

## Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒

### 说明:

细胞凋亡是细胞的基本特征之一，它在机体的胚胎发育、组织修复、内环境的稳定等方面起着十分重要的作用。Annexin V 是一种分子量为 35-36kD 的  $Ca^{2+}$  依赖性磷脂结合蛋白，能与细胞凋亡过程中翻转到膜外的磷脂酰丝氨酸 (Phosphatidylserine, PS) 高亲和力特异性结合。以标记了 FITC 的 Annexin V 作为荧光探针，利用流式细胞仪或荧光显微镜可检测细胞凋亡的发生。

Propidium iodide (PI) 是一种核酸染料，它不能透过完整的细胞膜，但在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红染。将 Annexin V 与 PI 匹配使用，可以将凋亡早期的细胞和晚期的细胞以及死细胞区分开来。

### 产品组成 (50 / 25 次反应) :

· Annexin V-FITC	500ul / 250ul (20ug /ml)
· Binding Buffer	40ml / 20 ml
· Propidium Iodide (PI)	250ul / 125ul (50ug /ml)

**保存条件:** 2-8℃ 储存，有效期一年。

### 注意事项:

1. 为保证得到理想的实验结果，在使用此试剂盒之前请认真阅读该注意事项；
2. 试剂（尤其是小瓶装的试剂）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；
3. Propidium iodide (PI) 能通过皮肤吸收，对眼睛有刺激作用；
4. 此试剂盒仅供科研使用，不宜用于临床诊断；
5. 本试剂盒中提供的 PBS 为随试剂赠送，并非试剂盒的真正组成成分；细胞的洗涤同常规方法。

### 操作注意要点:

1. 整个操作过程动作要尽量轻柔，勿用力吹打细胞，尽量在 4℃ 下操作；
2. 反应完毕后请尽快检测，因为细胞凋亡是一个动态的过程，反应 1 小时后荧光强度就开始衰变；

3. Annexin V-FITC 和 Propidium iodide 是光敏物质，在操作时请注意避光；
4. 成功的检测凋亡受以下几种因素的影响，如细胞类型、细胞膜上 PS 的密度、发生凋亡时 PS 翻转的比例、诱导细胞凋亡的方法、所用试剂、诱导凋亡的时间等，把这些影响因素进行优化对实验成功是非常必要的；
5. 在细胞洗涤的最后一步，请尽量将上清弃净，以免 PBS 残留，有可能会影响实验结果；
6. PI 染色时间过长有可能造成检测的凋亡率偏高，建议首先进行 Annexin V-FITC 染色，上机前 5 分钟再加入 PI 染色。

#### 操作步骤：

1. 贴壁细胞，先用胰酶消化；
2. 细胞计数后取  $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$  个/ml 细胞，1000rpm，4℃ 离心 10 分钟，弃上清；
3. 加入 1ml 冷的 PBS，轻轻震荡使细胞悬浮；
4. 1000rpm，4℃ 离心 10 分钟，弃上清；
5. 重复步骤 3、4 两次；
6. 将细胞重悬于 200ul Binding Buffer；
7. 加入 10ul Annexin V-FITC 轻轻混匀，避光室温反应 15 分钟 或 4℃ 反应 30 分钟。
8. 加入 300ul Binding Buffer（总反应体积 500 ul）以及 5ul PI，在 1 小时内上机检测；（建议在加入 PI 之前将细胞悬液用 200 目筛网过滤。）
9. 若用荧光显微镜检测，将细胞混合液离心，取细胞沉淀涂片，再进行观察。