Annexin V-Alexa Fluor 488/PI 凋亡检测试剂盒

Catalog No.	Size
FXP022Pro-020	20 Tests
FXP022Pro-050	50 Tests
FXP022Pro-100	100 Tests

检测原理:

正常活细胞的磷脂酰丝氨酸 (phosphatidylserine, PS)只分布在质膜磷脂双分子层的内侧。当细胞开始发生早期凋亡时，细胞膜脂质的不对称性消失，导致PS自质膜内层翻转至外层，从而暴露在细胞表面。Annexin V是一种36 kDa的钙依赖性的磷脂结合蛋白，对PS有高度的亲和性。因此，荧光标记的Annexin V可用于检测暴露于早期凋亡细胞表面的PS。

当细胞处于中晚期凋亡或发生坏死时，由于细胞膜的破裂，Annexin V可以进入细胞内部与质膜上的PS结合。因此，为了区分活细胞、早期凋亡细胞和中晚期凋亡细胞(或坏死细胞)，可通过将荧光标记Annexin V与核酸染料联合使用：活细胞和早期凋亡细胞的细胞膜仍然完整，核酸染料无法进入细胞内部与核酸结合，而中晚期凋亡细胞(或坏死细胞)由于细胞膜的破裂，核酸染料可进入细胞内部而核酸结合，通过流式细胞术检测细胞中Annexin V和核酸染料的荧光强度，可区分活细胞(Annexin V-/核酸染料-)、早期凋亡细胞(Annexin V+/核酸染料-) 与中晚期凋亡细胞（或坏死细胞）(Annexin V+/核酸染料+)。

储存条件:

2-8℃避光保存，勿冰冻。

有 效 期:

1年。

产品特点:

本试剂盒含有凋亡阳性诱导剂，凋亡诱导剂可以诱导细胞到凋亡状态，作为凋亡阳性细胞对照。15分钟即可染色，方便快捷，分群清晰，结果可靠。

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:

组分	浓度	20 Tests	50 Tests	100 Tests
4×结合缓冲液 (Binding Buffer 4x)	/	4ml	10ml	20ml
碘化丙锭溶液 (Propidium Iodide, PI)	20ug/ml	0.2ml	0.5ml	1.0ml
重组人Annexin V Alexa Fluor 488 (rh Annexin V Alexa Fluor 488)	/	0.1ml	0.25ml	0.5ml

凋亡阳性诱导剂	/	2ml	5ml	10ml

操作步骤：

1. 细胞样品的准备：

对于贴壁细胞：

1) 取细胞培养瓶，用移液器小心地吸取细胞培养液，转移到一个干净的离心管内备用；
2) 用不含EDTA的胰蛋白酶消化细胞，至细胞可以被移液器轻轻吹打下来时，加入收集的细胞培养液，终止消化；
3) 用移液器吹打下所有的贴壁细胞，并轻轻吹散细胞；
4) 将细胞收集到离心管内，1000rpm左右离心5min，沉淀细胞(根据待测细胞特性，可适当调整离心时间或离心力)；
5) 用移液器小心吸除上清，可保留约50μl左右的培养液，避免吸走细胞；
6) 加入约1ml 4℃预冷的1×PBS缓冲液重悬细胞，再次离心沉淀细胞，小心吸除上清；

对于悬浮细胞：

1) 将细胞收集到离心管内，1000rpm左右离心5min，沉淀细胞(根据待测细胞特性，可适当调整离心时间或离心力)；
2) 用移液器小心吸除上清，可保留约50μl左右的培养液，避免吸走细胞；
3) 加入约1ml 4℃预冷的1×PBS缓冲液重悬细胞，再次离心沉淀细胞，小心吸除上清；

2. 根据实验用量，按1:3的比例用去离子水将4×结合缓冲液稀释成1×结合缓冲液，用于后续实验；
   (e.g. 若需要16ml 1×结合缓冲液，则取4ml 4×结合缓冲液+12ml去离子水)；
3. 用1×结合缓冲液重悬细胞，将细胞密度调节至1-5×10^6/ml；
4. 诱导凋亡细胞制备：
   1) 取细胞悬液，1000rpm左右离心5min，小心吸除上清；
   2) 加入500ul凋亡阳性诱导剂重悬细胞，室温孵育15分钟后；
   3) 加入约1ml 1×PBS缓冲液重悬细胞，1000rpm左右离心5min，小心吸除上清；
   4) 用1×结合缓冲液重新悬浮细胞，调节其浓度为1-5×10^6/ml；
   5) 将经凋亡诱导的细胞与未经凋亡诱导的细胞按1:1比例混匀，用于空白管和单染管的检测；
5. 取100μl的细胞悬液于5ml流式管中，加入5μl rh Annexin V Alexa Fluor 488，用移液器轻柔吹吸混匀，室温避光孵育5min；
6. 加入10μl PI，并加400μl 1×PBS缓冲液，立刻进行流式检测。

