

Annexin V-Alexa Fluor 488/PI Kit 凋亡检测试剂盒

Catalog No.	Size
FXP022-100	100 Tests
FXP022-050	50 Tests
FXP022-020	20 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. 碘化丙锭溶液 (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/Alexa Fluor 488, (rh Annexin V/Alexa Fluor 488)

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/Alexa Fluor 488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/Alexa Fluor 488，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Annexin V/Alexa Fluor 488，用于调节补偿。

单染管2：阳性对照组细胞，只加碘化丙锭溶液(PI)，用于调节补偿。

检测管：处理的细胞，加 Annexin V/Alexa Fluor 488，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：Alexa Fluor 488 的最大激发波长是 495nm，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。

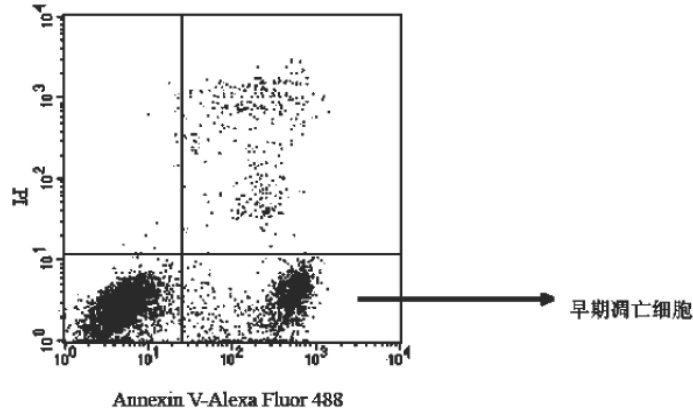
2 荧光显微镜观察：

a)滴一滴用 Annexin V-Alexa Fluor488/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-Alexa Fluor 488 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-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 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，然后在一个小时內检测完成。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。

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/7AAD 凋亡检测试剂盒	FC

4A Biotech Co., Ltd.

Add: No. Room 103/105, Building 1, No. 20 Kechuang 14th Street, Beijing Economic and technological Development Zone, Beijing, 10111
Website: www.4abio.com Toll Free (China only): 400-7060-959 Technical support: tech@4abio.com

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

4A Biotech Co., Ltd.

Add: No. Room 103/105, Building 1, No. 20 Kechuang 14th Street, Beijing Economic and technological Development Zone, Beijing, 10111
Website: www.4abio.com Toll Free (China only): 400-7060-959 Technical support: tech@4abio.com