

## Annexin V-eGFP/PI Kit 凋亡检测试剂盒

Catalog No.	Size
DW213-100	100 Tests

### 相关介绍:

细胞凋亡早期改变发生在细胞膜表面, 这些细胞膜表面的改变之一是磷脂酰丝氨酸 (PS) 从细胞膜内转移到细胞膜外, 使 PS 暴露在细胞膜外表面。PS 是一种带负电荷的磷脂, 正常主要存在于细胞膜的内面, 在细胞发生凋亡时细胞膜上的这种磷脂分布的不对称性被破坏而使 PS 暴露在细胞膜外。Annexin V 具有易于结合到磷脂类如 PS 的特性, 对 PS 有高度的亲和性。因此, 该蛋白可充当一敏感的探针检测暴露在细胞膜表面的 PS。PS 转移到细胞膜外不是凋亡所独特的, 也可发生在细胞坏死中。两种细胞死亡方式间的差别是在凋亡的初始阶段细胞膜是完好的, 而细胞坏死在其早期阶段细胞膜的完整性就破坏了。因此, 可以采用 Annexin V 与 PI 双染的方法, 通过流式检测细胞早期凋亡。

### 储存条件:

2-8℃ 避光保存, 勿冰冻。

### 注意事项:

本试剂盒需使用流式细胞仪进行检测。

此产品仅供研究, 不用于临床诊断。

### 试剂盒组份:

#### 1. 结合缓冲液 4x (Binding Buffer 4x)

体积: 20 Tests: 4ml (4倍浓缩液)

50 Tests: 10ml (4倍浓缩液)

100 Tests: 20ml (4倍浓缩液)

稀释后溶液中各组分浓度: 10mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 140mM NaCl, 2.5mM CaCl<sub>2</sub>

#### 2. 碘化丙锭溶液 (Propidium Iodide, PI)

体积: 20 Tests: 0.2ml

50 Tests: 0.5ml

100 Tests: 1.0ml

浓度: 20ug/ml

#### 3. 重组人Annexin V/eGFP, (rh Annexin V/eGFP)

来源: 大肠杆菌 (E.coli)

分子量: 35.8 KDa

样品量: 20 Tests: 0.1ml, 可用于20次实验

50 Tests: 0.25ml, 可用于50次实验

100 Tests: 0.5ml, 可用于100次实验

保存方法: 于50mM Tris, 100mM NaCl, 1%BSA, 0.02%NaN<sub>3</sub>, pH7.4 溶液中保存

纯度: SDS-PAGE及反相HPLC表明纯度大于98%

生物活性：Annexin V可结合于磷脂酰丝氨酸并表现出抗磷脂酶活性

## 操作步骤：

### 1. 细胞样品的准备：

a)对于贴壁细胞：小心收集细胞培养液到一离心管内备用。用不含EDTA的胰酶消化细胞，至细胞可以被轻轻用移液管或枪头吹打下来时，加入前面收集的细胞培养液，吹打下所有的贴壁细胞，并轻轻吹散细胞。再次收集到离心管内。1000rpm左右离心5min，沉淀细胞。对于特定的细胞，如果细胞无法完全离心至离心管底，可以适当延长离心时间或稍稍加大离心力。小心吸除上清，可以残留约50 $\mu$ l左右的培养液，以避免吸走细胞。加入约1ml 4 $^{\circ}$ C预冷的PBS，重悬细胞，再次离心沉淀细胞，小心吸除上清。

b)对于悬浮细胞：1000rpm左右离心5min，沉淀细胞。对于特定的细胞，如果细胞无法完全离心至离心管底，可以适当延长离心时间或稍稍加大离心力。小心吸除上清，可以残留约50 $\mu$ l左右的培养液，以避免吸走细胞。加入约1ml 4 $^{\circ}$ C预冷的PBS，重悬细胞，再次离心沉淀细胞，小心吸除上清。

