

产品组成:

| 规格 | 50T | 100T |
|-------------------|-------------|--------------|
| Annexin V-APC 染色液 | 250 μ L | 500 μ L |
| PI 染色液 | 500 μ L | 1000 μ L |
| Annexin V 结合缓冲液 | 40 mL | 80mL |

储存条件:

染色液 2-8 $^{\circ}$ C 避光保存;

结合液 2-8 $^{\circ}$ 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、内环境的稳定和某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。

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 APC 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-APC。

Annexin V-APC 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 PI。正常细胞和早期凋亡细胞的细胞膜是完整的，核酸染料 PI 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，PI 能够透过细胞膜与细胞核结合呈现红色。

PI/Annexin V-APC 试剂盒将 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。坏死细胞可以同时与 Annexin V-APC 和 PI 结合显色，而 PI 则被排除在活细胞（APC 阴性）和早期凋亡细胞（APC 阳性）之外。在没有巨噬细胞的情况下，凋亡的最后阶段会像细胞坏死一样发生整个细胞的解体，从而使凋亡晚期的细胞也同时被 APC 和 PI 结合染色呈现双阳性。

产品特点:

- 方便：可用流式细胞仪；
- 快速：1小时内即可完成实验；
- 准确：能准确区分活细胞、凋亡细胞和坏死细胞，并计数各群细胞的比例。

检测方法:

流式细胞仪。

样本类型:

- 悬浮细胞
- 贴壁细胞

试剂盒以外自备仪器和试剂耗材：

仪器

- 流式细胞仪或荧光显微镜或激光共聚焦
- 离心机
- 移液器
- 冰箱
- 冰盒

耗材

- 离心管
- 吸头

试剂

PBS 或 HBSS

使用方法：

使用注意事项：

- 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-APC 和 PI 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。
- 使用 Annexin V-APC 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-APC，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，胰酶消化时间过短，细胞需要用力吹打才能脱落，容易造成细胞膜的损伤，PI 摄入过多；消化时间过长，细胞膜同样易造成损伤，甚至会影响细胞膜上磷脂酰丝氨酸与 Annexin V-APC 的结合。消化时将胰酶铺满孔板底后，轻摇使胰酶与细胞充分接触，然后倒掉大部分胰酶，利用剩余的少量胰酶再消化一段时间，待细胞间空隙增大，瓶底呈花斑状即可终止。在消化液中应不用 EDTA，EDTA 影响 Annexin V 与 PS 的结合。
- 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：

- 1、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。

【注】：

- 2、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）。
- 3、用 400ul 1X Annexin V 结合液悬浮细胞，浓度大约为 $1-5 \times 10^6$ cells/ml。
- 4、取 100ul 细胞悬浮液中加入 5ul Annexin V-APC 染色液，轻轻混匀后于 2-8°C 避光条件下孵育 5-10 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 1-3 分钟。
- 6、加入 400ul PBS，轻轻混匀。

7、立即用流式细胞仪检测。

【注】:

- 染色完成后要尽快上机检测，因为细胞在 Annexin V 结合缓冲液中存活时间不会太长。

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-APC 的荧光最大激发波长 652nm，最大发射波长 670nm；PI 荧光最大激发波长 535nm，最大发射波长在 620nm。

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/APC，PI。用于调节电压。
- ② 单染管：有明显凋亡的细胞，只加 Annexin V/APC 染色。用于调节补偿。
- ③ 单染管：有明显凋亡的细胞，只加 PI 染色。用于调节补偿
- ④ 检测管：待测的处理细胞，加 Annexin V/APC，PI。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/APC，PI。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/APC，PI。用于调补偿
- ③ 未转染单染管：未转染且有明显凋亡的细胞，只加 Annexin V/APC 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 PI 染色。用于调节补偿
- ⑤ 检测管：待测的处理细胞，加 Annexin V/APC，PI。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。