

# Annexin V, FITC

# 凋亡检测试剂盒(50次)

## 试剂盒内含

Annexin V, FITC结合物  
PI Solution  
10 × Annexin V Binding Buffer

## 规格

50次

\*注：规格中的每“次”是以细胞浓度 $1 \times 10^6$ 个/ml计算

## 产品描述

细胞凋亡是指为维持有机体内环境稳定，由基因控制的细胞自主的有序的死亡。正常情况下任何细胞在形成过程中发生的异常都会通过凋亡消除。例如体内的癌细胞增长为肿瘤的过程会受细胞凋亡的引导而被抑制。然而在抑癌基因p53出现问题时，凋亡就不会诱导发生，从而导致癌细胞的不断增长。细胞凋亡可以通过细胞形态的变化或生物化学的变化来检测。目前常用的指标有caspase活性变化、DNA碎片、磷脂酰丝氨酸的外翻等。

Annexin V染色的细胞可以用于检测细胞凋亡早期的细胞膜变化。在细胞凋亡早期，膜磷脂酰丝氨酸由脂膜内侧翻向外侧。Annexin V是一种分子量为35-36 kD的Ca<sup>2+</sup>依赖性磷脂结合蛋白，与磷脂酰丝氨酸有高度亲和力，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特异性结合，因此Annexin V被作为检测细胞早期凋亡的灵敏指标之一。用绿色荧光FITC标记的Annexin V通过流式细胞仪或荧光显微镜可以检测到细胞凋亡的发生。碘化丙啶 (Propidium Iodide, PI) 是一种核酸染料，PI只能透过凋亡晚期和死细胞的细胞膜，因此Annexin V和PI结合使用，可以区分凋亡早晚期的细胞及死细胞。

## 所需的设备和材料

- 样品和诱导剂
- PBS、超纯水
- 合适量程的移液器
- 细胞培养用6, 12, 24, 96孔板
- 流式细胞仪或荧光显微镜

\*最大激发/发射波长

Annexin V, FITC: 494 nm/518 nm ; PI: 535 nm/617 nm

## 溶液制备

1 × Annexin V Binding Solution :  
将10 × Annexin V Binding Buffer用超纯水稀释10倍。

## 稳定性

试剂盒在0-5 °C下可以保存6个月，  
请避光保存Annexin V, FITC结合物。

## 储存条件

0-5 °C，避光 (切勿冻存)

## 运输条件

室温

## 实验例

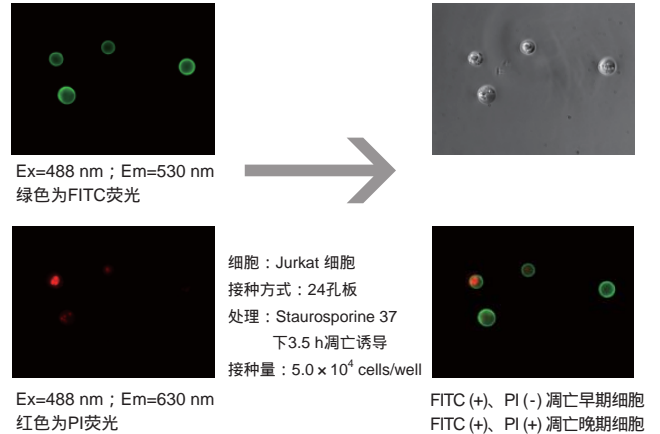


图1. Staurosporine诱导Jurkat细胞凋亡的图像

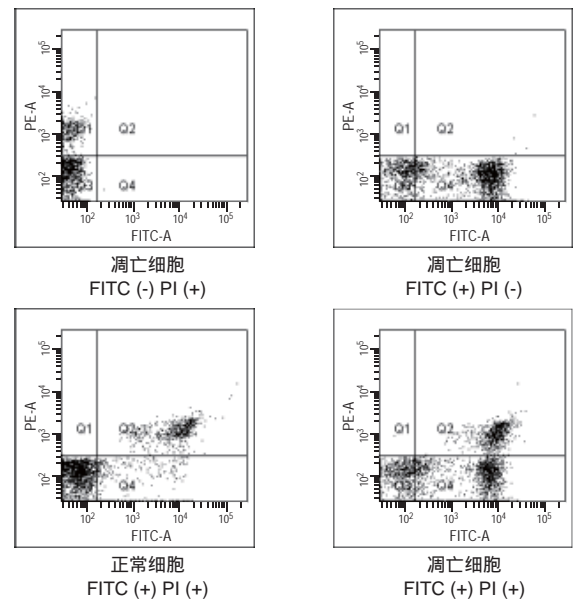


图2. 流式细胞仪二维点阵图

## 关联产品

- 细胞凋亡检测试剂盒  
Annexin V, 633 Apoptosis Detection Kit (AD11)
- 细胞衰老检测试剂盒  
Cellular Senescence Detection Kit-SPiDER-βGal (SG03)
- 细胞增殖毒性检测试剂盒  
Cell Counting Kit-8 (CK04)
- 细胞毒性检测试剂盒  
Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST (CK12)
- 活死细胞双染试剂盒  
Calcein-AM/PI Double Staining Kit (C542)
- 细胞周期检测试剂盒  
Cell Cycle Assay Kit-PI/RNase Staining (C543)

