

ANNEXIN V-FITC/PI Apoptosis Assay Kit

Catalog# ZP327

试剂盒组成

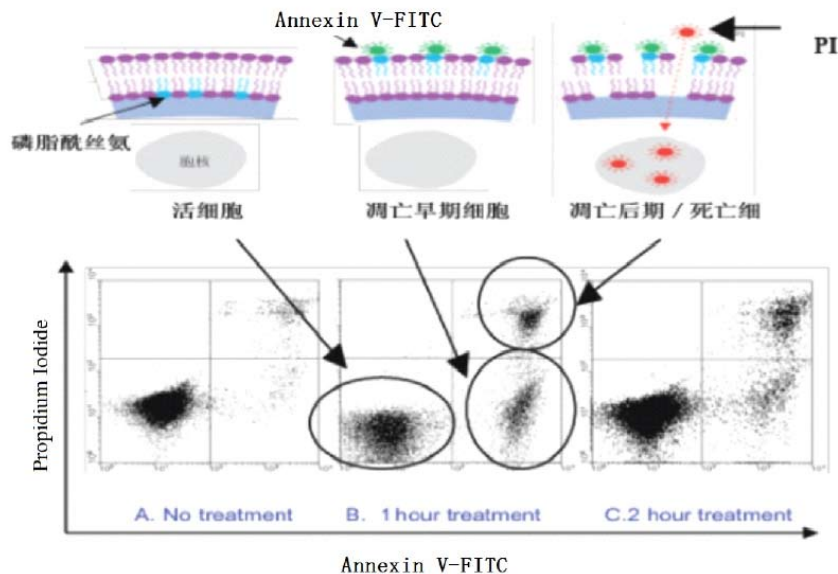
试剂盒组成	50 assays (ZP327-1)
Annexin V-FITC	250ul
10×Binding Buffer	5.5ml
Propidium Iodide(PI)	500ul

Store at 4 C°, 一年有效。

产品介绍:

细胞凋亡 (Apoptosis) 是一种由基因控制的细胞自主死亡方式。它与组织器官的发育, 机体正常生理功能的维持, 某些疾病的发生发展以及细胞癌变过程均有着密切的关系。细胞凋亡已成为生命学科极为活跃的研究领域之一。此外, 介绍几种常用的细胞凋亡检测方式。在细胞凋亡的早期, 细胞膜表面的磷脂酰丝氨酸 (Phosphatidylserine, PS) 将会从细胞膜内侧转移到细胞膜外侧, 使PS充分暴露在细胞膜外表面。Annexin V是一种磷脂结合蛋白, 对PS有高度的亲和力。因此, Annexin V作为一个敏感的探针可以有效地检测暴露在细胞膜表面的PS。目前普遍使用的检测方法是將荧光标记后的Annexin V-FITC作为探针, 利用流式细胞仪来检测细胞凋亡。

值得注意的是, 在细胞坏死的过程中也会发生PS的暴露。但两者的差别在于细胞凋亡的初始阶段细胞膜结构是完好的, 只有PS转移, 而细胞坏死则在早期阶段细胞膜的完整性就破坏了, 从而暴漏出PS。因此, 检测细胞凋亡时, 通常会使用染料碘化丙啶 (Propidium Iodide, PI) 以确立细胞膜的完整性。PI是一种核酸染料, 它可以染色死细胞, 但不能进入完整的活细胞, 从而将凋亡性细胞和坏死性细胞区分开来。



操作步骤:

1、 细胞收集与Annexin V-FITC结合

- (1) 完成细胞凋亡诱导处理后, 300g离心5min, 弃上清, 收集细胞。
(贴壁细胞收集: 先用PBS洗涤贴壁细胞一次, 再用胰酶消化液解离细胞, 300g离心5min, 弃上清, 收集细胞。)
- (2) 用PBS重新悬浮细胞, 并计数。(如用含有EDTA胰酶细胞消化液消化细胞, 建议将收集的细胞用PBS再洗涤一次。)
- (3) 取 $1 \sim 5 \times 10^5$ 细胞悬浮液, 300g离心5min, 弃PBS上清, 收集细胞。加入500ul的 $1 \times$ Binding Buffer。(用蒸馏水1:9稀释 $10 \times$ Binding Buffer)
- (4) 加入5ul Annexin V-FITC, 再加入10ul Propidium Iodide, 轻柔涡旋混匀。
- (5) 在室温下, 避光反应15-20min。
- (6) 反应后立即上机检测。如不能及时检测, 请于冰上避光静置并于1小时内完成检测。

注: 第(3)到(5)步也可以采用减量法操作:

- (3) 取 $1 \sim 5 \times 10^6$ 细胞悬浮液, 300g离心5min, 弃PBS上清, 收集细胞。加入100ul的 $1 \times$ Binding Buffer。(用蒸馏水1:9稀释 $10 \times$ Binding Buffer)
- (4) 加入2.5ul Annexin V-FITC, 再加入5ul Propidium Iodide, 轻柔涡旋混匀。
- (5) 在室温下, 避光反应15-20min。加入400ul的 $1 \times$ Binding Buffer, 混匀样品。

2、 流式细胞仪检测

- a) 取阴性样本(未经药物处理的细胞)进行 Annexin V-FITC 和 PI 双染, 作为阴性对照; 另取阳性样本(毒性药物处理的细胞)分别进行 Annexin V-FITC 和 PI 单染, 作为调节荧光补偿的单阳对照。
- b) 流式细胞仪检测时 Annexin V-FITC 可用 FITC 通道, PI 优先选 PerCP/Cy5.5 通道, 其次是 PE 通道。

3、 荧光显微镜观察

- (1) 如果用于荧光显微镜下检测, 300g离心5min, 收集细胞。用50-100ul $1 \times$ Binding Buffer轻轻重悬细胞。取一滴细胞悬浮液于载玻片上, 盖玻片观察。
- (2) 采用双色滤光片, Annexin V-FITC荧光呈绿色, PI荧光呈红色。

注意事项:

- 1、 如果是贴壁细胞, 也可直接用盖玻片培养和诱导细胞凋亡。
- 2、 Annexin V-FITC 禁止冷冻保存, 每冻融一次会有5-10%的效能下降。
- 3、 Propidium Iodide (PI) 有毒, 需戴手套操作使用。
- 4、 本试剂盒适用范围为动物性细胞或组织。植物细胞组织, 植物性海藻等不建议使用。