

## Annexin V-FITC/PI双染法细胞凋亡检测试剂盒 (JXA005-3)

### 包装规格:

货号	规格	包装规格		
		Annexin V-FITC	1X Binding Buffer	PI
JXA005-3	50T	250ul	20ml	500ul

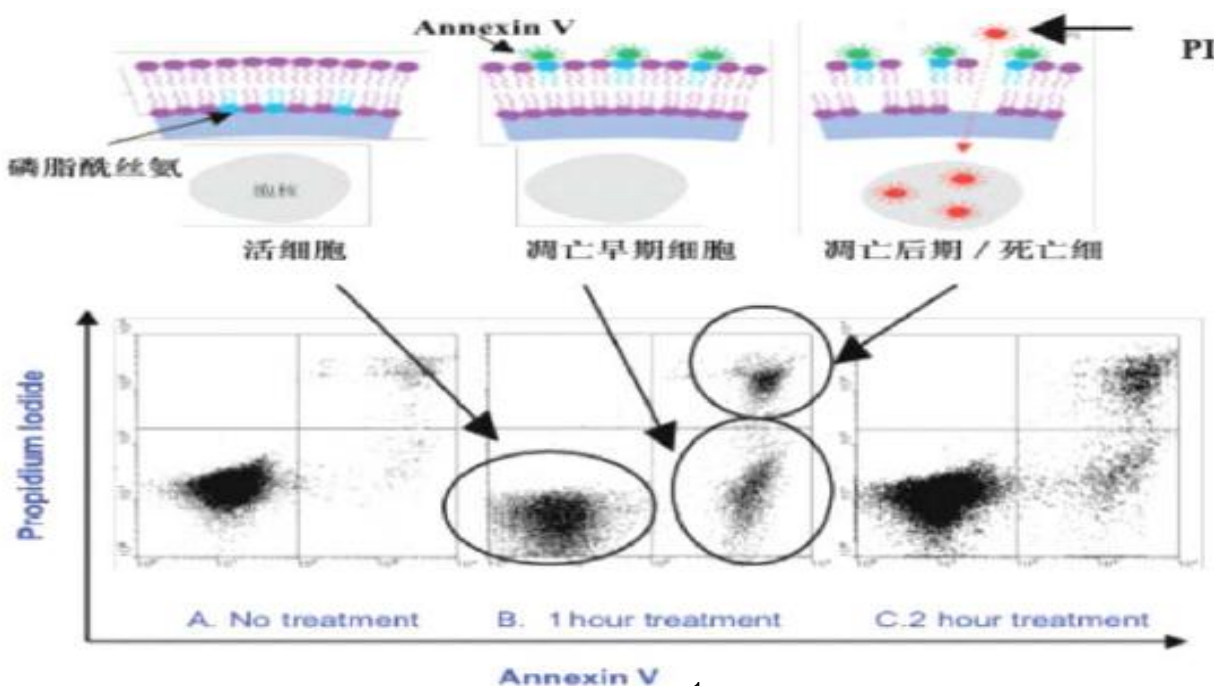
### 产品简介:

细胞凋亡普遍存在于生物界，是细胞的基本特征之一，对胚胎发育及形态发生、组织修复、内环境的稳定、机体的防御和免疫反应等方面都起到十分重要的作用。

Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒 (Annexin V-FITC/PI Apoptosis Detection Kit) 是用于 FITC 融合的重组人 Annexin V 来检测细胞凋亡时出现在细胞膜表面的磷脂酰丝氨酸 (PS) 的一种细胞凋亡检测试剂盒。可以使用流式细胞仪、荧光显微镜或者其他荧光检测设备进行检测。Annexin V 是一种分子量为 35.8KD 的  $Ca^{2+}$  依赖性磷脂结合蛋白，广泛分布于真核细胞浆内，参与细胞信号转导。Annexin V 能与磷脂酰丝氨酸 (phosphatidylserine, 简称 PS) 高亲和力、特异地结合。在正常细胞中，PS 主要分布在细胞膜内侧，在细胞发生凋亡的早期，细胞膜上的 PS 会外翻到细胞表面。用带有绿色荧光的 Annexin V-FITC 标识出凋亡细胞。

