

## C0007 AnnexinV-PI 细胞凋亡检测试剂盒

**描述:** 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Ca<sup>2+</sup>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。

**适用:** 本试剂盒可应用于培养细胞凋亡检测

**组成:** 20次

AnnexinV-FITC	100uL
Propidium Iodide	200uL
Binding Buffer (4X)	4mL

**储存条件:** 2-8℃ 避光

### 操作方法:

1. 细胞样品的准备:

A: 悬浮细胞:

- 1) 收集细胞, 1000-2000rpm 5min, 小心去除上清。
- 2) PBS 洗涤细胞两次, 具体方法: 用 1ml 4℃预冷 PBS 轻轻重悬细胞, 1000-2000rpm 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, 用 PBS 洗涤, 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) 加入以上步骤中收集的细胞培养液, 稍混匀, 转移到离心管内, 1000-2000rpm 5min, 小心吸除上清。

注意: 加入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-FITC 导致染色失败。

- 4) PBS 洗涤细胞两次, 具体方法: 用 1ml 4℃ 预冷 PBS 轻轻重悬细胞并计数, 1000-2000rpm 5min, 小心吸除上清。
2. 用去离子水稀释 Binding Buffer (4ml Binding Buffer+12ml 去离子水);
3. 用 250uL 结合缓冲液重新悬浮细胞, 调节其浓度为  $1 \times 10^6$ /ml;
4. 取 100uL 的细胞悬液于 5ml 流式管中, 加入 5uL Annexin V-FITC, 轻轻混匀;
5. 室温 (20-25℃) 避光孵育 10-15min;
6. 上机前 5min 加入 10uL 碘化丙啶 PI 溶液, 轻轻混匀;
7. 在反应管中加入 400uL PBS 重悬细胞, 避光保存, 随即进入流式细胞仪 (FACS) 检测, Annexin V-FITC 为绿色荧光, PI 为红色荧光。

### 流式细胞仪分析建议

- 1) 用流式细胞仪检测, 激发波长  $Ex=488$  nm; 发射波长  $Em=530$  nm。
- 2) 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。
- 3) 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。

### 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  $1 \times 10^5$ , 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. 消化贴壁细胞残留的胰酶会消化并降解 Annexin V-FITC, 最终导致染色失败。
8. 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。