

## FITC Annexin V and PI Apoptosis Kit

产品货号: C035

### 试剂盒组份

组份	试剂名称	包装	储存条件
组份 A	FITC Annexin V	500 $\mu$ l	2~8 $^{\circ}$ C, 避光。
组份 B	PI	200 $\mu$ l	2~8 $^{\circ}$ C, 避光。
组份 C	5 $\times$ Annexin-binding buffer	50 ml	2~8 $^{\circ}$ C。

注: 按照推荐的储存条件保存有效期为 1 年, 请注意不要冷冻保存。

### 产品介绍

细胞凋亡 (apoptosis) 指为维持内环境稳定, 由基因控制的细胞自主的有序的死亡。它是细胞正常生理活动的一部分。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 35~36 kD 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 (eGFP, FITC, Andy Fluor) 或生物素标记, 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。

FITC Annexin V/ PI 细胞凋亡检测试剂盒提供了一种快速、方便分析细胞凋亡的方法。本试剂盒包括含 FITC 标记的 Annexin V 用于检测早期凋亡细胞, 和即用型的核酸染料 PI 用于检测晚期凋亡细胞和死细胞。碘化丙啶 (Propidium Iodide, PI) 是一种红色核酸染料, 它不能透过完整的细胞膜, 但对凋亡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 联合使用时, 就可以将处于不同凋亡时期的细胞和死细胞区分开来。

### 实验所需耗材 (不包含在试剂盒中)

- 1 $\times$ PBS (pH 7.2~7.6)
- 去离子水
- 诱导剂
- 18 $\times$ 18 mm 盖玻片

### 注意事项

- 荧光染料均存在淬灭问题, 请尽量注意避光, 以减缓荧光淬灭。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

### 实验步骤

#### 样品染色

1. a) 悬浮细胞: 300 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C 离心 5 min 收集细胞。  
b) 贴壁细胞: 用不含 EDTA 的胰酶消化后, 300 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C 离心 5 min 收集细胞。(注: 胰酶消化时间不易过长, 否则容易引起假阳性)
2. 准备阳性实验对照组, 使用合适的方法诱导细胞凋亡。同时准备未经凋亡诱导处理的细胞作为阴性实验对照组。
3. 用 4 $^{\circ}$ C 预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次, 每次均需 300 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C 离心 5 min。
4. 配制 1 $\times$ Annexin-binding buffer: 用去离子水按 1:5 稀释 5 $\times$ Annexin-binding buffer (组份 C) (2ml 5 $\times$ Annexin-binding buffer +8ml 去离子水)。
5. 用 1 $\times$ Annexin-binding buffer 重悬细胞, 调节其浓度为 $\sim 1 \times 10^6$  细胞/ml。

- 取 100  $\mu\text{l}$  细胞悬液于 5 ml 流式管中，加入 5  $\mu\text{L}$  FITC Annexin V（组份 A）和 1~2  $\mu\text{l}$  PI（组份 B），轻轻混匀。
- 室温、避光、反应 15 min。
- 加入 400  $\mu\text{l}$  1 $\times$ Annexin-binding buffer，轻柔混匀，冰上放置。
- 请在 1 小时内，进行下述荧光显微镜或流式细胞仪的观察和检测。

#### 荧光显微镜观察

- 用 1 $\times$ Annexin-binding buffer 洗涤细胞，300 $\times$ g，4 $^{\circ}\text{C}$  离心 5 min。然后用 1 $\times$ Annexin-binding buffer 重悬细胞。
- 滴一滴上述染色后的细胞悬液于载玻片上，并用盖玻片盖上细胞。
- 对于贴壁细胞来说，也可直接用盖玻片来培养细胞并诱导细胞凋亡。
  - 将细胞于盖玻片上生长，用适当的凋亡诱导剂诱导细胞凋亡，并设立阴性对照组。
  - 用 PBS 洗涤细胞两次。
  - 在 100  $\mu\text{L}$  1 $\times$ Annexin-binding buffer 中加入 5~25  $\mu\text{L}$  FITC Annexin V，2  $\mu\text{L}$  Propidium Iodide 混匀。
  - 将上述溶液滴加于盖玻片表面，使盖玻片表面均匀覆盖。
  - 避光、室温反应 5~15 min。
  - 用 1 $\times$ Annexin-binding buffer 洗涤细胞两次。
- 将盖玻片倒置于载玻片上，于荧光显微镜下、双色滤光片（FITC 和罗丹明）观察 FITC Annexin V 荧光信号呈绿色，PI 荧光信号呈红色。

#### 流式细胞仪分析

用流式细胞仪检测，激发波长 Ex=488 nm；发射波长 Em=530 nm。

FITC Annexin V 绿色荧光通过 FITC 通道（FL1）检测；PI 红色荧光通过 PI 通道（FL2 或 FL3）检测。荧光补偿调节：使用未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迭和设定十字门的位置。

#### 实验案例

使用 10  $\mu\text{M}$  喜树碱处理 Jurkat 细胞 4 小时作为阳性实验组，同时设置未处理组做阴性对照。使用 FITC Annexin V/PI 细胞凋亡检测试剂盒的实验操作说明对以上两组细胞进行相应的实验处理，流式细胞仪进行观察。结果显示，阳性实验组（右图）相比对照组（左图），获得更高的凋亡细胞数量。A：代表凋亡细胞；V：代表活细胞；N：代表死亡细胞。

