

Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒

(本试剂盒仅供科研使用)

产品包装

4°C 干避光保存, 有效期 2 年。

产品编号	产品名称	产品规格
YFXCA03	Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡试剂盒	20T/100T

产品组分

试剂盒组分	20T	100T
Annexin V-FITC	100 μ L	500 μ L
PI Solution	200 μ L	1mL
Annexin V Binding Buffer	10mL	50mL

一、产品说明

磷脂酰丝氨酸(PS)只分布在正常细胞的细胞膜质双层的内侧, 如细胞发生凋亡, 则 细胞膜中的 PS 在细胞凋亡早期, 会由脂膜内侧翻向外侧。

Annexin V 是一种分子量为 35-36kD 的 Ca^{2+} 依赖性磷脂结合蛋白, 与 PS 有高度亲和力和, 故可通过细胞外侧暴露的 PS 与凋亡早期细胞的细胞膜结合。因此 Annexin V 被作为检测细胞早期凋亡的灵敏指标之一。将 Annexin V 进行荧光素(EGFP、FITC)标记, 以标记了的 Annexin V 作为荧光探针, 利用荧光显微镜活流式细胞仪可检测细胞凋亡的发生。

碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)是一种核酸染料, 它不能透过完整的细胞膜, 但对凋亡中晚期的细胞和死细胞, PI 能够透过细胞膜而使细胞核染红, 因此将 Annexin V 与 PI 匹配使用, 就可以灵敏方便的将处于不同凋亡时期的细胞区分开来。在双变量流式细胞仪的散点图上, 左下象限显示活细胞, 为(FITC-/ PI-); 右上象限是坏死细胞, 为(FITC+/ PI+); 右下象限为凋亡细胞, 为(FITC+/ PI-)。

二、操作步骤 (本方案仅提供一个建议, 可根据您的具体需要进行修改)

1、悬浮细胞的检测

1.1 1000g 离心 5min, 弃上清, 用适量 PBS 轻轻重悬细胞并计数。

注: PBS 重悬细胞同时起到洗涤细胞的作用, 可保证后续 Annexin V-FITC 的结合不受干扰。

1.2 取约 $5-10 \times 10^4$ 个细胞, 1000g 离心 5min, 弃上清, 加入 195 μ L Annexin V Binding Buffer, 轻柔重悬细胞。

1.3 加入 5 μ L Annexin V-FITC 和 10 μ L PI Solution 染色液, 轻柔混匀。

1.4 室温 (20-25°C) 避光孵育 10-20min。

注: 孵育过程中可以重悬细胞 2-3 次以改善染色效果。

1.5 1000g 离心 5min, 弃上清, 用适量 PBS 轻轻重悬细胞, 将样本转移至冰浴中, 建议用铝箔避光处理。

1.6 使用流式细胞仪或荧光显微镜对染色结果进行检测。

2、贴壁细胞消化后的检测

2.1 将细胞培养基吸出, 转移至合适大小的离心管内。

2.2 使用 PBS 轻柔清洗一次贴壁细胞, 加入适量胰酶进行消化细胞, 室温孵育至细胞形状逐

渐变圆并变得松散, 轻轻晃动出现细胞脱落, 立即向消化好的细胞中加入 2.1 步骤收集的细胞培养基, 以终止消化, 将细胞轻柔吹打下来。

注:

A. 建议此步骤使用 2.1 步骤收集的培养基终止消化, 也能够收集悬浮在培养基中的发生凋亡或坏死的细胞。

B. 胰酶消化需要适当: 消化时间过短, 细胞需要用力吹打才能脱落, 容易造成细胞膜损伤, 从而导致细胞坏死的假阳性; 消化时间过长, 同样容易造成细胞膜损伤而出现假阳性, 甚至会影响细胞膜上磷脂酰丝氨酸与 Annexin V-FITC 的结合, 干扰对细胞凋亡的检测。

C. 胰酶消化液中应尽量不含 EDTA。Annexin V 是 Ca^{2+} 依赖性蛋白, EDTA 可螯合 Ca^{2+} , 从而影响 Annexin V 和磷脂酰丝氨酸 (PS) 的结合, 影响实验结果。

D. 如果使用含 EDTA 的胰酶消化细胞, 建议在消化结束后、加入 Annexin V-FITC 前使用 PBS 多清洗几次细胞, 可以去除 EDTA 对凋亡检测的影响。

2.3 将细胞转入离心管中, 1000g 离心 5min, 弃上清, 收集细胞, 用 PBS 轻轻重悬细胞并计数。

注: 此步骤应尽量去除胰酶, 残留的胰酶会消化并降解后续加入的 Annexin V-FITC, 影响染色效果。

2.4 取约 $5-10 \times 10^4$ 个细胞, 1000g 离心 5min, 弃上清, 加入 195 μ L Annexin V Binding Buffer, 轻柔重悬细胞。

