

## Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒

### 产品简介:

细胞凋亡是细胞的基本特征之一，它在机体的胚胎发育、组织修复、内环境的稳定等方面起着十分重要的作用。在正常细胞中，磷脂酰丝氨酸 (PS) 只分布在细胞膜脂质双层的内侧，而在细胞凋亡早期，细胞膜中的磷脂酰丝氨酸 (PS) 由脂膜内侧翻向外侧。Annexin V 是一种分子量为 35-36kD 的  $Ca^{2+}$  依赖性磷脂结合蛋白，能与细胞凋亡过程中翻转到膜外的 PS 高亲和力特异性结合。

用标记了 FITC 的 Annexin V 作为荧光探针，利用流式细胞仪或荧光显微镜可检测细胞凋亡的发生，正常细胞和早期凋亡细胞的细胞膜是完整的。Propidium iodide (PI) 是一种核酸染料，它不能透过完整的细胞膜，但在凋亡中晚期的细胞和死细胞，PI 能够透过细胞膜与细胞核结合呈现红色。将 Annexin V 与 PI 匹配使用，可以将凋亡早期的细胞和晚期的细胞以及死细胞区分开来。

### 产品组成:

产品编号	401001	401002	401003	401004
规格	20 assays	50 assays	100 assays	400 assays
Annexin V-FITC	100 $\mu$ L	250 $\mu$ L	500 $\mu$ L	2 mL
Propidium Iodide	200 $\mu$ L	500 $\mu$ L	1 mL	4 mL
1X Binding Buffer	8 mL	20 mL	40mL	160mL

### 使用方法:

1. 离心收集悬浮细胞，微量离心机转速 2000RPM，离心时间 5min，弃培养基。
2. 用冷 PBS 洗涤细胞两次。
3. 用 400 $\mu$ l 1X Binding Buffer 悬浮细胞，浓度大约为  $1 \times 10^6$  cells/ml。
4. 在细胞悬浮液中加入 5 $\mu$ l Annexin V-FITC，轻轻混匀后于 2-8 $^{\circ}$ C 避光条件下孵育 15 分钟。
5. 加入 10 $\mu$ l PI 后轻轻混匀于 2-8 $^{\circ}$ C 避光条件下孵育 5 分钟。
6. 在 1 小时内用流式细胞仪或荧光显微镜检测。

### 流式细胞仪分析:

经处理过的细胞此时可以在流式细胞仪上分析。

使用流式细胞仪正确分析 Annexin V-FITC/PI 双染的细胞前要求仪器的荧光补偿来去除两种染料激发光之间的叠加。因为荧光补偿设置与 PMT 的电压直接相关，所以不同仪器之间的补偿不同。建议在实验开始阶段分析经 Annexin V、PI 分别单染的细胞来调整荧光补偿去除光谱重叠。根据未处理细胞空白对照和经 Annexin V、PI 分别细胞染色后的单染对照的分析设定十字门的位置。

1. 上样未经染色的细胞，在线性 FS-SS 点图上显示细胞并设门圈出目标细胞群体。
2. 建立 LogFL1-LogFL2 (最好用 FL3) 双参数点图并分析以上光散射图中设门的细胞；保证 >98% 的细胞处于在 X、Y 轴 Log 1 为边界的左下象限中心区域。
3. 检测 annexin V-FITC 单染的细胞并检查 FL1-FL2 (或 FL3) 散点图，保证在左上和右上象限内没有颗粒。如果有颗粒出现在上端象限则说明有荧光渗漏；此时 FL1 的荧光被 FL2 (或 FL3) PMT 检测到了。为了纠正这种现象，增加 FL1 漏到 FL2 (或 FL3) 荧光的补偿% (这可能在 1-5% 之间)。如果这个调节没有有效地去除 FL2 的阳性信号，此时要降低 FL2 (或 FL3) PMT 的电压。

4. 检测 PI 单染的细胞并检查 FL1-FL2 (或 FL3) 散点图, 保证在右上和右下象限内没有颗粒。如果有颗粒出现在右侧象限则说明有荧光渗漏; 此时 PI 的荧光被 FL1 PMT 检测到了。为了纠正这种现象, 增加 FL2 (或 FL3) 漏到 FL1 荧光的补偿% (这可能在 15-25%之间)。如果这个调节没有有效地去除 FL1 的阳性信号, 此时要降低 FL1 PMT 的电压。

注: 如果在以上调节补偿过程中更改了 PMT 的电压, 建议重复 3、4 步骤, 确保不引起过度荧光补偿。过度补偿可以从阳性细胞十分贴近从标这一现象观察出来。一个恰当的补偿应该是单阳性细胞荧光强度与落在左下 Log 1 为边界象限中间阴性细胞的荧光强度一致。

5. 设定十字门的位置, FL1 和 FL2 (或 FL3) 的划定方法如下:
  - 5.1 设定 FL1 标尺位置: 处于左下象限内的大群细胞是 Annexin V 染色阴性的细胞(一般这些细胞会在 FL1 轴方向上升至 2 个对数坐标值)。将垂直的 FL1 标尺设定在紧靠 Annexin V 阴性群体右侧 0.1-0.2Log 单位的地方。
  - 5.2 设定 FL2 (或 FL3) 标尺位置: 可以通过一定数据的双阳性细胞来区分 PI+和 PI-的细胞群体。在此条件下可能会识别出两群细胞, 一是位于散点图的右下方 (ANN+/PI-) 还有就是右上方 (ANN+/PI+)。水平线可以置于这两群细胞的中间。如果在分析的细胞群体中没有 PI+细胞, 区分 PI+细胞最好是参照双阴性细胞群体, 将水平线设在双阴性细胞以上 0.1-0.3 Log 单位的地方。

注: 在阴性群体门以外的细胞可被识为 Annexin V 或 Annexin V 和 PI 阳性的细胞。

#### 荧光显微镜观察:

1. 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。

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。
2. 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。

#### 储存条件:

2-8℃保存。

#### 有效期:

一年。

#### 注意事项:

1. 旋帽离心管装的试剂在开盖前请短暂离心, 将盖内壁上的液体甩至管底, 避免开盖时液体洒落。
2. 细胞处理需要小心操作, 尽量避免人为的损伤细胞。
3. Annexin V-FITC 和 Propidium iodide 是光敏物质, 在操作时请注意避光。
4. 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 PS 的密度、发生凋亡时 PS 翻转的比例、诱导细胞凋亡的方法、所用试剂、诱导凋亡的时间等, 把这些影响因素进行优化对实验成功与否至关重要。