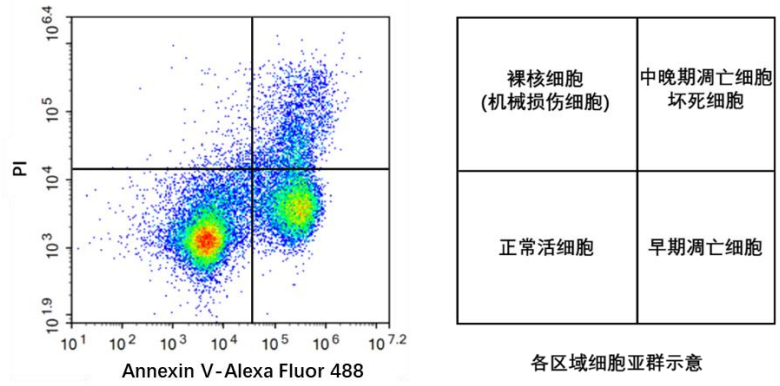
注：实验过程中应注意轻柔吹吸细胞，避免造成细胞机械损伤；加入步骤5中的PI溶液和1×PBS缓冲液后，建议立即上机检测，若无法立即上机，应将细胞置于4℃条件下避光保存，并在1h内上机检测，避免长时间放置导致检测结果不准确。

实验设计：

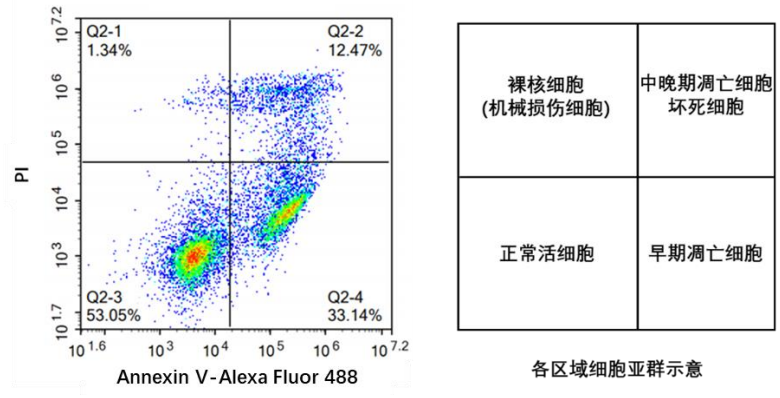
流式管设置	待测细胞	样本要求	rh Annexin V Alexa Fluor 488	PI	用途
空白管	100ul	凋亡细胞+活细胞	-	-	流式细胞仪参数调节
PI 单染管	100ul	凋亡细胞+活细胞	-	10ul	电压及荧光补偿调节
Annexin V 单染管	100ul	凋亡细胞+活细胞	5ul	-	电压及荧光补偿调节
检测管	100ul	依据实验设计处理	5ul	10ul	正式检测

样本分析：

Alexa Fluor 488 的最大激发波长是 488nm，最大发射波长是 519nm，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），Alexa Fluor488 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。



Jurkat 细胞用紫外诱导凋亡后用 Annexin V Alexa Fluor 488/PI 双染流式分析图谱



凋亡阳性诱导剂诱导凋亡 Jurkat 细胞与未处理 Jurkat 细胞 1:1 混合后 Annexin V Alexa Fluor 488/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 离心 5min，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？

先染 PI 可能会导致两个问题：1、不易判断每组 PI 是否染色均匀，2、PI 对细胞有毒性，对实验结果影响比胰酶消化更大。因此不建议先染 PI。

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，若加入 EDTA，ETDA 会螯合 Ca^{2+}离子，从而影响 Annexin V 与 PS 的结合，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，在一个小时内检测完成。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。

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？

FXP147 Annexin V- Alexa Fluor 647/7AAD 凋亡检测试剂盒

FXP023 Annexin V-Alexa Fluor 647/PI 凋亡检测试剂盒

FXP027 Annexin V- PE/7AAD 凋亡检测试剂盒

相关产品

Catalog No.	Product Name	Applications
FXP018	AnnexinV-FITC /PI 凋亡检测试剂盒	FC
FXP023	AnnexinV-Alexa Fluor647/PI 凋亡检测试剂盒	FC
FXP025	AnnexinV-eGFP/PI 凋亡检测试剂盒	FC
FXP027	Annexin V-PE/7-AAD 凋亡检测试剂盒	FC
FXP145	AnnexinV-FITC/7-AAD 凋亡检测试剂盒	FC
FXP146	AnnexinV-Alexa Fluor 488/7-AAD 凋亡检测试剂盒	FC
FXP147	AnnexinV-Alexa Fluor 647/7-AAD 凋亡检测试剂盒	FC
FXP127	Camptothecin(5mM)	细胞凋亡诱导剂
FXP128	Cisplatin(10mM)	细胞凋亡诱导剂
FXP129	CCCP (50mM)	细胞凋亡诱导剂
FXP130	Cycloheximide(10mM)	细胞凋亡诱导剂
FXP131	Etoposide(10mM)	细胞凋亡诱导剂