

Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒

货号: RK05875

规格: 50T / 100T

◆ 产品简介

细胞凋亡是胚胎发育和维持机体内稳态的一种正常生理过程。凋亡发生时具有较为明显的形态学表现特征, 包括细胞膜不对称性和附着性丧失、细胞质和核质浓缩、核小体间 DNA 断裂。细胞膜的破坏属于细胞凋亡的早期特征。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 PS 由内侧外翻至外侧, 从而将 PS 暴露于细胞外部环境。Annexin V 是一种 35-36 kDa 的 Ca^{2+} 依赖性磷脂结合蛋白, 与 PS 具有高度亲和力, 故可通过细胞外侧暴露的 PS 与凋亡早期细胞的细胞膜结合。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 以绿色荧光 FITC 进行标记, 标记后的 Annexin V 保留了与 PS 的高亲和力, 可作为探针, 利用荧光显微镜或流式细胞仪进行细胞凋亡的检测。由于在凋亡早期即发生 PS 外翻, 故 Annexin V-FITC 染色在凋亡早期就能识别出凋亡的发生。碘化丙啶 (Propidium Iodide, PI) 是一种核酸染料, PI 不能透过正常细胞或早期凋亡细胞的完整的细胞膜, 但可穿透膜损伤细胞如晚期凋亡细胞或者坏死细胞的细胞膜并与其内的 DNA 结合, 使细胞核染红, 可用来区分早期凋亡细胞和晚期凋亡细胞或坏死细胞。因此将 Annexin V-FITC 与 PI 进行共染, 就可以区分不同凋亡时期的细胞。在双色流式细胞仪散点图上, Annexin V-FITC 与 PI 双阴性为正常细胞, Annexin V-FITC 阳性、PI 阴性为早期凋亡细胞, Annexin V-FITC 与 PI 双阳性为晚期凋亡细胞。

◆ 产品组成

产品组成	RK05875-50T	RK05875-100T
Annexin V-FITC	250 μL	500 μL
Propidium Iodide	500 μL	1 mL
Binding Buffer (10X)	25 mL	50 mL

◆ 保存条件

2-8°C 避光保存, 有效期 12 个月

◆ 实验流程

1、细胞样本染色

(1) 根据实验实际需求诱导细胞凋亡。检测样品中应包含未经处理的细胞样品, 作为阴性对照。同时, 进行流式检测时需取细胞凋亡模型组细胞分别进行 Annexin V-FITC 和 PI 单染, 用于调节补偿, 各实验组别的设置可参考下表。

染色组别	双染组		单染组	
染料类型	Annexin V-FITC 和 Propidium Iodide		Annexin V-FITC	Propidium Iodide
实验组别	阴性对照组	实验诱导组	细胞凋亡模型组	
细胞处理方式	正常培养	诱导凋亡	正常培养的细胞, 56°C, 水浴 5-10 min	

注：单染组的细胞为正常培养的细胞，经 56°C，水浴 5-10 min 后人为构建的细胞凋亡损伤模型，对于一些相对敏感的细胞类型一般水浴 5 min 左右即可，但具体的水浴时间需根据实际具体的细胞类型加以合理的优化调整。

(2) Binding Buffer (10X) 稀释成 1×Binding buffer 工作液备用 (1ml 的 Binding Buffer (10X) 需加入 9mL 无菌去离子水)。

(3) 收集 $1-5 \times 10^5$ 个细胞，对于悬浮细胞：1800 rpm (300×g)、4°C 离心 5 min，弃培养基上清；对于贴壁细胞：用不含 EDTA 的胰酶消化细胞，1800 rpm (300×g)、4°C 离心 5 min，弃培养基上清。

(4) 洗涤细胞：加入预冷的 PBS，用移液器轻柔吹打洗涤细胞两次，每次均在 1800 rpm (300×g)、4°C 离心 5 min。

(5) 细胞重悬：加入 100 μ l 的 1×Binding Buffer，轻轻吹匀至单细胞悬液。

(6) 细胞染色：加入 5 μ l 的 Annexin V-FITC 和 5-10 μ l 的 PI，轻轻吹打混匀，室温避光孵育 15 min。染色结束后，加入 400 μ l 的 1×Binding Buffer，轻轻混匀。染色后样品在 1 h 内用流式细胞仪检测。

注：为了避免洗涤细胞时损失细胞，在吸液时可采用大枪头套上小枪头的方式进行吸液

2、样本分析

(1) 流式细胞仪分析：流式细胞仪选择激发波长为 488 nm 的激发器进行检测，Annexin V-FITC 的绿色荧光在 FITC 或 FL1 通道检测；PI 的红色荧光在 PE 或 PerCP (FL2 或 FL3) 通道检测，优先建议使用 PerCP 或 FL3 通道，每个样本采集 10,000 events。**(不同品牌的流式细胞仪在检测通道的命名上区别较大，具体需以实际使用的仪器的通道命名为准)**。用 FlowJo 等软件进行数据分析，以 FITC 或 FL1 为横坐标，以 PerCP 或 FL3 为纵坐标，根据 Annexin V-FITC 和 PI 荧光值确定两荧光参数阴阳界限，划定十字门。典型的实验中细胞可分为三个亚群：活细胞为双阴性 (Annexin V-FITC-/PI-)，早期凋亡细胞为 Annexin V-FITC 单阳性 (Annexin V-FITC+/PI-)；晚期凋亡细胞为 Annexin V-FITC 和 PI 双阳性 (Annexin V-FITC+/PI+)。

(2) 荧光显微镜分析：滴一滴染色后的细胞悬液于载玻片上，并用盖玻片盖上细胞，荧光显微镜下观察。在荧光显微镜下用双色滤光片观察：Annexin V-FITC 荧光信号呈绿色，PI 荧光信号呈红色（对于贴壁细胞，可直接用细胞爬片培养细胞并诱导细胞凋亡）。

◆ 注意事项

1. 可立式离心管内试剂在开盖前请短暂离心，将盖内壁上的液体甩至管底，避免开盖时液体洒落。

2. Annexin V 与 PS 的结合需要 Ca^{2+} , Binding Buffer 中含有 2.5 mM 的 Ca^{2+} , 含 EDTA 的胰酶消化会影响染色效果, 建议使用无 EDTA 的胰酶消化处理细胞。
3. Annexin V-FITC 和碘化丙啶 (PI) 是光敏物质, 在保存与操作时请注意避光。
4. 为获得准确试验结果, 建议样品在染色后 1 小时内进行分析。
5. 为了您的安全和健康, 请穿戴实验防护服、手套、口罩等必要的防护装备。