



## 细胞凋亡检测试剂盒 (Annexin V-Alexa Fluor 647/PI)

货号	规格
BDLS4002-20	20T
BDLS4002-50	50T
BDLS4002-100	100T

### 产品介绍

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)

**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 4×(Binding Buffer 4×)**

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 CaCl<sub>2</sub>

**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: 20μg/ml

**3. 重组人 Annexin V/Alexa Fluor 647, (rh Annexin V/Alexa Fluor 647)**

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%NaN<sub>3</sub>,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 50 $\mu$ l 左右的培养液, 以避免吸走细胞。加入约 1ml 4 $^{\circ}$ C 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 50 $\mu$ l 左右的培养液, 以避免吸走细胞。加入约 1ml 4 $^{\circ}$ C 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 100 $\mu$ l 的细胞悬液于 5ml 流式管中, 加入 5 $\mu$ l Annexin V/Alexa Fluor 647 和 10 $\mu$ l 20 $\mu$ g/ml 的碘化丙锭溶液; 混匀后于室温避光孵育 5 分钟;

5. 加入 10 $\mu$ l 20 $\mu$ g/ml 的碘化丙锭溶液 (PI), 并加 400 $\mu$ l PBS, 立刻流式检测。

## 实验设计:

### 1)未转染细胞

空白管: 阴性对照组细胞, 不加 Annexin V/Alexa Fluor 647, 碘化丙锭溶液(PI)。用于调节电压。

检测管: 处理的细胞, 加 Annexin V/Alexa Fluor 647, 碘化丙锭溶液(PI)。用空白管和单阳管调节好电压补偿后, 获得所需要的流式数据。

注: 无需用单染管 Annexin V/Alexa Fluor 647 调补偿。

### 2) 转染 GFP 细胞

未转染空白管: 未转染细胞, 不加 Annexin V/Alexa Fluor 647, 碘化丙锭溶液(PI)。用于调节电压

转染 GFP 空白管: 转染 GFP 对照组细胞, 不加转染 Annexin V/Alexa Fluor 647, 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 647, 碘化丙锭溶液(PI)。调节好电压补偿后, 获得所需要的流式数据。

## 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？

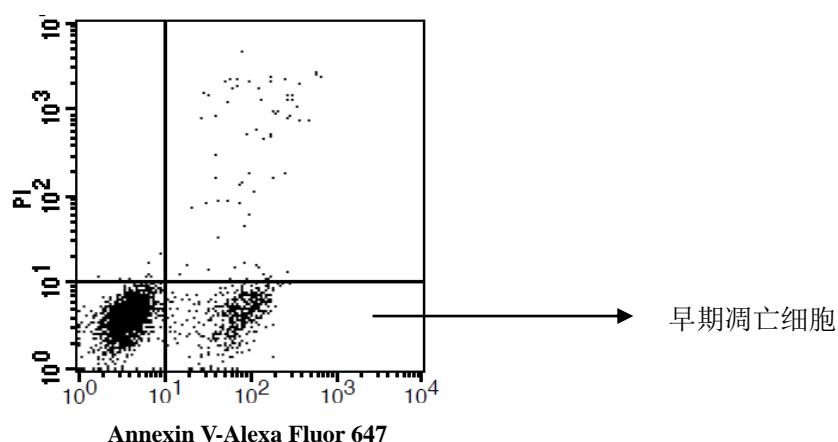
用流式检测凋亡时，PI 受时间的影响很大，因标记了 PI 后会加大细胞毒性，随着时间延长会导致 PI 的染色增加，特别是检测早期凋亡时，如果时间延长除了会导致在流式细胞仪上的细胞分群差距加大外，误差会明显加大。一般 PI 加上后立刻上机，然后在一个小时以内检测完成。两种方法都可以，但是按照我们操作步骤造成的误差会更小。

## 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？

BDLS4004 Annexin V-PE/7-AAD Apoptosis Detection Kit 凋亡检测试剂盒

BDLS4002 Annexin V-Alexa Fluor 647/PI Kit 凋亡检测试剂盒

### 实验参考图片



Jurkat 细胞用顺铂诱导凋亡后用 Annexin V-Alexa Fluor 647/PI 双染流式分析图谱