разредител, подходящ за използване с антитела срещу цитокини, транскрипционни фактори и нуклеарни протеини; 100 мл	88-8824-00, eBioscience, 100 tests
38	ОП Р-3-2	Кит за детекция на апоптоза, съдържащ: Анексин V - FITC, 10x буфер за свързване и Пропидиев йодид; опаковка за 100 теста	опак овка	2	Кит за детекция на апоптоза, съдържащ: Анексин V - FITC, 10x буфер за свързване и Пропидиев йодид; опаковка за 100 теста	88-8005-74 , eBioscience, 200 tests
39	ОП Р-3-3	Кит за детекция на апоптоза, съдържащ: 10X буфер за свързване; Анексин V - APC; разтвор на Пропидиев йодид; опаковка за 200 теста	опак овка	1	Кит за детекция на апоптоза, съдържащ: 10X буфер за свързване; Анексин V - APC; разтвор на Пропидиев йодид; опаковка за 200 теста	88-8007-74 , eBioscience, 200 tests
40	ОП Р-3-4	Кит за детекция на апоптоза, съдържащ: Анексин V-FITC, разтвор на Пропидиев йодид, Анексин V буфер за свързване ; опаковка за 100 теста	опак овка	1	Кит за детекция на апоптоза, съдържащ: Анексин V-FITC, разтвор на Пропидиев йодид, Анексин V буфер за свързване ; опаковка за 100 теста	BMS500FI/100 , eBioscience 100 tests
41	ОП Р-3-5	Кит за детекция на апоптоза, съдържащ: Анексин V-Cy3; 6-carboxyfluorescein diacetate (6-CFDA); 10x буфер за свързване;	опак овка	2	Кит за детекция на апоптоза, съдържащ: Анексин V-Cy3; 6-carboxyfluorescein	АРОАС-1КТ, 200 tests , Sigma Заличен печат - чл.37, ал1 от ЗЗК - търговска тайна; Заличен подпис - чл.2, ал.1 от ЗЗЛД

Проектът се осъществява с финансовата подкрепа на Оперативна програма „Развитие на човешките ресурси“, 2007-2013, съфинансирана от Европейския съюз чрез “Европейския социален фонд”

Заличен подпис - чл.2, ал.1 от ЗЗЛД

Заличени подписи - чл.2, ал.1 от ЗЗЛД

Заличен подпис - чл.2, ал.1 от ЗЗЛД

Заличен печат - чл.37, ал1 от ЗЗК -
търговска тайна;
Заличен подпис - чл.2, ал.1 от ЗЗЛД

		или еквивалент; опаковка от 100 теста			diacetate (6-CFDA); 10% буфер за свързване; или еквивалент; опаковка от 100 теста	
42	ОП Р-3-6	Apo-BrdU апоптоза детектиращ кит или еквивалент	опаковка	3	Apo-BrdU апоптоза детектиращ кит или еквивалент	88-6671-88, eBioscience, 100 tests

Забележка: Колони (1) – (5) от таблицата се попълват съгласно Техническата Спецификация на Възложителя - Приложение № 1 от документацията за участие – без да се променят !!

2. Срокът за изпълнение на доставки по обособената позиция, след получаване на възлагателно писмо от Възложителя е до **1 (един) календарен ден** (минимум 1 ден и не повече от 45 календарни дни. При непотъпване от участника се приема 45 кал. дни).

3. За обособени позиции № 1 – 38: Остатъчният срок на годност на предложените с офертата стоки към датата на доставка ще бъде **10 (десет) месеца** (не по-малко от 9 месеца, където е приложимо). Под остатъчен срок на годност се има предвид времето за което реактивът е годен за употреба след доставка в сградата на Възложителя.

4. Ако бъдем избрани за изпълнител се ангажираме да осигурим предложените с офертата стоки за целия срок на договора. В случай, че поради непредвидени обстоятелства същите бъдат спрени от производство се ангажираме да предложим продукт с еквивалентни или сходни характеристики.

5. Осигуряваме следното време за реакция, при подадена рекламация на артикул от страна на Възложителя, съгласно условията на договора: **1 (един) календарен ден** (минимум 1 и максимум 14 календарни дни. При непотъпване от участника се приема 14 кал. дни). В посочения срок ще отговорим на Възложителя обосновано в писмен вид дали приемаме или отхвърляме рекламацията.

6. Стоките (с изключение на рециклирани тонери) ще се доставят в оригинална, ненарушена опаковка на производителя, при спазване на условията на производителя за транспорт и съхранение на артикула.

7. При доставка, стоките ще бъдат придружени от приложимите за случая сертификати и документи, издадени от производителя и/или контролиращи организации.

8. Подаването на настоящата техническа оферта удостоверява безусловното приемане от наша страна на всички изисквания и задължения, поставени от Възложителя в провежданата процедура за съответната обособена позиция.

! ВАЖНО: Ако участникът подава оферта за повече от една обособена позиция, плик № 2, т.е. Техническа оферта се представя за всяка обособена позиция по отделно в отделен плик № 2 и се надписва по следния начин:

„Име на участника:

Предложение за изпълнение на поръчката по обособена позиция №”

Заличен печат - чл.37, ал1 от ЗЗК -
търговска тайна;
Заличен подпис - чл.2, ал.1 от ЗЗЛД

Дата 08.08.2014
гр. София

/ подпис / печат /

Заличени лични данни - чл.2, ал.1 от ЗЗЛД

Ай Ви Ди България ООД

Заличен подпис - чл.2, ал.1
от ЗЗЛД

Заличени подписи- чл.2,
ал.1 от ЗЗЛД

Проектът се осъществява с финансовата подкрепа на Оперативна програма „Развитие на човешките ресурси” 2007-2013, съфинансирана от Европейския съюз чрез “Европейския социален фонд“

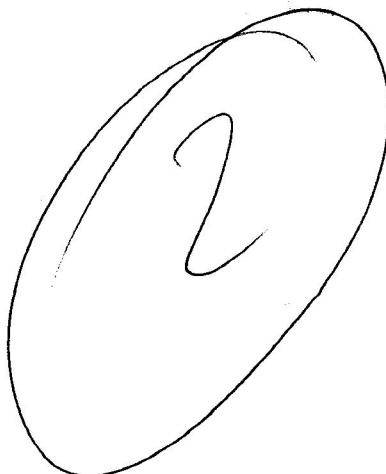
Заличен подпис -
чл.2, ал.1 от ЗЗЛД

Изх. No: 165/07.09.2014

До

Заличени лични данни - чл.2, ал.1 от ЗЗЛД

Председател на комисията
ИБИР БАН - София
Бул. Цариградско шосе 73
гр. София



Относно: Открита процедура за възлагане на обществена поръчка с предмет:
"Доставка на материали и реактиви и консумативи по обособени позиции" с 39 обособени позиции,
открита с решение N 375-НО от 20.06.2014г. На Възложителя

Уважаеми г-н Иванов,

Съгласно протокол от 12.08.2014 по чл. 68, ал. 7 от ЗОП от работата на Комисията по отваряне, проверка и констатиране на наличието и съответствието на представените документи в плик N 1 по обществена поръчка с предмет: "Доставка на материали и реактиви и консумативи по обособени позиции" с 39 обособени позиции, открита с решение N 375-НО от 20.06.2014г. На Възложителя, моля приемерте следните документи и разяснения:

По точките от протокола:

Заличени текстове, тъй като се отнасят до други обособени позиции.

4.1.1. Описателен лист за об. Позиция 3 /всички подпозиции от 3.1.-3.6/ с приложен електронен носител с методики на английски и български.

4.1.2 приложена – записана на електронния носител

4.1.3 приложена – записана на електронния носител

4.1.4 Каталогния номер за подпозиция 3.6 е 88-6671

Заличени текстове, тъй като се отнасят до други обособени позиции.

Заличени текстове, тъй като се отнасят до други обособени позиции.

Заличен подпис - чл.2, ал.1 от ЗЗЛД

С Уважение,

Заличени лични данни - чл.2, ал.1 от ЗЗЛД

/Управител/

07.09.2014 г.

София

ОПИСАТЕЛЕН ЛИСТ ЗА ПРЕДОСТАВЕНИТЕ МЕТОДИКИ НА ДИСК ПО ОБОСОБЕНА ПОЗИЦИЯ 3

НОМЕР ОТ ОП	НАИМЕНОВАНИЕ	ИМЕ НА ФАЙЛА
ОП Р-3-1	Кит за фиксация и пермеабилзация в една стъпка, съдържащ концентрат и разреждител, подходящ за използване с антитела срещу цитокини, транскрипционни фактори и нуклеарни протеини; 100 млОПР-3-1_88-8824.BG	ОПР-3-1_88-8824
ОП Р-3-2	Кит за детекция на апоптоза, съдържащ: Анексин V - FITC, 10x буфер за свързване и Пропидиев йодид; опаковка за 100 теста	ОПР-3-2_88-8005
ОП Р-3-3	Кит за детекция на апоптоза, съдържащ: 10X буфер за свързване; Анексин V - APC; разтвор на Пропидиев йодид; опаковка за 200 теста	ОП Р-3-388-8007
ОП Р-3-4	Кит за детекция на апоптоза, съдържащ: Анексин V-FITC, разтвор на Пропидиев йодид, Анексин V буфер за свързване ; опаковка за 100 теста	ОП Р-3-4BMS500FI
ОП Р-3-5	Кит за детекция на апоптоза, съдържащ: Анексин V-Cy3; 6-carboxyfluorescein diacetate (6-CFDA); 10x буфер за свързване; или еквивалент; опаковка от 100 теста	ОП Р-3-5APOAC-1KT
ОП Р-3-6	Аpo-BrdU апоптоза детектиращ кит или еквивалент	ОП Р-3-688-6671-88

Приложените методики на ел. носител са представени на англ. и в превод на български език.

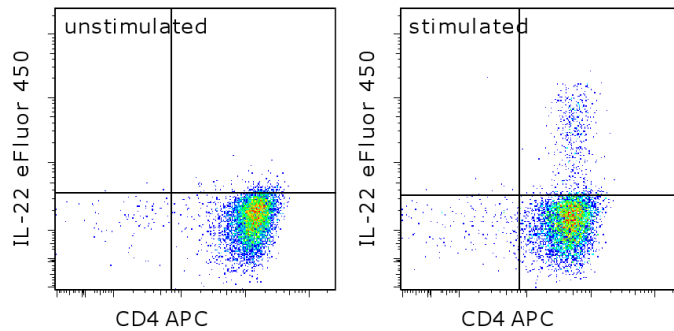
05.09.2014
 Георги Ралчев – управител
 Ай Ви Ди България ООД

Заличен печат - чл.37, ал. 1 от ЗЗК -
 търговска тайна;
 Заличен подпис - чл.2, ал.1 от ЗЗЛД

Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set

Catalog Number: 88-8824

GPR: General Purpose Reagents. For Laboratory Use.



