

## Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒 (20/50/100T)

目录号: ANT001/002/003

规格: 20 /50 /100 Tests

储存: 2-8°C避光保存, 勿冰冻。一年质保。

简介: 正常活细胞的磷脂酰丝氨酸 (phosphatidylserine, PS)只分布在质膜磷脂双分子层的内侧。当细胞开始发生早期凋亡时, 细胞膜脂质的不对称性消失, 导致PS自质膜内层翻转至外层, 从而暴露在细胞表面。Annexin V是一种36 kDa的钙依赖性的磷脂结合蛋白, 对PS有高度的亲和性。因此, 荧光标记的Annexin V可用于检测暴露于早期凋亡细胞表面的PS。当细胞处于中晚期凋亡或发生坏死时, 由于细胞膜的破裂, Annexin V可以进入细胞内部与质膜上的PS结合。因此, 为了区分活细胞、早期凋亡细胞和中晚期凋亡细胞(或坏死细胞), 可通过将荧光标记Annexin V与核酸染料联合使用: 活细胞和早期凋亡细胞的细胞膜仍然完整, 核酸染料无法进入细胞内部与核酸结合, 而中晚期凋亡细胞(或坏死细胞)由于细胞膜的破裂, 核酸染料可进入细胞内部与核酸结合, 通过流式细胞术检测细胞中Annexin V和核酸染料的荧光强度, 可区分活细胞(Annexin V-/核酸染料-)、早期凋亡细胞(Annexin V+/核酸染料-) 与中晚期凋亡细胞 (或坏死细胞) (Annexin V+/核酸染料+)。

### 组份:

Annexin V-FITC: 100µl 250µl 500µl

Binding Buffer (4X): 4ml 10ml 20ml

Propidium Iodide (20µg/ml): 200ul 500ul 1ml

应用: Flow Cytometric Analysis

### 步骤:

使用本试剂盒时, 需自备1×PBS缓冲液。

1. 细胞样品的准备:

#### 对于贴壁细胞:

- 1) 取细胞培养瓶, 用移液器小心地吸取细胞培养液, 转移到一个干净的离心管内备用;
- 2) 用不含EDTA的胰蛋白酶消化细胞, 至细胞可以被移液器轻轻吹打下来时, 加入收集的细胞培养液, 终止消化;
- 3) 用移液器吹打下所有的贴壁细胞, 并轻轻吹散细胞;
- 4) 将细胞收集到离心管内, 1000rpm左右离心5min, 沉淀细胞(根据待测细胞特性, 可适当调整离心时间或离心力);
- 5) 用移液器小心吸除上清, 可保留约50µl左右的培养液, 避免吸走细胞;
- 6) 加入约1ml 4°C预冷的1×PBS缓冲液重悬细胞, 再次离心沉淀细胞, 小心吸除上清;

#### 对于悬浮细胞:

- 1) 将细胞收集到离心管内, 1000rpm左右离心5min, 沉淀细胞(根据待测细胞特性, 可适当调整离心时间或离心力);
  - 2) 用移液器小心吸除上清, 可保留约50µl左右的培养液, 避免吸走细胞;
  - 3) 加入约1ml 4°C预冷的1×PBS缓冲液重悬细胞, 再次离心沉淀细胞, 小心吸除上清;
2. 根据实验用量, 按1:3的比例用去离子水将4×结合缓冲液稀释成1×结合缓冲液, 用于后续

实验:

(e.g. 若需要16ml 1×结合缓冲液, 则取4ml 4×结合缓冲液+12ml去离子水);

3. 用1×结合缓冲液重悬细胞, 将细胞密度调节至 $1-5 \times 10^6/\text{ml}$ ;

4. 取100 $\mu\text{l}$ 的细胞悬液于5ml流式管中, 加入5 $\mu\text{l}$  rh Annexin V FITC, 用移液器轻柔吹吸混匀, 室温避光孵育5min;

5. 加入10 $\mu\text{l}$  PI, 并加400 $\mu\text{l}$  1×PBS缓冲液, 立刻进行流式检测。

**注:** 实验过程中应注意轻柔吹吸细胞, 避免造成细胞机械损伤; 加入步骤5中的PI溶液和1×PBS缓冲液后, 建议立即上机检测, 若无法立即上机, 应将细胞置于4°C条件下避光保存, 并在1h内上机检测, 避免长时间放置导致检测结果不准确。

样本分析: FITC 的最大激发波长是488nm, 最大发射波长是525nm, 建议选择流式细胞仪的FL1通道检测; PI-DNA复合物的最大激发波长是535nm, 最大发射波长为615nm, PI的红色荧光在流式细胞仪的FL2或FL3通道检测。用FlowJo 等软件进行分析, 绘制双色散点图 (two-color dot plot), FITC为横坐标, PI为纵坐标。典型的实验中, 细胞可以分成三个亚群, 活细胞仅有很低强度的背景荧光, 早期凋亡细胞仅有较强的绿色荧光, 晚期凋亡或坏死的细胞有绿色和红色荧光双重染色。

相关产品:

ANT002 Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒 (50T)

ANT003 Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒 (100T)

ANT004 Annexin V-APC细胞凋亡检测试剂盒 (20T)

ANT005 Annexin V-APC细胞凋亡检测试剂盒 (50T)

ANT006 Annexin V-APC细胞凋亡检测试剂盒 (100T)

ANT007 Annexin V-PE细胞凋亡检测试剂盒 (20T)

ANT008 Annexin V-PE 细胞凋亡检测试剂盒 (50T)