

## Annexin V-FITC

### 产品信息

| 货号           | 名称             | 规格    |
|--------------|----------------|-------|
| CB1021-50 T  | Annexin V-FITC | 50 T  |
| CB1021-100 T | Annexin V-FITC | 100 T |

### 产品简介

Annexin V 是一种钙离子依赖性磷脂结合蛋白，与磷脂酰丝氨酸（PS）有高度亲和力，在正常生理条件下，PS 主要位于质膜的内叶。在启动细胞凋亡时，PS 被转移到细胞外膜上。PS 一旦到达膜外，即可被 Annexin V-FITC 结合，从而检测出细胞的凋亡。

碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)可与双链 DNA 特异性结合，并产生强烈的荧光，正常情况下无法透过细胞膜。由于凋亡晚期或坏死细胞膜丧失完整性，PI 可进入细胞内对 DNA 进行染色，PI 与 Annexin V 搭配使用，通过流式细胞术检测细胞中 Annexin V 和核酸染料的荧光强度，可区分活细胞(Annexin V-/核酸染料-)、早期凋亡细胞(Annexin V+/核酸染料-) 与中晚期凋亡细胞（或坏死细胞）(Annexin V+/核酸染料+)。

### 储存条件

4℃避光保存。

### 产品成分

| 名称             | Annexin V-FITC |              |        |
|----------------|----------------|--------------|--------|
| 组分             | CB1021-50 T    | CB1021-100 T | 储存条件   |
| Annexin V-FITC | 150 $\mu$ l    | 300 $\mu$ l  | 4℃避光保存 |

### 使用说明

使用本试剂时，需自备 1xPBS，1×结合缓冲液 (1×Annexin V Binding Buffer)，碘化丙啶溶液(PI)；

#### 实验设计建议：

- (1) 空白对照：不经药物处理的细胞，不加染料。
- (2) 阴性对照：不经药物处理的细胞，加入 Annexin V-FITC 和 PI。
- (3) 阳性对照：诱导凋亡的细胞，加入 Annexin V-FITC 和 PI。
- (4) 补偿：诱导凋亡的细胞，只用 Annexin V-FITC 染色；  
诱导凋亡的细胞，只用 PI 染色。

### 1. 细胞样品准备

#### 贴壁细胞：

- (1) 根据实验要求诱导细胞凋亡，同时需设置未经处理的细胞样品作为阴性对照。
- (2) 吸取培养细胞的上清液丢弃或转移至离心管中保存<sup>a</sup>。
- (3) 用 PBS 洗涤细胞 1 次，丢弃或收集清洗液保存<sup>a</sup>。
- (4) 用不含 EDTA 的胰酶消化细胞，时间不宜过长<sup>b</sup>。
- (5) 加入培养基终止消化，轻吹下细胞，将细胞悬液转移至离心管中，若第 2 步的上清液、第 3 步的清洗液有保存，可以一并加入。室温，1500 rpm，离心 5 min，收集细胞。
- (6) 加入 PBS，1500 rpm，室温离心 3 min，去除上清液。再重复本步操作一次<sup>c</sup>。
- (7) 细胞计数：吸弃 PBS，加入 1×Annexin V Binding Buffer，制成终浓度为  $1 \times 10^5$  cells/ml 的细胞悬液。

- (8) 取 300  $\mu$ l 细胞悬液于新的 EP 管中，再加入 3  $\mu$ l Annexin V-FITC 与 3  $\mu$ l 碘化丙啶染色液，轻轻混匀。
- (9) 室温(20-25 $^{\circ}$ C)避光孵育 10-20 min，随后立即使用流式细胞仪检测<sup>d</sup>。用 FL1 通道来确定 Annexin V-FITC 的结合，用 FL2 或 FL3 通道来确定 PI。

**OriNote:**

- a. 上清液及清洗液中可能含有细胞或凋亡细胞，可以收集一起处理。
- b. 对于贴壁细胞，胰酶消化步骤至关重要，如果胰酶消化时间过短，细胞需要用力吹打才能脱落，容易造成细胞膜的损伤，从而导致细胞坏死的假阳性；如果消化时间过长，细胞膜同样易造成损伤，甚至会影响细胞膜上 PS 与 Annexin V-FITC 的结合从而干扰对于细胞凋亡的检测。尽量使用不含 EDTA 的胰酶，EDTA 会影响 Annexin V 与 PS 的结合。
- c. 残留的胰酶会消化并降解后续加入的 Annexin V-FITC，导致染色失败。
- d. 如不能及时检测，请于冰上避光静置并于 1 小时内完成检测。