CD4-enriched normal human peripheral blood cells were polarized under Th17 conditions for 10 days then treated with Protein Transport Inhibitor Cocktail (cat. 00-4980) (left) or Cell Stimulation Cocktail (plus protein transport inhibitors) (cat. 00-4975) (right) for 5 hours. Cells were fixed and permeabilized with the Intracellular Fixation & Permeabilization Buffers (cat. 00-8824) and then intracellularly stained with Anti-Human CD4 APC (cat. 17-0049) and Anti-Human IL-22 eFluor[®] 450. Total viable cells, as determined by Fixable Viability Dye eFluor[®] 780, were used for analysis.

Product Information

Contents: Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set

REF **Catalog Number:** 88-8824



Temperature Limitation: Store at 2-8°C. Use within 6 months of receipt. Cautions: Harmful if inhaled, swallowed or by contact.



Batch Code: Refer to vial



Use By: Refer to vial



contains formaldehyde

Description

The Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set is designed for use in intracellular staining and flow cytometric analysis and has been specially formulated to reduce non-specific staining of fluorochrome-labelled antibodies and increase fluorescence signal to noise ratios. In the first step live cells can be “fixed” with the Fixation Buffer, which cross-links proteins. The second step, using the Permeabilization Buffer, creates holes in the membrane thereby allowing the intracellular staining antibodies to enter the cell effectively. Subsequent washing steps, antibody additions, and incubations after cell permeabilization should be performed using the Permeabilization Buffer. The final washing step and cell resuspension prior to running the sample is done using Flow Cytometry Staining Buffer. This kit is commonly used for staining both cytoplasmic proteins as well as proteins in the secretory pathway such as chemokines and cytokines. It is not recommended for intranuclear staining. Instead, please refer to the Foxp3/Transcription Factor Buffer Set (cat. 00-5523) for nuclear staining.

Before the fixation step, it is recommended to label the live cells using one of the Fixable Viability Dyes (eFluor 450, 506, 660 or 780) and then proceed with fixation.

Components

IC Fixation Buffer: cat. 00-8222; 125 mL. The IC Fixation Buffer is supplied at 1X working concentration and contains 4% formaldehyde, which is toxic and suspected carcinogen. Contact with eyes, skin and mucous membranes should be avoided.

Permeabilization Buffer: cat 00-8333; 100 mL. The Permeabilization Buffer is supplied as a 10X concentrate. Precipitates are commonly visible. Buffer can be brought to room temperature and mixed. Allow any precipitates to settle out before making the 1X solution. Prior to use, this should be diluted 10-fold in distilled water. 1X Permeabilization Buffer contains 0.1% saponin and 0.009% sodium azide and can be filtered if precipitates are visible.

Applications Reported

Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set has been reported for use in flow cytometric analysis. Please refer to Best Protocols for specific protocols in cytokine staining.

Related Products

00-4222 Flow Cytometry Staining Buffer

Not for further distribution without written consent.

Copyright © 2000-2012 eBioscience, Inc.

Tel: 888.999.1371 or 858.642.2058 • Fax: 858.642.2046 • www.ebioscience.com • info@ebioscience.com

Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set

Catalog Number: 88-8824

GPR: General Purpose Reagents. For Laboratory Use.

00-8222 IC Fixation Buffer

00-8333 Permeabilization Buffer (10X)

65-0863 Fixable Viability Dye eFluor® 450

65-0864 Fixable Viability Dye eFluor® 660

65-0865 Fixable Viability Dye eFluor® 780

65-0866 Fixable Viability Dye eFluor® 506

Not for further distribution without written consent.

Copyright © 2000-2012 eBioscience, Inc.

Tel: 888.999.1371 or 858.642.2058 • Fax: 858.642.2046 • www.ebioscience.com •
info@ebioscience.com



Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set
каталожен номер 88-8824

Съхранение: Съхранявайте при температура 2-8 ° C. Използвайте в рамките на 6 месеца от получаването. **Внимание:** Вреден при вдишване, поглъщане или при контакт.

Компоненти:

IC Fixation Buffer: cat. 00-8222; 125 mL. - 1X работна концентрация

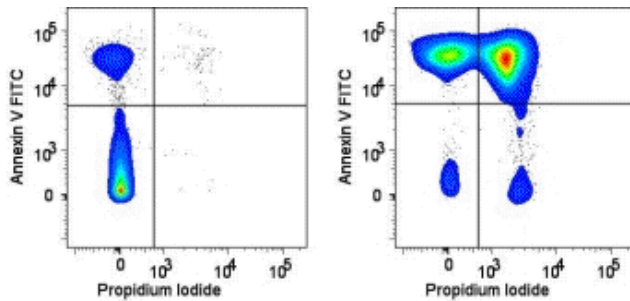
Permeabilization Buffer: cat 00-8333; 100 mL. - 10X

Приложение: Този сет е предназначен за използване в вътреклетъчното оцветяване и дебит цитометричен анализ и е специално разработен за намаляване на неспецифично оцветяване на флуорохром-белязани антитела и да се увеличи флуоресцентен сигнал до съотношения на шум. В първия етап живи клетки могат да бъдат "определени" с **Fixation Buffer**, който кръстосано връзки протеини. Вторият етап, като се използва **Permeabilization Buffer**, създава отвори в мембраната, което би позволило вътреклетъчни оцветяване антитела да влезе в клетката ефективно. Следващи стъпки на измиване, антитяло добавки, и след инкубиране клетъчна пермеабилзация трябва да се извършва с помощта на **Permeabilization Buffer**. Крайният етап на промиване и клетка отлагания преди стартиране на пробата се извършва чрез Flow Cytometry Staining Buffer. Този комплект се използва обикновено за оцветяване на цитоплазмени протеини, както и протеини в секреторния път като хемокини и цитокини.

Annexin V Apoptosis Detection Kit FITC

Catalog Number: 88-8005

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



Mouse thymocytes were prepared as a single cell suspension and incubated overnight at 37°C in medium (left) or medium with 1 uM dexamethasone (right). Cells were harvested and stained using the Annexin V Apoptosis Detection Kit FITC and Propidium Iodide Staining Solution (cat. 00-6990).

Product Information

Contents: Annexin V Apoptosis Detection Kit FITC

REF **Catalog Number:** 88-8005

Concentration: 5 uL/ test

Formulation: 50mM Tris, pH 7.4, 100mM NaCl, 1% BSA, 0.02% Sodium Azide



Temperature Limitation: Store at 2-8°C. Do not freeze. Light sensitive material.



Batch Code: Refer to Vial



Use By: Refer to Vial



Caution, contains Azide

Description

Annexins are a family of calcium-dependent phospholipid-binding proteins that preferentially bind phosphatidylserine (PS). Under normal physiologic conditions, PS is predominantly located in the inner leaflet of the plasma membrane. Upon initiation of apoptosis, PS loses its asymmetric distribution across the phospholipid bilayer and is translocated to the extracellular membrane leaflet marking cells as targets of phagocytosis. Once on the outer surface of the membrane, PS can be detected by fluorescently labeled Annexin V in a calcium-dependent manner.

In early-stage apoptosis, the plasma membrane excludes viability dyes such as propidium iodide (PI), 7-AAD, or Fixable Viability Dyes such as eFluor® 660 or eFluor® 780. These cells will stain with Annexin V but not a viability dye, thus distinguishing cells in early apoptosis. However, in late stage apoptosis, the cell membrane loses integrity thereby allowing Annexin V to also access PS in the interior of the cell. A viability dye can be used to resolve these late-stage apoptotic and necrotic cells (Annexin V, viability dye-positive) from the early-stage apoptotic cells (Annexin V positive, viability dye-negative).

Note: Fixable Viability Dye eFluor® 450 is not recommended for use with Annexin V Apoptosis Detection Kits.

Components

10X Binding Buffer (cat. 00-0055): Annexin V 10X Binding Buffer is a stock solution that must be diluted prior to use with distilled water. Dilute 1 part Binding Buffer with 9 parts distilled water.

Cat. 88-8005-72: 30 mL

Cat. 88-8005-74: 100 mL

Annexin V FITC (cat. 11-8005):

Cat. 88-8005-72: 50 tests

Cat. 88-8005-74: 200 tests

Propidium Iodide Staining Solution (cat. 00-6990):

Cat. 88-8005-72: 100 tests

Cat. 88-8005-74: 2X100 tests

Applications Reported

Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit has been reported for use in flow cytometric analysis.

Applications Tested

Annexin V Apoptosis Detection Kit FITC has been pre-titrated and tested on mouse thymocytes cultured overnight in medium (to induce apoptosis) or on Jurkat cells treated with 10 µM Camptothecin for 4 hours. Both the Annexin V FITC and the Propidium Iodide components can be used at 5 µL per test. A test is defined as the amount (µg) of antibody that will stain a cell sample in a final volume of 100 µL. Cell number

should be determined empirically but can range from 10^5 to 10^8 cells/test.

References

Andree HA, Reutelingsperger CP, Hauptmann R, Hemker HC, Hermens WT, Willems GM. Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers. *J Biol Chem.* 1990; 265(9):4923-4928

Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood.* 1994; 84(5):1415-1420

Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods.* 1995; 184(1):39-51

Related Products

00-6993 7-AAD Viability Staining Solution

65-0864 Fixable Viability Dye eFluor® 660

65-0865 Fixable Viability Dye eFluor® 780

88-8006 Annexin V Apoptosis Detection Kit eFluor® 450

88-8007 Annexin V Apoptosis Detection Kit APC

88-8008 Annexin V Apoptosis Detection Kit PerCP-eFluor® 710

88-8102 Annexin V PE Apoptosis Detection Kit PE

Legal

Pat. No. EP 181 465 B2, EP 0509 026, USP 5,066,787

Not for further distribution without written consent. © eBioscience, Inc. All rights reserved.
Tel: 888.999.1371 or 858.642.2058 • Fax: 858.642.2046 • www.eBioscience.com • info@eBioscience.com

Annexin V Staining Protocols

Research Use Only

Annexin V Staining Protocol

1. Dilute 10X Binding Buffer to 1X using distilled water (1ml 10X Binding Buffer + 9ml dH₂O).
2. Wash cells once in PBS, then once in 1X Binding Buffer.
3. Resuspend cells in 1X Binding Buffer at 1-5x10⁶/ml.
4. Add 5 µl of fluorochrome-conjugated Annexin V to 100 µl of the cell suspension.
5. Incubate 10-15 minutes at room temperature.
6. Wash cells in 1X Binding Buffer and resuspend in 200 µl of 1X Binding Buffer.
7. Add 5 µl of Propidium Iodide Staining Solution (cat. [00-6990](#)) or 7-AAD Viability Staining Solution (cat. [00-6993](#)).
8. Analyze by flow cytometry within 4 hours, storing at 2-8°C in the dark.

