

本产品仅用于科研, 不可用于诊断

## Annexin V-FITC/PI Apoptosis Kit

### 细胞凋亡检测试剂盒

RG100-101-100

#### 一、产品简介

本试剂盒用于细胞凋亡的快速检测。在细胞凋亡早期, 细胞膜内侧的磷脂酰丝氨酸 (Phosphatidylserine, PS) 会外翻至细胞膜表面。Annexin V为胞内蛋白膜联蛋白家族成员, 以钙依赖的方式与PS结合。荧光标记的Annexin V可与PS特异性结合, 表明该细胞为凋亡细胞。

#### 二、试剂盒组份

试剂盒组份	RG100-101-100 (100T)
Annexin V-FITC	500 $\mu$ L
PI solution	500 $\mu$ L
10 $\times$ Binding buffer	10 mL

#### 三、步骤

##### (一)、样本检测

- 按实验方案诱导凋亡。
- 收集细胞:
  - 对于悬浮细胞: 在进行完细胞凋亡刺激后, 1500 rpm离心5 min, 弃上清, 收集细胞。用预冷的PBS轻轻重悬细胞, 离心沉淀细胞, 共洗涤两次。注意: PBS重悬不能省略, PBS重悬的过程同时也起到了洗涤细胞的作用, 可以保证后续Annexin V的结合。
  - 对于贴壁细胞: 小心收集细胞培养液到一离心管内备用, 用不含EDTA的胰酶消化细胞, 至细胞可以被轻轻用移液管或枪头吹打下来时, 加入前面收集的细胞培养液, 吹打下所有的贴壁细胞, 并轻轻吹散细胞。再次收集到离心管内。1500 rpm左右离心5 min, 沉淀细胞。小心吸除上清, 可以残留约50  $\mu$ l左右的培养液, 以避免吸走细胞。加入4 $^{\circ}$ C预冷的PBS重悬细胞, 再次离心沉淀细胞, 小心吸除上清。重复洗涤步骤, 共洗涤两次。

注: a. 某些将贴壁细胞处理为单个细胞的过程中会造成细胞膜损伤, 从而造成Annexin V假阳性。  
b. 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合并染色。
- 用去离子水稀释10  $\times$  Binding buffer为1  $\times$  工作液, 再用1  $\times$  Binding buffer重悬细胞, 调整细胞浓度为1-5  $\times 10^6$  cells/mL。
- 吸取100  $\mu$ L细胞悬液 (细胞总数为1-5  $\times 10^5$  cells) 至一新离心管中, 加入5  $\mu$ L Annexin V-FITC, 轻柔混匀; 再加入5  $\mu$ L PI solution, 轻柔混匀, 室温避光孵育10~15 min。
- 加入400  $\mu$ L 1  $\times$  Binding buffer, 轻柔混匀。染色后样品尽量在1小时内检测。
- 根据实验方法, 进行流式分析 (A) 或荧光显微镜检测 (B)。

#### A.流式分析

Annexin V-FITC建议使用FL1通道（最大激发波长为490 nm，发射波长为525 nm，绿色荧光）；PI建议使用FL3通道（最大激发波长为535 nm，发射波长为615 nm，红色荧光）。根据FITC和PI荧光值确定两荧光参数阴阳界限，划定十字门。

#### B.荧光显微镜检测

a. 将染色后的细胞滴一滴于载玻片上，盖上盖玻片。

对于贴壁细胞，可将细胞直接种在盖玻片上。在步骤4的染色后，将盖玻片反转盖到载玻片上。观察前可将细胞洗涤并用2%福尔马林固定。（细胞必须在固定前孵育Annexin V-FITC，因为细胞固定后其细胞膜被破坏，会使Annexin V与细胞膜内层的PS结合，产生人为的假阳性。）

b. 使用荧光显微镜上的FITC和罗丹明通道进行观察。

#### （二）、仪器参数调节

空白管：阴性对照组细胞，不加Annexin V-FITC和PI solution。用空白管调节FSC、SSC和荧光通道的电压，并在此电压条件下，用单染管调节荧光通道的补偿。

单染管：阳性对照组细胞，单染管分别加入Annexin V-FITC或PI solution染色，用于调节补偿。

检测管：处理的细胞，加Annexin V-FITC和PI solution，用空白管和单染管调节好电压补偿后，获得所需要的流式数据。

### 四、保存

4℃保存，Annexin V-FITC和PI solution需避光保存；试剂长期不用放-20℃保存；避免反复冻融。

### 五、注意事项

1. Annexin V-FITC和PI染色前，不能用破坏细胞膜完整性的固定剂和穿透剂固定或透膜。
2. PI有毒性，能通过皮肤吸收，对眼睛有刺激作用，使用时需戴手套。
3. Annexin V-FITC和PI是光敏物质，在操作时请注意避光。在处理 and 标记时，尽可能在暗处进行。在孵育阶段，用铝箔包裹容器或置于抽屉中。原位染色时，在细胞标记后应在暗室内用荧光显微镜观察。
4. 尽量使用不含EDTA的胰酶，EDTA会影响Annexin V与PS的结合。
5. 如果样品来源于血液，务必除去血小板。因血小板含有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，在1500 rpm下离心洗去血小板。
6. 整个操作过程动作要尽量轻柔，勿用力吹打细胞，以免影响细胞状态。