Annexin V-Alexa Fluor 647/PI 细胞凋亡检测试剂盒　C0020

描述：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 进行红色荧光 Alexa Fluor 647 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。在双变量流式细胞仪的散点图上，左下象限显示活细胞，右下象限为早期凋亡细胞，右上象限是凋亡晚期细胞和坏死细胞。

组成：20次

Annexin V-Alexa Fluor 647	100uL
Propidium Iodide	200uL
Binding Buffer（4X）	4mL

储存条件：2-8℃　避光

所需实验器材：微量移液器；PBS；　不含EDTA的胰酶消化液；　低速离心机；　流式细胞仪

操作说明：

1. **细胞样品的准备：**

a）　**悬浮细胞：**

1）　收集细胞至离心管中 1000-2000rpm 离心 5min，小心去除上清。

2）　用 1ml 4℃预冷 PBS 轻轻重悬细胞并计数，1000-2000rpm 离心 5min，小心吸除上清。

3）　再加入 1ml 4℃预冷的 PBS 重悬细胞，1000-2000rpm 离心 5min，小心吸除上清。

b）　**贴壁细胞：**

1）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。

2）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。

3）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-Alexa Fluor 647 导致染色失败。

4）用 1ml 4℃预冷 PBS 轻轻重悬细胞并计数，1000-2000rpm 离心 5min，小心吸除上清。

5）再加入 1ml 4℃预冷的 PBS 重悬细胞，1000-2000rpm 离心 5min，小心吸除上清。

2. 用去离子水按 1：4 稀释 Binding Buffer（4ml Binding Buffer+12ml 去离子水）；
3. 用 250μl 结合缓冲液重新悬浮细胞，调节其浓度为 1×10^6/ml；
4. 取 100μl 的细胞悬液于 5 ml 流式管中，加入 Annexin V- Alexa Fluor 647，轻轻混匀；
5. 室温(20-25℃)避光孵育 10min；
6. 上机前 5min 加入 10μl 碘化丙啶溶液，轻轻混匀；
7. 上机前在反应管中补加 400μl PBS 重悬细胞， 避光保存， 随即进行流式细胞仪(FACS)检测， Annexin V- Alexa Fluor 647 和 PI 均为红色荧光。

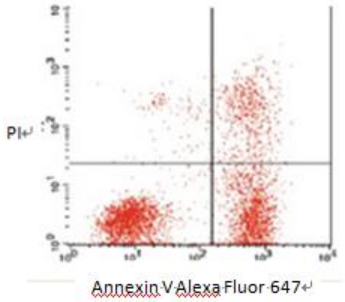

图 2. 流式细胞仪检测早期凋亡细胞。在双变量流式细胞仪的散点图上，左下象限显示活细胞，右下象限为早期凋亡细胞，右上象限是凋亡晚期细胞和坏死细胞。

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-Alexa Fluor 647 中含有剧毒成分叠氮化钠（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 $1x10^6$。
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) Annixin 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-Alexa Fluor 647，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。