2. 用去离子水按1:3稀释结合缓冲液(4ml 4x结合缓冲液+12ml去离子水)；

3. 用1x结合缓冲液重新悬浮细胞，调节其浓度为 $1-5 \times 10^6$ /ml；

4. 取100 $\mu$ l的细胞悬液于5ml流式管中，加入5 $\mu$ l Annexin V/eGFP混匀后于室温避光孵育5分钟；

5. 加入10 $\mu$ l 20ug/ml的碘化丙锭溶液(PI)，并加400 $\mu$ l PBS，立刻进行流式检测。

## 实验设计：

空白管：阴性对照组细胞，不加Annexin V/eGFP，碘化丙锭溶液(PI)。用于调节电压

单染管：阳性对照组细胞，只加Annexin V/eGFP。用于调节补偿

检测管：处理的细胞，加 Annexin V/eGFP，碘化丙锭溶液(PI)。用空白管和单染管调节好电压补偿后，获得所需要的流式数据。

## 常见问题：

1、Annexin V/ PI 凋亡检测的试剂盒能否检测人以外其他动物的细胞凋亡情况？

可以。因为 Annexin V 是与磷脂酰丝氨酸(PS)亲和，而 PS 在不同种属间没差异。在正常细胞中，PS 只分布在细胞膜脂质双层的内侧，而在细胞凋亡早期，PS 由脂膜内侧翻向外侧。

2、贴壁细胞做凋亡用胰酶消化下来对细胞膜损伤？

低浓度胰酶消化，轻柔吹打贴壁细胞 2~3 次，离心机 4 $^{\circ}$ C 1000rpm 5min 离心，处理得当的话，胰酶造成损伤可以控制在 5%以内，有对照组的情况下对实验结果不会造成明显影响。

3、贴壁细胞可以先染 PI 然后再消化下来吗？这样是否可以减小由于消化液造成的细胞膜破损而染上的 PI 的误差？

先加 PI 不仅染色是否每组都均匀充分很难判断，而且 PI 本身对细胞也是有毒性的，对实验结果影响会比胰酶大，不建议这样做。

4、为什么只能用不含 EDTA 的胰酶消化贴壁细胞，用含 EDTA 的胰酶消化细胞对结果有什么影响？

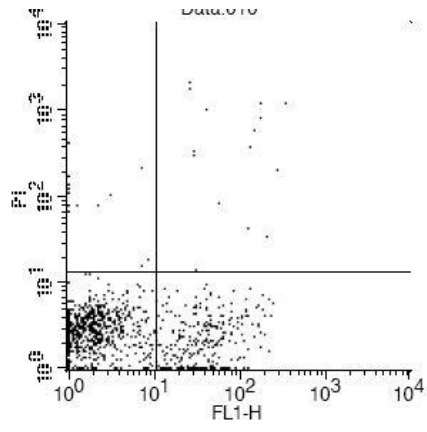
因为 Annexin V 是 Ca 依赖的蛋白，所以不能加入 EDTA，防止 EDTA 螯合了 Ca 离子从而影响 Annexin V，进而影响结果。

5、有些厂家说明书 Annexin V 和 PI 一起加？为什么你们先加 Annexin V 后加 PI？

用流式检测凋亡时，PI 受时间的影响很大，因标记了 PI 后会加大细胞毒性，随着时间延长会导致 PI 的染色增加，特别是检测早期凋亡时，如果时间延长除了会导致在流式细胞仪上的细胞分群差距加大外，误差会明显加大。一般 PI 加上后立刻上机，然后在一个小时內检测完成。两种方法都可以，但是按照我们操作步骤造成的误差会更小。

6、你们哪种凋亡检测试剂盒能用于转染 GFP 细胞的凋亡检测？

## 实验参考图



Jurkat 细胞用紫外诱导凋亡后用 Annexin V-eGFP/PI 双染流式分析图谱