Annexin V Staining Protocol with Fixable Viability Dyes

1. Choose an appropriate viability stain that has an emission profile compatible with the Annexin V-conjugate to be used, such as Fixable Viability Dye eFluor® 660 (cat. [65-0864](#)) or eFluor® 780 (cat. [65-0865](#)). *Note: Fixable Viability Dye eFluor® 450 is not recommended for use with the Annexin V Apoptosis Detection Kits.*
2. Follow the staining protocol for the chosen product to stain late-apoptotic/dead cells.
3. Dilute 10X Binding Buffer to 1X using distilled water (1ml 10X Binding Buffer + 9ml dH₂O).
4. After staining with Fixable Viability Dye, be sure to wash cells twice with a protein-containing buffer such as Flow Cytometry Staining Buffer (cat. [00-4222](#)).
5. Wash cells once with the 1X Binding Buffer.
6. Resuspend cells in 1X Binding Buffer at 1-5x10⁶/ml.
7. Add 5 µl of fluorochrome-conjugated Annexin V to 100 µl of the cell suspension.
8. Incubate 10-15 minutes at room temperature, protected from light.
9. Wash cells in 1X Binding Buffer and resuspend in 200 µl of 1X Binding Buffer.
10. Analyze by flow cytometry within 4 hours, storing at 2-8°C in the dark.

Note: Due to the calcium dependence of the Annexin V : PS interaction, it is critical to avoid buffers containing EDTA or other calcium chelators during Annexin V experiments. Annexin V can only be used as a marker of apoptosis in cells where the plasma membrane is intact because destroying the integrity of the plasma membrane will allow non-specific binding of Annexin V to PS inside the cell.



Annexin V Apoptosis Detection Kit FITC
каталожен номер 88-8005

Концентрация: 5 μ L/test

Съхранение: 2-8 $^{\circ}$ C. Не замръзвайте. Светлинно чувствителен материал.

Приложение: Анексин V Апоптоза Detection Kit FITC е предварително титрува и тестван на миши тимоцити култивират една нощ в среда (за да се индуцира апоптоза) или на Jurkat клетки, третирани с 10 μ M камптотецин в продължение на 4 часа. Както Анексин V FITC и компонентите на пропидиев йодид могат да бъдат използвани в 5 μ l на тест. Тест се определя като сума (μ g) на антияло, което ще оцвети клетъчна проба в краен обем от 100 μ l. Броят на клетките трябва да се определят емпирично, но може да варира 105-108 клетки /на тест.

Annexin V Staining Protocol

1. Разреждете 10X буфер за свързване на до 1X с дестилирана вода (1ml 10X буфер за свързване + 9ml dH₂O).
2. клетките се промиват веднъж в PBS, след това веднъж в 1 x свързващ буфер.
3. Ресуспендирайте клетките в 1x свързващ буфер в $1-5 \times 10^6$ / мл.
4. Добавете 5 мкл флуорохром-конюгирани Анексин V на 100 μ l от клетъчната суспензия.
5. Инкубирайте 10-15 минути при стайна температура.
6. клетките се промиват в 1 x свързващ буфер и се ресуспендират в 200 μ l 1x свързващ буфер.
7. Добави 5 мкл Пропидиев Iodide оцветяващ разтвор (котка. 00-6990) или 7-AAD жизнеспособност оцветяващ разтвор (кат. 00-6993).
8. Анализ с поточна цитометрия в рамките на 4 часа съхранение при температура 2-8 $^{\circ}$ C на тъмно.

Annexin V Apoptosis Detection Kit APC

Catalog Number: 88-8007

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

Product Information

Contents: Annexin V Apoptosis Detection Kit APC
Catalog Number: 88-8007
Concentration: 5 uL/test

REF



LOT



Formulation: 50mM Tris, pH 7.4, 100mM NaCl, 1% BSA, 0.02% Sodium Azide

Temperature Limitation: Store at 2-8°C. Do not freeze. Light sensitive material.

Batch Code: Refer to vial

Use By: Refer to vial

Caution, contains Azide

Description

Annexins are a family of calcium-dependent phospholipid-binding proteins that preferentially bind phosphatidylserine (PS). Under normal physiologic conditions, PS is predominantly located in the inner leaflet of the plasma membrane. Upon initiation of apoptosis, PS loses its asymmetric distribution across the phospholipid bilayer and is translocated to the extracellular membrane leaflet marking cells as targets of phagocytosis. Once on the outer surface of the membrane, PS can be detected by fluorescently labeled Annexin V in a calcium-dependent manner.

In early-stage apoptosis, the plasma membrane excludes viability dyes such as propidium iodide (PI), 7-AAD, or Fixable Viability Dyes such as eFluor® 660 or eFluor® 780. These cells will stain with Annexin V but not a viability dye, thus distinguishing cells in early apoptosis. However, in late stage apoptosis, the cell membrane loses integrity thereby allowing Annexin V to also access PS in the interior of the cell. A viability dye can be used to resolve these late-stage apoptotic and necrotic cells (Annexin V, viability dye-positive) from the early-stage apoptotic cells (Annexin V positive, viability dye-negative).

Note: Fixable Viability Dye eFluor® 450 is not recommended for use with Annexin V Apoptosis Detection Kits.

Components

10X Binding Buffer (cat. 00-0055): Annexin V 10X Binding Buffer is a stock solution that must be diluted prior to use with distilled water. Dilute 1 part Binding Buffer with 9 parts distilled water.

Cat. 88-8007-72: 30 mL

Cat. 88-8007-74: 100 mL

Annexin V APC (cat. 17-8007):

Cat. 88-8007-72: 50 tests

Cat. 88-8007-74: 200 tests

Propidium Iodide Staining Solution (cat. 00-6990):

Cat. 88-8007-72: 100 tests

Cat. 88-8007-74: 2X100 tests

Applications Reported

Annexin V-APC Apoptosis Detection Kit has been reported for use in flow cytometric analysis.

Applications Tested

Annexin V Apoptosis Detection Kit APC has been pre-titrated and tested on mouse thymocytes cultured overnight in medium (to induce apoptosis) or on Jurkat cells treated with 10 µM Camptothecin for 4 hours. Both the Annexin V APC and the Propidium iodide components can be used at 5 µL per test. A test is defined as the amount (µg) of antibody that will stain a cell sample in a final volume of 100 µL. Cell number should be determined empirically but can range from 10⁵ to 10⁸ cells/test.

Special Notes

This kit is compatible with eBioscience IC Fixation Buffer (cat. 00-8222) for intracellular staining. It is recommended that eBioscience Fixable Viability Dyes (cat. 65-0863 and 65-0865) are used for viability staining for all intracellular

Not for further distribution without written consent.

Copyright © 2000-2012 eBioscience, Inc.

Tel: 888.999.1371 or 858.642.2058 • Fax: 858.642.2046 • www.ebioscience.com •
info@ebioscience.com

Annexin V Apoptosis Detection Kit APC

Catalog Number: 88-8007

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

staining protocols.

References

Andree HA, Reutelingsperger CP, Hauptmann R, Hemker HC, Hermens WT, Willems GM. Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers. *J Biol Chem.* 1990; 265(9):4923-4928

Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood.* 1994; 84(5):1415-1420

Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods.* 1995; 184(1):39-51

Related Products

00-6993 7-AAD Viability Staining Solution

65-0864 Fixable Viability Dye eFluor[®] 660

65-0865 Fixable Viability Dye eFluor[®] 780

88-8005 Annexin V Apoptosis Detection Kit FITC

88-8006 Annexin V Apoptosis Detection Kit eFluor[®] 450

88-8008 Annexin V Apoptosis Detection Kit PerCP-eFluor[®] 710

88-8102 Annexin V PE Apoptosis Detection Kit PE

Legal

Pat. No. EP 181 465 B2, EP 0509 026, USP 5,066,787

Not for further distribution without written consent.

Copyright © 2000-2012 eBioscience, Inc.

Tel: 888.999.1371 or 858.642.2058 • Fax: 858.642.2046 • www.ebioscience.com •
info@ebioscience.com

Annexin V Staining Protocols

Research Use Only

Annexin V Staining Protocol

1. Dilute 10X Binding Buffer to 1X using distilled water (1ml 10X Binding Buffer + 9ml dH₂O).
2. Wash cells once in PBS, then once in 1X Binding Buffer.
3. Resuspend cells in 1X Binding Buffer at 1-5x10⁶/ml.
4. Add 5 µl of fluorochrome-conjugated Annexin V to 100 µl of the cell suspension.
5. Incubate 10-15 minutes at room temperature.
6. Wash cells in 1X Binding Buffer and resuspend in 200 µl of 1X Binding Buffer.
7. Add 5 µl of Propidium Iodide Staining Solution (cat. [00-6990](#)) or 7-AAD Viability Staining Solution (cat. [00-6993](#)).
8. Analyze by flow cytometry within 4 hours, storing at 2-8°C in the dark.

Annexin V Staining Protocol with Fixable Viability Dyes

1. Choose an appropriate viability stain that has an emission profile compatible with the Annexin V-conjugate to be used, such as Fixable Viability Dye eFluor® 660 (cat. [65-0864](#)) or eFluor® 780 (cat. [65-0865](#)). *Note: Fixable Viability Dye eFluor® 450 is not recommended for use with the Annexin V Apoptosis Detection Kits.*
2. Follow the staining protocol for the chosen product to stain late-apoptotic/dead cells.
3. Dilute 10X Binding Buffer to 1X using distilled water (1ml 10X Binding Buffer + 9ml dH₂O).
4. After staining with Fixable Viability Dye, be sure to wash cells twice with a protein-containing buffer such as Flow Cytometry Staining Buffer (cat. [00-4222](#)).
5. Wash cells once with the 1X Binding Buffer.
6. Resuspend cells in 1X Binding Buffer at 1-5x10⁶/ml.
7. Add 5 µl of fluorochrome-conjugated Annexin V to 100 µl of the cell suspension.
8. Incubate 10-15 minutes at room temperature, protected from light.
9. Wash cells in 1X Binding Buffer and resuspend in 200 µl of 1X Binding Buffer.
10. Analyze by flow cytometry within 4 hours, storing at 2-8°C in the dark.

