

## Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒

**产品货号： BA00101**

**产品规格： 100T**

**产品介绍：**磷脂酰丝氨酸（PS）是一种带负电荷的磷脂，正常细胞中，PS 只分布在细胞膜脂质双层内侧，而在细胞凋亡早期，细胞膜 PS 由脂膜内侧翻向细胞膜外侧，使 PS 暴露在细胞膜外表面。Annexin V 是一种分子量为 35~36kD 的  $Ca^{2+}$  依赖性磷脂结合蛋白，与磷脂酰丝氨酸有高度亲和力，故可通过细胞外侧暴露的磷脂酰丝氨酸与凋亡早期细胞的胞膜结合。因此 Annexin V 被公认为检测细胞早期凋亡的灵敏指标之一。

将 Annexin V 进行 FITC 标记，以标记了的 Annexin V 作为探针，利用荧光显微镜或流式细胞仪可检测细胞凋亡的发生。碘化丙啶（Propidium Iodide, PI）是一种核酸染料，它不能透过正常细胞或早期凋亡细胞完整的细胞膜，但对凋亡中晚期的细胞和坏死细胞，PI 能够透过细胞膜而使细胞核染红。因此采用 Annexin V 与 PI 双染的方法，就可以将处于不同凋亡时期的细胞区分开来。

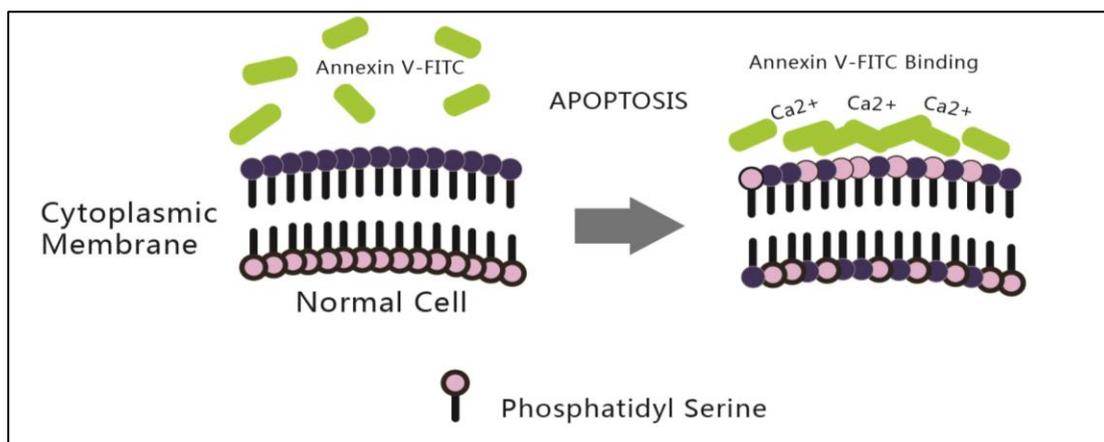


图 1. 细胞凋亡过程中磷脂酰丝氨酸（PS）外翻示意图

### 试剂盒组份：

组份	20T	50T	100T
Annexin V-FITC	100 $\mu$ l	250 $\mu$ l	500 $\mu$ l
Propidium Iodide, PI	100 $\mu$ l	250 $\mu$ l	500 $\mu$ l
Binding Buffer ( 10 $\times$ )	2 ml	3 ml	6 ml

### 所需实验器材和试剂：

1. 胰酶（不含 EDTA）
2. PBS
3. 微量移液器
4. 低速离心机
5. 流式细胞仪

## 操作说明：

### 1. 样品染色

(1). 悬浮细胞：300g，4℃离心 5min 收集细胞。

贴壁细胞：用不含 EDTA 的胰酶消化后，300g，4℃离心 5min 收集细胞。胰酶消化时间不宜过长，以防引起假阳性。

(2). 用预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次，每次均需 300g，4℃离心 5min，收集  $1\sim 5\times 10^5$  个细胞。

