

TransDetect[®] Annexin V-EGFP/PI Cell Apoptosis Detection Kit

使用前请仔细阅读说明书

目录号: FA111

保存: 2-8°C避光保存一年。

产品说明

Annexin V 是检测早期细胞凋亡最灵敏的指标之一。正常细胞中, 磷脂酰丝氨酸(PS)只分布在细胞膜磷脂双分子层的内侧, 而在细胞凋亡早期, 细胞质膜内侧的磷脂酰丝氨酸发生外翻, 暴露于细胞质膜的外侧。Annexin V是一种与磷脂酰丝氨酸有高度亲和力的Ca²⁺依赖性磷脂结合蛋白, 因此能够利用Annexin V与细胞外侧暴露的磷脂酰丝氨酸相结合的性质, 检测细胞的早期凋亡。以融合蛋白Annexin V-EGFP作为探针, 利用流式细胞仪或荧光显微镜即可检测细胞凋亡的发生。

碘化丙啶(PI)是一种核酸染料, 它不能透过具备完整细胞膜的正常细胞和早期凋亡细胞, 但能够透过凋亡中晚期的细胞和坏死细胞的细胞膜而将细胞核染色, 在特定激发光条件下呈现红色。将Annexin V-EGFP与PI匹配使用, 就可以区分出处于不同凋亡时期的细胞。本试剂盒操作简便、灵敏度高、特异性强, 适用于早期凋亡细胞的检测。与FITC相比, EGFP更加稳定, 荧光更强且不易淬灭。由于Annexin V-EGFP是融合蛋白, EGFP与PS的结合比例为1:1, 因此还可进行定量检测。

试剂盒组成

Component	FA111-01 (25 rxns)	FA111-02 (50 rxns)
Annexin V-EGFP	125 µl	250 µl
Propidium Iodide (PI)	125 µl	250 µl
1×Annexin V Binding Buffer	12.5 ml	2×12.5 ml

操作步骤

自备

Product Name	Catalog
PBS (1×)	TransGen, Cat. FG701-01

- 细胞完成凋亡刺激后, 500×g, 2-8°C离心5分钟, 收集1~5×10⁵个细胞。
 - 如果为悬浮细胞, 直接离心收集细胞即可;
 - 如果为贴壁细胞, 尽量使用不含EDTA的胰酶消化处理。消化结束后, 使用含血清的培养基终止反应, 离心收集细胞。贴壁细胞诱导凋亡后, 如有漂浮细胞, 请将培养液一并收集到离心管中, 与消化处理的细胞一起离心, 以保证实验结果的可靠性。
- 用预冷的1×PBS洗涤细胞两次, 500×g, 2-8°C离心5分钟, 收集细胞。
- 加入100 µl预冷的1×Annexin V Binding Buffer, 重悬细胞。
- 加入5 µl Annexin V-EGFP和5 µl PI, 轻轻混匀。
- 室温 (20°C ~25°C) 条件下避光反应15分钟。
- 加入400 µl预冷的1×Annexin V Binding Buffer, 轻轻混匀, 将样品于冰上避光放置, 1小时内用流式细胞仪或荧光显微镜检测。

样品分析

A. 流式细胞仪分析

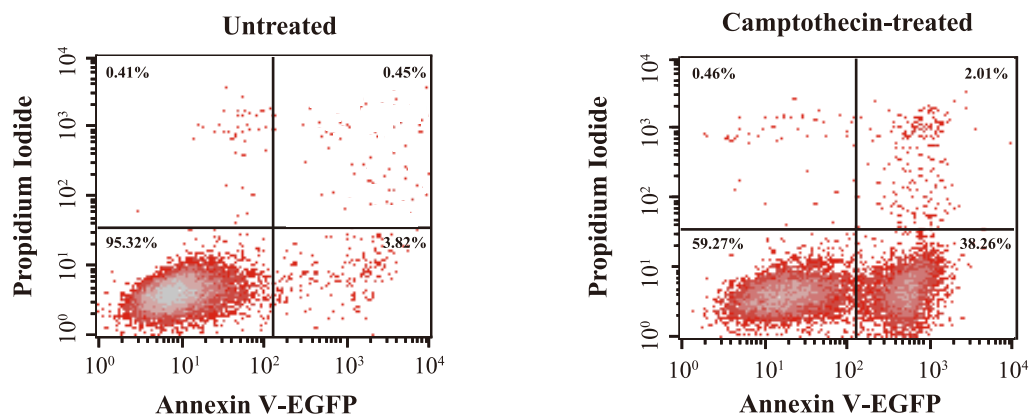
流式细胞仪分析时需要选择合适的电压并调节光补偿, 建议除待测样品外设置以下对照样品

- (1) 阴性对照细胞, 不加任何染料;
- (2) 凋亡阳性细胞, 单染 Annexin V (不加PI);
- (3) 凋亡阳性细胞, 单染 PI (不加Annexin V);



流式细胞仪分析参考实例

用10 μ M Camptothecin诱导Jurkat T淋巴瘤细胞4小时，细胞发生凋亡后，参照以上实验步骤，用流式细胞仪检测，结果如下图所示。



B. 荧光显微镜检测

取10 μ l Annexin V-EGFP/PI双染的细胞悬液于载玻片上，盖上盖玻片，在荧光显微镜下用双色滤光片观察，Annexin V-EGFP荧光信号呈绿色，PI荧光信号呈红色。

注：对于贴壁比较牢固的细胞，可直接用盖玻片培养细胞并诱导细胞凋亡，进行镜检，最好不要进行固定。如果必须固定，需要在完成Annexin V-EGFP/PI标记后，洗掉未结合的探针再进行固定。贴壁不牢的细胞建议处理为细胞悬液后再进行镜检。

注意事项

- 整个操作过程尽量轻柔以避免出现细胞碎片，引起假阳性。
- 掌握好胰酶消化细胞的程度，无论消化不足或者消化过度都易产生细胞碎片，造成假阳性结果；用胰酶消化贴壁细胞后务必用血清终止消化反应。
- 预冷1 \times PBS洗涤细胞步骤不可省略，且需尽可能吸尽残留的1 \times PBS。
- 待测细胞样品不可以进行透化，否则AnnexinV-EGFP/PI会直接进入被透化细胞内，造成实验误差。
- 细胞凋亡是一个持续变化的动态反应过程，并且Annexin V-EGFP和PI是光敏性物质，因此反应结束后应尽快进行检测，并且需要全程避光操作。
- 试剂在开盖前请短暂离心，将管盖及内壁上的液体甩至管底。
- 能否成功检测细胞的早期凋亡，取决于以下几个因素，包括细胞的状态及类型，诱导凋亡的方法及剂量，膜磷脂酰丝氨酸的表达水平及凋亡时外翻的程度，实验操作中细胞机械损伤的程度等。因此，建议进行预实验对相应步骤进行优化。
- 实验过程中请穿实验服并且戴一次性手套，确保安全。

本产品仅供研究，不用于临床诊断。

版本号: V1-202008

服务投诉电话 +86-10-57815020

服务投诉邮箱 complaints@transgen.com.cn

