请在使用前仔细阅读本说明书

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1×10^6 cells/ml计算

储存条件

0-5°C，避光 (切勿冻存)

运输条件

室温

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^{2+}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。

实验实例

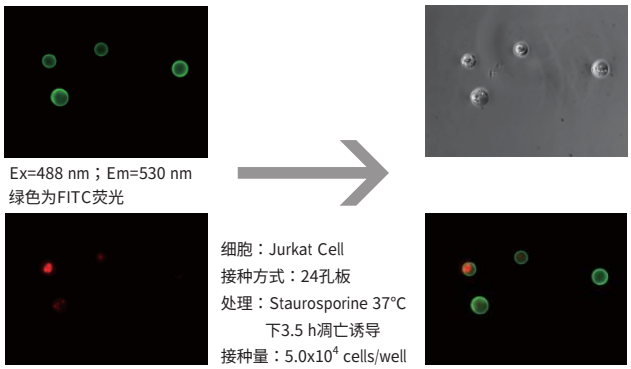
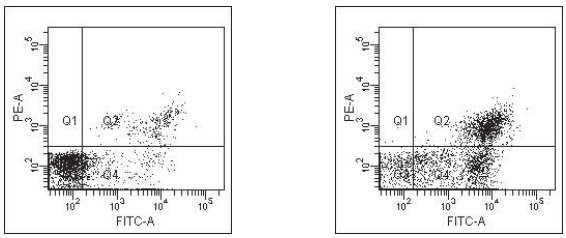
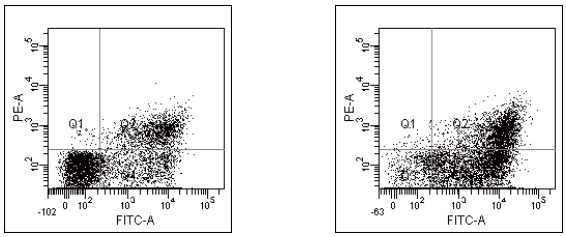


图1. staurosporine诱导Jurkat细胞凋亡的图像



a.参照 (无Staurosporine处理)　　b. Staurosporine诱导的凋亡

图2. Staurosporine诱导凋亡后的活细胞数量 (FITC/PI 二维点阵图；细胞：Jurkat)



a.参照 (无paclitaxel处理)　　b. Paclitaxel诱导的凋亡

图3. paclitaxel诱导凋亡后的活细胞数量 (FITC/PI 二维点阵图；细胞：MDA-MB-231)

图2、3中诱导凋亡组 (b) 显示早期细胞凋亡区域(Q4) 比无凋亡组该区域 (a) 的细胞数量更多。处于凋亡晚期的细胞数量也可以被观察到 (Q2)，几乎所有细胞的凋亡情况都可以观测到。

所需的设备和材料

- 样品和诱导剂
- PBS、去离子水
- 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用蒸馏水稀释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。

关联产品

细胞增殖毒性检测试剂盒 CCK-8；
活死细胞双染 (Calcein-AM+PI)

操作流程

-悬浮细胞的操作流程

诱导凋亡的操作步骤

1.制备细胞 (Jurkat cell) 悬液 (1×10^6 cells/ml)
2.加入终浓度为1 μg/ml的凋亡诱导剂 (Staurosuporine)
3.在37°C下培养3.5 h。

** Staurosuporine用于诱导Jurkat cell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，1,000 rpm离心3 min，去除上清液。
2. 加入PBS，1,000 rpm离心 3 min，去除上清液。再重复本步操作一遍。
3. 用之前准备好的1×Annexin V Binding Solution制备细胞终浓度为1×10^6 cells/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 μl细胞悬液。*

4. 取100 μl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 μl Annexin V,FITC结合物，再加入5 μl PI Solution。
6. 室温下避光培养15 min。
7. 加入400 μl 1×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

1. 制备细胞 (Caco-2) 悬液 (1×10^6 cells/ml)
将细胞悬液接种到培养皿或者培养板中。
2. 在5% CO_2培养箱中37°C预培养。
3. 加入终浓度为25 μmol/ml的凋亡诱导剂 (Cisplatin)。
4. 37°C培养4 days。

** Cisplatin用于诱导Caco-2 cell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型管中保存。
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. 1,000 rpm离心3 min，弃上清。
6. 加入PBS后1,000 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×Annexin V Binding Solution，制成终浓度为1×10^6 cells/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 μl细胞悬液。*

8. 取100 μl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 μl Annexin V, FITC结合物，再加入5 μl的PI Solution。
10. 室温下避光培养15 min。
11. 加入400 μl 1×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Ex = 488 nm；发射波长Em = 530 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. PI有潜在的致癌性，操作时请特别注意并采取必要的防护措施。
2. 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。
3. 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。

热线电话：400-823-9388　800-988-0083

如果您需要更多的信息或者有任何问题可以通过以下的方式联系我们：

上海
上海市零陵路899号飞洲国际广场27楼J座
邮编：200030
电话：021-6427-2302
网址：http://www.dojindo.cn

北京
北京市朝阳区德外马甸裕民路12号元辰鑫大厦E1-210室
邮编：100029
电话：010-8225-1765、8225-3054
E-mail: info@dojindo.cn

修订日期：2014.09