

Annexin V-Alexa Fluor 488/PI Apoptosis Detection Kit

Annexin V-Alexa Fluor 488/PI 凋亡检测试剂盒

产品简介

Annexin V-Alexa Fluor 488/PI 凋亡检测试剂盒利用带有 Alexa Fluor 488 标记的 Annexin V 作为探针，来检测细胞早期凋亡的发生，可通过流式细胞仪或其他荧光检测设备进行检测。

试剂盒检测原理如下：在正常活细胞中，磷脂酰丝氨酸（phosphatidylserine, PS）位于细胞膜的内侧；在早期凋亡的细胞中，PS 从细胞膜的内侧翻转到细胞膜的表面，暴露在细胞外环境中。Annexin-V（膜联蛋白-V）是一种分子量为 35-36KD 的 Ca^{2+} 依赖性磷脂结合蛋白，能与 PS 高亲和力结合。因此，它能够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。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，但可以透过凋亡晚期和坏死细胞的细胞膜而使细胞核染红。因此，将 Annexin V 与 PI 联合使用时，PI 则被排除在活细胞（Annexin V-/PI-）和早期凋亡细胞（Annexin V+/PI-）之外，而晚期凋亡细胞和坏死细胞同时被 Alexa Fluor 488 和 PI 结合染色呈现双阳性（Annexin V+/PI+）。

产品规格

货号	C331404E/C331404S/C331404M
规格	20 T/50 T/100 T

组分信息

组分编号	组分名称	C331404E	C331404S	C331404M
C331404-A	Annexin V-Alexa Fluor 488	100 μL	250 μL	500 μL
C331404-B	PI Staining Solution (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	200 μL	500 μL	1 mL
C331404-C	1 $\times$ Binding Buffer	10 mL	25 mL	50 mL

储存条件

冰袋（wet ice）运输。-20°C 避光长期保存，避免反复冻融，一年有效。如果需要在短时间内多次重复使用，可以在 4°C 避光保存，半年有效。

注意事项

1. 由于细胞凋亡是一个快速的过程，建议样品在染色后 1 小时之内进行分析。
2. 对于贴壁细胞，消化是一个关键步骤。贴壁细胞诱导细胞凋亡时如有漂浮细胞，需收集漂浮细胞和贴壁细胞后合并染色。处理贴壁细胞时要小心操作，尽量避免人为损伤细胞。胰酶消化时间过短，细胞需要用力吹打才能脱落，容易造成细胞膜的损伤，PI 摄入过多；消化时间过长，细胞膜同样易造成损伤，甚至会影响细胞膜上磷脂酰丝氨酸与 Annexin V-Alexa Fluor 488 的结合。消化时将胰酶铺满孔

板底后，轻摇时胰酶与细胞充分接触，然后倒掉大部分胰酶，利用剩余的少量胰酶再消化一段时间，待细胞间空隙增大，瓶底呈花斑状即可终止。在消化液中尽量不用 EDTA，EDTA 会影响 Annexin V 与 PS 的结合。

3. 如果样品来源于血液，请务必除去血液中的血小板。因为血小板含有 PS，能与 Annexin V 结合，从而干扰实验结果。可以使用含有 EDTA 的缓冲剂并在 200 g 离心洗去血小板。
4. 试剂在开盖前请短暂离心，将盖内壁上的液体甩至管底，避免开盖时液体洒落。
5. Annexin V-Alexa Fluor 488 和 PI 是光敏物质，在操作时请注意避光。
6. 本产品仅用于科研。

使用说明

1. 样品染色

- 1) 悬浮细胞：300 g，4℃离心 5 min 收集细胞。贴壁细胞：用不含 EDTA 的胰酶消化后，300 g，4℃离心 5 min 收集细胞。胰酶消化时间不宜过长，以防引起假阳性。
- 2) 用 4℃预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次，每次均需 300g，4℃离心 5 min。
- 3) 吸弃 PBS，加入 100 μL 1×Binding Buffer 重悬细胞。
- 4) 加入 5 μL Annexin V-Alexa Fluor 488 和 10 μL PI，轻轻混匀。
- 5) 避光、室温反应 15 min。
- 6) 加入 400 μL 1×Binding Buffer，混匀，样品在 1 小时内用流式细胞仪检测。

【注意】为了避免洗涤细胞时损失细胞，在吸液时可以用大的 Tip 头套上小的 Tip 头吸液。

2. 流式细胞仪分析

Alexa Fluor 488 最大激发波长为 488 nm，最大发射波长为 519 nm；PI-DNA 复合物的最大激发波长为 535 nm，最大发射波长为 615 nm。用 CellQuest 等软件进行分析，绘制双色散点图（two-color dot plot），Alexa Fluor 488 为横坐标，PI 为纵坐标。每个样采集 10,000 events。

3. 荧光显微镜分析

- 1) 滴一滴滴用 Annexin V-Alexa Fluor 488/PI 双染的细胞悬液于载玻片上，并用盖玻片盖上细胞。
- 2) 在荧光显微镜下用双色滤光片观察。Annexin V-Alexa Fluor 488 荧光信号呈绿色，PI 荧光信号呈红色。