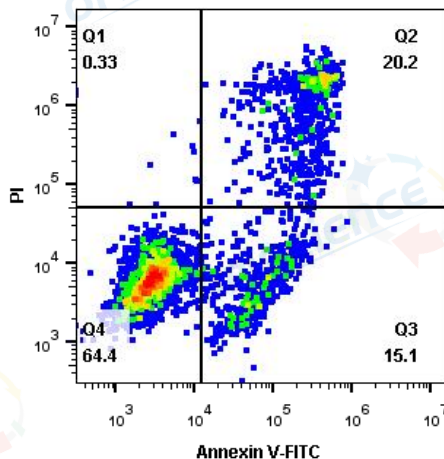
**悬浮细胞:**

- (1) 根据实验要求诱导细胞凋亡，同时需设置未经处理的细胞样品作为阴性对照。
- (2) 收集细胞悬液，室温，1500 rpm，离心 5 min。
- (3) 加入 PBS，1500 rpm，室温离心 3 min，去除上清液。再重复本步操作一次。
- (4) 吸弃 PBS，加入 1 $\times$ Annexin V Binding Buffer，制成终浓度为 1 $\times$ 10<sup>5</sup>cells/ mL 的细胞悬液。
- (5) 取 300  $\mu$ l 细胞悬液于新的 EP 管中，再加入 3  $\mu$ l Annexin V-FITC 与 3  $\mu$ l 碘化丙啶染色液，轻轻混匀。
- (6) 室温(20-25 $^{\circ}$ C)避光孵育 10-20 min，随后立即使用流式细胞仪检测<sup>d</sup>。用 FL1 通道来确定 Annexin V-FITC 的结合，用 FL2 或 FL3 通道来确定 PI。

**2、样品分析**

**流式细胞仪分析:**

流式细胞仪激发波长为 488 nm，FITC 的绿色荧光在 FL1 通道检测；PI 的红色荧光激发波长为 535 nm，在 FL2 或 FL3 通道检测。用 FlowJo 等软件进行数据分析，FL1 为横坐标，FL2 或 FL3 为纵坐标，根据 FITC 和 PI 荧光值确定两荧光参数阴阳界限，划定十字门。



- Q1: 机械损伤细胞或裸核细胞，PI 单阳性(Annexin V-FITC-/PI+);
- Q2: 晚期凋亡或坏死细胞，Annexin V-FITC 和 PI 双阳性(Annexin V-FITC+/PI+);
- Q3: 早期凋亡细胞，Annexin V-FITC 单阳性(Annexin V-FITC+/PI-);
- Q4: 活细胞，双阴性(Annexin V-FITC-/PI-)。

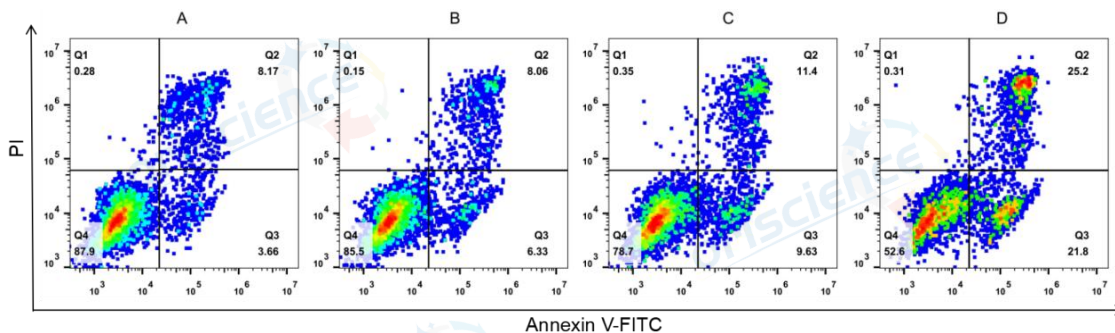
**荧光显微镜检测:**

将染色后的细胞悬液滴在显微镜载玻片上，并用盖玻片盖上细胞，通过荧光显微镜或共聚焦显微镜观察。Annexin V-FITC 阳性细胞染成绿色，PI 阳性细胞染成红色。（若为贴壁细胞，可直接在孔板上/玻片

