

Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit

Cat #:GK3603-20T/GK3603-50T

一、试剂盒组成、规格、储存:

成分	20T	50T	储存
Annexin V-FITC	100 μl	250 μl	-20℃避光保存
Propidium Iodide	100 μl	250 μl	4℃避光保存
Binding Buffer	10ml	25ml	4℃保存

二、产品简介:

在正常细胞中, 磷脂酰丝氨酸 (PS) 只分布在细胞膜脂质双层的内侧, 而在细胞凋亡早期, 细胞膜中的磷脂酰丝氨酸 (PS) 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, 与磷脂酰丝氨酸有高度亲和力, 故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。因此 Annexin V 被作为检测细胞早期凋亡的灵敏指标之一。将 Annexin V 进行荧光素 FITC 标记, 以标记了的 Annexin V 作为荧光探针, 利用荧光显微镜或流式细胞仪可检测细胞凋亡的发生。

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, 但对凋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, 就可以将处于不同凋亡时期的细胞区分开来。

Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒 (Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit) 是用 FITC 标记重组人 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的一种细胞凋亡试剂盒。可以使用流式细胞仪、荧光显微镜或其它荧光检测设备进行检测。

本试剂盒可应用于培养细胞凋亡检测 (不推荐用于检测组织样本)。

三、自备试剂及仪器

流式细胞仪或荧光显微镜、低速离心机、微量移液器、1.5m L Microtube、载玻片、盖玻片 (荧光显微镜观察需用)、PBS、不含 EDTA 的胰酶消化液。

四、使用方法 (仅供参考):

- 1、悬浮细胞离心 (2000rpm 离心 5min) 收集; 贴壁细胞用不含 EDTA 的胰酶消化收集 (注: 胰酶消化时间不易过长, 否则容易引起假阳性);
- 2、用 PBS 洗涤细胞二次 (2000rpm 离心 5min) 收集 $1\sim 5 \times 10^5$ 细胞;
- 3、加入 500 μL 的 Binding Buffer 悬浮细胞;
- 4、加入 5 μL Annexin V-FITC 混匀后, 加入 5 μL Propidium Iodide, 混匀;
- 5、室温、避光、反应 5~15min;
- 6、请在 1h 内, 进行下述荧光显微镜或流式细胞仪的观察和检测。

A. 荧光显微镜观察

- 1、滴一滴上述染色后的细胞悬液于载玻片上, 并用盖玻片盖上细胞;
- 2、对于贴壁细胞来说, 也可直接用盖玻片来培养细胞并诱导细胞凋亡;
 - (1) 将细胞于盖玻片上生长, 用适当的凋亡诱导剂诱导细胞凋亡, 并设立阴性对照组;
 - (2) 用 PBS 洗涤细胞两次;
 - (3) 在 500 μL 的 Binding Buffer 中加入 5 μL Annexin V-FITC, 5 μL Propidium Iodide, 混匀;
 - (4) 将上述溶液滴加于盖玻片表面, 使盖玻片表面均匀覆盖;
 - (5) 避光、室温反应 5 min。
 - (6) 将盖玻片倒置于载玻片上, 于荧光显微镜下、双色滤光片 (FITC 和罗丹明) 观察。Annexin V-FITC 荧光信号呈绿色, PI 荧光信号呈红色。

B. 流式细胞仪分析

- 1、用流式细胞仪检测, 激发波长 $Ex=488\text{ nm}$; 发射波长 $Em=530\text{ nm}$ 。
- 2、Annexin V-FITC 的绿色荧光通过 FITC 通道 (FL1) 检测; PI 红色荧光 (流式 $Ex=488\text{ nm}, Em \geq 630\text{ nm}$) 通过 FL2 或 FL3 通道检测, 建议使用 FL3。
- 3、荧光补偿调节: 使用未经凋亡诱导处理的正常细胞, 作为对照进行荧光补偿调节去除光谱重叠和设定十字门的位置。