(3). 吸弃 PBS，加入 100 $\mu$ l 1 $\times$ Binding Buffer（双蒸水稀释）重悬细胞。

(4). 加入 5 $\mu$ l Annexin V-FITC 和 5 $\mu$ l PI Staining Solution，轻轻混匀。

(5). 室温避光孵育 10-15min。

(6). 加入 400 $\mu$ l 1 $\times$ Binding Buffer，混匀后放置于冰上，样品 1 小时内用流式细胞仪或荧光显微镜检测。

### 2. 样品分析

#### A. 流式细胞仪分析：

FITC 最大激发波长为 488nm，最大发射波长 525nm；PI-DNA 复合物的最大激发波长为 535nm，最大发射波长为 615nm。用 CellQuest 等软件进行分析，绘制散点图，FITC 为横坐标，PI 为纵坐标。典型实验中的细胞可以分成三个亚群，活细胞仅有很低强度的自发荧光，早期凋亡细胞仅有较强的绿色荧光，晚期凋亡细胞有绿色及红色荧光双重染色。

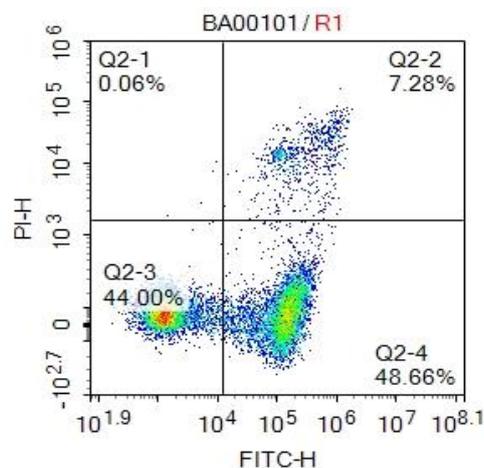


图 2. 流式细胞仪检测早期凋亡细胞。在双变量流式细胞仪的散点图上，左下象限显示活细胞，右下象限为早期凋亡细胞，右上象限是凋亡晚期细胞和坏死细胞。

#### B. 荧光显微镜分析：

(1). 悬浮细胞：滴一滴滴用 AnnexinV-FITC/PI 双染的细胞悬液于载玻片上，并用盖玻片盖上细胞。

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。早期凋亡细胞仅有绿色荧光信号，晚期凋亡细胞有绿色及红色荧光双重染色。

