

Annexin V/PI 流式细胞凋亡检测试剂盒

使用说明

产品简介

细胞凋亡是细胞的基本特征，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。Annexin V 是检测早期细胞凋亡的最灵敏指标之一。正常细胞中，磷脂酰丝氨酸 (PS) 只分布在细胞膜磷脂双分子层的内侧，而在细胞凋亡早期，细胞质膜内侧的磷脂酰丝氨酸发生外翻，暴露于细胞质膜的外侧。在体内，巨噬细胞可以识别翻转的 PS，从而将这些程序性细胞凋亡的细胞清除，因此凋亡过程中并不伴随局部的炎症反应。Annexin V 是一种分子量为 35-36kD 的与磷脂酰丝氨酸有高度亲和力的 Ca^{2+} 依赖性磷脂结合蛋白，因此能够利用 Annexin V 与细胞外侧暴露的磷脂酰丝氨酸相结合的性质，检测细胞的早期凋亡。将 Annexin V 进行绿色荧光 (FITC) 标记，以标记了的 Annexin V-FITC 作为探针，利用流式细胞仪或荧光显微镜可检测细胞凋亡的发生。碘化丙啶 (PI) 是一种核酸染料，它不能透过具备完整细胞膜的正常细胞和早期凋亡细胞，但能够透过凋亡中晚期的细胞和坏死细胞的细胞膜而将细胞核染色，在特定激发光条件下呈现红色。

将 Annexin V-FITC 与 PI 匹配使用，就可以将处于不同凋亡时期的细胞区分开来。在双变量流式细胞仪的散点图上，若横坐标表示 Annexin V 信号，纵坐标表示 PI 信号，则左下象限 (Annexin V-/PI-) 代表活细胞；右下象限 (Annexin V+ /PI-) 代表早期凋亡细胞；右上象限 (Annexin V+ /PI+) 代表凋亡晚期细胞和坏死细胞；左上象限 (Annexin V-/PI+) 被认为是许可范围内的检测误差。

检测方法

利用流式细胞仪或者荧光显微镜检测悬浮细胞或者贴壁细胞中的绿色荧光信号 (Annexin V-FITC) 以及红色荧光信号 (PI)。

产品特点

该产品能够在极短的时间内方便、快速、准确的区分正常细胞、凋亡细胞和坏死的细胞，并计算各群细胞的比例。

产品组分

编号	组分	C01201-20T	C01201-50T	C01201-100T
C01201-A	Annexin V-FITC 染色液	100 μ l	250 μ l	500 μ l
C01201-B	PI 染色液	200 μ l	500 μ l	1ml
C01201-C	结合缓冲液 (1 \times)	10ml	25ml	50ml

运输及保存方式

蓝冰运输。-20 $^{\circ}$ C避光长期保存，避免反复冻融。如短时间内需多次重复使用，请于4 $^{\circ}$ C避光保存，有效期半年。

使用注意事项

1、螺旋盖微量试剂管装的试剂在开盖前请低速短暂离心，将管内壁上的液体收集至管底，避免开盖时液体洒落造成损失。

2、细胞处理需小心操作，避免人为的损伤细胞。

3、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。

4、Annexin V-FITC 和 PI 是光敏感物质，在操作时应注意避光，尽量减少暴露在光下的时间，必要时请使用带盖子的冰盒或者铝箔纸进行避光操作。

5、使用该试剂盒检测凋亡是针对活细胞，不需要固定细胞，否则会对结果产生干扰。

6、如果细胞样品中含有血小板，请使用含有 EDTA 的缓冲剂并低速离心洗去血小板后再进行检测，因为血小板含有 PS，能够与 Annexin V 结合。

7、对于贴壁细胞，消化是一个关键步骤。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，操作过程中需严格控制胰酶的消化时间，时间过短，细胞需要用力吹打才能够脱落，容易造成细胞膜的损伤，使得 PI 摄入过多；消化时间过长，细胞膜同样会产生损伤，甚至会影响细胞膜上的 PS 与 Annexin V 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解除，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，待细胞空隙增大，瓶底呈花斑状即可终止。

8、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，因为胰酶会消化并降解 Annexin V-FITC，最终导致染色失败；

9、尽量避免在消化液中使用 EDTA 或者 EGTA，因为 EDTA 和 EGTA 会螯合钙离子，而 Annexin V 与 PS 的结合是依赖于钙离子的，因此这两种物质的存在或者残留会影响 Annexin V 与 PS 的结合，进而影响信号的检测。

10、成功的检测凋亡受以下几种因素的影响，如细胞类型、细胞膜上的 PS 的密度、发生凋亡时 PS 翻转的比例、诱导凋亡的方法、所用试剂、诱导凋亡的时间以及实验过程中机械损伤的程度等，把这些因素进行优化对实验成功与否非常重要。请根据实验样本和操作流程对这些步骤进行优化后再进行检测。

