

## Annexin V-FITC/PI Apoptosis Detection Kit

### Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒

产品编号: MA0220 规格: 10T/ 50T/ 100T/50T×5/100T×5

#### 产品内容

产品组成	MA0220-T 10T/盒	MA0220-1 50T/盒	MA0220-2 100T/盒	MA0220-3 50T×5/箱	MA0220-4 100T×5/箱
Annexin V-FITC	50μL	250μL	500μL	250μL×5	500μL×5
Propidium iodide	100μL	500μL	1mL	500μL×5	1mL×5
Binding Buffer(10×)	5mL	25mL	50mL	25mL×5	50mL×5
说明书	1份	1份	1份	5份	5份

#### 产品简介

本试剂盒用于检测细胞凋亡早期的发生,其中 Annexin V 为胞内蛋白膜联蛋白家族成员,以钙离子依赖的方式选择性与磷脂酰丝氨酸(PS)结合。

PS 正常分布在细胞膜内侧,即与细胞浆相邻的一侧。在细胞发生凋亡的早期,不同类型的细胞都会把 PS 外翻到细胞膜外侧。用带有 FITC 标记的 Annexin V,即 Annexin V-FITC,就可以通过流式细胞仪或荧光显微镜检测到 PS 外翻这一细胞凋亡的重要特征。

碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)是一种可对 DNA 染色的细胞核染色试剂,在嵌入 DNA 后释放红色荧光。PI 不能穿透完整的细胞膜,但可以穿透坏死细胞或凋亡晚期丧失细胞膜完整性的细胞。因此,将 Annexin V 与 PI 联合使用时,PI 被排除在活细胞(Annexin V-/PI-)和早期凋亡细胞(Annexin V+/PI-)外,而晚期凋亡细胞和坏死细胞同时被 FITC 和 PI 结合染色呈现双阳性(Annexin V+/PI+)。

FITC 最大吸收波长为 490nm,发射波长为 525nm,PI-DNA 复合物的最大吸收和发射波长分别为 535nm 和 615nm。

#### 使用方法

##### (一) 样品染色

1. 将 Binding Buffer (10×) 稀释成 1×Binding Buffer 工作液备用(1ml Binding Buffer (10×) 需加入 9ml 无菌去离子水)。

2. 对于悬浮细胞,500-1000g 离心 5min 收集细胞。

对于贴壁细胞,要用不含 EDTA 的胰酶消化细胞,胰酶消化时间不宜过长或过短,最好是在轻轻吹打可以使贴壁细胞吹打下来时,加入细胞培养液,将细胞轻轻吹打下来,转移到离心管内,500-1000g



离心 5min 收集细胞。

3. 收集细胞后，加入预冷 PBS 溶液轻摇或用移液器轻柔吹打洗涤，离心收集细胞，共洗涤两次。
4. 在细胞沉淀中加入 1×Binding Buffer 工作液，重悬细胞，使细胞浓度达到  $1 \times 10^6$  cell/ml。
5. 吸取 100 $\mu$ l 细胞悬液（细胞总数为  $1 \times 10^5$  cell）至一新管中，加入 5 $\mu$ l Annexin V-FITC 和 5-10 $\mu$ l PI，轻轻混匀，室温避光孵育 15min。

## （二）样品检测

### 1. 流式细胞仪检测：

染色孵育后，每管加入 400 $\mu$ l 1×Binding Buffer 工作液，混匀后使用流式细胞仪检测（1 小时内检测）。

建议设置正常细胞、PI 单染和 Annexin V-FITC 单染 3 个对照组，正常细胞组可作为荧光补偿调节去除光谱重叠和设定十字门的位置。若十字门的位置不易设定，可采用经凋亡诱导的细胞进行设定。结果可用 CellQuest 等软件进行分析，绘制双色散点图（two-color dot plot），FITC 为横坐标，PI 为纵坐标。Annexin V-FITC 和 PI 联合使用时，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，晚期凋亡细胞有绿色和红色双重荧光。

### 2. 荧光显微镜检测：

染色孵育后涂片，显微镜下观察。使用荧光显微镜上的蓝光和绿光通道分别观察 FITC 和 PI。被 Annexin V-FITC 结合的细胞显示浆膜上有绿色光环。丧失细胞膜完整性的细胞，细胞核显示红色，膜上有绿色光环。

## 保存条件

2~8℃避光保存，自生产之日起一年有效。Annexin V-FITC 不可冷冻。

## 注意事项

1. 可立式离心管内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. Annexin V-FITC 和碘化丙啶（PI）是光敏物质，在保存与操作时请注意避光。
3. 在细胞洗涤的最后一步，请尽量将上清弃净，以免 PBS 残留影响实验结果。
4. 为获得准确试验结果，建议样品在染色后 1 小时内进行分析。
5. 为了您的安全和健康，请穿戴实验防护服、手套、口罩等必要的防护装备。

