

Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒

(本试剂盒仅供科研使用)

产品包装

4°C, 避光储存, 1年有效

产品编号	产品名称	试剂盒组成	50T	100T
YFXCA03	Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒	Annexin V-FITC	250μL	500μL
		Propidium Iodide	500μL	1mL
		1× Binding Buffer	50mL	2× 50mL

注: 各组分开盖前, 务必先低速离心。

一、产品说明

磷脂酰丝氨酸 (PS) 只分布在正常细胞的细胞膜质双层的内侧, 如细胞发生凋亡, 则细胞膜中的 PS 在细胞凋亡早期, 会由脂膜内侧翻向外侧。

Annexin V 是一种分子量为 35-36kD 的 Ca^{2+} 依赖性磷脂结合蛋白, 与 PS 有高度亲和力, 故可通过细胞外侧暴露的 PS 与调亡早期细胞的细胞膜结合。因此 Annexin V 被作为检测细胞早期调亡的灵敏指标之一。将 Annexin V 进行荧光素 (EGFP、FITC) 标记, 以标记了的 Annexin V 作为荧光探针, 利用荧光显微镜活流式细胞仪可检测细胞调亡的发生。

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, 但对调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, 就可以灵敏方便的将处于不同调亡时期的细胞区分开来。在双变量流式细胞仪的散点图上, 左下象限显示活细胞, 为 (FITC-/PI-); 右上象限是坏死细胞, 为 (FITC+/PI+); 右下象限为调亡细胞, 为 (FITC+/PI-)。

光谱推荐: Annexin V-FITC: Ex/Em = 494/518 nm;

PI: Ex/Em = 535/617 nm (with DNA)

二、检测方法

1、实验设计

空白管: 阴性对照组细胞, 不加 Annexin V-FITC/PI, 用于调节电压。

单染管: 阳性对照组细胞, 只加 Annexin V-FITC/只加 PI。用于调节补偿。

检测管: 处理的细胞, 加 Annexin V-FITC/PI。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。

2、细胞收集

2.1 悬浮细胞

A. 细胞调亡刺激后, 1000rpm离心5min, 弃上清, 收集细胞, 用PBS轻轻重悬细胞并计数。

B. 取 5×10^4 - 1×10^5 个重悬的细胞, 1000rpm离心5min, 弃上清, 加入 100μL 1× Binding Buffer 轻轻重悬细胞。

C. 加入 5μL Annexin V-FITC, 轻轻混匀。

D. 加入 5μL PI 染色液, 轻轻混匀。

E. 室温避光孵育 10 - 15min (可用铝箔进行避光)。期间可重悬细胞 2-3 次以改善染色效果。

2.2 贴壁细胞

A. 把细胞培养液转移至一合适离心管内, PBS 洗涤贴壁细胞一次, 加入适量胰酶细胞消化液 (不含 EDTA) 消化细胞。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。

B. 加入上步中收集的细胞培养液, 把细胞轻轻吹打下来, 转移到离心管内, 1000rpm离心5min, 弃上清, 收集细胞, 用PBS轻轻重悬细胞并计数。

C. 取 5×10^4 - 1×10^5 个重悬的细胞, 1000rpm离心5min, 弃上清, 加入100 μ L 1 \times Binding Buffer轻轻重悬细胞。

D. 加入5 μ L Annexin V-FITC, 轻轻混匀。

E. 加入5 μ L PI染色液, 轻轻混匀。

F. 室温 (20-25 $^{\circ}$ C) 避光孵育10 - 15min (可使用铝箔进行避光)。期间可以重悬细胞2-3次以改善染色效果。

3、结果分析

3.1 使用流式细胞仪检测

A. 孵育完成后, 可直接加入400 μ L 1 \times Binding Buffer重悬细胞, 立即上机检测, Annexin V-FITC由488nm激光激发, 检测荧光发射光谱在530nm处 (FITC 通道), PI通道发射光谱约在617nm处。

B. 在双变量流式细胞仪的散点图上, 左下象限显示活细胞, 为 (Annexin V-FITC-/PI-); 右下象限为早期凋亡细胞, 为 (Annexin V-FITC+/PI-); 右上象限是坏死与晚期凋亡细胞, 为 (Annexin V-FITC+/PI+); 左上象限显示裸核细胞, 为 (Annexin V-FITC-/PI+)。

3.2 使用荧光显微镜检测

A. 1000rpm 离心 5min, 收集细胞, 用 400 μ L 1 \times Binding Buffer 轻轻重悬细胞。将细胞移至 96 孔板中沉降片刻或进行细胞涂片后, 置于荧光显微镜下观察。

B. Annexin V-FITC 可用 FITC 适用的滤光片, PI 可用 Cy3 或者 Texas 适用的滤光片。

三、注意事项

- 1、使用前请将产品瞬时离心至管底, 再进行后续实验。
- 2、为降低细胞凋亡进程, 孵育过程可在冰上操作, 但孵育时间至少延长至 30min。
- 3、由于细胞凋亡是一个快速的过程, 建议样品在染色后 1h 之内进行分析。
- 4、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 FITC-Annexin V 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。
- 5、贴壁细胞用胰蛋白酶消化后, 建议在最佳培养条件和培养基中恢复约 30min 后染色, 避免假阳性。
- 6、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。
- 7、染料的最佳使用浓度由具体实验要求确定。
- 8、荧光染料均存在淬灭问题, 保存和使用过程中请尽量注意避光, 以减缓荧光淬灭。