Note: Due to the calcium dependence of the Annexin V : PS interaction, it is critical to avoid buffers containing EDTA or other calcium chelators during Annexin V experiments. Annexin V can only be used as a marker of apoptosis in cells where the plasma membrane is intact because destroying the integrity of the plasma membrane will allow non-specific binding of Annexin V to PS inside the cell.



Annexin V Apoptosis Detection Kit APC
каталожен номер 88-8007

Концентрация: 5 uL/test

Съхранение: 2-8 C⁰. Не замръзвайте. Светлинно чувствителен материал.

Приложение: Анексин V Апоптоза Detection Kit APC е предварително титрува и тестван на миши тимоцити култивират една нощ в среда (за да се индуцира апоптоза) или на Jurkat клетки, третирани с 10 цМ камптотецин в продължение на 4 часа. Както Анексин V АПК и компонентите на пропидиев йодид могат да бъдат използвани в 5 ul на тест. Тест се определя като сума (ug) на антитяло, което ще оцвети клетъчна проба в краен обем от 100 ul. Броят на клетките трябва да се определят емпирично, но може да варира 105-108 клетки /на тест.

Annexin V Staining Protocol

1. Разрежете 10X буфер за свързване на до 1X с дестилирана вода (1ml 10X буфер за свързване + 9ml dH₂O).
2. клетките се промиват веднъж в PBS, след това веднъж в 1 x свързващ буфер.
3. Ресуспендирайте клетките в 1x свързващ буфер в 1-5x10⁶ / мл.
4. Добавете 5 мкл флуорохром-конюгирани Анексин V на 100 ul от клетъчната суспензия.
5. Инкубирайте 10-15 минути при стайна температура.
6. клетките се промиват в 1 x свързващ буфер и се ресуспендират в 200 ul 1x свързващ буфер.
7. Добави 5 мкл Пропидиев Iodide оцветяващ разтвор (котка. 00-6990) или 7-AAD жизнеспособност оцветяващ разтвор (котка. 00-6993).
8. Анализ с поточна цитометрия в рамките на 4 часа съхранение при температура 2-8 ° C на тъмно.

PRODUCT INFORMATION & MANUAL

Annexin V-FITC **Apoptosis detection Kit** ***BMS500FI/20, BMS500FI/100, BMS500FI/300***

For research use only.
Not for diagnostic or therapeutic procedures.



Annexin V-FITC

North America

Technical Support:

Research Products:
888.810.6168
858.642.2058
tech@eBioscience.com

Clinical Products:
877.726.8559
858.642.2058
tech@eBioscience.com

Customer Service:

888.999.1371
858.642.2058
info@eBioscience.com

Fax:

858.642.2046

Europe/International*

Technical Support:

+43 1 796 40 40-120
tech@eBioscience.com

Customer Service:

+43 1 796 40 40-304
europe@eBioscience.com

Fax:

+43 1 796 40 40-400



Bender MedSystems GmbH
Campus Vienna Biocenter 2
1030 Vienna, Austria
www.eBioscience.com

* Customers outside North America and Europe may contact their eBioscience distributor listed on our website at www.eBioscience.com/distributors.

TABLE OF CONTENTS

1	Intended Use	3
2	Summary	3
3	Principles of the Test	4
4	Reagents Provided	4
5	Storage and Stability	5
6	Materials Required But Not Provided	5
7	Precautions for Use	6
8	Preparation of Reagents	8
9	Test Protocol	8
10	Limitations	8
11	Ordering Information	9

1 Intended Use

The Annexin V-FITC Kit can be used to detect phosphatidylserine on the outer leaflet of the cell membrane using flow cytometry.

The Annexin V-FITC Kit is for research use only. Not for diagnostic or therapeutic procedures.

2 Summary

Annexins are a family of calcium-dependent phospholipid-binding proteins. They are abundant in eukaryotic organisms belonging to a family of ubiquitous cytoplasmic proteins involved in signal transduction. All annexins have been shown to have a putative binding site for protein kinase C (PKC) but only annexin V would possess a potential pseudo-substrate site. Thus annexin V seems to modulate the activity of some PKCs on their substrates.

Annexin V was found to play a major role in matrix vesicle-initiated cartilage calcification as a collagen-regulated calcium channel. Annexin V binds to procoagulant phospholipids (Vascular anticoagulant alpha) with high affinity.

Annexin V's preferential binding partner is phosphatidylserine (PS). PS is predominantly located in membrane leaflets, which face the cytosol. However, recent findings show that each cell type has the molecular machinery to expose PS at its cell surface. This machinery is activated during the execution of apoptosis. Once PS is exposed at the cell surface it exhibits procoagulant and proinflammatory activities. Annexin V will bind to the PS-exposing apoptotic cell and can inhibit the procoagulant and proinflammatory activities of the dying cell.

For literature update refer to **www.eBioscience.com**

3 Principles of the Test

Annexin V exhibits anti-phospholipase activity and binds to phosphatidylserine. FITC labelling allows simple direct detection by FACS analysis. Counterstaining by propidium iodide allows the discrimination of apoptotic cells.

4 Reagents Provided

- **rh Annexin V-FITC**
- **Binding Buffer (4x)**
- **Propidium Iodide (20 µg/ml)**

	Catalog Number		
	BMS500FI/20 for 20 tests	BMS500FI/100 for 100 tests	BMS500FI/300 for 300 tests
rh Annexin V-FITC	1 vial (100µl)	1 vial (500µl)	1 vial (1.5 ml)
Binding Buffer (4x)	1 bottle (50 ml)	1 bottle (50 ml)	1 bottle (50 ml)
Propidium Iodide	1 vial (1.6 ml)	1 vial (1.6 ml)	2 vials (1.6 ml)

5 Storage and Stability

Store kit reagents between 2° and 8°. Immediately after use remaining reagents should be returned to cold storage (2° to 8°C). Expiry of the kit and reagents is stated on labels.

Expiry of the kit components can only be guaranteed if the components are stored properly, and if, in case of repeated use of one component, this reagent is not contaminated by the first handling.

6 Materials Required But Not Provided

- 5 ml and 10 ml graduated pipettes
- 5 µl to 1000 µl adjustable single channel micropipettes with disposable tips
- Beakers, flasks, cylinders necessary for preparation of reagents
- Glass-distilled or deionized water
- Bench top centrifuge
- Flow Cytometer
- PBS (for 1 liter: 8.00 g NaCl, 0.20 g KCl, 1.78 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 0.27 g KH₂PO₄)

7 Precautions for Use

- All reagents should be considered as potentially hazardous. We therefore recommend that this product is handled only by those persons who have been trained in laboratory techniques and that it is used in accordance with the principles of good laboratory practice. Wear suitable protective clothing such as laboratory overalls, safety glasses and gloves. Care should be taken to avoid contact with skin or eyes. In the case of contact with skin or eyes wash immediately with water. See material safety data sheet(s) and/or safety statement(s) for specific advice.
- Reagents are intended for research use only and are not for use in diagnostic or therapeutic procedures.
- Do not mix or substitute reagents with those from other lots or other sources.
- Do not use kit reagents beyond expiration date on label.
- Do not expose kit reagents to strong light during storage or incubation.
- Do not pipette by mouth.
- Do not eat or smoke in areas where kit reagents or samples are handled.
- Avoid contact of skin or mucous membranes with kit reagents or specimens.
- Rubber or disposable latex gloves should be worn while handling kit reagents or specimens.
- Avoid splashing or generation of aerosols.
- In order to avoid microbial contamination or cross-contamination of reagents which may invalidate the test use disposable pipette tips and/or pipettes.
- Glass-distilled water or deionized water must be used for reagent preparation.

- Decontaminate and dispose specimens and all potentially contaminated materials as they could contain infectious agents. The preferred method of decontamination is autoclaving for a minimum of 1 hour at 121.5°C.
- Liquid wastes not containing acid and neutralized waste may be mixed with sodium hypochlorite in volumes such that the final mixture contains 1.0% sodium hypochlorite. Allow 30 minutes for effective decontamination. Liquid waste containing acid must be neutralized prior to the addition of sodium hypochlorite.

8 Preparation of Reagents

Dilute **Binding Buffer** (4x) 1:4 in distilled water (50 ml binding buffer and 150 ml distilled water).

9 Test Protocol

- a. Wash cells in **PBS** by gentle shaking or pipetting up and down.
- b. Resuspend cells in 200 μ l **Binding Buffer** (1x); cell density should be $2-5 \times 10^5$ /ml.
- c. Add 5 μ l **Annexin V-FITC** to 195 μ l cell suspension.
- d. Mix and incubate for 10 min at room temperature.
- e. Wash cells in 200 μ l Binding Buffer (1x) and resuspend in 190 μ l Binding buffer (1x).
- f. Add 10 μ l **Propidium Iodide** (20 μ g/ml)
- g. Perform FACS analysis.

10 Limitations

- Bacterial or fungal contamination of either screen samples or reagents or cross-contamination between reagents may cause erroneous results.
- Disposable pipette tips, flasks or glassware are preferred, reusable glassware must be washed and thoroughly rinsed of all detergent before use.

11 Ordering Information

North America

Technical Support:

Research Products:
888.810.6168
858.642.2058
tech@eBioscience.com

Clinical Products:
877.726.8559
858.642.2058
tech@eBioscience.com

Customer Service:

888.999.1371
858.642.2058
info@eBioscience.com

Fax:

858.642.2046

Europe/International*

Technical Support:

+43 1 796 40 40-120
tech@eBioscience.com

Customer Service:

+43 1 796 40 40-304
info@eBioscience.com

Fax:

+43 1 796 40 40-400



Bender MedSystems GmbH
Campus Vienna Biocenter 2
1030 Vienna, Austria
www.eBioscience.com

* Customers outside North America and Europe may contact their eBioscience distributor listed on our website at www.eBioscience.com/distributors.



Annexin V-FITC Apoptosis detection Kit
BMS500FI/20, BMS500FI/100, BMS500FI/300

Съхранение: Съхранявайте комплекта реактиви между 2° и 8°. Веднага след работа с останалите реагенти трябва да бъдат върнати на хладилно съхранение (2° до 8° C). Изтичане на кита и реагентите, отбелязан върху етикетите.

Изтичане на компонентите на кита може да бъде гарантирана само ако компонентите са съхранявани правилно, и ако, в случай на повторно използване на един компонент, този реагент не е замърсена от първата обработка.

Компоненти:

rh Annexin V-FITC - 1 виалка 500µl

Binding Buffer (4x) - 1 бутилка 50 ml

Propidium Iodide (20 µg/ml) – 1 виалка 1.6 ml

Протокол за работа:

Разредете свързващия буфер (4x) 1: 4 в дестилирана вода (50 мл свързващ буфер и 150 мл дестилирана вода).

