

AnnexinV-FITC/PI 双染法细胞凋亡检测试剂盒(增强型)
Annexin V-FITC/PI Apoptosis Assay Kit(Enhanced)

使用说明书

◆货号及规格:

目录编号	包装规格
C203-01	50T

◆产品组成:

试剂盒组分	储存条件	组分规格
AnnexinV-FITC	4℃(避光)	250 uL
Propidium Iodide	4℃(避光)	250 uL
Binding Buffer	4℃	25 mL

◆储存条件: 4℃保存和运输, 有效期 12 个月。

◆产品概述:

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 C2+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)。

◆使用方法:

1. 悬浮细胞离心(2000rpm 离心 5min)收集: 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(2000rpm 离心 5min)收集 $1\sim5\times 10^5$ 细胞。

3. 加入 500uL 的 Binding Buffer 悬浮细胞。

- 加入 5uL Annexin V-FITC 混匀后, 加入 5uL Propidium Iodide,混匀。
- 室温、避光、反应 5~15min。
- 请在 1h 内, 进行下述荧光显微镜或流式细胞仪的观察和检测。

A. 荧光显微镜观察:

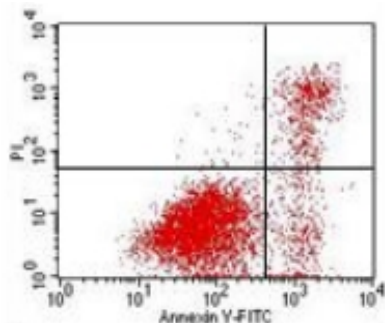
- 滴一滴上述染色后的细胞悬液于载玻片上, 并用盖玻片盖上细胞。
- 对于贴壁细胞来说, 也可直接用盖玻片来培养细胞并诱导细胞凋亡。
- 将细胞于盖玻片上生长, 用适当的凋亡诱导剂诱导细胞凋亡, 并设立阴性对照组。
- 用 PBS 洗涤细胞两次。
- 在 500uL 的 Binding Buffer 中加入 5uL Annexin V-FITC, 5uL Propidium Iodide, 混匀。
- 将上述溶液滴加于盖玻片表面, 使盖玻片表面均匀覆盖。
- 避光、室温反应 5min。
- 将盖玻片倒置于载玻片上, 于荧光显微镜下、双色滤光片(FITC 和罗丹明)观察。
Annexin V-FITC 荧光信号呈绿色, PI 荧光信号呈红色。

B. 流式细胞仪分析:

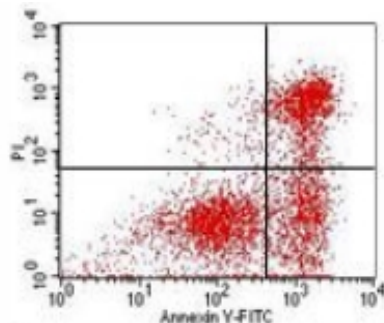
- 用流式细胞仪检测, 激发波长 Ex=488 nm, 发射波长 Em=530 nm。
- Annexin V-FITC 的绿色荧光通过 FITC 通道(FL1)检测; PI 红色荧光 (流式 Ex=488 nm, Em \geq 630 nm)通过 FL2 或 FL3 通道检测, 建议使用 FL3。
- 荧光补偿调节: 使用经凋亡诱导处理的正常细胞, 作为对照进行荧光补偿调节去除光谱重叠和设定十字门的位置。

C. 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。



对照



诱导剂处理

◆注意事项:

1. 微量试剂取用前请离心收集。
2. Annexin V-FITC, Propidium Iodide(PI)避光保存及使用。
3. Propidium Iodide(PI)有毒, 操作时要戴手套。
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, 而用细胞刮子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未经凋亡诱导处理的细胞作为对照, 进行荧光补偿的调节。
8. 为了您的安全和健康, 请穿戴实验服并戴一次性手套操作。
9. 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或药品等用途。

=====

