

Product Data Sheet

Product Name: Annexin V-FITC/PI Apoptosis Kit
Cat. No.: GK10037

Components

Components	20 Assays (20T)	50 Assays (50T)	100 Assays (100T)
Annexin V-FITC	100 μ L	250 μ L	500 μ L
Propidium Iodide	200 μ L	500 μ L	1 mL
Annexin V Binding Buffer	10 mL	25 mL	50 mL

Features

Applications	结合效率高 快速方便, 仅需一步简单的染色程序, 10-20分钟即可完成。 本试剂盒通过Annexin V-FITC和PI染色, 可区分早期和晚期凋亡细胞及坏死细胞。
Shipping	蓝冰运输
Storage	冰袋 (wet ice) 运输。-20 避光保存, 避免反复冻融, 一年有效。 【注】: 如果需要在短时间内多次重复使用, 可以在4 避光保存, 半年有效。
Usage	For Research Use Only! Not For Use in Humans.

Protocol

本方案仅提供一个指导, 请根据您的具体需要进行修改。

一、细胞悬浮染色:

1、悬浮细胞染色

(1) 细胞经1000g离心5分钟, 弃上清, 用适量PBS轻轻重悬细胞并计数。

注意: PBS重悬细胞也起到了洗涤细胞的作用, 可以保证后续Annexin V-FITC的结合不受干扰, 此步骤不可省略。

(2) 取约 $5-10 \times 10^4$ 个细胞, 1000g离心5分钟, 弃上清, 加入195 μ L Annexin V Binding Buffer轻柔重悬细胞。

(3) 加入5 μ L Annexin V-FITC和10 μ L Propidium Iodide染色液, 轻柔混匀。

(4) 室温(20-25)避光孵育10-20分钟。

注意: 孵育过程中可以重悬细胞2-3次以改善染色效果。

(5) 1000g离心5分钟, 弃上清, 使用PBS重悬细胞, 将样本转移至冰浴中, 建议使用铝箔避光处理。

(6) 使用流式细胞仪或荧光显微镜对染色结果进行检测。

2. 对于贴壁细胞的消化后检测:

(1) (重要) 将细胞培养基吸出, 转移至合适大小的离心管内。

(2) (关键) 使用PBS轻柔清洗一次贴壁培养的细胞, 加入适量胰酶细胞消化液消化细胞, 室温孵育至细胞形状逐渐变圆并变得松散、轻轻晃动出现细胞脱落, 立即向消化好的细胞中加入步骤(1)收集的细胞培养基终止消化, 将细胞轻柔吹打下来。

注意:

建议在此步骤使用步骤(1)中收集的细胞培养基终止消化, 也能够收集悬浮在培养基的发生凋亡或坏死的细胞。

胰酶消化需要适当。消化时间过短, 细胞需要用力吹打才能脱落, 容易造成细胞膜损伤, 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假阳性, 甚至会影响细胞膜上磷脂酰丝氨酸与Annexin V-FITC的结合, 从而干扰对细胞凋亡的检测。

胰酶细胞消化液中应尽量不含EDTA。Annexin V是Ca²⁺依赖的蛋白, EDTA可以螯合Ca²⁺, 从而影响Annexin V和磷脂酰丝氨酸(PS)结合, 影响实验结果。

如果使用含EDTA的胰酶消化细胞, 建议在消化结束后、加Annexin V-FITC前使用PBS多清洗几次细胞, 能够去除EDTA对凋亡检测的影响。

(3) 将细胞液转移至离心管中, 1000g离心5分钟, 弃上清, 收集细胞, 用PBS轻轻重悬细胞并计数。

注意: 此步骤应尽量去除胰酶, 残留的胰酶会消化并降解后续加入的Annexin V-FITC, 影响染色效果。

Caution: Product has not been fully validated for medical applications. For research use only.

Tel: (909) 407-4943 Fax: (626) 353-8530 E-mail: tech@glpbio.com

Address: 10292 Central Ave. #205, Montclair, CA, USA

Product Data Sheet

- (4) 取约 $5-10 \times 10^4$ 个细胞，1000g离心5分钟，弃上清，加入195 μ l Annexin V Binding Buffer轻柔重悬细胞。
 - (5) 加入5 μ l Annexin V-FITC和10 μ l Propidium Iodide染色液，轻轻混匀，室温(20-25)避光孵育10-20分钟。
- 注意：孵育过程中可以重悬细胞2-3次以改善染色效果。
- (6) 1000g离心5分钟，弃上清，使用PBS重悬细胞，将样本转移至冰浴中，建议使用铝箔避光处理。
 - (7) 使用流式细胞仪或荧光显微镜对染色结果进行检测。

