

ANNEXIN V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒说明书

注意：本产品试剂浓度发生变化，使用前请仔细阅读说明书。

货号：AC10860

规格：20T/50T /100T

保存：2-8°C，避光保存，有效期 1 年。

产品内容:	AC10860-20	AC10860-50	AC10860-100	保存
Annexin V-FITC	100 μ l	250 μ l	500 μ l	4°C，避光保存
Propidium iodide(PI)	100 μ l	250 μ l	500 μ l	4°C，避光保存
Binding Buffer (10 \times)	6 ml	15ml	30 ml	4°C 保存，长时间-20°C

产品说明：

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。

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 μ l 左右的培养液，以避免吸走细胞。加入约 1ml 4°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 μ l 左右的培养液，以避免吸走细胞。加入约 1ml 4°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 1:9 稀释 Binding Buffer (2ml 10x Binding Buffer+18ml 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 μ l 的细胞悬液于 5ml 流式管中，加入 5 μ l Annexin V/FITC 混匀后于室温避光孵育 5 分钟；

5. 加入 5 μ l 的碘化丙锭溶液(PI)，并加 400 μ l PBS，立刻进行流式或荧光显微镜检测。

实验设计：

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

单染管：阳性对照组细胞，只加 Annexin V/FITC。用于调节补偿

检测管：处理的细胞，加 Annexin V/FITC，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。

实验结果分析：

A. 流式细胞仪分析：

FITC 最大激发波长为 488 nm，最大发射波长 525 nm，FITC 的绿色荧光在 FL1 通道检测；PI-DNA 复合物的最大激发波长为 535 nm，最大发射波长为 615 nm，PI 的红色荧光在 FL2 或 FL3 通道检测。用 flowjo、CellQuest 等软件进行分析，绘制双色散点图，FITC 为横坐标，PI 为纵坐标。典型的实验中，细胞可以分成三个亚群，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荧光双重染色。

B. 荧光显微镜分析：

1) 滴一滴滴用 Annexin V-FITC/PI 双染的细胞悬液于载玻片上，并用盖玻片盖上细胞。

注意：对于贴壁细胞，可直接用盖玻片培养细胞并诱导细胞凋亡。

2) 在荧光显微镜下用双色滤光片观察。Annexin V-FITC 荧光信号呈绿色，PI 荧光信号呈红色。

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°C1000rpm 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。

相关文献:

- [1] Chenguang Wang, Yukun Guan, Mengze Lv, et al. Manganese Increases the Sensitivity of the cGAS-STING Pathway for Double-Stranded DNA and Is Required for the Host Defense against DNA Viruses. *Immunity*. April 2018. (IF 21.522)
- [2] Wei Ling, Guoguang Li, Ya Li, et al. Materials and Techniques for Implantable Nutrient Sensing Using Flexible Sensors Integrated with Metal-Organic Frameworks. *Advanced Materials*. 2018. (IF 25.809)
- [3] Hao Huang, Lizhen He, Wenhua Zhou, et al. Stable black phosphorus/Bi₂O₃ heterostructures for synergistic cancer radiotherapy. *Biomaterials*. July 2018. (IF 10.273)
- [4] Chang Yu, Binbin Ding, Xinyang Zhang, et al. Targeted iron nanoparticles with platinum-(IV) prodrugs and anti-EZH2 siRNA show great synergy in combating drug resistance in vitro and in vivo. *Biomaterials*. February 2018. (IF 10.273)
- [5] Lina Zhang, Hui Tian, Xiuli Zhou, et al. Upregulation of microRNA-351 exerts protective effects during sepsis by ameliorating skeletal muscle wasting through the Tead-4 - mediated blockade of the Hippo signaling pathway. *Faseb Journal*. November 2018. (IF 5.391)