

## Annexin V-EGFP 凋亡检测试剂盒

### Annexin V-EGFP Apoptosis Detection Kit

本产品冰袋运输；避光保存于4℃，保质期12个月。

#### 货号规格

CX005S	20次
CX005	50次
CX005L	100次

#### 产品简介

细胞凋亡 (Apoptosis) 是最常见的细胞死亡方式之一，其受到基因的严格调控。细胞凋亡过程常伴随着明显的细胞形态学变化，比如，细胞凋亡早期，质膜内侧的磷脂酰丝氨酸 (phosphatidylserine, PS) 会翻转到细胞质膜表面；而在凋亡的中后期，随着细胞质膜的通透性的增大，一些较大分子的化合物，如碘化丙啶 (Propidium Iodide, PI, 一种 DNA 结合染料)，便可自由扩散进入细胞，将细胞核染上红色荧光。

Annexin V (膜联蛋白-V) 是一种分子量为 35~36 kDa 的  $Ca^{2+}$  依赖性磷脂结合蛋白，能与磷脂酰丝氨酸高亲和力特异性结合。本试剂盒采用与绿色荧光蛋白 (EGFP) 融合的 Annexin V 作为检测磷脂酰丝氨酸的探针，配合碘化丙啶 (PI)，通过使用流式细胞仪、荧光显微镜或其它荧光检测设备，可以快速检测细胞凋亡。Annexin V-EGFP 凋亡检测试剂盒对细胞群进行染色后，凋亡细胞显示绿色荧光，死细胞显示红色和绿色荧光，活细胞几乎没有荧光。

#### 产品内容

组分	CX005S	CX005	CX005L
Annexin V-EGFP	80 $\mu$ L	200 $\mu$ L	400 $\mu$ L
结合缓冲液	14 mL	35 mL	70 mL
碘化丙啶 (PI)	80 $\mu$ L	200 $\mu$ L	400 $\mu$ L

#### 注意事项

- 流式检测需设置三个对照样品来校准：  
空白管：仅用 **结合缓冲液** 重悬的细胞，以评估自身荧光水平，并相应地调整仪器；  
单染管：分别用 Annexin V-EGFP 或碘化丙啶 (PI) 染色，以确定每个细胞群体的边界；
- 如使用含 EDTA 的胰酶消化细胞时，有必要在染色之前用 PBS 或 **结合缓冲液** 洗涤细胞两次以去除 EDTA，从而避免螯合 Annexin V 所必需的  $Ca^{2+}$ ；
- 流式细胞仪检测时，使用 FITC 通道 (通常是 FL1) 检测 Annexin V-EGFP；phycoerythrin 通道 (通常是 FL2) 检测 PI。用 CellQuest 等软件进行分析，以 EGFP 为横坐标，PI 为纵坐标，绘制双色散点图 (two-color dot plot)；
- 建议细胞在染色后 1 h 之内完成检测；
- 实验操作过程需尽量轻柔，从而最大限度地保留凋亡的细胞；
- 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，以避免开盖时液体洒落；
- Annexin V-EGFP 和 PI 是光敏物质，在操作时请注意避光；
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作；
- 本产品仅限科研使用。

## 操作步骤

### ◆ 对于悬浮细胞

1. 离心收集细胞 (2000×g, 1 min)，用预冷的 PBS (pH 7.4) 轻轻重悬细胞并计数；
2. 配置 Staining Buffer:  
将 4 μL Annexin V-EGFP 及 4 μL 碘化丙啶(PI) 加入 192 μL 结合缓冲液 中，充分混匀并简短离心，获得 Staining Buffer；
3. 取  $0.5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^5$  个细胞，离心 (2000×g, 1 min)，弃上清，加入 200 μL Staining Buffer，轻轻重悬细胞，室温或 37°C 避光孵育 5~10 min；
4. (可选步骤) 将孵育后的细胞离心 (2000×g, 1 min)，去除 Staining Buffer，用 结合缓冲液 重悬细胞；
5. 立即进行流式细胞仪检测。如用于荧光显微镜检测，可涂片后，在荧光显微镜下进行观察。

### ◆ 对于贴壁细胞

1. 首先将细胞培养液吸出至一新离心管内，接着用预冷的 PBS (pH 7.4) 轻柔地洗涤贴壁细胞一次，加入适量胰酶细胞消化液 (不含 EDTA)，室温孵育至轻轻吹打可以使贴壁细胞脱落下来即可，吸除胰酶细胞消化液。需避免胰酶的过度消化，以免造成假阳性；
2. 在细胞中加入上一步骤收集的细胞培养液，稍混匀，转移至离心管内，离心 (2000×g, 1 min)，弃上清，收集细胞，用预冷的 PBS (pH 7.4) 轻轻重悬细胞并计数；

**注意：**加入步骤 1 中的细胞培养液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-EGFP 导致染色失败。

3. 配置 Staining Buffer:  
将 4 μL Annexin V-EGFP 及 4 μL 碘化丙啶(PI) 加入 192 μL 结合缓冲液 中，充分混匀并简短离心，获得 Staining Buffer；
4. 取  $0.5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^5$  个细胞，离心 (2000×g, 1 min)，弃上清，加入 200 μL Staining Buffer，轻轻重悬细胞，室温或 37°C 避光孵育 5~10 min；
5. (可选步骤) 将孵育后的细胞离心 (2000×g, 1 min)，去除 Staining Buffer，用 结合缓冲液 重悬细胞；
6. 立即进行流式细胞仪检测。如用于荧光显微镜检测，可涂片后，在荧光显微镜下进行观察。

### ◆ 对于贴壁细胞的原位荧光显微镜检测

**注：**本方法的优点是可以原位观察细胞凋亡，缺点是部分凋亡细胞由于不贴壁而检测不到。

1. 将细胞培养于 24 孔板、48 孔板或 96 孔板内。在凋亡诱导结束后吸除细胞培养液，加入预冷的 PBS (pH 7.4) 洗涤一次，轻柔地去除细胞上清；
2. 配置 Staining Buffer:  
将 4 μL Annexin V-EGFP 及 4 μL 碘化丙啶(PI) 加入 192 μL 结合缓冲液 中，充分混匀并简短离心，获得 Staining Buffer；
3. 加入适量 Staining Buffer (覆盖住细胞)，室温或 37°C 避光孵育 5~10 min；
4. (可选步骤) 去除 Staining Buffer，加入适量 结合缓冲液 ；
5. 立即在荧光显微镜下观察。

版本号：21L13