

## Annexin V-Super Fluor 488/PI 细胞凋亡检测试剂盒

### 产品介绍:

磷脂酰丝氨酸 (PS) 是一种带负电荷的磷脂, 正常细胞中, 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 PS 由脂膜内侧翻向细胞膜外侧, 使 PS 暴露在细胞膜外表面。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 被公认为检测细胞早期凋亡的灵敏指标之一。

将 Annexin V 进行绿色荧光 Super Fluor 488 标记, 以标记了的 Annexin V 作为探针, 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, 它不能透过正常细胞或早期凋亡细胞的完整的细胞膜, 但对凋亡中晚期的细胞和坏死细胞, PI 能够透过细胞膜而使细胞核染红。因此采用 Annexin V 与 PI 双染的方法, 就可以将处于不同凋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, 右下象限为早期凋亡细胞, 右上象限是凋亡晚期细胞和坏死细胞。

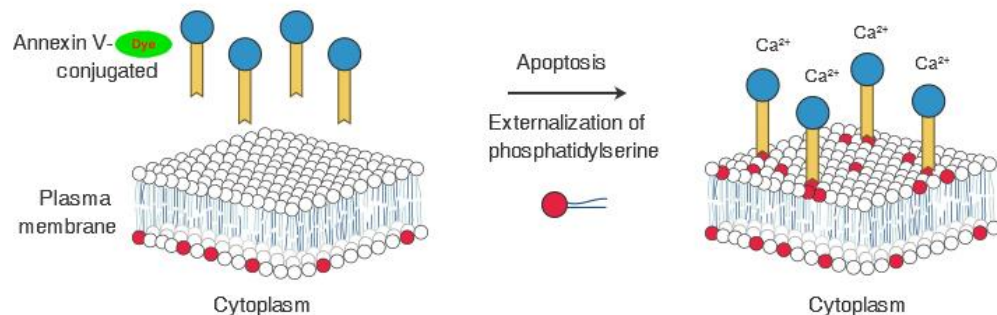


图 1. 细胞凋亡过程中磷脂酰丝氨酸(PS)外翻示意图

### 试剂盒组份:

Reagents	20 assays	50 assays	100 assays	Storage
Annexin V-Super Fluor 488	100 $\mu$ l	250 $\mu$ l	500 $\mu$ l	4°C 避光
Propidium Iodide, PI	200 $\mu$ l	500 $\mu$ l	1000 $\mu$ l	4°C 避光
Binding Buffer (4 $\times$ )	4 mL	10 mL	20 mL	4°C

### 所需实验器材:

微量移液器; PBS; 不含 EDTA 的胰酶消化液; 低速离心机; 流式细胞仪

### 注意事项:

- 1) 此试剂盒仅供研究使用。
- 2) 微量试剂需离心数秒将试剂收集至管底后再开盖取用。
- 3) Propidium Iodide (PI) 有毒, 操作时要带手套, 使用时避免与皮肤, 眼睛和黏膜接触。

- 4) Annexin V-Super Fluor 488 中含有剧毒成分叠氮化钠 ( $\text{NaN}_3$ )，操作时要带手套，使用时避免与皮肤，眼睛和黏膜接触。
- 5) 本试剂盒用于检测活细胞，流式细胞仪检测时，细胞数量  $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 。
- 6) 染色后宜尽快检测，时间过长可能会导致凋亡或坏死细胞的数量增加。
- 7) Annexin V 检测凋亡细胞的方法适用于悬浮生长的细胞，如：淋巴细胞等细胞的检测。对于贴壁生长的细胞，由于在胰酶等消化处理过程中会造成细胞膜的损伤，会造成较高的假阳性，而用细胞刮子会造成细胞粘连成团，而影响检测，可将胰酶消化后的细胞保存在含 2%BSA 的 PBS 中，防止进一步的损伤。尽管目前，包括国外也有一些单位采用该方法检测贴壁生长的细胞。我不推荐用该方法检测。因为其重复性较差，且需要操作时非常小心。
- 8) 消化贴壁细胞残留的胰酶会消化并降解 Annexin V-Alexa Fluor 488，最终导致染色失败。
- 9) 细胞固定后可能导致荧光的淬灭，请不要固定样品。

