

Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒

Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit

说明书修订日期：2019.11.27

Cat number: KGA105-KGA108

Store at 2-8℃ for 12 months, protected from light

For Research Use Only(科研专用)

一、试剂盒说明

在正常细胞中，磷脂酰丝氨酸（PS）只分布在细胞膜脂质双层的内侧，而在细胞凋亡早期，细胞膜中的磷脂酰丝氨酸（PS）由脂膜内侧翻向外侧。Annexin V 是一种分子量为 35~36kD 的 Ca^{2+} 依赖性磷脂结合蛋白，与磷脂酰丝氨酸有高度亲和力，故可通过细胞外侧暴露的磷脂酰丝氨酸与凋亡早期细胞的胞膜结合。因此 Annexin V 被作为检测细胞早期凋亡的灵敏指标之一。将 Annexin V 进行荧光素 FITC 标记，以标记了的 Annexin V 作为荧光探针，利用荧光显微镜或流式细胞仪可检测细胞凋亡的发生。

碘化丙啶（Propidium Iodide, PI）是一种核酸染料，它不能透过完整的细胞膜，但对凋亡中晚期的细胞和死细胞，PI 能够透过细胞膜而使细胞核染红。因此将 Annexin V 与 PI 匹配使用，就可以将处于不同凋亡时期的细胞区分开来。

本试剂盒可应用于培养细胞凋亡检测（不推荐用于检测组织样本）。

二、试剂盒组份

组份	Cat: KGA105 (10 assays)	Cat: KGA106 (20 assays)	Cat: KGA107 (50 assays)	Cat: KGA108 (100 assays)	储存条件
AnnexinV-FITC	50 μL	100 μL	250 μL	500 μL	2-8℃,避光
Propidium Iodide	50 μL	100 μL	250 μL	500 μL	2-8℃,避光
Binding Buffer	5.0 mL	10.0 mL	25 mL	50 mL	2-8℃

三、试剂盒以外自备仪器和试剂

流式细胞仪或荧光显微镜、低速离心机、微量移液器

1.5m L Microtube、载玻片、盖玻片（荧光显微镜观察需用）、PBS、不含 EDTA 的胰酶消化液

四、使用注意事项

1. 微量试剂取用前请离心集液。
2. Annexin V-FITC, Propidium Iodide（PI）避光保存及使用。
3. Propidium Iodide（PI）有毒，操作时要戴手套。
4. 本试剂盒适用于检测活细胞，流式细胞仪检测时，细胞数量不应低于 1×10^5 ，不推荐用于检测组织样本。
5. 推荐使用悬浮培养细胞。如果是贴壁细胞，需用不含 EDTA 的胰酶消化，如消化不当，可能引起假阳性，而用细胞刮子会造成细胞粘连成团，而影响检测。可将胰酶消化后细胞的保存在含 2%BSA 的 PBS 中，防止进一步的损伤。
6. 细胞固定后可能导致荧光的淬灭，请不要固定样品。
7. 因检测细胞的类型、凋亡诱导剂种类、使用的检测仪器不同，因而流式检测的荧光补偿也不同，因此建议每次检测均需使用经凋亡诱导处理的细胞作为对照，进行荧光补偿的调节。

五、操作方法

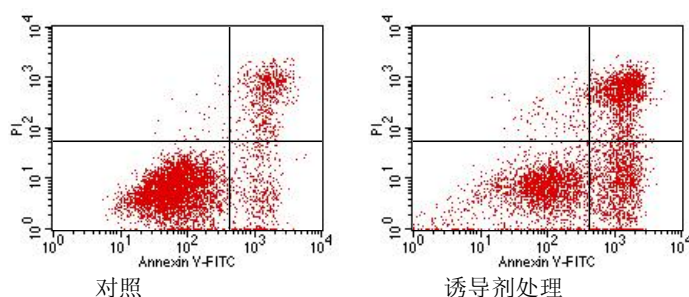
1. 悬浮细胞离心（2000rpm 离心 5min）收集；贴壁细胞用不含 EDTA 的胰酶消化收集（注：胰酶消化时间不易过长，否则容易引起假阳性）；
2. 用 PBS 洗涤细胞二次（2000rpm 离心 5min）收集 $1\sim5\times10^5$ 细胞；
3. 加入 500 μ L 的 Binding Buffer 悬浮细胞；
4. 加入 5 μ L Annexin V-FITC 混匀后，加入 5 μ L Propidium Iodide，混匀；
5. 室温、避光、反应 5~15min；
6. 请在 1 hour 内，进行流式细胞仪的观察和检测。

流式细胞仪分析

- 1) 用流式细胞仪检测，激发波长 Ex=488 nm；发射波长 Em=530 nm。
- 2) Annexin V-FITC 的绿色荧光通过 FITC 通道（FL1）检测；PI 红色荧光（流式 Ex=488nm, Em $\geq$ 630nm）通过 FL2 或 FL3 通道检测，建议使用 FL3。
- 3) 荧光补偿调节：使用经凋亡诱导处理的正常细胞，作为对照进行荧光补偿调节去除光谱重叠和设定十字门的位置。

六、实验范例

用凋亡诱导剂诱导 P388 细胞凋亡，在 37°C，5%CO₂ 培养箱培养 4~6h 后，参照说明书的操作方法进行检测，经流式细胞仪检测结果见下图。



七、凯基相关产品（详见凯基网站 <http://www.keygentec.com.cn>）

细胞株、细胞提取物及细胞培养产品

细胞凋亡

细胞增殖/毒性/活力与细胞周期

细胞染色产品

亚细胞组分制备