

Annexin V-FITC/PI Kit凋亡检测试剂盒

Catalog No.	Size
DW210-100	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。

有效期: 一年

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 CaCl₂

2. 碘化丙啶溶液 (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/FITC, (rh Annexin V/FITC)

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%NaN₃, 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50μl左右的培养液, 以避免吸走细胞。加入约1ml 4℃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50μl左右的培养液, 以避免吸走细胞。加入约1ml 4℃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100μl的细胞悬液于5ml流式管中, 加入5μl Annexin V/FITC混匀后于室温避光孵育5分钟;

5. 加入10μl 20ug/ml的碘化丙锭溶液(PI), 并加400μl 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/FITC, 碘化丙锭溶液(PI), 用于调节电压。

单染管1: 阳性对照组细胞, 只加碘化丙锭溶液(PI), 用于调节补偿。

单染管2: 阳性对照组细胞, 只加Annexin V/FITC, 用于调节补偿。

检测管: 处理的细胞, 加 Annexin V/FITC, 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。

样本分析:

1 流式细胞仪分析: FITC 的最大激发波长是 488nm, 最大发射波长是 525nm, 建议选择 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 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。

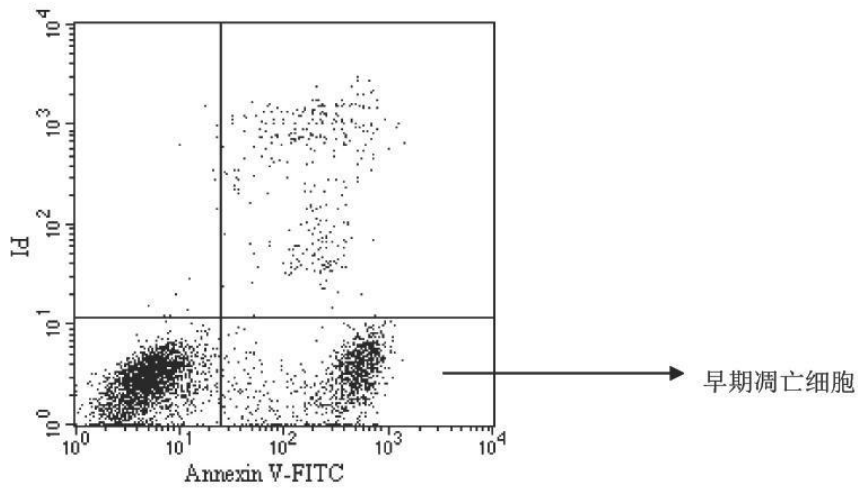
2 荧光显微镜观察:

a) 滴一滴滴用 Annexin V-FITC/PI 双染的细胞悬液于载玻片上, 并用盖玻片盖上细胞。

b) 在荧光显微镜下用双色滤光片观察。Annexin V-FITC 荧光信号呈绿色, PI 荧光信号呈红色。

【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。

实验参考图



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

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℃ 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，然后在一个小时以内检测完成。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。