

# 488-Annexin V/PI Apoptosis Kit

## CP301



### 产品概述

Product Overview

488-Annexin V 和 PI 凋亡试剂盒提供了一种通过标记早期凋亡细胞 (绿色) 和坏死或晚期凋亡的细胞 (红色) 快速简便地检测细胞凋亡水平的方法。Annexin V (膜联蛋白-V) 是一种分子量为 35~36 KD 的  $\text{Ca}^{2+}$  依赖性磷脂结合蛋白, 可与磷脂酰丝氨酸 (PS) 选择性结合。磷脂酰丝氨酸 (PS) 主要分布在细胞膜内侧, 即与细胞质相邻的一侧。在细胞发生凋亡的早期, 不同类型的细胞都会把磷脂酰丝氨酸外翻到细胞表面, 暴露在细胞外环境中, 此时, 使用 488-Annexin V 与外翻的磷脂酰丝氨酸 (PS) 结合, 就可用流式细胞仪或荧光显微镜直接检测到磷脂酰丝氨酸的外翻这一细胞凋亡的重要特征。碘化丙啶 (Propidium Iodide, PI) 是一种 DNA 结合染料, 它可以染色坏死细胞或凋亡晚期丧失细胞膜完整性的细胞的细胞核。PI 可以由 488、532 或 546 nm 的激光激发, 呈现红色荧光。

### 产品组成

Product Composition

组 分	CP301 100 rxns
1 × Annexin V 结合缓冲液	2 × 50 mL
488-Annexin V*	500 $\mu\text{L}$
PI	1 mL

\* 该组分请勿冻存。

### 注意事项

Precautions

1. 使用前请将产品瞬时离心至管底, 再进行后续实验。
2. 为降低细胞凋亡进程, 孵育过程可在冰上操作, 但孵育时间至少延长至 30 min。
3. 由于细胞凋亡是一个快速的过程, 建议样品在染色后 1 h 之内进行分析。
4. 为了避免洗涤细胞时损失细胞, 在吸液时可以用大的 Tip 头套上小的 Tip 头吸液。
5. 荧光染料均存在淬灭问题, 保存和使用过程中请尽量注意避光, 以减缓荧光淬灭。
6. 本产品仅限于科研, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品和药品, 不得存放于普通住宅内。
7. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

### ➤ 实验组别设计

#### 无自发荧光样本

组别	Annexin V	核染料	样本类型
空白对照组	-	-	不做任何处理的细胞
阴性对照组	+	+	不做任何处理的细胞
单阳对照组 1	+	-	有明显的凋亡的细胞
单阳对照组 2	-	+	有明显的凋亡的细胞
实验组	+	+	实验组细胞

#### 自发荧光样本

组别	Annexin V	核染料	样本类型
空白对照组	-	-	不做任何处理无自发荧光的细胞
阴性对照组	+	+	不做任何处理无自发荧光的细胞
单阳对照组 1	+	-	无自发荧光有明显的凋亡的细胞
单阳对照组 2	-	+	无自发荧光有明显的凋亡的细胞
单阳对照组 3	-	-	带自发荧光的细胞
实验组	+	+	实验组细胞

空白对照：调节阈值和仪器电压。

阴性对照：排除实验操作对实验结果的影响，扣除荧光背景，同时还可以作为实验组划门的依据。

单阳对照：调节补偿，同时也可以辅助调节该通道的电压，防止信号超出仪器接收范围。

实验组：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。

### ➤ 收集细胞

#### 1. 对于悬浮细胞

1) 在进行完细胞凋亡刺激后，1000 rpm 离心 5 min，弃上清，收集细胞，用 PBS 轻轻重悬细胞并计数。

注：PBS 重悬不能省略，PBS 重悬的过程同时也起到了洗涤细胞的作用，可以保证后续 Annexin V 的结合。

2) 取  $50 \sim 1 \times 10^6$  个重悬的细胞，1000 rpm 离心 5 min，弃上清，加入 100  $\mu$ L  $1 \times$  Annexin V 结合缓冲液轻轻重悬细胞。

3) 加入 5  $\mu$ L 488-Annexin V，轻轻混匀。

4) 加入 5  $\mu$ L PI 染色液，轻轻混匀。

5) 室温 (20 ~ 25°C) 避光孵育 10 ~ 15 min。可以使用铝箔进行避光。孵育过程中可以重悬细胞 2 ~ 3 次以改善染色效果。

## 2. 对于贴壁细胞

1) 把细胞培养液吸出至一合适离心管内，PBS 洗涤贴壁细胞一次，加入适量胰酶细胞消化液（不含 EDTA）消化细胞。室温孵育至轻轻吹打使贴壁细胞吹打下来时，即可停止消化。这一步需避免胰酶过度消化。

注：对于贴壁细胞，胰酶消化步骤很关键。胰酶消化时间如果过短，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；消化时间如果过长，同样易造成细胞膜损伤而出现细胞坏死的假阳性，甚至会影响细胞膜上磷脂酰丝氨酸与 Annexin V 的结合从而干扰对于细胞凋亡的检测。

2) 加入上步中收集的细胞培养液，把细胞轻轻吹打下来，转移到离心管内，1000 rpm 离心 5 min，弃上清，收集细胞，用 PBS 轻轻重悬细胞并计数。

注：加入上步中的细胞培养液非常重要，一方面可以收集已经悬浮的发生凋亡或坏死的细胞，另一方面细胞培养液中的血清可以有效抑制或中和残留的胰酶。残留的胰酶会消化并降解后续加入的 Annexin V，导致染色失败。