1. Измийте клетки в PBS чрез леко разклащане или с пипета нагоре и надолу.
2. Ресуспендирайте клетките в 200 µl свързващ буфер (1x); клетъчна плътност трябва да бъде 2-5x10⁵ / мл.
3. Добавят се 5 мкл Анексин V-FITC 195 мкл клетъчна суспензия.
4. Разбърква се и се инкубира за 10 минути при стайна температура. напр. Клетките се промиват в 200 µl свързващ буфер (1x) и се ресуспендира в 190 мкл свързващ буфер (1x)
5. Прибавят се 10 мкл пропидиев йодид (20 мкг / мл)
6. Извършване на FACS анализ.

Product Information

Annexin V-Cy3™ Apoptosis Detection Kit

Catalog Number **APOAC**

Storage Temperature 2–8 °C

TECHNICAL BULLETIN

Product Description

The annexins are a group of homologous proteins that bind phospholipids in the presence of calcium.^{1,2} Apoptosis, or programmed cell death, is an important mechanism of most cells used to negatively select cells deleterious to the host. Many cells of the immune system such as thymocytes, self-reactive B and T cells undergo apoptosis as a result of the normal cell selection process. The cellular changes involved in the process include loss of cell membrane phospholipid asymmetry during early stages of apoptosis. In living cells phosphatidylserine [PS] is transported to the inner plasma membrane leaflet by the enzyme Mg-ATP dependent aminophospho-lipid translocase.³ However, during the onset of apoptosis, PS is transported to the external leaflet of the plasma membrane. PS is then available for binding to annexin V and any of its conjugates in the presence of Ca²⁺ ions.

Apoptotic cells can be differentiated from necrotic cells in several ways. The method employed by this kit involves the use of two labels:

- Annexin-Cy3.18 (AnnCy3) binds to phosphatidylserine present in the outer leaflet of the plasma membrane of cells starting the apoptotic process. The binding is observed as red fluorescence.
- 6-Carboxyfluorescein diacetate (6-CFDA) is used to measure viability. When this non-fluorescent compound enters living cells, esterases present hydrolyze it, producing the fluorescent compound, 6-carboxyfluorescein (6-CF). This appears as green fluorescence.

Cells can be incubated either with AnnCy3 or 6-CFDA separately, or with the two compounds simultaneously. After labeling at room temperature, the cells are immediately observed by fluorescence microscopy. Live cells will be labeled only with 6-CF (green), while necrotic cells will label only with AnnCy3 (red). Cells in the early stage of apoptosis, however, will be labeled with both AnnCy3 (red) and 6-CF (green).

Components

The kit includes sufficient reagents for 200 assays (which is equivalent to 5–10 × 10⁶ Jurkat cells according to the supplied procedure).

- Annexin V Cy3.18 Conjugate 10 µg protein (Catalog Number A4963)
100 µg/ml solution in 50 mM Tris HCl, pH 7.5, containing 100 mM NaCl
- 6-Carboxyfluorescein diacetate (6-CFDA) 10 mg (Catalog Number C5041)
- 10× Binding Buffer 20 ml (Catalog Number B9796)
100 mM HEPES/NaOH, pH 7.5, containing 1.4 M NaCl and 25 mM CaCl₂

Reagents and Equipment Required But Not Provided

(Catalog Numbers have been given where appropriate)

- Cells to undergo apoptosis. A procedure is given using Jurkat E6-1 cells.⁶
- Apoptosis inducer - Induction may be spontaneous or induced. In the procedure, staurosporin (Catalog Number S4400) dissolved at 100 µg/ml in DMSO is used as inducer.⁶
- Phosphate buffered saline (PBS, Catalog Number D8537)
- Fluorescence microscope
- Serological centrifuge
- Incubator at 37 °C with 5% CO₂ atmosphere
- Poly-Prep poly-L-lysine coated slides (Catalog Number P0425)
- Cover glasses, 24 × 50 mm (Catalog Number C8181)
- PAP pen for immunostaining (Catalog Number Z377821)

Precautions and Disclaimer

This product is for R&D use only, not for drug, household, or other uses. Please consult the Material Safety Data Sheet for information regarding hazards and safe handling practices.

Preparation Instructions

1× Binding Buffer (10 mM HEPES, pH 7.5, containing 140 mM NaCl and 2.5 mM CaCl₂) - Dilute 10× Binding Buffer (Catalog Number B9796) 10-fold with deionized water.

50 mM 6-CFDA in acetone solution - Dissolve 2.32 mg of 6-Carboxyfluorescein diacetate (6-CFDA, Catalog Number C5041) in 0.1 ml acetone. Store solution in an amber vial and protect from light. After opening, store remaining 6-CFDA at -20 °C.

Double Label Staining Solution (1 µg/ml AnnCy3 and 500 µM 6-CFDA in 1× Binding Buffer) - To prepare 2 ml of Double Label Staining Solution mix the following:

20 µl	Annexin V Cy3.18 Conjugate (100 µg/ml solution, Catalog Number A4963)
20 µl	50 mM 6-CFDA in acetone solution
200 µl	10× Binding Buffer (Catalog Number B9796)
1.76 ml	Deionized water

Store the Double Label Staining Solution in an amber vial and protect from light.

If single staining is desired, prepare the following:

- AnnCy3 Solution (1 µg/ml of AnnCy3 in 1× Binding Buffer) - Dilute Annexin V Cy3.18 Conjugate (100 µg/ml solution, Catalog Number A4963) 100-fold with 1× Binding Buffer. Store in an amber vial and protect from light.
- 500 µM CFDA Solution – Dilute 50 mM 6-CFDA in acetone solution 100-fold in 1× Binding Buffer. Store in an amber vial and protect from light.

Storage/Stability

Store the kit at 2–8 °C. Protect from light

Note: All the solutions supplied in this kit have been filtered with a sterile 0.2 µm filter and the bottles aseptically filled. For long term stability of solutions when in use, it is recommended to remove an aliquot in a sterile manner in a hood. No preservative is added to these solutions.

Procedure

The following procedure is a general guideline. It uses Jurkat cells and the Double Label Staining Solution.

Notes: Staining of Jurkat cells with 6-CFDA can be performed with lower concentrations of 6-CFDA (minimal concentration of 100 µM).

When using cells other than Jurkat cells or in the case of non-optimal staining, it is recommended to optimize the concentrations of the reagents required for appropriate staining.

1. Induce apoptosis in a cell suspension of Jurkat cells (e.g., by addition of staurosporin to 1 µg/ml). Keep non-induced cells for a zero time control.
2. Incubate for the desired time at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere.
3. Wash the cells twice with PBS.
4. Suspend the cells in PBS at a concentration of 0.5–1 × 10⁶ cells per ml.
5. Take a PAP pen and draw 2 circles of ~1 cm diameter on a PolyPrep poly-L-lysine-coated slide (one for control cells and one for induced sample cells). This will restrict the drop placed on the slide to a specific area.
6. Place 50 µl of the cell suspension (induced or non-induced) in each circle and leave at room temperature for 10 minutes, allowing the cells to be absorbed to the plate.
7. Remove the excess liquid by carefully touching a tissue to the side of the circle. Do not blot directly on top of the sample since this will damage the cells.
8. Wash the cells three times with 50 µl of 1× Binding Buffer each. Blot the excess liquid each time with a tissue as in step 7.

9. Place 50 μ l of the Double Label Staining Solution (AnnCy3 and 6-CFDA) on each circle and cover with a petri dish covered with aluminum foil.
10. Incubate for 10 minutes at room temperature. After staining, wash each circle five times with 50 μ l of 1 \times Binding Buffer each as in step 8. This will remove excess label from the cells.
11. Place 35 μ l of 1 \times Binding Buffer on each circle and cover the slide with a 24 \times 50 mm cover slip. Observe the results using a fluorescence microscope and then photograph. Use the correct filter and light source depending on the label.

Results

By fluorescence microscopy, 6-carboxyfluorescein (6-CF) is observed as green fluorescence and Annexin V Cy3.18 (AnnCy3) is observed as red fluorescence.

There are three possible results:

1. Live cells will only stain with 6-CF (green).
2. Necrotic cells will only stain with AnnCy3 (red).
3. Cells starting the apoptotic process will stain both with AnnCy3 (red) and 6-CF (green).

Note: By microscopy, Annexin Cy3 fluoresces more brightly than the Annexin FITC conjugate.

References

1. Pigault C., *et al.*, J. Mol. Biol., **236**, 199 (1994).
2. Trotter, P.J., *et al.*, Biochem. J., **308**, 591 (1995).
3. Kuypers, F.A., *et al.*, Blood, **87**, 1179 (1996).
4. Darzynkiewicz, Z., *et al.*, *Cell Growth and Apoptosis*, IRL Press, pp143-167 (1995)
5. Breeuwer, P., *et al.*, Appl. Environ. Microbio., **61**, 1614 (1995).
6. Martin, S.J., *et al.*, J. Exp. Med., **182**, 1545 (1995).

Cy3 is a trademark of GE Healthcare and is distributed under license.

KAA,LPG,MAM 02/10-1

Sigma brand products are sold through Sigma-Aldrich, Inc.

Sigma-Aldrich, Inc. warrants that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications. Purchaser must determine the suitability of the product(s) for their particular use. Additional terms and conditions may apply. Please see reverse side of the invoice or packing slip.

ИНФОРМАЦИОНЕН ЛИСТ ЗА БЕЗОПАСНОСТ

според Регулация (EU) No. 1907/2006
Версия 4.3 Преработено издание (дата): 08.01.2013
Дата на Печат 06.08.2014

РАЗДЕЛ 1: Идентификация на веществото/сместа и на дружеството/предприятието

1.1 Идентификатори на продукта

Име на Продукта : Annexin V-Cy3™ Apoptosis Detection Kit

Номер на продукта : APOAC

Марка : Sigma

REACH No. : За това вещество не е наличен регистрационен номер. Веществото или неговата употреба е освободена от регистрацията. Годишният тонаж не изисква регистрацията или регистрацията е предвидена за по-късен срок.

1.2 Идентифицирани употреби на веществото или сместа, които са от значение, и употреби, които не се препоръчват

Идентифицирани употреби : Лабораторни химикали, Производство на субстанции

1.3 Подробни данни за доставчика на информационния лист за безопасност

Фирма/Производител : Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Riedstrasse 2
D-89555 STEINHEIM

Телефон : +49 89-6513-1444

Факс : +49 7329-97-2319

Email адрес : eurtechserv@sial.com

1.4 Телефонен номер при спешни случаи

Спешен телефон No. : +49 7329-97-2323

Това е резюме на данните за безопасност на материала (MSDS) за един набор, за пълни MSDS за всеки един от компонентите, изброени в секция 16, моля посетете нашия интернет сайт.

