

ANNEXIN V-FITC细胞凋亡检测试剂盒

原理

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（EGFP、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。

产品组成

Catalog#	BW3300	BW3301	BW3302	BW3303
Paper	4T	20T	50T	250T
Annexin V-FITC	20 μ L	100 μ L	250 μ L	500 μ L
Propidium Iodide Staining Solution	20 μ L	100 μ L	250 μ L	500 μ L
Annexin V Binding Buffer	2 mL	10 mL	25 mL	25 mL x 2

保存条件

自生产之日起，置于 4°C 保存，保质期一年。

操作步骤

1. 悬浮细胞离心（离心 2000rpm，5min）收集；贴壁细胞用不含 EDTA 的胰酶消化收集，（胰酶消化时间不易过长，否则会影响细胞膜上磷脂酰丝氨酸与 Annexin V-FITC 的结合）；
 2. 用 PBS 洗涤细胞二次（离心 2000rpm，5min）收集 $1\sim 5\times 10^5$ 细胞；
 3. 加入 500 μ L 的 Annexin V Binding Buffer 悬浮细胞；
 4. 加入 5 μ L Annexin V-FITC 混匀后，加入 5 μ L Propidium Iodide，混匀；
 5. 避光、室温反应 10min；
- 根据不同的分析方法选择步骤 A 或 B。

A. 荧光显微镜观察

1. 滴一滴经过步骤 1~5 处理过的细胞悬浮液于载玻片，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 μ L 的 Annexin V Binding Buffer 中加入 5 μ L Annexin V-FITC，5 μ L Propidium Iodide，混匀；
 - （4）将上述溶液滴加于盖玻片表面，使长有细胞的盖玻片表面均匀覆盖；
 - （5）避光、室温反应 10min。
 3. 将盖玻片倒置于载玻片上，于荧光显微镜下观察；
- 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

用流式细胞仪检测（Ex=488 nm; Em=530 nm）细胞凋亡的情况。（绿色荧光通过 FITC 通道通常为 FL1 来检测；红色荧光通过 PI 通道通常为 FL2 或 FL3 来检测）

注意事项

1. Annexin V-FITC，Propidium Iodide（PI）避光保存及使用。
2. Propidium Iodide（PI）有毒，操作时要戴手套。