3) 取  $50 \sim 1 \times 10^6$  个重悬的细胞，1000 rpm 离心 5 min，弃上清，加入 100  $\mu\text{L}$   $1 \times$  Annexin V 结合缓冲液轻轻

## 3. 重悬细胞。

1) 加入 5  $\mu\text{L}$  488-Annexin V，轻轻混匀。

2) 加入 5  $\mu\text{L}$  PI 染色液，轻轻混匀。

3) 室温 (20 ~ 25  $^{\circ}\text{C}$ ) 避光孵育 10 ~ 15min。可以使用铝箔进行避光。孵育过程中可以重悬细胞 2 ~ 3 次以改善染色效果。

## ➤ 结果分析

### 1. 流式细胞仪检测

1) 孵育完成后，可直接加入 400  $\mu\text{L}$   $1 \times$  Annexin V 结合缓冲液重悬细胞，立即上机检测，488-Annexin V 由 488 nm 激光激发，检测荧光发射光谱在 530 nm 处 (FITC 通道)，PI 通道发射光谱约在 617 nm 处。

2) 在双变量流式细胞仪的散点图上，左下象限显示活细胞，为 (488-Annexin V- / PI-)；右下象限为早期凋亡细胞，为 (488 -Annexin V+ / PI-)；右上象限是坏死与晚期凋亡细胞，为 (488-Annexin V+ / PI+)；左上象限显示裸核细胞，为 (488-Annexin V- / PI+)。

### 2. 荧光显微镜检测

1) 1000 rpm 离心 5 min，收集细胞，用 400  $\mu\text{L}$   $1 \times$  Annexin V 结合缓冲液轻轻重悬细胞。将细胞移至 96 孔板中沉降片刻或进行细胞涂片后，置于荧光显微镜下观察。

2) 488-Annexin V 可用 FITC 适用滤光片。PI 可用 Cy3 或者 Texas 适用的滤光片。

## 保存条件

Storage Conditions

4  $^{\circ}\text{C}$  避光冷藏，有效期见外包装；冰袋运输。

## 1. 问：引起假阳性问题的原因是什么？该怎么解决？

答：(1) 消化液中含有 EDTA 或消化时间过长引起的假阳性。Annexin V 和 PS 的结合需要  $\text{Ca}^{2+}$ ，而 EDTA 是  $\text{Ca}^{2+}$  螯合剂，使用含有 EDTA 的胰酶会造成假阴性。其次消化时间不宜过长，吹打细胞要轻柔，因为胰酶的过度消化和机械损伤都会引起细胞膜的损伤，造成假阳性。细胞消化下来后，建议在培养箱中再孵育 30 min，使细胞膜恢复完整性，避免假阳性，或者将细胞保存在含 2% BSA 的 PBS 中，防止进一步的损伤。

(2) 如果样品来源于血液，必须去除血液中的血小板，因为血小板含有 PS，能与 Annexin V 结合，干扰实验结果。建议：可以含有 EDTA 的缓冲液 200 g 离心去除血小板，最后细胞多洗几遍，减小 EDTA 螯合钙离子产生的影响。

(3) 神经细胞膜容易破坏外翻，导致假阳性，所以 Annexin V/PI 双染法流式检测细胞凋亡不适用于神经细胞。

(4) 诱导时间过长。一般情况下诱导几个小时就可以出现早期凋亡，因此通常不需要处理大于 48 h 以上，诱导时间过长会使营养物质耗尽，导致细胞状态差，假阳性结果偏高。

## 2. 问：对于贴壁细胞的操作该注意什么？

答：对于贴壁细胞，消化是一个关键步骤。贴壁细胞诱导细胞凋亡时如有漂浮细胞，需收集漂浮细胞和贴壁细胞后合并染色。处理贴壁细胞时要小心操作，尽量避免人为的损伤细胞。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，PI 摄入过多；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磷脂酰丝氨酸与 FITC-Annexin V 的结合。消化时将胰酶铺满孔板底后，轻摇时胰酶与细胞充分接触，然后倒掉大部分胰酶，利用剩余的少量胰酶再消化一段时间，待细胞间空隙增大，瓶底呈花斑状即可终止。EDTA 会影响 Annexin V 与 PS 的结合，因此在消化液中尽量不用 EDTA，贴壁细胞用胰蛋白酶消化后，建议在最佳培养条件和培养基中恢复约 30 min 后染色，避免假阳性。

## 3. 问：Annexin V 可以用在植物和细菌中吗？

答：Annexin V 也可以用在植物和细菌中检测凋亡，具体实验步骤可参考相关文献。

## 4. 问：对于贴壁细胞的操作该注意什么？

答：(1) 确认细胞有凋亡，确认染色 Annexin V 单染组是否有阳性。

(2) Annexin V 是否有过冻融？冻融会明显影响效果。

(3) 贴壁细胞用的胰酶消化液是否有 EDTA，EDTA 会影响 Annexin V 和 PS 的结合。

(4) 确定药物诱导细胞凋亡，药物本身是否会破坏 PS 导致影响 Annexin V 与 PS 的结合。

(5) 染料的最佳使用浓度由具体实验要求确定，可以适当调节染色的浓度。

## 5. 问：正常细胞（阴性对照组）为什么有大量的凋亡？

答：(1) 细胞本身状态不佳。建议重新铺细胞，获得状态良好的细胞。

(2) 实验操作过程中带来的机械损伤，或者消化过度。建议控制好消化时间和轻柔处理细胞。