РАЗДЕЛ 2: Описание на опасностите

2.1 Класифициране на веществото или сместа

Не е опасна субстанция или смес, съгласно Регламент (ЕО) No. 1272/2008
Веществото не е класифицирано като опасно според Директива 67/548/ЕЕС.

2.2 Елементи на етикета

2.3 Други опасности

Третирайте, допускайки възможност за предаване на инфекциозни агенти.

РАЗДЕЛ 3: Състав/информация за съставките

Обърнете се към данните безопасност на материала (MSDS) за един компонент.

РАЗДЕЛ 4: Мерки за първа помощ

Обърнете се към данните безопасност на материала (MSDS) за един компонент.

РАЗДЕЛ 5: Противопожарни мерки

Обърнете се към данните безопасност на материала (MSDS) за един компонент.

РАЗДЕЛ 6: Мерки при аварийно изпускане

Обърнете се към данните безопасност на материала (MSDS) за един компонент.

РАЗДЕЛ 7: Работа и съхранение**7.1 Предпазни мерки за безопасна работа**

Нормални мерки за превантивна противопожарна защита.

<** Phrase language not available: [BG] CUST - SIAL00000005873 **>

7.2 Условия за безопасно съхраняване, включително несъвместимости

Съхранявайте на хладно. Пазете контейнера плътно затворен в сухо и добре проветрявано място. Контейнерите, които са отворени, трябва да бъдат внимателно изваждани и държани изправени за да се избегне разливане.

Препоръчителна температура на съхранение: 2 - 8 °C

7.3 Специфична(и) крайна(и) употреба(и)

<** Phrase language not available: [BG] CUST - SIAL00000005874 **>

РАЗДЕЛ 8: Контрол на експозицията/лични предпазни средства

Обърнете се към данните безопасност на материала (MSDS) за един компонент.

РАЗДЕЛ 9: Физични и химични свойства

Обърнете се към данните безопасност на материала (MSDS) за един компонент.

РАЗДЕЛ 10: Стабилност и реактивност

Обърнете се към данните безопасност на материала (MSDS) за един компонент.

РАЗДЕЛ 11: Токсикологична информация

Обърнете се към данните безопасност на материала (MSDS) за един компонент.

РАЗДЕЛ 12: Екологична информация

Обърнете се към данните безопасност на материала (MSDS) за един компонент.

РАЗДЕЛ 13: Обезвреждане на отпадъците

Обърнете се към данните безопасност на материала (MSDS) за един компонент.

РАЗДЕЛ 14: Информация относно транспортирането**14.1 UN-номер.**

ADR/RID: -

IMDG: -

IATA: -

14.2 Точното на наименование на пратката по списъка на ООН

ADR/RID: Безопасни продукти

IMDG: Not dangerous goods

IATA: Not dangerous goods

14.3 Клас(ове) на опасност при транспортиране

ADR/RID: -

IMDG: -

IATA: -

14.4 Опаковачна група

ADR/RID: -

IMDG: -

IATA: -

14.5 Опасности за околната среда

ADR/RID: не

IMDG Marine Pollutant: no

IATA: no

14.6 Специални предпазни мерки за потребителите

няма информация

РАЗДЕЛ 15: Информация относно нормативната уредба

Инструкцията за безопасност отговаря на изискванията на Регулация (EU) No. 1907/2006.

15.1 Специфични за веществото или сместа нормативна уредба/ законодателство относно безопасността, здравето и околната среда

няма информация

15.2 Оценка на безопасност на химично вещество или смес

<** Phrase language not available: [BG] CUST - SIAL00000005877 **>

РАЗДЕЛ 16: Друга информация**Kit Components:**

Annexin V Cy3.18	SIGMA	A4963	-
Conjugate, from human placenta			
6-Carboxyfluorescein diacetate	SIGMA	C5041	-
10X Binding buffer (kit component only)	SIGMA	B9796	-

Допълнителна информация

Запазени права 2013 Sigma-Aldrich Co. LLC. Лицензът се дава за отпечатване на неограничен брой хартиени копия само за вътрешна употреба.

Горепосочената информация се счита за вярна, но не претендира да е изчерпателна и трябва да се използва само като ръководство. Информацията в този документ е базирана на сегашните ни знания и е приложима към продукта по отношение на предпазните мерки за безопасност.

Документът не представлява никаква гаранция за свойствата на продукта. Sigma-Aldrich Co и нейните представителства не носят отговорност за щети в резултат на работа или контакт с посочения продукт. Вижте www.sigma-aldrich.com, обратната страна на фактурата или опаковъчния лист за допълнителни правила и условия на продажба.

Apo-BrdU Apoptosis Detection

Catalog Number: 88-6671

Also Known As: 5-bromodeoxyuridine

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

Product Information

Contents: Apo-BrdU Apoptosis Detection

 Catalog Number: 88-6671



Temperature Limitation: Refer to vials for proper storage conditions.



Batch Code: Refer to Vial



Use By: Refer to Vial



Caution, contains Azide

Description

The APO-BRDU™ Kit is a 2-color staining method for labeling DNA breaks and total cellular DNA to detect apoptotic cells by flow cytometry. The kit contains the instructions and reagents required for measuring apoptosis in cells, including positive and negative control cells for assessing reagent performance; washing, reaction and rinsing buffers for processing individual steps in the assay; terminal deoxynucleotidyl transferase enzyme (TdT), bromodeoxyuridine triphosphate (Br-dUTP), and fluorescein labeled anti-BrdU antibody for labeling DNA breaks and propidium iodide/RNase A solution for counterstaining the total DNA.

One of the most easily measured features of apoptotic cells is the break-up of the genomic DNA by cellular nucleases. These DNA fragments can be extracted from apoptotic cells and result in the appearance of DNA laddering when the DNA is analyzed by agarose gel electrophoresis. The DNA of non-apoptotic cells that remains largely intact does not display this laddering on agarose gels during electrophoresis. The large number of DNA fragments appearing in apoptotic cells results in a multitude of 3'-hydroxyl termini in the DNA. This property can be used to identify apoptotic cells by labeling the 3'-hydroxyl ends with bromolabeled deoxyuridine triphosphate nucleotides (Br-dUTP). The enzyme terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) catalyzes a template independent addition of deoxyribonucleoside triphosphates to the 3'-hydroxyl ends of double- or single-stranded DNA with either blunt, recessed or overhanging ends. A substantial number of these sites are available in apoptotic cells providing the basis for the method utilized in the APO-BRDU™ Kit. Recent evidence has demonstrated that Br-dUTP is more readily incorporated into the genome of apoptotic cells than are the deoxynucleotide triphosphates complexed to larger ligands like fluorescein, biotin or digoxigenin. This greater incorporation gives rise to a brighter flow cytometry signal when the Br-dUTP sites are identified by a fluorescein labeled anti-BrdU monoclonal antibody. Non-apoptotic cells do not incorporate significant amounts of the Br-dUTP due to the lack of exposed 3'-hydroxyl DNA ends.

Sufficient reagents are provided to process a total of 60 cell suspensions including 5ml positive and 5ml negative control cell suspensions of approximately 1×10^6 cells per ml in 70% (v/v) ethanol.

APO-BRDU™ Protocol

Research Use Only

APO-BRDU™ Protocol

The following protocol describes the method for measuring apoptosis in the positive and negative control cells that are provided in the APO-BRDU™ Kit. The same procedure should be employed for measuring apoptosis in the cell specimens provided by the researcher.

1. Resuspend the positive (brown cap) and negative (natural cap) control cells by swirling the vials. Remove 1 ml aliquots of the control cell suspensions (approximately 1×10^6 cells per 1 ml) and place in 12x75 mm flow cytometry centrifuge tubes. Centrifuge the control cell suspensions for 5 minutes at 300 *xg*, then remove the 70% (v/v) ethanol by aspiration being careful to not disturb the cell pellet.
2. Resuspend each tube of control cells with 1 ml of Wash Buffer (blue cap). Centrifuge as before and remove the supernatant by aspiration.
3. Repeat the Wash Buffer treatment (step 2).
4. Resuspend each tube of the control cell pellets in 50 μ l of the DNA Labeling Solution (prepared as described below).

DNA LABELING SOLUTION	1 ASSAY	5 ASSAYS	10 ASSAYS
TdT Reaction Buffer (green cap)	10.00 μ l	50.00 μ l	100.00 μ l
TdT Enzyme (yellow cap)	0.75 μ l	3.75 μ l	7.50 μ l
Br-dUTP (violet cap)	8.00 μ l	40.00 μ l	80.00 μ l
Distilled H ₂ O	32.25 μ l	161.25 μ l	322.50 μ l
Total Volume	51.00 μ l	255.00 μ l	510.00 μ l

Note: The appropriate volume of Staining Solution to prepare for a variable number of assays is based upon multiples of the component volumes combined for 1 Assay. Mix only enough DNA Labeling Solution to complete the number of assays prepared per session. The DNA Labeling Solution is active for approximately 24 hours.

5. Incubate the cells in the DNA Labeling Solution for 60 minutes at 37°C in a temperature-controlled bath. Shake cells every 15 minutes to resuspend.

Note: The DNA Labeling Reaction can also be carried out overnight at 22-24°C for the control cells. For samples other than the control cells provided in the kit, incubation times at 37°C may need to be adjusted to longer or shorter periods depending on the characteristics of the cells supplied by the researcher.

6. At the end of the incubation time add 1.0 ml of Rinse Buffer (red cap) to each tube and centrifuge each tube for 5 minutes at 300 *xg*. Remove the supernatant by aspiration.
7. Repeat the cell rinsing as in step 6 and remove the supernatant by aspiration.
8. Resuspend the cells in 0.1 ml of the Antibody Solution (prepared as described below).

ANTIBODY SOLUTION	1 ASSAY	5 ASSAYS	10 ASSAYS
Flourescein~PRB-1 (orange cap)	5.00 μ l	25.00 μ l	50.00 μ l
Rinse Buffer (red cap)	95.00 μ l	475.00 μ l	950.00 μ l
Total Volume	100.00 μ l	500.00 μ l	1000.00 μ l

9. Incubate the cells with the Fluorescein~PRB-1 Antibody Solution in the dark for 30 minutes at room temperature. (Hint: Wrap tubes with aluminum foil.)
10. Add 0.9 ml of the Propidium Iodide/RNase A Solution (amber bottle) to the tubes containing the 0.1 ml Antibody Staining Solution.

