Annexin V-FITC/PI Apoptosis Detection Kit

产品信息

产品名称	货号	规格
Annexin V-FITC/PI Apoptosis Detection Kit Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒	40302ES20	20T
	40302ES50	50T
	40302ES60	100T

产品描述

Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒是用 FITC 标记的 Annexin V 作为探针，来检测细胞早期凋亡的发生。

其检测原理为：在正常的活细胞中，磷脂酰丝氨酸（phosphotidylserine，PS）位于细胞膜的内侧，但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 35-36 kDa 的 Ca^{2+} 依赖性磷脂结合蛋白，能与 PS 高亲和力结合，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。

另外，本试剂盒中还提供了碘化丙啶（Propidium Iodide，PI）用来区分存活的早期细胞和坏死或晚期凋亡细胞。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 FITC 和 PI 结合染色呈现双阳性（Annexin V+/PI+）。

本试剂盒可用于流式细胞仪、荧光显微镜进行检测。

产品组分

编号	组分	产品编号/规格		
		40302ES20（20T）	**40302ES50（50T）**	**40302ES60（100T）**
40302-A	Annexin V-FITC	100 μL	250 μL	500 μL
40302-B	PI Staining Solution	200 μL	500 μL	1.0 mL
40302-C	1×Binding Buffer	10 mL	25 mL	50 mL

运输与保存方法

冰袋（wet ice）运输。-20℃避光保存，避免反复冻融，一年有效。

【注】：如果需要在短时间内多次重复使用，可以在4℃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，尽量避免人为的损伤。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-FITC 的结合。消化时将胰酶铺满孔板底后，轻摇使胰酶与细胞充分接触，然后倒掉大部分胰酶，利用剩余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-FITC 和 PI 是光敏物质，在操作时请注意避光。

6）本产品仅作科研用途！

操作方法

1.1 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）用预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次，每次均需 300 g，4℃离心 5 min。收集 1～5×10^5 细胞。

3）吸弃 PBS，加入 100 μL 1×Binding Buffer 重悬细胞。

4）加入 5 μL Annexin V-FITC 和 10 μLPI Staining Solution，轻轻混匀。

5）避光、室温反应 10-15 min。

6）加入 400 μL 1×Binding Buffer，混匀后放置于冰上，样品在 1 小时内用流式细胞仪或荧光显微镜检测。

【注】：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。

1.2 样品分析

A．流式细胞仪分析：

FITC 最大激发波长为 488 nm，最大发射波长 525 nm，FITC 的绿色荧光在 FL1 通道检测；PI-DNA 复合物的最大激发波长为 535 nm，最大发射波长为 615 nm，PI 的红色荧光在 FL2 或 FL3 通道检测。用 CellQuest 等软件进行分析，绘制双色散点图（two-color dot plot），FITC 为横坐标，PI 为纵坐标。典型的实验中，细胞可以分成三个亚群，活细胞仅有很低强度的背景荧光，早期凋亡细胞仅有较强的绿色荧光，晚期凋亡细胞有绿色和红色荧光双重染色。

B．荧光显微镜分析：

1）滴一滴用 Annexin V-FITC/PI 双染的细胞悬液于载玻片上，并用盖玻片盖上细胞。

【注】：对于贴壁细胞，可直接用盖玻片培养细胞并诱导细胞凋亡。

2）在荧光显微镜下用双色滤光片观察。Annexin V-FITC 荧光信号呈绿色，PI 荧光信号呈红色。