

## Annexin V-AlexaFluor488/PI 细胞凋亡试剂盒

(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
YFXCA05	Annexin V-AlexaFluor488/PI 细胞凋亡试剂盒	100T

### 产品组分

试剂盒组分	规格
Annexin V-AlexaFluor 488	0.5mL
PI Solution	0.5mL
10× Binding Buffer	3× 2mL

### 一、产品说明

Annexin V(膜联蛋白-V)是一种分子量为 35-36KD 的  $\text{Ca}^{2+}$  依赖性磷脂结合蛋白, 可与磷脂酰丝氨酸(PS)选择性结合。磷脂酰丝氨酸(PS)主要分布在细胞膜内侧, 即与细胞浆相邻的一侧。在细胞发生凋亡的早期, 不同类型的细胞都会把磷脂酰丝氨酸外翻到细胞表面, 暴露在细胞外环境中。此时, 使用绿色荧光探针 Alexa Fluor 488 标记的 Annexin V, 即 Annexin V-Alexa Fluor 488, 与外翻的磷脂酰丝氨酸(PS)结合, 就可用流式细胞仪或荧光显微镜直接检测到磷脂酰丝氨酸的外翻这一细胞凋亡的重要特征。对于坏死或晚期凋亡的细胞, 由于细胞完整性已经被破坏, Annexin V-Alexa Fluor 488 则可以进入胞浆与处于磷脂层内侧的 PS 结合, 从而也使坏死细胞呈现绿色荧光。

碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)是一种 DNA 结合染料, 它可以染色坏死细胞或凋亡晚期丧失细胞膜完整性的细胞的细胞核。PI 可以由 488, 532 或 546nm 的激光激发, 呈现红色荧光。

本试剂盒适用于培养细胞凋亡检测, 不推荐用于组织样本的检测。

光谱推荐: Annexin V-Alexa Fluor 488: Ex/Em = 488/514nm;  
PI: Ex/Em = 535/617nm (with DNA)

### 二、操作步骤

1. 悬浮细胞离心收集 (2000rpm 离心 5min); 贴壁细胞用不含 EDTA 的胰酶进行消化收集。
2. 用 PBS 洗涤细胞 2 次 (2000rpm 离心 5min), 收集  $1-5 \times 10^6$  数量的细胞。
3. 用去离子水 1:9 稀释 Binding Buffer (1mL 10× Binding Buffer + 9mL 去离子水)。
4. 加入 500 $\mu$ L 的 1× Binding Buffer 重悬细胞。
5. 加入 5 $\mu$ L 的 Annexin V-AlexaFluor 488 混匀后, 加入 5 $\mu$ L 的 PI Solution 混匀, 室温避光反应 15-20min。
6. 孵育后将样本置于冰上, 准备进行检测。

### 三、结果分析

#### A. 用流式细胞仪进行分析

- 1、Annexin V-Alexa Fluor 488 由 488nm 激光激发, 检测荧光发射光谱约在 530nm 处, PI 通道发射光谱约在 617nm 处。
- 2、在双变量流式细胞仪的散点图上, 左下象限显示活细胞, 为(Annexin V-Alexa Fluor 488-/PI-); 右下象限为早期凋亡细胞, 为(Annexin V-Alexa Fluor 488+/PI-); 右上象限是坏死与晚期凋亡细胞, 为(Annexin V-Alexa Fluor 488+/PI+); 左上象限显示裸核细胞, 为 (Annexin V-Alexa Fluor 488-/PI+).

#### B. 用荧光显微镜进行分析

Annexin V-Alexa Fluor 488 可用 FITC 适用的滤光片, PI 可用 Cy3 或者 Texas 适用的滤光片。

### 四、注意事项

- 1、使用前请将产品瞬时离心至管底, 再进行后续实验。
- 2、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。
- 3、对于贴壁细胞, 消化是关键步骤。诱导贴壁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细胞。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; 胰酶消化过长, 细胞膜同样容易造成损伤, 甚至会影响细胞膜上磷脂酰丝氨酸与 Annexin V-Alexa Fluor 488 的结合。消化时将胰酶铺满孔板底后, 轻摇时与细胞充分接触, 然后倒掉大部分胰酶, 利用剩余的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。
- 4、贴壁细胞用胰酶消化后, 建议在最佳培养条件和培养基中恢复约 30min 后染色, 避免假阳性。
- 5、为了避免洗涤细胞时损失细胞, 在洗液时可以用大的 Tip 头套上小的 Tip 头吸液。
- 6、染料的最佳使用浓度由具体实验要求确定。
- 7、荧光染料均存在淬灭问题, 保存和使用过程中均应尽量避光, 以减缓荧光淬灭。