APO-BRDU™ Protocol

Research Use Only

Note: If the cell density is low, decrease the amount of Propidium Iodide/RNase A solution to 0.5ml.

11. Incubate the cells in the dark for 30 minutes at room temperature.
12. Analyze the cells in the Propidium Iodide/RNase A Solution by flow cytometry.
13. Analyze the cells within 3 hours of staining.

Cell Fixation Procedure for APO-BRDU™ ASSAY:

Note: Cell fixation using paraformaldehyde is a required step in the APO-BRDU™ assay. The following cell fixation procedure is a suggested method. Variables such as cell origin and growth conditions can affect the results. The fixation conditions provided below should be considered as guidelines. Additional experimentation may be required to obtain results comparable to the control cells provide with this kit. The positive and negative control cells provided in the APO-BRDU™ Kit are already fixed.

1. Suspend $1-2 \times 10^6$ cells in 0.5 ml of phosphate buffered saline (PBS) (10 mM sodium phosphate pH 7.2, 150 mM sodium chloride).
2. Add the cell suspension into 5 ml of 1% (w/v) paraformaldehyde in PBS and incubate on ice for 15 minutes.
3. Centrifuge cells for 5 minutes at 300 xg and discard the supernatant.
4. Wash the cells in 5 ml of PBS then pellet the cells by centrifugation. Discard the supernatant.
5. Repeat the wash and centrifugation.
6. Resuspend the cells in 0.5 ml of PBS.
7. Add cells to 5 ml of ice-cold 70% (v/v) ethanol and incubate for a minimum of 30 minutes on ice or at -20°C.

Note: In some biological systems, storage of the cells at -20°C in 70% (v/v) ethanol for at least 12-18 hours prior to staining for apoptosis detection yields the best results.

8. Store cells in 70% (v/v) ethanol at -20°C until use. Cells may be stored at -20°C for several days before use.

APO-BRDU is a trademark of Phoenix Flow Systems, San Diego, California.



APO-BRDU™ Протокол

Следващият протокол описва метод за измерване на апоптоза в положителни и отрицателни контролни клетки, които са предвидени в комплекта APO-BrdU™. Трябва да се използва същата процедура за измерване на апоптоза в клетъчни проби, предвидени от изследователя.

1. Ресуспендирайте положителен (кафява капачка) и отрицателни (естествени капачка) контролни клетки чрез разклащане мкл от контрол клетъчни суспензии (приблизително 1×10^6 клетки на 1 мл) и място на vials.Remove 1 в 12x75 mm флоуцитометрия центрофужни епруветки. Центрофуга за суспендиране на клетъчен контрол в продължение на 5 минути при 300 x g, след това извадете 70% (V / V) етанол чрез аспирация като внимавате да не се нарушава клетъчната пелета.
2. Ресуспендирайте всяка тръба на контролни клетки с 1 мл от Wash Buffer (синя капачка). Центрофугира както преди и отстраняване на супернатанта чрез аспирация.
3. Повторете третирането на Wash Buffer (стъпка 2).
4. Ресуспендирайте всяка тръба на пелетите клетъчна контрола в 50 μ l на ДНК Обозначаване разтвор (получен както е описано по-долу).

DNA LABELING SOLUTION	1 ASSAY	5 ASSAYS	10 ASSAYS
TdT Reaction Buffer (green cap)	10.00 μ l	50.00 μ l	100.00 μ l
TdT Enzyme (yellow cap)	0.75 μ l	3.75 μ l	7.50 μ l
Br-dUTP (violet cap)	8.00 μ l	40.00 μ l	80.00 μ l
Distilled H ₂ O	32.25 μ l	161.25 μ l	322.50 μ l
Total Volume	51.00 μ l	255.00 μ l	510.00 μ l

Забележка: Съответният обем на оцветяващ разтвор да се подготвят за променлив брой анализи се основава на кратни на обемите на съставни комбинирани за едно вещество. Смесете достатъчно само DNA Labeling Solution за завършване на броя на анализите, изготвени на сесия. ДНК Обозначаване решение е активен за около 24 часа.

5. Инкубирайте клетките в ДНК Обозначаване разтвор в продължение на 60 минути при 37 ° C в баня с контролирана температура. Разклатете клетки на всеки 15 минути, за да ресуспендирате.
6. Забележка: ДНК Обозначаване Реакцията може да се извърши на една нощ при 22-24 ° C в продължение на контролните клетки. За проби, различни от контролните клетки, предвидени в комплекта, може да се наложи да бъдат коригирани по-дълги или по-кратки периоди, в зависимост от характеристиките на клетките, предоставени от изследователя инкубация при 37 ° C.

7. Повтаря се промиването клетка като в стъпка 6 и отстраняване на супернатанта чрез аспирация.
8. Resuspend the cells in 0.1 ml of the Antibody Solution (prepared as described below).

ANTIBODY SOLUTION	1 ASSAY	5 ASSAYS	10 ASSAYS
Flourescein~PRB-1 (orange cap)	5.00 µl	25.00 µl	50.00 µl
Rinse Buffer (red cap)	95.00 µl	475.00 µl	950.00 µl
Total Volume	100.00 µl	500.00 µl	1000.00 µl

9. Инкубирайте клетките с флуоресцеин ~ PRB-1 разтвор на анти тяло на тъмно в продължение на 30 минути при стайна температура. (Съвет: Wrap тръби с алуминиево фолио.)
10. Добавете 0,9 мл от Пропидиев Iodide / RNase A разтвор (кехлибар бутилка) на тръби Containing the 0.1 мл антитела оцветяващ разтвор.

Забележка: Ако клетъчната плътност е ниско, намаляване на размера на пропидиев йодид / RNase A разтвор на 0.5 ml.

11. инкубират клетките на тъмно в продължение на 30 минути при стайна температура.
12. Анализ на клетките в Пропидиев Iodide / RNase решение чрез флоуцитометрия.
13. Анализирайте клетките в рамките на 3 часа след оцветяване.

Cell Fixation Процедура за APO-BrDU™ АНАЛИЗ:

Забележка:

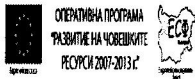
Клетъчната фиксация с помощта параформалдехид е необходима стъпка в анализа на APO-BrDU™. Следната процедура клетка фиксиране е Предложен метод. Променливи като клетка произход и условия за растеж могат да повлияят на резултатите. Условията за закрепване, предвидени по-долу следва да се разглеждат като насоки. Допълнителна експериментиране може да се изисква да получи резултати, сравними с контрола клетки осигуряват с този комплект. Положителни и отрицателни контролни клетки, предвидени в™ комплект APO-BrDU вече са фиксирани.

1. спре 1-2x10⁶ клетки в 0,5 мл фосфатен буферен физиологичен разтвор (PBS) (10 mM натриев фосфат pH 7.2, 150 mM натриев хлорид).
2. добави клетъчната суспензия в 5 мл 1% (W / V) параформалдехид в PBS и се инкубира върху лед за 15 минути.
3. Центрофугирайте клетките в продължение на 5 минути при 300 x g и отстранява изплувалата на повърхността.
4. Измийте клетки в 5 мл PBS след това се пелетират клетките чрез центрофугиране. Изхвърлете супернатанта.
- 5 Повторете измиване и центрофугиране.
6. Ресуспендирайте клетките в 0,5 мл PBS.
7. Добавете клетки 5 мл ледено студен 70% (V / V) етанол и се инкубира в продължение на

минимум 30 минути върху лед или при -20°C .

Забележка: В някои биологични системи, съхранение на клетките при -20°C в 70% (V / V) етанол в продължение на най-малко 12-18 часа преди да се оцветят за откриване апоптоза дава най-добри резултати.

8. Съхранявайте клетки в 70% (V / V) етанол при -20°C до употреба. Клетките могат да бъдат съхранявани при -20°C в продължение на няколко дни преди употреба.



ЕВРОПЕЙСКИ СОЦИАЛЕН ФОНД 2007 – 2013
МИНИСТЕРСТВО НА ОБРАЗОВАНИЕТО И НАУКАТА
ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА „РАЗВИТИЕ НА ЧОВЕШКИТЕ РЕСУРСИ“



BG051PO001-3.3.06 -0059

ФУНДАМЕНТАЛНО И ПРИЛОЖНО ОБУЧЕНИЕ
НА ДОКТОРАНТИ, ПОСТДОКТОРАНТИ,
СПЕЦИАЛИЗАНТИ И МЛАДИ УЧЕНИ
В ИНТЕРДИСЦИПЛИНАРНИ БИОЛОГИЧНИ НАПРАВЛЕНИЯ
И ИНОВАЦИОННИ БИОТЕХНОЛОГИИ.

Бенефициент:

Институт по биология и имунология на размножаването "Акад. Кирил Братанов"

Образец № 4

ДО ИБИР – БАН
бул. „Цариградско шосе“ № 73
гр. София

ЦЕНОВА ОФЕРТА

За участие в открита процедура за възлагане на обществена поръчка с предмет:
«Доставка на материали /реактиви/ и консумативи по обособени позиции»

ЗА ОБОСОБЕНА ПОЗИЦИЯ № и име
Обособена позиция № 3 - Китове за детекция на апоптоза

Настоящата оферта е подадена от: Ай Ви Ди България ООД/наименование на участника/, ЕИК/БУЛСТАТ200123131.; адрес по регистрация: гр. София, ул. Бигла 21А, Адрес за кореспонденция: гр. София 1756, ж.к. Дървеница, бл. 48 В, факс 02/975 80 23,

Заличени данни - чл.37,
ал.1 от ЗЗК - търговска
тайна

Заличени данни - чл.37, ал.1 от
ЗЗК - търговска тайна

УВАЖАЕМА ГОСПОЖО ДИРЕКТОР,

1. С настоящето представяме нашата ценова оферта за обособена позиция **Обособена позиция № 3 - Китове за детекция на апоптоза (офертата се изготвя за всяка обособена позиция по отделно)** от поръчката.

