



Annexin V-EGFP细胞凋亡检测试剂盒 (Annexin V-EGFP Apoptosis Detection Kit)

产品说明:

凋亡是一种程序性的细胞死亡，与细胞的坏死有生化 and 形态等方面的不同。磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)是细胞膜的一种组成成分，在正常细胞主要分布在细胞膜内侧；细胞发生凋亡的早期，PS会外翻到细胞表面，即细胞膜外侧。Annexin V对PS有高度的亲和力，可以选择性结合和标记PS。本试剂盒采用重组人Annexin V-EGFP融合蛋白，来检测细胞凋亡时出现在细胞膜表面的PS，标识出凋亡细胞。由于坏死细胞和凋亡晚期细胞，其膜内侧的PS也可以被Annexin V结合，通常用另一种活细胞非透过性荧光染料碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)进行双重染色，以区别凋亡早期细胞与坏死细胞和凋亡晚期的细胞。用Annexin V-EGFP和PI染色后，正常的活细胞不被Annexin V-EGFP和PI着色；凋亡早期的细胞仅被Annexin V-EGFP着色，PI染色呈阴性；坏死细胞和凋亡晚期的细胞可以同时被Annexin V-EGFP和PI着色。用流式细胞仪或荧光显微镜直接观察PS外翻这一细胞凋亡的重要特征，是一种快速简便的细胞凋亡经典检测方法。

产品内容与储存方法:

名称	数量	保存条件
Annexin V-EGFP	40/100 μ l	4 $^{\circ}$ C
Propidium Iodide (PI)	10/25 μ l	4 $^{\circ}$ C
4x Annexin V Binding Buffer (结合液)	5/15 ml	4 $^{\circ}$ C

试剂盒可作20/50次检测。常温运输，4 $^{\circ}$ C避光保存。有效期6个月。

操作方法:

染色液的配制:

- 1) 取适量4x Annexin V结合液，用双蒸水稀释至1xAnnexin V结合液。后续工作均使用1x Annexin V结合液。
- 2) 将20 μ l Annexin V-EGFP加入1 ml Annexin V结合缓冲液中，即配成10次测试的Annexin V染色液。
- 3) 将5 μ l PI加入5 ml Annexin V结合缓冲液中，即配成10次测试的PI染色液。

荧光显微照相操作方法:

- 1) 培养细胞用所需方法处理以诱导凋亡。应同时设置阴性对照。
- 2) 对贴壁生长细胞，离心收取培养液内的悬浮细胞，并用胰酶消化贴壁细胞，合并两部分细胞悬液；对悬浮生长细胞，直接收集细胞。用冰冷PBS洗涤细胞后，1000g离心5 min，弃上清，加入100 μ l Annexin V染色液轻轻重悬细胞。室温(20-25 $^{\circ}$ C)放置，孵育10~15 min。再加入PI染色液0.5 ml混匀。室温孵育5 min
- 3) 完成孵育后，1000g离心5 min，弃上清，轻轻重悬细胞于50~100 μ l Annexin V结合缓冲液中；取25-50 μ l细胞悬液滴到一张显微载玻片上，再盖上一张盖玻片。

- 4) 荧光显微镜下,用蓝光激发,观察和拍摄细胞红色发射图像。结合Annexin V-EGFP的凋亡细胞的质膜将显示绿色光圈;膜结构不完整的坏死细胞和晚期凋亡细胞在整个核区被PI染成红色而质膜为Annexin V-EGFP阳性呈现为绿色光圈。
- 5) 培养于48孔板或96孔板内的贴壁细胞,也可进行原位染色。在凋亡诱导结束后,用冰冷PBS轻轻洗涤细胞,完全去除PBS,加入100 μ l Annexin V染色液,室温孵育10~15 min;吸除染色液,加入PI染色液0.5 ml混匀。室温孵育5 min。立即在倒置荧光显微镜下观察。

流式细胞分析操作方法:

- 1) 培养细胞用所需方法处理以诱导凋亡。应同时设置阴性对照。
- 2) 对贴壁生长细胞,用胰酶消化制备成单细胞悬液;对悬浮生长细胞,直接收集细胞。用冰冷PBS洗涤细胞后,取5~10万重悬的细胞,1000g离心5 min,弃上清,加入100 μ l Annexin V染色液轻轻重悬细胞。室温(20-25 $^{\circ}$ C)放置,孵育10~15 min。
- 3) 再加入PI染色液0.5 ml混匀。室温孵育5 min。
- 4) 完成孵育后,立即进行流式细胞分析。采用488 nm双波长激发,测定~510 nm和>575 nm的发射,细胞应可分成三个亚群:活细胞仅有很低的荧光强度,凋亡细胞有较强的绿色荧光,坏死细胞(包括极晚期凋亡细胞)有绿色和红色荧光双重染色。

注意事项:

- 1) 该试剂盒只能检测活细胞,而不能用于切片、擦刮、固定或浸润细胞样品的检测。如需对活细胞固定进行其它检测,可在本试剂盒标记完成后,用Annexin V结合缓冲液清洗细胞,再固定进行后续操作。
- 2) 细胞凋亡是一种持续变化的动态过程,选择合适的诱导时间对观察凋亡比较重要。
- 3) Annexin V和PI染色的活细胞应尽快检测。
- 4) 微生物污染的细胞样品或试剂可导致错误的观察结果。