

## Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒 (Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit) Cell Biology

### 产品介绍:

磷脂酰丝氨酸 (PS) 是一种带负电荷的磷脂, 正常细胞中, PS 只分布在细胞膜脂质双层的内侧, 而在细胞凋亡早期, 细胞膜 PS 由脂膜内侧翻向细胞膜外侧, 使 PS 暴露在细胞膜外表面。Annexin V 是一种分子量为 35~36kD 的  $Ca^{2+}$  依赖性磷脂结合蛋白, 与磷脂酰丝氨酸有高度亲和力, 故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。因此 Annexin V 被公认为检测细胞早期凋亡的灵敏指标之一。

将 Annexin V 进行绿色荧光 (FITC) 标记, 以标记了的 Annexin V 作为探针, 利用荧光显微镜或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, 它不能透过正常细胞或早期凋亡细胞的完整的细胞膜, 但对凋亡中晚期的细胞和坏死细胞, PI 能够透过细胞膜而使细胞核染红。因此采用 Annexin V 与 PI 双染的方法, 就可以将处于不同凋亡时期的细胞区分开来。

### 试剂盒组份:

组份	20 assays	50 assays	100 assays	保存条件
Annexin V-FITC	100 $\mu$ l	250 $\mu$ l	250 $\mu$ l*2	4°C 避光
Propidium Iodide, PI	100 $\mu$ l	250 $\mu$ l	250 $\mu$ l*2	4°C 避光
Binding Buffer (10 $\times$ )	2 ml	3ml	3ml*2	4°C

### 操作说明:

#### 1 细胞样品的准备:

##### a) 悬浮细胞:

- i. 收集细胞至离心管中 1000-2000rpm 离心 5min, 小心去除上清。
- ii. 用 1ml 4°C 预冷 PBS 轻轻重悬细胞并计数, 1000-2000rpm 离心 5min, 小心吸除上清。
- iii. 再加入 1ml 4°C 预冷的 PBS 重悬细胞, 1000-2000rpm 离心 5min, 小心吸除上清。

##### b) 贴壁细胞:

- i. 吸出细胞培养液至离心管中, PBS 洗涤贴壁细胞一次, 加入适量不含 EDTA 的胰酶细胞消化液消化细胞。
- ii. 室温孵育至轻轻吹打可以使贴壁细胞吹打下来时, 吸除胰酶细胞消化液。需避免胰酶的过度消化。
- iii. 加入步骤 i 中收集的细胞培养液, 稍混匀, 转移到离心管内, 1000-2000rpm 离心 5min, 小心吸除上清。  
注: 加入步骤 i 中的细胞培养液一方面可以收集已经悬浮的发生凋亡或坏死的细胞, 另一方面细胞培养液中的血清可以有效抑制或中和残留的胰酶; 残留的胰酶会消化并降解后续加入的 Annexin V-FITC 导致染色失败。
- iv. 用 1ml 4°C 预冷 PBS 轻轻重悬细胞并计数, 1000-2000rpm 离心 5min, 小心吸除上清。
- v. 再加入 1ml 4°C 预冷的 PBS 重悬细胞, 1000-2000rpm 离心 5min, 小心吸除上清。

FOR RESEARCH USE ONLY, NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC AND THERAPEUTIC PROCEDURES



M&C Gene Technology • Phone: (010)8205-7786 • (010)8693-7385 • Fax: (010)8205-9875

E-mail: order@macgene.com • Tech Support: support@macgene.com • URL: <http://www.macgene.com>

- 2 用去离子水按 1: 9 稀释 Binding Buffer
  - 3 用 300 $\mu$ l 结合缓冲液重新悬浮细胞, 调节其浓度为  $1 \times 10^6$ /ml;
  - 4 加入 5 $\mu$ l Annexin V-FITC, 轻轻混匀;
  - 5 室温(20-25 $^{\circ}$ C)避光孵育 15min;
  - 6 上机前 5min 加入 5 $\mu$ l 碘化丙啶溶液, 轻轻混匀;
- 上机前在反应管中补加 200 $\mu$ l Binding Buffer 重悬细胞, 避光保存, 随即进行流式细胞仪 (FACS) 检测, Annexin V-FITC 为绿色荧光, PI 为红色荧光。

**注意事项:**

1. 此试剂盒仅供研究使用。
2. 微量试剂需离心数秒将试剂收集至管底后再开盖取用。
3. Propidium Iodide (PI) 有毒, 操作时要带手套, 使用时避免与皮肤, 眼睛和黏膜接触。
4. Annexin V-FITC 中含有剧毒成分叠氮化钠 ( $\text{NaN}_3$ ), 操作时要带手套, 使用时避免与皮肤, 眼睛和黏膜接触。
5. 本试剂盒用于检测活细胞, 流式细胞仪检测时, 细胞数量不应低于  $1 \times 10^6$ 。
6. 染色后宜尽快检测, 时间过长可能会导致凋亡或坏死细胞的数量增加。
7. Annexin V 检测凋亡细胞的方法适用于悬浮生长的细胞, 如: 淋巴细胞等细胞的检测。对于贴壁生长的细胞, 由于在胰酶等消化处理过程中会造成细胞膜的损伤, 会造成较高的假阳性, 而用细胞刮子会造成细胞粘连成团, 而影响检测, 可将胰酶消化后的细胞保存在含 2% BSA 的 PBS 中, 防止进一步的损伤。尽管目前, 包括国外也有一些单位采用该方法检测贴壁生长的细胞。我不推荐用该方法检测。因为其重复性较差, 且需要操作时非常小心。
8. 消化贴壁细胞残留的胰酶会消化并降解 Annexin V-FITC, 最终导致染色失败。
9. 细胞固定后可能导致荧光的淬灭, 请不要固定样品。