本试剂盒还提供了碘化丙啶 (Propidium Iodide, PI)，PI 可以染色坏死细胞或凋亡晚期丧失细胞膜完整性的细胞，呈现红色荧光。

综上所述，参考下图，用 Annexin V-FITC 和碘化丙啶染色后，正常的活细胞不被 Annexin V-FITC 和 PI 染色（如箭头指示）；凋亡早期的细胞仅被 Annexin V-FITC 染色，PI 染色成阴性（如箭头指示）；坏死细胞和凋亡晚期的细胞可以同时被 Annexin V-FITC 和 PI 双重染色（如箭头指示），以区别凋亡早期细胞。



## 保存条件:

4℃保存, Annexin V-FITC、PI 染色液需避光保存, 半年有效。若长期保存, 可以把 PI 染色液适当分装后 -20℃保存, Annexin V-FITC 结合也可以直接-20℃保存。

## 所需试剂及仪器:

1, PBS 2, 蒸馏水或去离子水 3, 水平离心机 4, 流式细胞仪或荧光显微镜 5, 移液器

## 使用说明:

### ※细胞样品制备:

(1) A 对于悬浮细胞, 在进行完细胞凋亡刺激后, 1000g 离心 5 分钟;

(1) B 对于贴壁细胞, 把细胞培养液吸出至一合适离心管内 (内含已经悬浮的发生凋亡或坏死的细胞), PBS 洗涤贴壁细胞一次, 加入适量胰酶消化细胞。室温孵育至轻轻吹打可以使细胞吹打下来时, 吸除胰酶, 避免胰酶消化不够或消化过度。加入收集的细胞培养液, 轻轻吹打均匀, 转移到离心管内, 500g 离心 5 分钟。

☆注意 I: 中晚期凋亡细胞因失去贴壁能力而悬浮于上清中, 此部分细胞对于结果是否显著具有重大影响, 不可任意丢弃, 需离心收集后一起检测才能全面反映出细胞凋亡的整体情况。

☆注意 II: 胰酶消化时细胞处理需要小心操作, 尽量避免人为的损伤细胞。

(2) 弃上清, 用 1ml PBS 洗涤细胞, 洗掉残留的胰酶, 否则残留的胰酶会消化并降解 Annexin V-FITC, 最终导致染色失败。

(3) 加入 400ul 1XBinding Buffer 轻轻重悬细胞。如果消化液中含有 EDTA 则需加入 400ul 1\*binding buffer 洗涤一次。

(4) 加入 5ul Annexin V-FITC, 轻轻混匀, 室温避光孵育 15 分钟。

(5) 加入 10ul PI 染色液, 轻轻混匀, 冰浴避光放置 5 分钟。

(6) 在 30 分钟内进行流式细胞仪检测, Annexin V-FITC 为绿色荧光, PI 为红色荧光。

### ※荧光显微镜分析

如果用荧光显微镜下检测, 则 1000g 离心 5 分钟, 收集细胞, 用 50-100ul 1XBinding Buffer 轻轻重悬细胞, 涂片后, 荧光显微镜下观察。

### ※流式细胞仪分析

流式细胞仪激发光采用激发波长 488nm, 发射波长 530nm 检测 FITC 和 >575nm 检测 PI。Annexin V-FITC 的绿色荧光通过 FITC 通道 (FL1) 检测; PI 红色荧光通过 PI 通道 (FL3/FL2 建议使用 FL3) 检测。细胞应可分成三个亚群: 正常活细胞仅有有很低的荧光强度, 凋亡细胞有较强的绿色荧光, 坏死细胞有绿色和红色荧光双重染色。

### 注意事项:

1. 该试剂盒只能检测活细胞, 而不能用于切片、擦刮、固定或浸润细胞样品的检测。

2. 细胞凋亡是一种持续变化的动态过程, 选择合适的诱导时间对观察凋亡比较重要。染色后宜尽快检测, 时间过长可能导致凋亡或坏死细胞的数量增加。

3. 如果有细菌或真菌污染, 会严重影响检测效果。

4. PBS 洗涤细胞, 洗掉残留的胰酶, 否则残留的胰酶会消化并降解 Annexin V-FITC, 最终导致染色失败。

5. 荧光物质均易发生淬灭, 在进行荧光观察时, 尽量缩短观察时间, 同时在操作和存放过程中也尽量注意避光保存。

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. 检测血液样品时, 如果含有血小板, 请使用含有 EDTA 的缓冲液并 200xg 离心洗去血小板。因为血小板含有 PS, 能与 Annexin V-FITC 结合, 从而干扰实验结果。

8. 旋盖离心管装的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。

9. Annexin V-FITC 和 PI 是光敏物质, 在操作时请注意避光。

