

AnnexinV-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒

说明书

名 称	AnnexinV-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒
货 号	CSP061
规 格	100T
保 存	2-8℃保存 12 个月。（Annexin V-FITC 和 PI Staining Solution 需避光保存；Annexin V-FITC 不可冷冻）
用 途	仅供科研使用

【产品描述】

本试剂盒用于检测细胞凋亡早期的发生,其中 Annexin V 为胞内蛋白膜联蛋白家族成员,以钙离子依赖的方式选择性与磷脂酰丝氨酸(PS)结合。PS 正常分布在细胞膜内侧,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 PS 外翻到细胞膜外侧。用带有 FITC 标记的 Annexin V,即 Annexin V-FITC,就可以通过流式细胞仪或荧光显微镜检测到 PS 的外翻这一细胞凋亡的重要特征。碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)是一种可对 DNA 染色的细胞核染色试剂,在嵌入 DNA 后释放红色荧光。PI 不能穿透完整的细胞膜,但可以穿透坏死细胞或凋亡晚期丧失细胞膜完整性的细胞。因此,将 Annexin V 与 PI 联合使用时,PI 被排除在活细胞(Annexin V-/PI-)和早期凋亡细胞(Annexin V+/PI-)外,而晚期凋亡细胞和坏死细胞同时被 FITC 和 PI 结合染色呈现双阳性(Annexin V+/PI+)。

组分	名称	规格
CSP061-A	Annexin V-FITC	500ul
CSP061-B	Propidium Iodide (PI)	1ml
CSP061-C	Binding Buffer (10×	50ml

【操作说明】

1. 将 Binding Buffer (10×)用无菌去离子水稀释成 1×Binding Buffer 工作液备用。
2. 对于悬浮细胞, 500-1000 g 离心 5 min 收集细胞。对于贴壁细胞, 要用不含 EDTA 的胰酶消化细胞, 胰酶消化时间不宜过长或过短, 最好是在轻轻吹打可以使贴壁细胞吹打下来时,

加入细胞培养液，将细胞轻轻吹打下来，转移到离心管内，500-1000g 离心 5 min 收集细胞。

注意：

- (1) 对于贴壁细胞，胰酶消化步骤很关键。胰酶消化时间如果过短，细胞需要用力吹打才能脱落，容易造成细胞膜的损伤，从而导致细胞坏死的假阳性；消化时间如果过长，同样易造成细胞膜损伤而出现细胞坏死的假阳性，甚至会影响细胞膜上磷脂酰丝氨酸与 Annexin V- FITC 的结合从而干扰对于细胞凋亡的检测。
- (2) 在消化液中尽量不用 EDTA，EDTA 会影响 Annexin V 与 PS 结合。
- (3) 如果细胞收集过程中使用了胰酶，需去除残留胰酶。残留的胰酶会消化并降解 Annexin V-FITC，导致染色失败。
3. 如果样品来源于血液，请务必除去血液中的血小板。因为血小板含有 PS，能与 Annexin V 结合，从而干扰实验结果。可以使用含有 EDTA 的缓冲剂并 200 g 离心洗去血小板。
4. 收集细胞后，加入预冷 PBS 溶液轻摇或用移液器轻柔吹打洗涤，离心收集细胞，共洗涤 2 次。注意：请尽量将上清弃净，以免 PBS 残留影响实验结果。
5. 在细胞沉淀中加入 1×Binding Buffer 工作液，重悬细胞，使细胞密度达到 1×10^6 cell/mL。
6. 吸取 100 μ L 细胞悬液(细胞总数为 1×10^5 cell)至一新管中，加入 5 μ L Annexin V-FITC 和 5-10 μ L PI，轻轻混匀，室温避光孵育 15 min。

7. 样品检测

A、流式细胞仪检测

染色孵育后，每管加入 400 μ L 1×Binding Buffer 工作液，混匀后使用流式细胞仪检测。建议设置正常细胞、PI 单染和 Annexin V-FITC 单染 3 个对照组，正常细胞组可作为荧光补偿调节去除光谱重叠和设定十字门的位置。若十字门的位置不易设定，可采用经凋亡诱导的细胞进行设定。FITC 最大激发波长为 488 nm，最大发射波长 525 nm，FITC 的绿色荧光在 FL1 通道检测；PI-DNA 复合物的最大激发波长为 535 nm，最大发射波长为 615 nm，PI 的红色荧光在 FL2 或 FL3 通道检测。结果可用 CellQuest 等软件进行分析，绘制双色散点图 (two-color dot plot)，FITC 为横坐标，PI 为纵坐标。Annexin V-FITC 和 PI 联合使用时，活细胞仅有很低强度的背景荧光，早期凋亡细胞仅有较强的绿色荧光，晚期凋亡细胞有绿色和红色双重荧光。注意：由于细胞凋亡是一个快速的过程，建议样品在染色后 1 小时之

内进行分析。

B、荧光显微镜检测

染色孵育后涂片，显微镜下观察。使用荧光显微镜上的蓝光和绿光通道分别观察 FITC 和 PI。被 Annexin V-FITC 结合的细胞显示浆膜上有绿色荧光。丧失细胞膜完整性的细胞，细胞核显示红色，膜上有绿色荧光。

【注意事项】

- 1、 注意无菌操作，避免污染，如果有细菌或真菌污染，会严重影响检测结果；
- 2、 开盖前，请将试剂管短暂离心，将盖内壁上的试剂离心至管底，避免开盖时液体洒落；
- 3、 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；
- 4、 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作；
- 5、 仅供科研使用。