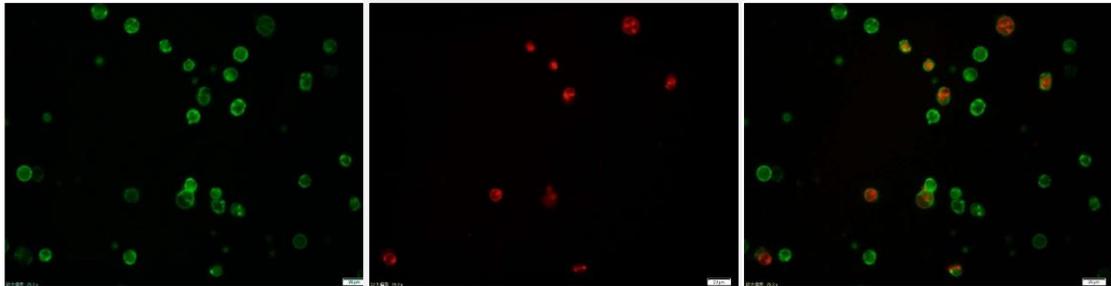


图 3. 荧光显微镜检测凋亡细胞，绿色荧光为 Annexin V-FITC 染色细胞，红色荧光为 PI 染色细胞，被绿色和红色荧光双染的是晚期凋亡或坏死细胞。

#### 注意事项：

1. 此试剂盒仅供研究使用。
2. 微量试剂需离心数秒将试剂收集至管底后再开盖取用。
3. Propidium Iodide (PI) 有毒，操作时要带手套，使用时避免与皮肤，眼睛和黏膜接触。
4. Annexin V-FITC中含有毒性成分叠氮化钠 (NaN<sub>3</sub>)，操作时要带手套，使用时避免与皮肤，眼睛和黏膜接触。
5. 本试剂盒用于检测活细胞，流式细胞仪检测时，细胞数量不应低于 $1 \times 10^5$ 个。
6. 染色后宜尽快检测，时间过长可能会导致凋亡或坏死细胞的数量增加。
7. 对于贴壁细胞，由于胰酶消化会造成细胞膜的损伤，从而导致较高的假阳性；用细胞刮会造成细胞粘连成团，从而影响检测。
8. 细胞固定后可能导致荧光的淬灭，请不要固定样品。

#### 运输与保存方法

冰袋运输，如需在短时间内多次重复使用，可4℃避光保存，一年有效。

#### 参考文献

1. Wu XX, Sun Y, Zhou XB, Zhang J, Yu BY, Xu Q. Effect of Bufotalin on the Apoptosis of BGC-823 Cells. *Chinese medicine and clinical pharmacology of new drugs*. 2007 March, Vol. 18 No. 2.
2. Yang L, Zhou X, Yang J, Yin X, Han L, Zhao D. Aspirin inhibits cytotoxicity of prion peptide PrP106-126 to neuronal cells associated with microglia activation in Vitro. *J Neuroimmunol*. 2008 Aug 13;199(1-2):10-7.
3. Gao C, Jiang Y, Tan C, Zu X, Liu H, Cao D. Synthesis and potent antileukemic activities of 10-benzyl-9(10H)-acridinones. *Bioorg Med Chem*. 2008 Sep 15;16(18):8670-5. Epub 2008 Aug 5.
4. Wang LM, Li QY, Zu YG, Fu YJ, Chen LY, LV HY, Yao LP, Jiang SG. Anti-proliferative and pro-apoptotic effect of CPT13, a novel camptothecin analog, on human colon cancer HCT8 cell line. *Chem Biol Interact*. 2008 Nov 25;176(2-3):165-72. Epub 2008 Jul 30.
5. Wang L, Li Z, Wang C, Yang Y, Sun L, Yao W, Cai X, Wu G, Zhou F, Zha X. E-cadherin decreased human breast cancer cells sensitivity to staurosporine by up-regulating Bcl-2 expression. *Arch*

*Biochem Biophys.* 2009 Jan 1;481(1):116-22. *Epub* 2008 Nov 1.

6. Yan HL, Xue G, Mei Q, Wang YZ, Ding FX, Liu MF, Lu MH, Tang Y, Yu HY, Sun SH. Repression of the miR-17-92 cluster by p53 has an important function in hypoxia-induced apoptosis. *EMBO J.* 2009 Sep 16;28(18):2719-32. *Epub* 2009 Aug 20.
7. Ji YB, Qu ZY, Zou X. Juglone-induced apoptosis in human gastric cancer SGC-7901 cells Via the mitochondrial pathway. *Exp Toxicol Pathol.* 2009 Oct 6.

**相关细胞凋亡检测产品：**

产品编号	产品名称	应用
BA00101	AnnexinV-FITC/PI Apoptosis assay Kit	FC
BA00102	AnnexinV-Alexa Fluor488/PI Apoptosis assay Kit	FC
BA00103	AnnexinV-Alexa Fluor647/PI Apoptosis assay Kit	FC
BA00204	Cell Cycle Analysis Kit	FC
BA00205	Cell Cycle Analysis Kit (with RNase)	FC
BA00206	Annexin V-eGFP/PI Apoptosis assay Kit	FC
BA00207	Annexin V-PE/7-AAD Apoptosis assay Kit	FC