

**描述:** 细胞凋亡是细胞的基本特征之一, 它在机体的胚胎发育、组织修复、内环境的稳定等方面起着十分重要的作用。

AnnexinV 是一种分子量为 35~36kD 的  $Ca^{2+}$  依赖性磷脂结合蛋白, 能与细胞凋亡过程中翻转到膜外的磷脂酰丝氨酸 (Phosphatidylserine, PS) 高亲和力特异性结合。以标记了 FITC 的 AnnexinV 作为荧光探针, 利用流式细胞仪或荧光显微镜可检测细胞凋亡的发生。 Propidium iodide (PI) 是一种核酸染料, 它不能透过完整的细胞膜, 但凋亡中晚期和死细胞由于细胞膜破裂, 因此 PI 能够将细胞核染红。将 AnnexinV 与 PI 匹配使用, 可以区分活细胞 (FITC/PI 均为阴性)、凋亡早期细胞 (FITC 阳性、PI 均为阴性)、凋亡晚期或死细胞 (FITC/PI 均为阳性)。

本试剂盒使用改进型的高纯度 FITC 染料, 其在红色通道 (690nm) 无发射光, 因此极大的减少了对红色通道的干扰。使用该试剂盒进行细胞凋亡检测时荧光相互干扰更小、检测更准确。

#### 组分

组 分	S0185(20T)	S0185(100T)
Annexin V-FITC	100 $\mu$ l	500 $\mu$ l
PI Staining Solution	100 $\mu$ l	500 $\mu$ l
10 $\times$ Annexin V Binding Buffer	20 ml	20 ml

**储存:** 2~8 $^{\circ}$ C, 有效期 1 年。

#### 注意事项

1. 整个操作过程动作要尽量轻柔, 勿用力吹打细胞。
2. 反应完毕后请尽快检测, 反应 1 小时后荧光强度就开始衰变。
3. Annexin V-FITC 和 Propidium iodide 是光敏物质, 在操作时请注意避光。
4. 试验操作过程中佩戴手套等防护用品。
5. 试验开始前将一定量的 10 $\times$  Annexin V Binding Buffer 用超纯水 (1: 9) 稀释至 1 $\times$  备用。

## 操作步骤:

1. 贴壁细胞: 用胰酶消化至单细胞悬液; 悬浮细胞: 可直接使用。
2. 1000rpm (400g), 离心 5min, 弃上清。
3. 加入 1ml PBS, 轻轻吹打使细胞悬浮, 1000rpm, 离心 5min, 弃上清。
4. 再重复步骤 3 一次, 尽可能吸除多余的 PBS 溶液;
5. 加入 1×Annexin V Binding Buffer 重悬细胞, 使细胞密度为  $0.2\sim 1\times 10^6$  个/ml。

注意: a. 必须使用 1×Annexin V Binding Buffer 重悬细胞 (不可使用 PBS 重悬, 否则会导致 AnnexinV 无法结合 PS 位点);

b. 将细胞悬液用 200 目筛网过滤一次, 再进行下述操作将有助于获得最佳试验结果。

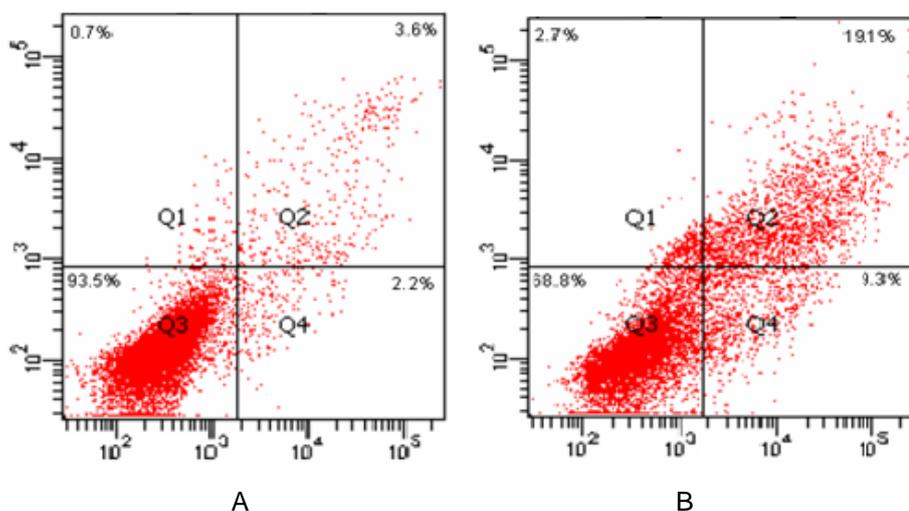
6. 取 100 $\mu$ l 上述细胞重悬液, 加入 5 $\mu$ l Annexin V-FITC、5 $\mu$ l PI Staining Solution 混合均匀, 室温避光放置 15min。

7. 反应结束后加 400 $\mu$ l Binding Buffer 轻轻混匀在 1 小时内上流式细胞仪检测。

注意: a. 流式细胞仪要求配备 488nm 激发光源; FITC 使用绿色通道检测 (525nm); PI 推荐使用红色通道检测 (690nm), PI 也可使用黄色通道检测 (580nm), 但黄色通道必须进行荧光补偿操作。

b. 本试剂采用高纯度改进型 FITC 染料, 其无法在红色通道检测, 因此采用绿色通道和红色通道进行检测时, 通常无需荧光补偿操作。

8. 若用荧光显微镜检测, 将细胞混合液离心, 取细胞沉淀涂片, 再进行观察。



实验实例—药物对细胞凋亡的影响: (A)未添加药物的肿瘤细胞; (B)添加药物的肿瘤细胞