Приемаме да изпълним поръчката по посочената обособена позиция, при следните цени:

Заличен печат - чл.37, ал1 от ЗЗК -
търговска тайна;
Заличен подпис - чл.2, ал.1 от ЗЗЛД

1	2	3	4	5	6	7	8	
№ по ред	Номер от ОП	Наименование	Единица мярка	Количество	Предложение на участника	Единична цена в лева без ДДС, съобразно единицата мярка	Обща цена в лева без ДДС (колона 5 х колона 7)	Каталожен номер/брой в опаковка/ производител
	ОП Р-3	Обособена позиция № 3 - Китове за детекция на апоптоза						
37	ОП Р-3-1	Кит за фиксация и пермеабилзация в една стъпка, съдържащ концентрат и разредител, подходящ за използване с антигела срещу цитокини, транскрипционни фактори и нуклеарни протеини; 100 мл	опаковка	2	Съгласно приложената Техническа оферта за съответната обособена позиция.	328,00	656,00	88-8824-00, eBioscience, 100 tests
38	ОП Р-3-2	Кит за детекция на апоптоза, съдържащ: Анексин V - FITC, 10x буфер за свързване и Пропидиев йодид; опаковка за 100 теста	опаковка	2	Съгласно приложената Техническа оферта за съответната обособена позиция.	435,50 за 100 теста	871,00 за 200 теста (опаковката предлагана от производителя е неделима и е със съдържание 200 теста)	88-8005-74, eBioscience, 200 tests
39	ОП Р-3-3	Кит за детекция на апоптоза, съдържащ: 10X буфер за свързване; Анексин V - APC; разтвор на Пропидиев йодид; опаковка за 200 теста	опаковка	1	Съгласно приложената Техническа оферта за съответната обособена позиция.	970,00	970,00	88-8007-74, eBioscience, 200 tests
	ОП Р-3-4	Кит за детекция на апоптоза, съдържащ: Анексин V-FITC, разтвор на Пропидиев йодид, Анексин V буфер за свързване; опаковка за 100	опаковка	1	Съгласно приложената Техническа оферта за	357,00	357,00	BMS500FI/100, eBioscience 100 tests

Проектът се осъществява с финансовата подкрепа на Оперативна програма „Развитие на човешките ресурси“ 2007-2013, съфинансирана от Европейския съюз чрез „Европейския социален фонд“.

	теста	содержание	упаковка	количество	соответствующая обособленная позиция	цена за единицу	цена за количество	наименование
41	ОП Р-3-5	Кит за детекция на апоптоза, съдържащ: Анексин V-Cy3; 6-carboxyfluorescein diacetate (6-CFDA); 10x буфер за свързване; или еквивалент; опаковка от 100 теста	опаковка	2	Съгласно приложената Техническа оферта за съответната обособена позиция	800,00 за 100 теста	1600,00 за 200 теста (опаковката предлагана от производителя е неделима и е съдържание 200 теста)	АРОАС-1КТ, 200 tests, Sigma
42	ОП Р-3-6	Аро-BrdU апоптоза детектиращ кит или еквивалент	опаковка	3	Съгласно приложената Техническа оферта за съответната обособена позиция	945,00	2835,00	88-6671-88, eBioscience, 100 tests

Обща цена на обособената позиция, лева без ДДС		7289,00
За участници регистрирани по ЗДДС: ДДС = 20%, лева		1457,80
Обща цена на офертата с ДДС, лева		8746,80

Пояснения:

Заличен печат - чл.37, ал.1 от ЗЗК - търговска тайна;
Заличен подпис - чл.2, ал.1 от ЗЗЛД

- Колони 1 – 5 от таблицата се попълват съгласно Техническата Спецификация на Възложителя - Приложение № 1 от документацията за участие – без да се променят !!.
- Колона № 6 „Предложение на участника“ може да не се попълва с конкретни технически характеристики, каталожен или партиден номер на артикула и други, а да се напише текст „Съгласно приложената Техническа оферта за съответната обособена позиция“.
- ДДС, в случай, че е дължим от Възложителя, ще се заплаща съгласно разпоредбите на българското законодателство.

Оценката на офертите се извършва по цени в лева без ДДС.!

Проектът се осъществява с финансовата подкрепа на Оперативна програма „Развитие на човешките ресурси“ 2007-2013, съфинансирана от Европейския съюз чрез “Европейския социален фонд“

2. Цените включват стойност на стоките и всички присъщи разходи, данъци и такси за доставка (без ДДС) франко ИБИР-БАН, гр. София, бул. «Цариградско шосе» № 73. Данък добавена стойност (ДДС) се заплаща отделно, съгласно изискванията на българското законодателство.

3. Цените се представят с точност до втория знак след десетичната запетая и не подлежат на промяна за срока на договора, сключен с Възложителя.

4. Условия и начин на плащане: по банков път, в лева по наша банкова сметка както следва:

Заличени данни - чл.37, ал1 от ЗЗК - търговска тайна

при банка

в срок от 5 календарни дни след доставка и представяне на фактура, двустранно подписан приемателно-предавателен протокол и заверено копие на писмена заявка от възложителя.

5. При условие, че бъдем избрани за изпълнител на обществената поръчка, ще представим парична / банкова гаранция за изпълнение на задълженията по договора в размер на 2% от стойността му, без ДДС.

6. Подаването на настоящата ценова оферта удостоверява безусловното приемане от наша страна на всички изисквания и задължения, поставени от Възложителя в провежданата процедура.

! ВАЖНО: Ако участникът подава оферта за повече от една обособена позиция, плик № 3, т.е. Ценова оферта се представя за всяка обособена позиция по отделно в отделен плик № 3 и се надписва по следния начин:

„Име на участника:
Предлагана цена по обособена позиция №”.

Заличен печат - чл.37, ал1 от ЗЗК -
търговска тайна;
Заличен подпис - чл.2, ал.1 от
ЗЗЛД

Дата 08.08.2014
гр. София

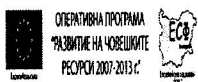
.....
/ подпис, печат/

Заличени лични данни - чл.2, ал.1 от ЗЗЛД

Управител
Ай Ви Ди България ООД

BG051PO001-3.3.06 -0059

«Доставка на материали /реактиви/ и консумативи по обособени позиции»



ЕВРОПЕЙСКИ СОЦИАЛЕН ФОНД 2007 – 2013
МИНИСТЕРСТВО НА ОБРАЗОВАНИЕТО И НАУКАТА
ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА „РАЗВИТИЕ НА ЧОВЕШКИТЕ РЕСУРСИ”



BG051PO001-3.3.06 -0059

ФУНДАМЕНТАЛНО И ПРИЛОЖНО ОБУЧЕНИЕ
НА ДОКТОРАНТИ, ПОСТДОКТОРАНТИ,
СПЕЦИАЛИЗАНТИ И МЛАДИ УЧЕНИ
В ИНТЕРДИСЦИПЛИНАРНИ БИОЛОГИЧНИ НАПРАВЛЕНИЯ
И ИНОВАЦИОННИ BIOTEKHOЛОГИИ.

Проектът се осъществява с финансовата подкрепа на Оперативна програма „Развитие на човешките ресурси” 2007-2013, съфинансирана от Европейския съюз чрез “Европейския социален фонд”

Образец № 8

ДЕКЛАРАЦИЯ

по чл. 56, ал. 1, т. 8 от ЗОП

за използване / не използване на подизпълнители

Долуподписаният Заличени лични данни - чл.2, ал.1 от ЗЗЛД

в качеството си на Управител (длъжност) на .Ай Ви Ди България ООД

(наименование на участника или на дружество – член на обединение / консорциум - участник в процедурата), ЕИК 200123131, със седалище и адрес на управление гр. София, ул. Бигла 21А - участник в процедура за възлагане на обществена поръчка с предмет: «Доставка на материали /реактиви/ и консумативи по обособени позиции», обявена от ИБИР-БАН в изпълнение на Договор № BG051PO001-3.3.06 -0059

ДЕКЛАРИРАМ, ЧЕ:

Представленият от мен участник в процедурата – Ай Ви Ди България ООД(наименование на участника):

1. при изпълнението на обществената поръчка няма да използва подизпълнители

Известно ми е, че за посочване на неверни данни, нося наказателна отговорност по чл. 313 от Наказателния кодекс.

Забележка: т. 2, 3 и 4 се попълват за всяка обособена позиция поотделно.

05.08.2014

(дата на подписване)

Декларатор:

Заличен печат - чл.37, ал1 от ЗЗК -
търговска тайна;
Заличен подпис - чл.2, ал.1 от ЗЗЛД

Заличени лични данни - чл.2, ал.1 от ЗЗЛД

Проектът се осъществява с финансовата подкрепа на Оперативна програма „Развитие на човешките ресурси” 2007-2013, съфинансирана от Европейския съюз чрез “Европейския социален фонд”

Платете на - име на получателя ИБИР БАН			
IBAN на получателя BG26UNCR96603110023912		BIC на банката на получателя UNCRBGSF	
При банка - име на банката на получателя УНИКРЕДИТ БУЛБАНК АД		Вид плащане***	
ПЛАТЕЖНО НАРЕЖДАНЕ / ВНОСНА БЕЛЕЖКА за плащане от/към бюджета		Валута BGN	Сума 145.78
Основание за плащане гаранция изп. ОП ИБИР-БАН 2014			
Още пояснения доставка на консумативи лот 3			
Вид* и номер на документа, по който се плаща 9		Дата (ддммгггг) на документа	
Период, за който се плаща От дата (ддммгггг)	До дата (ддммгггг)		
Задължено лице - наименование на юридическото лице или трите имена на физическото лице IVD BULGARIA OOD			
БУЛСТАТ на задълженото лице 200123131	ЕГН на задълженото лице	ЛНЧ на задълженото лице	
Наредител - наименование на юридическото лице или трите имена на физическото лице IVD BULGARIA OOD			
IBAN на наредителя		BIC на банката на наредителя	
Заличени данни - чл.37, ал. 1 от ЗЗК - търговска тайна			
Договорен курс / Negotiated rate			
Платежна система / РИНГС или БИСЕРА**** БИСЕРА	Такси** 2	Вид плащане***	

*Вид документ: 1 – декларация; 2 - ревизионен акт; 3 – наказ. постановление; 4 – авансова вноска; 5 – парт. номер на имот; 6 – постановление за принудително събиране; 9 - други

**Такси: 1 - за сметка на наредителя; 2 - споделени (стандарт за местни преводи); 3 - за сметка на получателя

***Вид плащане: попълва се за сметки на администратори на приходи и на Централния бюджет

****За суми под 100.000 лв., ако полето "платежна система" не е попълнено, банката изпълнява нареждането чрез БИСЕРА

Статистическа форма/Statistics form

Създаване

Създател	Дата на създаване	Дата на изпълнение	Валидно преди
Заличени лични данни - чл.2, ал.1 от ЗЗЛД	17.11.2014 15:40	17.11.2014	17.12.2014

Подписи:

Дата на подписване
17.11.2014 15:41
Изпратен: 17.11.2014 15:41

Име на потребител
Заличени лични данни - чл.2, ал.1 от ЗЗЛД

Заличен печат - чл.37, ал. 1 от ЗЗК - търговска тайна;
Заличен подпис - чл.2, ал.1 от ЗЗЛД