实验步骤

1、悬浮细胞：300 g，4°C 离心 5 分钟收集细胞；

贴壁细胞：用不含 EDTA 的胰酶进行消化后，300 g，4°C 离心 5 分钟收集细胞。胰酶的消化时间不宜过长，以防引起假阳性。

2、用预冷的 PBS 溶液洗涤细胞两次，每次均以 300 g，4°C 离心 5 分钟收集细胞，并尽量去除 PBS 溶液。(可以用大 Tip 上套上小 Tip 去尽量去除 PBS 溶液)

3、加入 100 μ l 结合缓冲液重悬细胞。

4、加入 5 μ l Annexin V-FITC 染色液和 10 μ l PI 染色液，轻轻混匀。

5、室温、避光孵育 10-15 分钟。

6、再加入 400 μ l 结合缓冲液，混匀后置于冰上。

7、立即用流式细胞仪或者荧光显微镜进行检测。

样品分析

1、流式细胞仪分析

FITC 的最大激发波长为 488 nm，最大发射波长为 525 nm，FITC 的绿色荧光在 FL1 通道检测；PI-DNA 复合物的最大激发波长为 535 nm，最大发射波长为 615 nm，PI 的红色荧光在 FL2 或 FL3 通道检测。用分析软件绘制双色散点图，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荧光，早期凋亡细胞仅有较强的绿色荧光，晚期凋亡的细胞有绿色和红色荧光的双

重染色。

2、荧光显微镜观察

滴加 30-50 μl 用 Annexin V-FITC/PI 双染色的细胞悬液于载玻片上,并用盖玻片盖上细胞,然后在荧光显微镜下用双色滤光片进行观察。Annexin V-FITC 的荧光信号呈绿色,PI 的荧光信号为红色。因此 Annexin V-FITC 阳性的细胞将在细胞膜表面呈现明亮的绿色,而 PI 阳性的细胞则会在整个胞质内呈现不同强度的黄-红色。早期凋亡的细胞只呈现绿色,而坏死和晚期凋亡细胞则会显示黄-红色的胞质,红色的细胞核以及环绕细胞的绿色的胞膜,在晚期凋亡的细胞中还可以观察到胞膜皱缩和起泡。

【注】:对于贴壁细胞,可直接用盖玻片培养细胞并诱导细胞凋亡,然后染色后将盖玻片置于载玻片上进行荧光显微镜观察即可。

常见问题分析

实验过程中 Annexin V 染不上色或阳性率偏低。

可能的原因如下:

1、确定实验中的诱导剂是否能够有效产生凋亡。可以通过设定确切凋亡诱导的阳性药物对照来排除这一情况。

2、消化液中的胰酶或 EDTA 等是否去除干净,建议使用无 EDTA 的胰酶进行消化,或者消化后用 PBS 彻底洗涤干净。

3、细胞用预冷的 PBS 洗涤后,离心,应尽量吸干残余液体,因为 PBS 中含有的磷酸根离子会与结合缓冲液中的钙离子形成磷酸钙沉淀,进而影响 Annexin V 的染色。

4、结合缓冲液瓶盖需盖紧密封,长时间暴露于空气中后,空气中的二氧化碳会与钙离子形成碳酸钙沉淀,从而导致钙离子浓度降低,导致实验的结果不佳。

5、吸取完 PBS 的枪头如果不更换,继续取结合缓冲液,也会导致结合缓冲液中游离钙离子的减少,导致实验结果不佳。

6、阳性细胞的丢失。如果是贴壁细胞,药物诱导后漂浮细胞也应该和贴壁细胞一起收集后合并检测,漂浮细胞往往是凋亡阳性的细胞,否则丢失漂浮细胞会导致

阳性结果偏低。

实验过程中阳性率偏高。

可能的原因如下：

1、细胞本身活力太差。若实验中发现未经诱导凋亡的对照细胞经染色后 Annexin V+/PI+双阳性的细胞比例过高，可能的原因是细胞本身活力太差，建议用台盼蓝染色计算细胞活力，拒染细胞比例应大于 95%；若活力偏低，建议重新复苏细胞，刚刚复苏的细胞至少要传代 3 次以后才能进行该实验。

2、细胞操作不当。贴壁细胞消化过程中避免反复剧烈吹打导致细胞膜破坏，假阳性偏高。

3、凋亡诱导时间过长。诱导时间过长会使营养物质耗尽，导致细胞状态变差，假阳性偏高。

相关产品列表

产品	货号
EdU 细胞增殖检测试剂盒	C01501、C01502、C01503
CCK8 细胞活力检测试剂盒	C00901、C00902
EU 新生 RNA 检测试剂盒	C01901
流式细胞周期检测试剂盒	C01301、C01302
TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒	C01101、C01102

上海东寰生物科技有限公司

SHANGHAI DONGHUAN BIOTECH CO., LTD

公司网址:www.dhbiotech.com QQ 咨询:3295258699

电话咨询:021-39965016 邮箱:market@dhbiotech.com