

# Annexin V-FITC/PI Apoptosis Detection Kit 凋亡检测试剂盒

## 产品简介

Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒是用 FITC 标记的 Annexin V 作为探针，来检测细胞早期凋亡的发生。其检测原理为：在正常的活细胞中，磷脂酰丝氨酸（phosphatidylserine, PS）位于细胞膜的内侧，但在早期凋亡的细胞中，PS 从细胞膜的内侧翻转到细胞膜的表面，暴露在细胞外环境中。Annexin-V（膜联蛋白-V）是一种分子量为 35-36 kDa 的  $Ca^{2+}$  依赖性磷脂结合蛋白，能与 PS 高亲和力结合，可通过细胞外侧暴露的磷脂酰丝氨酸与凋亡早期细胞的胞膜结合。另外，本试剂盒中还提供了碘化丙啶（Propidium Iodide, PI）用来区分存活的早期细胞和坏死或晚期凋亡细胞。PI 是一种核酸染料，它不能透过正常细胞或早期凋亡细胞的完整的细胞膜，但可以透过凋亡晚期和坏死细胞的细胞膜而使细胞核染红。因此，将 Annexin V 与 PI 联合使用时，PI 则被排除在活细胞（Annexin V-/PI-）和早期凋亡细胞（Annexin V+/PI-）之外，而晚期凋亡细胞和坏死细胞同时被 FITC 和 PI 结合染色呈现双阳性（Annexin V+/PI+）。本试剂盒可用于流式细胞仪、荧光显微镜进行检测。

## 产品规格

产品货号	C331406E	C331406S	C331406M
产品规格	20 T	50 T	100 T

## 产品储存

冰袋运输。-20°C 避光保存，避免反复冻融，一年有效。

【注】如果需要在短时间内多次重复使用，可以在 4°C 避光保存，半年有效。

## 操作注意

1. 由于细胞凋亡是一个快速的过程，建议样品在染色后 1 小时之内进行分析。
2. 对于贴壁细胞，消化是一个关键步骤。贴壁细胞诱导细胞凋亡时如有漂浮细胞，需收集漂浮细胞和贴壁细胞后合并染色。处理贴壁细胞时要小心操作，尽量避免人为的损伤。胰酶消化时间过短，细胞需要用力吹打才能脱落，容易造成细胞膜的损伤；PI 摄入过多，消化时间过长，细胞膜同样易造成损伤，甚至会影响细胞膜上磷脂酰丝氨酸与 Annexin V-FITC 的结合。消化时将胰酶铺满孔板底后，轻摇使胰酶与细胞充分接触，然后倒掉大部分胰酶，利用剩余少量胰酶再消化一段时间，待细胞间空隙增大，瓶底呈花斑状即可终止。在消化液中尽量不用 EDTA，EDTA 会影响 Annexin V 与 PS 的结合。
3. 如果样品来源于血液，请务必除去血液中的血小板。因为血小板含有 PS，能与 Annexin V 结合，从而干扰实验结果。可以使用含有 EDTA 的缓冲剂并在 200 g 离心洗去血小板。
4. 试剂在开盖前请短暂离心，将盖内壁上的液体甩至管底，避免开盖时液体洒落。
5. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
6. 本产品仅作科研用途！

## 操作说明

### 1. 样品染色

- 1) 悬浮细胞：300 g，4°C 离心 5 min 收集细胞。
- 2) 贴壁细胞：用不含 EDTA 的胰酶消化后，300 g，4°C 离心 5 min 收集细胞。胰酶消化时间不宜过长，以防引起假阳性。
- 3) 用预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次，每次均需 300 g，4°C 离心 5 min。收集  $1 \times 10^5$ - $5 \times 10^5$  细胞。
- 4) 吸弃 PBS，加入 100  $\mu$ L 1×Binding Buffer 重悬细胞。
- 5) 加入 5  $\mu$ L Annexin V-FITC 和 10  $\mu$ L PI Staining Solution，轻轻混匀。
- 6) 避光、室温反应 10-15 min。
- 7) 加入 400  $\mu$ L 1×Binding Buffer，混匀后放置于冰上，样品在 1 小时内用流式细胞仪或荧光显微镜检测。

【注】为了避免洗涤细胞时损失细胞，在吸液时可以用大的 Tip 头套上小的 Tip 头吸液。

### 2. 样品分析

#### 1) 流式细胞仪分析：

FITC 最大激发波长为 488 nm，最大发射波长 525 nm，FITC 的绿色荧光在 FL1 通道检测；PI-DNA 复合物的最大激发波长为 535 nm，最大发射波长为 615 nm，PI 的红色荧光在 FL2 或 FL3 通道检测。用 CellQuest 等软件进行分析，绘制双色散点图（two-color dot plot），FITC 为横坐标，PI 为纵坐标。典型的实验中，细胞可以分成三个亚群，活细胞仅有很低强度的背景荧光，早期凋亡细胞仅有较强的绿色荧光，晚期凋亡细胞有绿色和红色荧光双重染色。

#### 2) 荧光显微镜分析：

- a. 滴一滴滴用 Annexin V-FITC/PI 双染的细胞悬液于载玻片上，并用盖玻片盖上细胞。

【注】对于贴壁细胞，可直接用盖玻片培养细胞并诱导细胞凋亡。

- b. 在荧光显微镜下用双色滤光片观察。Annexin V-FITC 荧光信号呈绿色，PI 荧光信号呈红色。