



### Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒

产品编号	产品名称	规格
CG-DW-01	Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒	50T

#### 产品简介

Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒提供了一种通过标记早期凋亡细胞（绿色）和坏死或晚期凋亡的细胞（红色）快速简便地检测细胞凋亡水平的方法。AnnexinV(膜联蛋白-V)是一种分子量为 35~36KD 的  $\text{Ca}^{2+}$  依赖性磷脂结合蛋白，可与磷脂酰丝氨酸（PS）选择性结合。磷脂酰丝氨酸（PS）主要分布在细胞膜内侧，即与细胞质相邻的一侧。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 FITC-AnnexinV 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。

碘化丙啶（PropidiumIodide,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，可以由 488、532 或 546 nm 的激光激发，呈现红色荧光。

#### 试剂盒组成

组份编号	组份名称	规格	数量
CG-DW-01a	FITC-Annexin V	250 $\mu\text{L}$	1
CG-DW-01b	1×Annexin V 结合缓冲液	50mL	1
CG-DW-01c	PI	500 $\mu\text{L}$	1

注：产品参数（1）FITC-Annexin V: Ex/Em: 494/518 nm (2) PI: Ex/Em: 535/617 nm (With DNA) (3) 组分 a 请勿冻存。

#### 储存条件

4°C 避光保存，两年有效；冰袋运输。

#### 注意事项

- 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。
- 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。
- 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。
- 使用前请将产品瞬时离心至管底，再进行后续实验。
- 为降低细胞凋亡进程，孵育过程可在冰上操作，但孵育时间至少延至 30min。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
- 本产品仅限于科研，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品和药品，不得存放于普通住宅内。



## 使用说明

### 一、对于悬浮细胞

1. 在进行完细胞凋亡刺激后，1000rpm 离心 5min，弃上清，收集细胞，用 PBS 轻轻重悬细胞并计数。

**注：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。**

2. 取  $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$  个重悬的细胞，1000 rpm 离心 5min，弃上清，加入 100 $\mu$ L 1×Annexin V 结合缓冲液轻轻重悬细胞。

3. 加入 5 $\mu$ L FITC-Annexin V，轻轻混匀。

4. 加入 5 $\mu$ L PI 染色液，轻轻混匀。

5. 室温（20~25°C）避光孵育 10~15min。可以使用铝箔进行避光。孵育过程中可以重悬细胞 2~3 次以改善染色效果。

### 二、对于贴壁细胞

1. 把细胞培养液吸出至一合适离心管内，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，即可停止消化。这一步需避免胰酶的过度消化。

**注：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 AnnexinV 的结合从而干扰对于细胞凋亡的检测。**

2. 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，1000 rpm 离心 5min，弃上清，收集细胞，用 PBS 轻轻重悬细胞并计数。

**注：加入上步中的细胞培养液非常重要，一方面可以收集已经悬浮的发生凋亡或坏死的细胞，另一方面细胞培养液中的血清可以有效抑制或中和残留的胰酶。残留的胰酶会消化并降解后续加入的 Annexin V，导致染色失败。**

3. 取  $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$  个重悬的细胞，1000 rpm 离心 5min，弃上清，加入 100 $\mu$ L 1×Annexin V 结合缓冲液轻轻重悬细胞。

4. 加入 5 $\mu$ L FITC-Annexin V，轻轻混匀。

5. 加入 5 $\mu$ L PI 染色液，轻轻混匀。

6. 室温（20~25°C）避光孵育 10~15min。可以使用铝箔进行避光。孵育过程中可以重悬细胞 2~3 次以改善染色效果。

## 结果分析

### 一、流式细胞仪检测



1. 孵育完成后，可直接加入 400 μL1×AnnexinV 结合缓冲液重悬细胞，立即上机检测，FITC-AnnexinV 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。
2. 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-Annexin V-/PI-）；右下象限为早期凋亡细胞，为（FITC-Annexin V+/PI-）；右上象限是坏死与晚期凋亡细胞，为（FITC-AnnexinV+/PI+）；左上象限显示裸核细胞，为（FITC-AnnexinV-/PI+）。

## 二、荧光显微镜检测

1. 1000 rpm 离心 5min，收集细胞，用 400μL1×AnnexinV 结合缓 冲液轻轻重悬细胞。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。
2. FITC-Annexin V 可用 FITC 适用滤光片。PI 可用 Cy3 或者 Texas 适用的滤光片。