

Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒

DW027

产品简介

在正常细胞中，磷脂酰丝氨酸（PS）只分布在细胞膜脂质双层的内侧，而在细胞凋亡早期，细胞膜中的磷脂酰丝氨酸（PS）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 FITC 标记，以标记了的 Annexin V 作为荧光探针，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，就可以将处于不同凋亡时期的细胞区分开来。

本试剂盒可应用于培养细胞凋亡检测（不推荐用于检测组织样本）。

储存与运输

-20°C 避光储存，本试剂盒有效期 1 年。

产品组分

组分	DW027-020 20 assays	DW027-50 50 assays	DW027-100 100 assays	储存条件
AnnexinV-FITC	100 μ L	250 μ L	500 μ L	2-8°C, 避光
Propidium Iodide	100 μ L	250 μ L	500 μ L	2-8°C, 避光
Binding Buffer	10.mL	25 mL	50 mL	2-8°C

三、试剂盒以外自备仪器和试剂

流式细胞仪、低速离心机、微量移液器（注：不建议使用荧光显微镜）

1.5m L 微量离心管、PBS、不含 EDTA 的胰酶消化液

四、注意事项

1. 微量试剂取用前请离心集液。
2. Annexin V-FITC，Propidium Iodide (PI) 避光保存及使用。
3. Propidium Iodide (PI) 有毒，操作时请戴手套。

4. 本试剂盒适用于检测活细胞，流式细胞仪检测时，细胞数量不应低于 1×10^5 ，**不推荐用于检测组织样本。**
5. 推荐使用悬浮培养细胞。如果是贴壁细胞，**需用不含 EDTA 的胰酶消化**，如消化不当，可能引起假阳性，而用细胞刮刀会造成细胞粘连成团，而影响检测。可将胰酶消化后细胞的保存在含 2%BSA 的 PBS 中，防止进一步的损伤。
6. 细胞固定后可能导致荧光的淬灭，请不要固定样品。
7. 因检测细胞的类型、凋亡诱导剂种类、使用的检测仪器不同，因而流式检测的荧光补偿也不同，因此建议每次检测均需使用经凋亡诱导处理的细胞作为对照，进行荧光补偿的调节。

五、操作步骤

1. 细胞收集

1) 悬浮细胞：800g 离心力，离心 5min 收集。

2) 贴壁细胞：贴壁细胞用**不含 EDTA 的胰酶**消化收集（注：**胰酶消化时间不易过长，否则容易引起假阳性**）；

2. 用 PBS 洗涤细胞二次（800g 离心力，离心 5min）收集 $1 \sim 5 \times 10^5$ 细胞；

3. 加入 500 μ L 的 Binding Buffer 轻轻吹匀成单细胞悬液；

4. 加入 5 μ L Annexin V-FITC 混匀后，加入 5 μ L Propidium Iodide，混匀；

5. 室温、避光、反应 5~10min；

6. 请在 1h 内，进行流式细胞仪的观察和检测。

7. 流式细胞仪分析

1) 用流式细胞仪检测，Annexin V-FITC(Ex=488 nm, Em=530 nm) 的绿色荧光通过 FITC 通道 (FL1) 检测；PI 红色荧光(Ex=488nm,Em \geq 630nm)通过 PI 通道 (FL2 或 FL3) 检测，建议使用 FL3。

2) 荧光补偿调节：使用经凋亡诱导处理的正常细胞，作为对照进行荧光补偿调节去除光谱重叠和设定十字门的位置。

六、实验范例

用凋亡诱导剂诱导 P388 细胞凋亡，在 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 培养箱培养 4~6h 后，参照说明书的操作方法进行检测，经流式细胞仪检测结果见下图。