2.5 加入 5 μ L Annexin V-FITC 和 10 μ L PI Solution 染色液, 轻柔混匀。室温 (20-25 $^{\circ}$ C) 避光孵育 10-20min。

注: 孵育过程中可以重悬细胞 2-3 次以改善染色效果。

2.6 1000g 离心 5min, 弃上清, 用适量 PBS 轻轻重悬细胞, 将样本转移至冰浴中, 建议用铝箔避光处理。

2.7 使用流式细胞仪或荧光显微镜对染色结果进行检测。

3、贴壁细胞的原位荧光检测

3.1 (选做) 如果条件允许, 建议在凋亡诱导结束后, 将多孔板经 1000g 离心 5min。

3.2 吸弃细胞培养基, 加入 PBS 洗涤一次。如果条件允许, 建议在吸弃 PBS 前将多孔板经 1000g 离心 5min。

3.3 加入 195 μ L Annexin V Binding Buffer。

3.4 加入 5 μ L Annexin V-FITC 和 10 μ L PI Solution 染色液, 轻柔混匀。室温 (20-25 $^{\circ}$ C) 避光孵育 10-20mi。

3.5 1000g 离心 5min, 弃上清, 使用 PBS 洗涤细胞, 将样本转移至冰浴中, 建议用铝箔避光处理。

3.6 使用流式细胞仪或荧光显微镜对染色结果进行检测。

三、注意事项

1、由于细胞凋亡是一个快速的过程, 建议样品在染色后 1h 内进行结果分析。

2、如果用于流式细胞仪检测, 可立即上机检测, Annexin V-FITC 为绿色荧光, 最大激发光/发射光波长为 525/530nm, 也能够使用 488 通道激发; PI 为红色荧光, 结合核酸后最大激发光/发射光波长为 535/617nm。

3、染色完成后可以不更换染色液, 直接上机检测。如果不能立即检测, 监狱去除染色液, 使用 PBS 或 Annexin V Binding Buffer 重悬细胞。

- 4、如果细胞在悬浮染色后使用荧光显微镜检测, 建议 1000g 离心 5min 收集细胞, 使用 50-100 μ L Annexin V Binding Buffer 轻轻重悬细胞, 涂片后在荧光显微镜下观察。
- 5、在初次使用流式细胞仪进行检测时, 建议设置未染色、PI 单染和 Annexin V-FITC 单染 3 组对照。
- 6、在使用流式细胞仪进行检测时, 如果发现 Annexin V-FITC 单独染色时出现了过多的 PI 假阳性细胞, 并且通过调整相关设置和参数也无法改善, 可以使用 PBS 将 Annexin V-FITC 稀释 3-10 倍后再进行检测。
- 7、本试剂盒只适用于细胞模型的凋亡双染, 也适用于检测精子凋亡, 但不能用于检测组织样本中的凋亡。
- 8、不同细胞系对 PI 的敏感度不同, 请根据染色情况酌情调整 PI 用量。
- 9、Annexin V-FITC 通过结合磷脂酰丝氨酸 (PS) 对凋亡细胞进行标记, PS 在不同种属间相对保守, 因此本试剂盒适用于对不同种树的细胞进行凋亡检测, 具体实验步骤可参考相关文献。
- 10、本试剂盒能够和抗体一起对细胞进行染色, 但建议分开染色, 建议在抗体染色完成后将缓冲液更换为 Annexin V Binding Buffer 进行凋亡检测。
- 11、如果样品为血液, 必需去除血液中的血小板, 因为血小板中的 PS 会干扰实验结果。
- 12、神经细胞膜容易破坏外翻, 从而导致假阳性, 所以本试剂盒不适用于检测神经细胞的凋亡。
- 13、操作中保持动作轻柔, 离心后需确认管底是否有细胞。
- 14、荧光染料均存在淬灭问题, 实验过程中请尽量注意避光, 以减缓荧光淬灭。
- 15、为了您的健康和安, 请穿实验服并戴一次性手套操作。