



488-Annexin V/PI Apoptosis Kit CP301

产品概述

Product Overview

488-Annexin V/PI凋亡检测试剂盒提供了一种快速、简便的细胞凋亡分析方法，可通过绿色与红色荧光分别标记早期凋亡与晚期凋亡/坏死细胞。利用 Annexin V 与凋亡早期外翻的磷脂酰丝氨酸 (PS) 特异性结合，实现早期凋亡细胞的绿色荧光标记；同时采用碘化丙啶 (PI) 穿透膜结构受损的细胞，并嵌入细胞核 DNA 产生红色荧光，从而区分晚期凋亡和坏死细胞。该方法兼容流式细胞仪和荧光显微镜检测，适用于定量和定性分析细胞凋亡水平。

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 µL
PI	1 mL

* 该组分请勿冻存。

注意事项

Precautions

- 使用前请将产品瞬时离心至管底，再进行后续实验。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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。

操作流程

Operation Process

► 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 $5 \times 10^4 - 10^5$ 个重悬的细胞，1000 rpm 离心 5 min，弃上清，加入 100 μ L $1 \times$ Annexin V 结合缓冲液轻轻重悬细胞。

3) 加入 5 μ L 488-Annexin V，轻轻混匀。

4) 加入 5 μ 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 $5 \times 10^4 - 10^5$ 个重悬的细胞，1000 rpm 离心 5 min，弃上清，加入 100 μ L $1 \times$ Annexin V 结合缓冲液轻轻重悬细胞。

4) 加入 5 μ L 488-Annexin V，轻轻混匀。

5) 加入 5 μ L PI 染色液，轻轻混匀。

6) 室温 (20 ~ 25 °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 μ 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 μ 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 °C避光冷藏, 冰袋运输。保质期: 36个月。