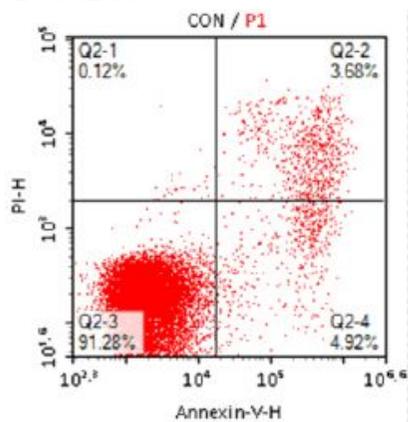
五、储存条件

- 1、Annexin V-FITC 组份建议按需分装小份冻存于 -20°C , 避免反复冻融;
- 2、Propidium Iodide 和 Binding Buffer 组份不用时可放置于 4°C 保存, Propidium Iodide 需要避光;
- 3、一年有效。

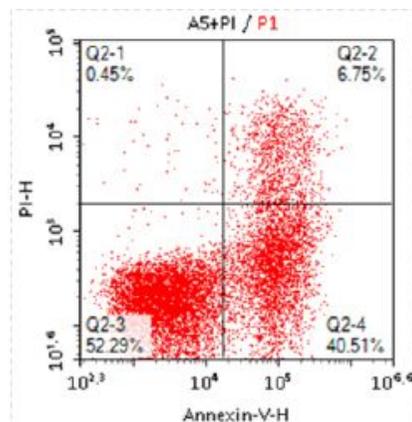
六、注意事项

- 1、AnnexinV-FITC、Propidium Iodide 取用前请低速离心。
- 2、本试剂盒适用于检测活细胞，流式细胞仪检测时，细胞数量不应低于 1×10^5 ，不推荐用于检测组织样本。
- 3、推荐使用悬浮培养细胞。如果是贴壁细胞，需用不含 EDTA 的胰酶消化，如消化不当，可能引起假阳性，而用细胞刮子会造成细胞粘连成团，而影响检测。可将胰酶消化后细胞的保存在含 2%BSA 的 PBS 中，防止进一步的损伤。
- 4、细胞固定后可能导致荧光的淬灭，请不要固定样品。
- 5、因检测细胞的类型、凋亡诱导剂种类、使用的检测仪器不同，因而流式检测的荧光补偿也不同，因此建议每次检测均需使用未经凋亡诱导处理的细胞作为对照，进行荧光补偿的调节。
- 4、PI 对人体有刺激性，请注意适当防护。
- 5、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

七、实验范例



阴性对照，双染



喜树碱 2.5 μ M, 双染

附：细胞培养常用试剂

编号	名称	规格
GR3101-500ML	1640 medium 培养液	500ml
GD3103-500ML	DMEM,high glucose 高糖培养液	500ml
GH3106-500ML	D-Hank' s 液(不含 Ca ²⁺ Mg ²⁺ 含酚红)	500ml
GH3116-500ML	D-Hank' s 液(不含 Ca ²⁺ Mg ²⁺ 不含酚红)	500ml
GH3107-500ML	Hank' s 液(含 Ca ²⁺ Mg ²⁺ 含酚红)	500ml
GH3117-500ML	Hank' s 液(含 Ca ²⁺ Mg ²⁺ 不含酚红)	500ml
GP3108-100ML	0.25%胰蛋白酶消化液 (含 EDTA)	100ml
GP3109-100ML	0.25%胰蛋白酶消化液 (不含 EDTA)	100ml
GA3502-100ML	青链霉素混合液 (100 \times)	100ml
GP3302-500ML	D-PBS	500ml
GS3303-100ML	碳酸氢钠溶液	100ml
GG3304-10ML	L-谷氨酰胺 (100 \times)	10ml
GH3301-10ML	HEPES 溶液 (1mol/L)	10ml
GC3305-50ML	细胞冻存液	50ml
GK3601-50T	细胞凋亡与周期检测试剂盒 (单染)	50T
GK3603-20T	细胞凋亡-Annexin V-FITC/PI 检测试剂盒 (双染)	20T
GK3603-50T	细胞凋亡-Annexin V-FITC/PI 检测试剂盒 (双染)	50T
GK3605-500T	MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒	500T
GK3607-500T	CCK-8 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒	500T
GC3310-100ML	流式细胞保存液	100ml