Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒

货　　号：AF2020
保存温度：4℃

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 Ca2+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。

本产品将 Annexin V 进行绿色荧光（FITC）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。

试剂盒组份：

Reagents	20 assays	50 assays	100 assays	Storage
Annexin V-FITC	100ul	250ul	500ul	4°C 避光
Propidium Iodide, PI	200ul	500ul	1000ul	4°C 避光
Binding Buffer (4×)	4ml	10ml	20ml	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-FITC 中含有剧毒成分叠氮化钠（NaN3），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，细胞数量不应低于 1x106。
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. Annixin 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。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-FITC，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）加入以上步骤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-FITC 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 250μl 结合缓冲液重新悬浮细胞，调节其浓度为 1×106/ml；

4. 取 100μl 的细胞悬液于 5 ml 流式管中，加入 5μl Annexin V-FITC，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 400μl PBS 重悬细胞， 避光保存，随即进行流式细胞仪（FACS）检测， Annexin V-FITC 为绿色荧光，PI 为红色荧光。