上对细胞染色, 可延长染色时间至 15 min)

#### 数据展示

用 PLK 抑制剂(Volasertib, BI6727)诱导 A549 细胞(人非小细胞肺癌细胞)凋亡, 诱导浓度分别为 0 $\mu$ M (A)、0.1  $\mu$ M (B)、0.25  $\mu$ M (C)、0.5  $\mu$ M (D), 分别诱导 24 h 后, 根据说明书实验方案进行染色, 用流式细胞仪检测结果如下图。因药物诱导细胞凋亡时间过长, 图 A 中的晚凋亡细胞也较多。随着药物浓度的增加, 凋亡细胞明显增加, 说明 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒的分离效果佳。



#### 注意事项

1. 荧光染料均存在淬灭问题, 请尽量注意避光, 以减缓荧光淬灭。
2. 被 Annexin V 染色的细胞不能用多聚甲醛或甲醇等试剂固定或透化; 不能有破坏细胞膜的操作, 因为这可能会产生假阳性。
3. 胰酶消化后, 可在培养基中于最佳培养条件下恢复约 30 min 后染色, 避免假阳性。
4. 在样品采集前加入 PI, 因为长时间与 PI 孵育可能会导致假阳性结果。
5. 由于检测细胞种类、诱导剂类型、仪器型号的差异, 可选择设置加入不同的 Annexin V-FITC 用量 (如: 1.5  $\mu$ l、3  $\mu$ l、6  $\mu$ l), 通过流式分析获取检测时 Annexin V-FITC 的最佳用量, 以取得更好的实验结果。
6. 染色后需尽快检测, 时间过长会导致凋亡和坏死的细胞增加。
7. 神经细胞膜容易破坏外翻, 导致假阳性, 不适合此方法检测。
8. 血液样品须去除血小板。因为血小板含有 PS, 与 Annexin V 结合, 干扰实验结果。可使用含 EDTA 的缓冲剂并离心洗去血小板。
9. 1 $\times$ Annexin V Binding Buffer 的瓶盖要紧闭, 防止空气中的 CO<sub>2</sub> 进入后形成碳酸钙沉淀, 减少游离 Ca<sup>2+</sup>, 导致实验失败。
10. PI 染料有毒, 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。
11. 试剂在使用前可短暂离心, 防止溶液粘在管壁。
12. 本产品仅供科研使用。请勿用于医药、临床诊断或治疗, 食品及化妆品等用途。

#### 常见问题及解决方法

Q1: 流式细胞仪检测细胞凋亡, 贴壁细胞有无更好的消化方式?

a. 检测消化时间不易控制的贴壁细胞, 建议用对细胞损伤小且不会影响细胞膜上 PS 分布的 Accutase 细胞消化液。

Q2: 是否可以用 PBS 代替凋亡试剂盒里面的 Annexin V Binding Buffer?

a. 不可以, Annexin V 与 PS 的结合依赖 Ca<sup>2+</sup>, Annexin V Binding Buffer 含有 Ca<sup>2+</sup>, 能促进 Annexin V 与 PS 的结合。不加 Annexin V Binding Buffer, 会导致 Annexin V 的结合能力降低, 造成阳性信号下降甚至无阳性信号。

Q3: 没有检测到 Annexin V-FITC 信号?

a. 可能细胞没有凋亡, 没有 PS 外翻, 可用显微镜观察, 验证细胞的形态; 也可能是 Annexin V Binding Buffer 的 pH 降低, 检查结合液的 pH, 确保其  $\text{pH} > 5$ , 最佳  $\text{pH}=7.2$ 。

**Oriscience Biotechnology Co., Ltd.**

[www.oriscience.com](http://www.oriscience.com)

Tel: 400-158-2128

Emails: [order@oriscience.com](mailto:order@oriscience.com)

[technical\\_support@oriscience.com](mailto:technical_support@oriscience.com)

