

## Annexin V Alexa Fluor 647/PI 凋亡检测试剂盒

产品货号: BA1986

产品规格: 20T/50T/100T

### 产品简介:

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內面, 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。

### 产品组成:

产品名称	20T	50T	100T	保存条件
10× (Binding Buffer 10×)	2ml	5ml	10ml	2-8℃
Propidium Iodide(PI)(20 μg/ml)	0.1ml	0.25ml	0.5ml	2-8℃
Annexin V/Alexa Fluor 647	0.1ml	0.25ml	0.5ml	2-8℃

### 操作步骤 (仅供参考):

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1:9稀释结合缓冲液(2ml 10×结合缓冲液+18ml去离子水);
3. 用1×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 647混匀后于室温避光孵育5分钟;
5. 加入5μl 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:

#### 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, 加加Annexin V/Alexa Fluor 647, 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。

注: 无需单染管Annexin V/Alexa Fluor 647调补偿。

#### 2) 转染GFP细胞



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

QQ: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

未转染空白管：未转染细胞，不加Annexin V/Alexa Fluor 647，碘化丙啶溶液（PI）。用于调电压。

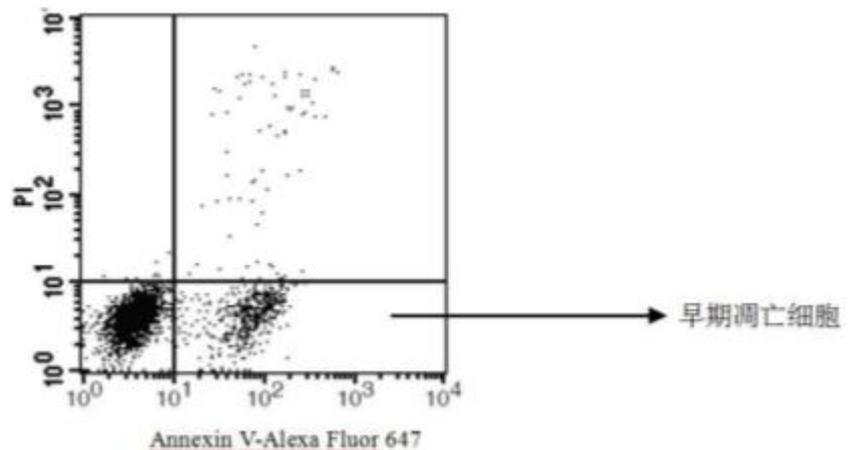
转染GFP空白管：转染GFP对照组细胞，不加Annexin V/Alexa Fluor 647，碘化丙啶溶液（PI）。用于调补偿。

检测管：处理的细胞，加Annexin V/Alexa Fluor 647，碘化丙啶溶液（PI）。调节好电压补偿后，获得所需要的流式数据。

#### 注意事项：

1. 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. 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. 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. 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. 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。

实验参考图：



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

**保存条件：**2-8℃避光，勿冷冻。6个月有效。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

QQ：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com