

## Annexin V-AlexaFluor 488/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, 1年有效

产品编号	产品名称	试剂盒组成	50T	100T
YFXCA05	Annexin V-Alexa Fluor 488 /PI 细胞凋亡检测试剂盒	1× Binding Buffer	50mL	50mL×2
		Annexin V-AlexaFluor 488	250μL	500μL
		Propidium Iodide (PI)	500μL	1mL

**注: 各组分开盖前, 务必先低速离心。**

### 一、产品说明

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, 可于磷脂酰丝氨酸 (PS) 选择性结合。磷脂酰丝氨酸 (PS) 主要分布在细胞膜内侧, 即与细胞浆相邻的一侧。在细胞发生凋亡的早期, 不同类型的细胞都会把磷脂酰丝氨酸外翻到细胞表面, 暴露在细胞外环境中。此时, 使用绿色荧光探针 Alexa Fluor 488 标记的 Annexin V, 即 Annexin V-Alexa Fluor 488, 与外翻的磷脂酰丝氨酸 (PS) 结合, 就可用流式细胞仪或荧光显微镜直接检测到磷脂酰丝氨酸的外翻这一细胞凋亡的重要特征。对于坏死或晚期凋亡的细胞, 由于细胞完整性已经被破坏, Annexin V-Alexa Fluor 488 则可以进入胞浆与处于磷脂层内侧的 PS 结合, 从而也使坏死细胞呈现绿色荧光。

碘化丙啶 (Propidium Iodide, PI) 是一种 DNA 结合染料, 它可以染色坏死细胞或凋亡晚期丧失细胞膜完整性的细胞的细胞核。PI 可以由 488, 532 或 546 nm 的激光激发, 呈现红色荧光。

光谱推荐: Annexin V-Alexa Fluor 488: Ex/Em = 490/515 nm;

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

### 二、检测方法

#### 1、实验设计

- 1.1 空白管: 阴性对照组细胞, 不加 Annexin V-Alexa Fluor 488 /PI。用于调节电压
- 1.2 单染管: 阳性对照组细胞, 只加 Annexin V-Alexa Fluor 488 /只加 PI。用于调节补偿。
- 1.3 检测管: 处理的细胞, 加 Annexin V-Alexa Fluor 488/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. 细胞凋亡刺激后, 1000rpm离心5min, 弃上清, 收集细胞, 用PBS轻轻重悬细胞并计数。
- B. 取 $5 \times 10^4$  -  $1 \times 10^5$ 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-Alexa Fluor 488, 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 $5 \times 10^4$  -  $1 \times 10^5$ 个重悬的细胞, 1000rpm离心5min, 弃上清, 加入100 $\mu$ L 1 $\times$  Binding Buffer轻轻重悬细胞。

D. 加入5 $\mu$ L Annexin V-Alexa Fluor 488, 轻轻混匀。

E. 加入5 $\mu$ 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

#### A. 使用流式细胞仪检测

A. 孵育完成后, 可直接加入400 $\mu$ L 1 $\times$ Binding Buffer重悬细胞, 立即上机检测, Annexin V-Alexa Fluor 488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-Alexa Fluor 488-/PI-); 右下象限为早期凋亡细胞, 为 (Annexin V-Alexa Fluor 488+/PI-); 右上象限是坏死与晚期凋亡细胞, 为 (Annexin V-Alexa Fluor 488+/PI+); 左上象限显示裸核细胞, 为 (Annexin V-Alexa Fluor 488-/PI+)。

#### B. 用荧光显微镜检测方法如下

A. 1000rpm 离心 5min, 收集细胞, 用 400 $\mu$ 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-Alexa Fluor 488 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 30 min。
- 3、由于细胞凋亡是一个快速的过程, 建议样品在染色后 1 h 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 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。
- 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 30 min 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。