## 操作流程

### -悬浮细胞的操作流程

#### 诱导凋亡的操作步骤 (以Jurkat细胞为例)

1. 制备  $1 \times 10^6$  个/ml 的 Jurkat 细胞悬液。
2. 加入终浓度为  $1 \mu\text{g/ml}$  的凋亡诱导剂 (Staurosporine)。
3. 在  $37^\circ\text{C}$  下培养 3.5 h。

\* Staurosporine 用于诱导 Jurkat 细胞凋亡。最佳诱导条件请根据实验的细胞类型与诱导剂调整。

#### Annexin V 染色操作步骤

1. 将细胞悬液转移到离心管中，在  $1,000 \text{ rpm}$  离心 3 min，去除上清液。
2. 加入 PBS，在  $1,000 \text{ rpm}$  离心 3 min，去除上清液。再重复本步操作一遍。
3. 加入预先配好的  $1 \times$  Annexin V Binding Solution，制成终浓度为  $1 \times 10^6$  个/ml 的细胞悬液。  
\* 细胞悬液体积根据实验目的自行调整，一般推荐不少于  $500 \mu\text{l}$  细胞悬液。
4. 取  $100 \mu\text{l}$  步骤 3 中制备的细胞悬液，加入到一个新的 Tube 中。
5. 向细胞悬液中加入  $5 \mu\text{l}$  Annexin V, FITC 结合物，再加入  $5 \mu\text{l}$  PI Solution。
6. 在室温下避光培养 15 min。
7. 加入  $400 \mu\text{l}$   $1 \times$  Annexin V Binding Solution，请在 1 h 内检测。

### -贴壁细胞的操作流程

#### 诱导凋亡的操作步骤 (以 Caco-2 细胞为例)

1. 制备  $1 \times 10^6$  个/ml 的 Caco-2 细胞悬液，将细胞悬液接种到培养皿或者培养板中。
2. 在  $37^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  培养箱中预培养。
3. 加入终浓度为  $25 \mu\text{mol/ml}$  的凋亡诱导剂 (Cisplatin)。
4. 在  $37^\circ\text{C}$  培养 4 days。

\* Cisplatin 用于诱导 Caco-2 细胞凋亡。最佳的诱导条件请根据实验的细胞类型与诱导剂调整。

#### Annexin V 染色操作步骤

1. 吸取培养皿或培养板中的上清液丢弃或转移至微量管中保存。
2. 用 PBS 洗细胞 2 次，丢弃或收集清洗液保存。
3. 用胰蛋白酶消化细胞。
4. 用适量的培养基或 PBS 将细胞悬液转移至离心管中，如果第一步的上清液和第二步的清洗液没有丢弃，可以一并加入。
5. 在  $1,000 \text{ rpm}$  离心 3 min，弃上清。

6. 加入 PBS 后在  $1,000 \text{ rpm}$  离心 3 min，弃上清。重复本步操作一遍。
7. 加入预先配好的  $1 \times$  Annexin V Binding Solution，制成终浓度为  $1 \times 10^6$  个/ml 的细胞悬液。  
\* 细胞悬液体积根据实验目的自行调整，一般推荐不少于  $500 \mu\text{l}$  细胞悬液。
8. 取  $100 \mu\text{l}$  步骤 7 中的细胞悬液，加入到新的 Tube 中。
9. 向细胞悬液中加入  $5 \mu\text{l}$  Annexin V, FITC 结合物，再加入  $5 \mu\text{l}$  的 PI Solution。
10. 在室温下避光培养 15 min。
11. 加入  $400 \mu\text{l}$   $1 \times$  Annexin V Binding Solution，请在 1 h 内检测。

备注：1. 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。

2. 离心后如果无法判断 Tube 中是否含有细胞？可以保留上清液，以防检测时没有细胞，进而得不到实验结果。

#### -设定对照

1. 未染色细胞。
2. Annexin V, FITC 染色细胞 (没有 PI)。
3. PI 染色细胞 (没有 Annexin V-FITC)。

#### -流式细胞仪检测

1. 加样到流式细胞仪检测，激发波长  $\text{Ex} = 488 \text{ nm}$ ；发射波长  $\text{Em} = 530 \text{ nm}$ 。
2. Annexin V-FITC 的绿色荧光通过 FITC 通道 (FL1) 检测；PI 的红色荧光通过 PI 通道 (FL2 或 FL3) 检测 (建议使用 FL3)。

#### -荧光显微镜检测

将细胞悬液滴到玻片上，置于显微镜上使用合适的滤光片检测。

\* 由于 EDTA 会对细胞膜的特定部位有损伤，建议使用不含 EDTA 的胰酶消化贴壁细胞。

## 注意事项

1. Annexin V, FITC 和 PI 均对光敏感。所有染色过程和培养过程均需避光。
2. 若细胞收集过程中使用胰酶，需设法去除残留的胰酶，这些胰酶会消化并降解 Annexin V, FITC，最终导致染色失败。