

## 产品组成:

产品编号	CA001-1	CA001-2
规格	50T	100T
Annexin V-PE 染色液	250 $\mu$ L	500 $\mu$ L
7-AAD 染色液	500 $\mu$ L	1000 $\mu$ L
Annexin V 结合缓冲液	40 mL	80mL

**储存条件:** 2-8 $^{\circ}$ C 避光保存。Annexin V-PE 染色液避免反复冻融，冻融 2 次以上可能会失效。长期保存分装后-20 $^{\circ}$ C 保存。

**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。

## 检测原理:

在正常的活细胞中，磷脂酰丝氨酸（phosphatidylserine, PS）位于细胞膜的内侧，但在早期凋亡的细胞中，PS 从细胞膜的内侧翻转到细胞膜的表面，暴露在细胞外环境中。Annexin-V 能与 PS 高亲和力结合。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。用标记了 PE 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。细胞坏死的过程中也会发生细胞膜损伤，坏死的细胞会结合 Annexin V-PE。

Annexin V-PE 通常与细胞膜非渗透性核酸荧光染料联合使用以检测凋亡细胞。常用的染料是 7-AAD。正常细胞和早期凋亡细胞的细胞膜是完整的，核酸染料 7-AAD 不能透过完整的细胞膜，但在凋亡中晚期的细胞和坏死细胞，7-AAD 能够透过细胞膜与细胞核结合呈现红色。

## 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:

- 螺旋盖微量试剂管装的试剂在开盖前请短暂离心，将盖内壁上的液体收集至管底，避免开盖时液体损失导致试剂量不够用。
- 细胞处理需要小心操作, 尽量避免人为的损伤细胞。离心力在不损失细胞的前提下尽可能小, 重悬细胞是动作要轻柔, 避免多次反复的激烈吹打。不用涡旋振荡器。
- Annexin V-PE 和 7-AAD 是光敏物质, 在操作时请注意避光, 尽量减少它们暴露在光下的时间。必要时可以使用带盖子的冰盒或铝箔纸避光。
- 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-PE 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。
- 流式细胞仪检测时, 细胞数量应不低于  $1 \times 10^5$ 。
- 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-PE, 最终导致染色失败。
- 贴壁细胞诱导凋亡时如有漂浮细胞, 需收集漂浮细胞和贴壁细胞后合并染色。中晚期凋亡细胞失去贴壁能力而漂浮于培养基, 此部分细胞对结果有显著影响, 不可随意丢弃, 需离心后收集与贴壁细胞一起检测, 才能全面的反映出细胞凋亡的整体情况;
- 对于贴壁细胞, 消化是一个关键步骤。处理贴壁细胞时要小心操作, 尽量避免人为的损伤细胞,
- 在进行流式细胞仪检测之前, 事先进行显微镜观察有好处。
- 有极少数细胞株其细胞膜上 PS 的密度很低, 难以染色, 此时不适合用 Annexin V 方法检测凋亡。

### 样品染色:

- 离心收集悬浮细胞。离心机 300-500g 力, 2-8°C, 离心时间 5 分钟, 弃培养基。
- 用冷 PBS 洗涤细胞两次。(300g-400g, 2-8°C, 离心时间 5 分钟收集细胞)。
- 用 400ul 1X Annexin V 结合液悬浮细胞, 浓度大约为  $1-5 \times 10^6$  cells/ml。
- 取 100ul 细胞悬浮液中加入 5ul Annexin V-PE 染色液, 轻轻混匀后于 2-8°C 避光条件下孵育 5-10 分钟。
- 加入 5-10ul 7-AAD 染色液后轻轻混匀于 2-8°C 避光条件下孵育 1-3 分钟。
- 加入 400ul PBS, 轻轻混匀。
- 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。

按照常规的流式凋亡检测的操作即可。

Annexin V-PE 的荧光最大激发波长 565nm, 最大发射波长 578nm, 信号可以通过 FL2 (PE 接收器) 通道检测; 7-AAD 红色荧光最大发射波长在 647nm, 通过 FL3 通道检测。

上机检测前, 须用待测细胞制备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:

#### (I) 未转染 GFP 等标记的细胞

- ① 空白管: 阴性对照组细胞, 没有染色的细胞。不加 Annexin V/PE, 7AAD。用于调节电压。
- ② 单染管: 有明显凋亡的细胞, 只加 Annexin V/PE 染色。用于调节补偿。
- ③ 单染管: 有明显凋亡的细胞, 只加 7-AAD 染色。用于调节补偿
- ④ 检测管: 待测的处理细胞, 加 Annexin V/PE, 7AAD。用空白管和单阳管调节好电压补偿后, 获得所需要的流式数据。

## (II) 转染 GFP 细胞

- ① 未转染空白管：未转染细胞，阴性对照组细胞，没有染色的细胞。不加 Annexin V/PE, 7AAD。用于调节电压。
- ② 转染 GFP 空白管：转染 GFP 的对照组细胞，没有染色的细胞。不加 Annexin V/PE, 7AAD。用于调节补偿
- ③ 未转染单染管：未转染且有明显凋亡的细胞，只加 Annexin V/PE 染色。用于调节补偿。
- ④ 未转染单染管：未转染且有明显凋亡的细胞，只加 7-AAD 染色。用于调节补偿
- ⑤ 检测管：待测的处理细胞，加 Annexin V/PE, 7AAD。用空白管和单阳管调节好电压补偿后，获得所需要的流式数据。

**【注】：**具体流式设置按常规方法即可。请参照流式细胞仪说明书或咨询仪器技术支持。

### 荧光显微镜/激光共聚焦观察：

1. 滴加 30-50ul 用 Annexin V-PE/7-AAD 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 $\mu$ l Annexin V 结合液于孔中。再加入 5 $\mu$ l Annexin V-PE 染色液与 5 $\mu$ l 7-AAD 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。

Annexin V-PE 染色阳性的细胞将在细胞膜表面呈现黄色。7-AAD 染色阳性的细胞则会在整个胞质内呈现不同强度的红色。

早期凋亡细胞不会被 7-AAD 染色或显示背景荧光，而坏死或晚期凋亡细胞则会显示出红色的胞质，红色的胞核和环绕细胞的黄色胞膜。在晚期凋亡细胞中还可以观察到胞膜皱缩和起泡。