

产品组成:

产品编号	CA001-1	CA001-2	CA001-3
规格	20T	50T	100T
Annexin V-FITC 染色液	100 μ L	250 μ L	500 μ L
PI 染色液	200 μ L	500 μ L	1000 μ L
结合液 A	20 mL	40 mL	80mL

储存条件: 2-8°C 避光保存。长期不用可以分装后-20°C 避光保存延长有效期，避免反复冻融。

有效期: 一年。

产品简介:

细胞凋亡是细胞的基本特征之一，它在机体的胚胎发育、组织修复、内环境的稳定和一些疾病发生过程等方面起着十分重要的作用。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。在体内，巨噬细胞可以识别翻转到细胞膜表面的 PS 从而将这些程序性死亡的细胞清除，因此凋亡过程中并不伴随局部的炎症反应，而在细胞坏死的过程中则常常伴随着炎症反应。

Annexin V 是一种分子量为 35-36kD 的 Ca^{2+} 依赖性磷脂结合蛋白，能与细胞凋亡过程中翻转到膜外的 PS 高亲和力特异性结合。PS 外翻发生在细胞核破裂，DNA 片段化以及凋亡相关蛋白出现之前，这使得 Annexin V 与 PS 的结合成为凋亡早期的一种重要检测标志事件。

检测方法:

流式细胞仪或荧光显微镜

样本类型:

- 悬浮细胞
- 贴壁细胞

使用方法:

- 由于细胞凋亡是一个快速和动态的过程，因此最好在染色后立即进行分析。
- 使用 Annexin V-FITC 试剂盒检测凋亡需要针对活细胞。不要固定细胞，固定操作会对结果产生干扰。
- 如果细胞样品中含有血小板，如血液样品，请使用含有 EDTA 的缓冲剂并 200g 离心洗去血小板。因为血小板含有 PS，能与 Annexin V 结合。
- 流式细胞仪检测时，细胞数量应不低于 1×10^5 。
- 如果细胞收集过程中使用了胰酶，需注意用 PBS 洗净去除残留的胰酶。残留的胰酶会消化并降解 Annexin V-FITC，最终导致染色失败。

➤ 样品染色:

- 1、离心收集悬浮细胞。离心机 300-500g，2-8°C，离心时间 5min，弃培养基。（贴壁细胞用不含 EDTA 的胰酶消化后离心，收集细胞。胰酶消化时间不宜过长，以防引起假阳性）。

- 2、用冷 PBS 洗涤细胞两次。（300g，2-8°C，离心时间 5min 收集细胞）。
- 3、用 400ul 1X Annexin V 结合液悬浮细胞，浓度大约为 1×10^6 cells/ml。
- 4、在细胞悬浮液中加入 5ul Annexin V-FITC 染色液，轻轻混匀后于 2-8°C 避光条件下孵育 15 分钟。
- 5、加入 5-10ul PI 染色液后轻轻混匀于 2-8°C 避光条件下孵育 5 分钟。
- 6、立即用流式细胞仪或荧光显微镜检测。

➤ **流式细胞仪分析：**

经处理过的细胞此时可以在流式细胞仪上分析。激发波长为 488nm。

按照常规的流式凋亡检测的操作即可。

Annexin V-FITC 的绿色荧光发射波长 530nm，信号可以通过 FL1（FITC 接收器）通道检测；PI 红色荧光在 620nm，通过 FL2（Propidium iodide 接收器）通道或 FL3 通道检测。

上机检测前，需用待测细胞制备三个质控样本来设定流式细胞仪的荧光补偿和设置十字门的范围：

- ① 没有染色的细胞；
- ② 仅用 Annexin V-FITC 染色的细胞；
- ③ 仅用 PI 染色的细胞。

➤ **荧光显微镜观察：**

1. 滴加 30-50ul 用 Annexin V-FITC/PI 双染的细胞悬液于载玻片上，并用盖玻片盖上细胞。

注：对于贴壁细胞，可以象悬浮细胞那样染色后，滴一滴细胞悬液于载玻片上，用盖玻片盖上细胞，荧光显微镜下观察。也可直接用盖玻片培养细胞并诱导细胞凋亡。根据盖玻片大小，置于 24 孔或 12 孔细胞培养板内培养，然后诱导细胞凋亡。细胞染色在细胞培养板内进行。先用 PBS 冲洗两次，加入 400 μ l Annexin V 结合液于孔中。再加入 5 μ l Annexin V-FITC 染色液与 10 μ l Propidium Iodide 染色液，混匀。避光室温反应 10 分钟。

2. 在荧光显微镜下用双色滤光片观察。使用荧光显微镜上的 FITC 滤镜（蓝光），Annexin V-FITC 染色阳性的细胞将在细胞膜表面呈现明亮的苹果绿色。使用 Rhodamine 滤镜（绿光），Propidium Iodide 染色阳性的细胞则会在整个胞质内呈现不同强度的黄-红色。早期凋亡细胞不会被 Propidium Iodide 染色或显示背景荧光，而坏死或晚期凋亡细胞则会显示出黄-红色的胞质，红色的胞核和环绕细胞的绿色胞膜。在晚期凋亡细胞中还可以观察到胞膜皱缩和起泡。