### 操作说明：

#### 1. 细胞样品的准备：

##### a) 悬浮细胞：

- 1) 收集细胞至离心管中 1000-2000rpm 离心 5min，小心去除上清。
- 2) 用 1ml 4℃ 预冷 PBS 轻轻重悬细胞并计数，1000-2000rpm 离心 5min，小心吸除上清。
- 3) 再加入 1ml 4℃ 预冷的 PBS 重悬细胞，1000-2000rpm 离心 5min，小心吸除上清。

##### b) 贴壁细胞：

- 1) 吸出细胞培养液至离心管中，PBS 洗涤贴壁细胞一次，加入适量不含 EDTA 的胰酶细胞消化液消化细胞。
- 2) 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。
- 3) 加入步骤 i 中收集的细胞培养液，稍混匀，转移到离心管内，1000-2000rpm 离心 5min，小心吸除上清。

注：加入步骤 i 中的细胞培养液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- Alexa Fluor 488 导致染色失败。

- 4) 用 1ml 4℃ 预冷 PBS 轻轻重悬细胞并计数，1000-2000rpm 离心 5min，小心吸除上清。
- 5) 再加入 1ml 4℃ 预冷的 PBS 重悬细胞，1000-2000rpm 离心 5min，小心吸除上清。

#### 2. 用去离子水按 1: 4 稀释 Binding Buffer (4ml Binding Buffer+12ml 去离子水)；

3. 用 250ml 结合缓冲液重新悬浮细胞，调节其浓度为  $1 \times 10^6/\text{ml}$ ；
4. 取 100ul 的细胞悬液于 5 ml 流式管中，加入 Annexin V- Alexa Fluor 488，轻轻混匀；
5. 室温(20-25℃)避光孵育 10min；
6. 上机前 5min 加入 10ul 碘化丙啶溶液，轻轻混匀；
7. 上机前在反应管中补加 400ml PBS 重悬细胞， 避光保存， 随即进行流式细胞仪（FACS）检测， Annexin V- Super Fluor 488 和 PI 均为红色荧光。

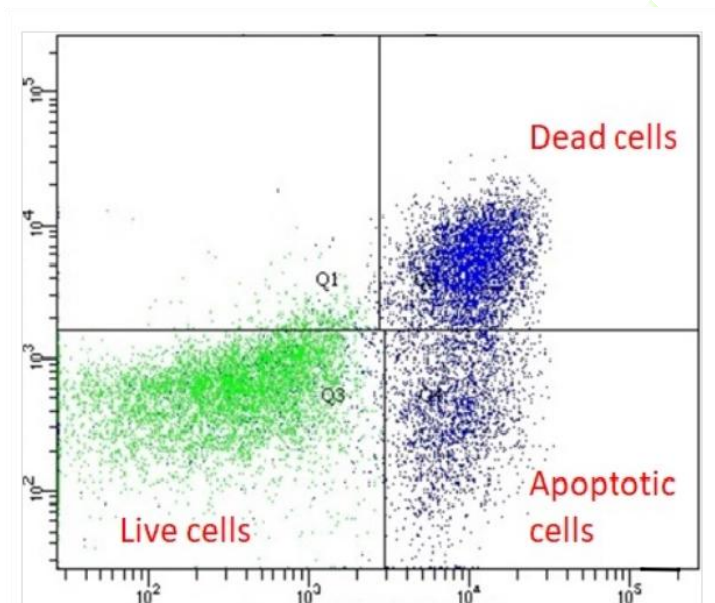


图 2：流式细胞术检测早期凋亡细胞。右下象限为早期凋亡细胞，右上象限为凋亡终末细胞和坏死细胞。

**特别提醒：**

- 1) 本公司所有产品仅限于专业人员用于生命科学研究，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅！
- 2) 本公司所有产品必须由合格专业技术人员操作同时佩戴口罩/手套/实验服并遵守生物实验室安全操作规程！