

# Annexin V-EGFP/PI 细胞凋亡检测试剂盒

## Annexin V-EGFP/PI Cell Apoptosis Detection Kit

### 使用说明书

#### ◆货号及规格:

目录编号	包装规格
C216-01	50T
C216-02	100T

#### ◆产品组成:

组分编号	试剂盒组分	储存条件	C216-01(50T)	C216-02(100T)
C216-1	Annexin V-EGFP	4℃(避光)	250uL	2*250uL
C216-2	Propidium Iodide(PI)	4℃(避光)	250uL	2*250uL
C216-3	1×Binding Buffer	4℃	25mL	2*25mL

◆**储存条件:** 2-8℃运输和避光保存, 12个月有效。

#### ◆产品概述:

细胞凋亡是发生在胚胎发育和维持组织稳态过程中的正常生理过程, 伴随着许多形态学特征改变, 其中细胞膜的丢失是细胞凋亡早期的特征之一。在正常细胞中, 磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine/PS)只分布在细胞膜磷脂双分子层的内侧, 但在细胞凋亡早期, PS 会从脂膜的内侧翻转外侧, 使其暴露于细胞外侧。Annexin V(膜联蛋白 V)是一种  $Ca^{2+}$  依赖的磷脂结合蛋白, 对 PS 具有高度亲和力, 会与暴露 PS 的细胞特异性结合, 因此 Annexin V 被作为检测细胞早期凋亡的指标之一。碘化丙啶(Propidium Iodide/PI)是一种核酸染料, 它不能透过具有完整细胞膜的正常细胞和早期凋亡细胞, 但能透过凋亡晚期和坏死细胞的细胞膜并将细胞核染色。

本产品通过将 EGFP(enhanced Green Fluorescent Protein)与 Annexin V 组成融合蛋白作为检测探针, 检测细胞的早期凋亡。同时以 PI 区分存活的细胞与坏死、晚期凋亡细胞。Annexin V-EGFP 和 PI 结合使用, 活细胞呈现阴性染色(Annexin V-/PI-), 早期凋亡细胞呈现单荧光阳性(Annexin V+/PI-), 而晚期凋亡细胞和坏死细胞呈现双荧光阳性(Annexin V+/PI+)。本试剂盒适用于流式细胞仪或荧光显微镜检测。同时由于 EGFP 与 Annexin V 是 1:1 融合, 因此本产品还可对凋亡细胞进行定量检测。

## ◆使用方法:

## 1. 细胞收集:

- 1) 悬浮细胞: 取细胞悬液, 经 500xg, 4°C离心 5min 收集细胞。
- 2) 贴壁细胞: 先收集细胞培养上清液。然后用不含 EDTA 的胰酶(推荐 C610)消化后, 与细胞培养上清液合并, 经 500xg, 4°C离心 5min 收集细胞。

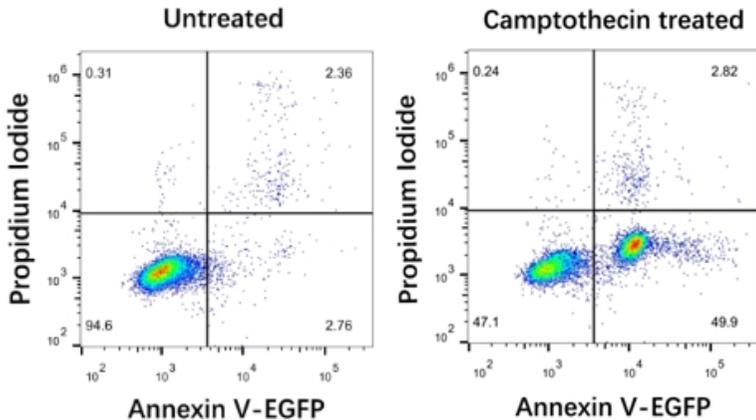
**注:** 胰酶消化时间不宜过长, 以免过度消化引起假阳性。

2. 用预冷的 PBS(推荐 C511)清洗细胞 2 次, 每次 500xg、4°C离心 5min 收集细胞。
3. 用预冷的 1×Binding Buffer 轻柔重悬细胞, 调整细胞浓度至 1~5×10<sup>6</sup>/mL。
4. 取 100μL 细胞悬液, 加入 5μL Annexin V-EGFP 和 5μL PI, 轻柔混匀, 室温避光 8-10min。
5. 加入 400μL 预冷的 1×Binding Buffer, 轻轻摇匀, 1h 内用流式细胞仪或者荧光显微镜进行检测。

## ◆结果分析:

## 1. 流式细胞仪检测:

- 1) 流式细胞仪检测分析时选择合适的电压并调好光补偿, 除实验组外建议设置阴性对照(不加 Annexin V-EGFP 和 PI 标记)用于调节电压, 单标对照(只加 Annexin V-EGFP, 以及只加 PI 的细胞)用于调节补偿。
- 2) 流式细胞仪检测分析参考实例: 用 5μM Camptothecin 诱导 Jurkat T 淋巴瘤细胞 6h, 参照以上实验步骤, 用流式细胞仪进行检测。结果如下图所示:



EGFP 最大激发波长为 488nm, 最大发射波长为 507nm; PI-DNA 复合物的最大激发波长为 535nm, 最大发射波长为 615nm。经流式细胞仪相关分析软件

绘制双色散点图，EGFP 位于横坐标，PI 位于纵坐标。在典型实验中，活细胞无荧光，散点位于左下第一象限。处于早期凋亡细胞有较强的绿色荧光，散点位于右下第二象限。晚期凋亡细胞、坏死细胞呈现红色、绿色双重荧光，散点位于右上第三象限。

2. **荧光显微镜检测** 在载玻片上加 5-10 $\mu$ L 经 Annexin V-EGFP 和 PI 双染的细胞悬液，盖上盖玻片，在荧光显微镜下用双色滤光片进行观察，Annexin V-EGFP 呈绿色荧光信号，PI 呈红色荧光信号。

◆**注意事项：**

1. 整个实验过程操作应尽量轻柔避免细胞破碎，影响实验结果。
2. 用 PBS 清洗细胞不可省略，同时也要尽可能的去掉残留的 PBS。
3. 使用胰酶消化细胞时，应小心操作，避免人为损伤细胞，并控制消化时间。消化时间过短，细胞需用力吹打才能脱落，容易造成细胞膜的机械损伤；若消化时间过长，细胞膜同样容易受到损伤，影响检测结果。另外不能使用含 EDTA 的胰酶，EDTA 会影响 Annexin V 与 PS 的结合。
4. 贴壁细胞经凋亡刺激后，如有部分细胞漂浮，需同时收集细胞培养上清液及贴壁细胞合并染色，会使得结果更加准确。
5. Annexin V-EGFP 和 PI 对光敏感，操作时注意避光，反应结束后应尽快进行检测。
6. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
7. 本产品仅限于专业人员科学研究使用，不得用于临床诊断和药品等用途。

=====