二、贴壁细胞的原位荧光检测：

- 1、(选做)如果条件允许，建议在凋亡诱导结束后将多孔板经1000g离心5分钟。
- 2、吸弃细胞培养基，加入PBS洗涤一次。如果条件允许，建议在吸弃PBS前将多孔板经1000g离心5分钟。
- 3、加入195 μ l Annexin V Binding Buffer。
- 4、加入5 μ l Annexin V-FITC和10 μ l Propidium Iodide染色液，轻轻混匀，室温(20-25)避光孵育10-20分钟。
- 5、1000g离心5分钟，弃上清，使用PBS洗涤细胞，将样本转移至冰浴中，建议使用铝箔避光处理。
- 6、使用荧光显微镜对染色结果进行检测。

注意事项：

- 1、细胞在染色后应尽快检测，建议在1小时之内完成检测，不建议将细胞在结合液中保存过久。
- 2、如果用于流式细胞仪检测，可立即上机检测，Annexin V-FITC为绿色荧光，最大激发光/发射光波长为525/530nm，也能够使用488通道激发；碘化丙啶(PI)为红色荧光，结合核酸后的最大激发光/发射光波长为535/617nm。
- 3、染色完成后可以不更换掉染色液，直接上机检测。如果不能立即检测，建议离心去除染色液，使用PBS或Annexin V Binding Buffer重悬细胞。
- 4、如果细胞在悬浮染色后使用荧光显微镜检测，建议1000g离心5分钟收集细胞，使用50-100 μ l Annexin V Binding Buffer轻柔重悬细胞，涂片后在荧光显微镜下观察。
- 5、在初次使用流式细胞仪进行检测时，建议设置未染色、PI单染和Annexin V-FITC单染3组对照。
- 6、在使用流式细胞仪进行检测时，如果发现Annexin V-FITC单独染色时出现了过多的PI假阳性细胞，并且通过调整相关设置和参数也无法改善，可以用PBS将Annexin V-FITC稀释3-10倍后再进行检测。
- 7、本产品只适用于细胞模型的凋亡双染，也适用于检测精子凋亡，但不能用于检测组织样本中的凋亡。
- 8、不同细胞系对PI的敏感度不同，请根据染色情况酌情调整PI用量。
- 9、Annexin V-FITC通过结合磷脂酰丝氨酸(PS)对凋亡细胞进行标记，PS在不同种属间相对保守，故而本产品适用于对不同种属的细胞进行凋亡检测，具体实验步骤可参考相关文献。
- 10、本产品能够和抗体一起对细胞进行染色，但建议分开染色，建议在抗体染色完成后将缓冲液更换为Annexin V Binding Buffer进行凋亡检测。
- 11、如果样品来源于血液，必须去除血液中的血小板，血小板中的PS会干扰实验结果。
- 12、神经细胞膜容易破坏外翻，从而导致假阳性，所以本产品不适用于检测神经细胞的凋亡。
- 13、操作中务必动作轻柔，离心后需确认管底是否有细胞。
- 14、荧光染料均存在淬灭问题，实验过程中请尽量注意避光，以减缓荧光淬灭。
- 15、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

Background

Annexin V-FITC/PI Apoptosis Detection Kit (Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒)是一种使用FITC标记的Annexin V蛋白来检测细胞凋亡水平的凋亡检测类试剂盒。

Annexin V是一种分子量为35-36kD的Ca²⁺依赖性磷脂结合蛋白，广泛分布于真核细胞细胞浆内，参与细胞内的信号转导。在正常细胞中，磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)只分布在细胞膜脂质双层的内侧；在细胞凋亡早期，磷脂酰丝氨酸发生翻转，FITC标记的Annexin V能够与翻转到膜外的磷脂酰丝氨酸高亲和力特异性结合，从而标记凋亡细胞。对于坏死细胞，由于细胞膜的完整性已经丧失，Annexin V-FITC可以进入到细胞浆内，与位于细胞膜内侧的磷脂酰丝氨酸结合，从而使坏死细胞呈现绿色荧光。通过流式细胞仪、荧光显微镜或其它荧光检测设备能够对凋亡情况进行检测。本试剂盒也提供了碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)染色液。碘化丙啶是一种能结合DNA的菲啶类荧光染料，可以染色坏死细胞或凋亡晚期丧失细胞膜完整性的细胞，呈现红色荧光，而活细胞和凋亡早期细胞则有碘化丙啶拒染的现象。经Annexin V-FITC和PI联合染色后，正常细胞基本无荧光(Annexin V-/PI-)，凋亡早期细胞呈绿色荧光(Annexin V+/PI-)，凋亡晚期细胞及坏死细胞则呈绿色和红色荧光(Annexin V+/PI+)。

Caution: Product has not been fully validated for medical applications. For research use only.

Tel: (909) 407-4943 Fax: (626) 353-8530 E-mail: tech@glpbio.com

Address: 10292 Central Ave. #205, Montclair, CA, USA