

产品组成:

规格	20 assays	50 assays	100 assays
Annexin V-EGFP 染色液	100 μ L	250 μ L	500 μ L
Propidium Iodide 染色液	200 μ L	500 μ L	1000 μ L
Annexin V 结合液	20 mL	40 mL	80mL

储存条件:

2-8°C 避光保存。长期保存于-20°C 避光。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。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。

用标记了 EGFP 的 Annexin V 作为荧光探针，利用流式细胞仪或荧光显微镜可检测细胞凋亡的发生，正常细胞和早期凋亡细胞的细胞膜是完整的。Propidium iodide (PI) 是一种核酸染料，它不能透过完整的细胞膜，但在凋亡中晚期的细胞和死细胞，PI 能够透过细胞膜与细胞核结合呈现红色。将 Annexin V 与 PI 匹配使用，可以将凋亡早期的细胞和晚期的细胞以及死细胞区分开来。在双变量流式细胞仪的散点图上，左下象限显示活细胞，为 (EGFP-/PI-); 右上象限是非活细胞，即坏死细胞，为 (EGFP+ /PI+); 而右下象限为凋亡细胞，显现 (EGFP+ /PI-)。

使用方法:**➤ 样品染色:**

- 1、离心收集悬浮细胞，离心机转速 2000RPM，离心时间 5min，弃培养基。（贴壁细胞用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。（2000RPM，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-EGFP 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 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、在 1 小时内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-EGFP 的绿色荧光通过 FL1 通道检测；PI 红色荧光通过 FL2 或 FL3 通道检测，建议使用 FL3。

➤ 荧光显微镜观察:

1. 滴加用 Annexin V-EGFP/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-EGFP 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-EGFP 荧光信号呈绿色；使用 Rhodamine 滤镜（绿光），PI 荧光信号呈红色，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。