

ANNEXIN V-Alexa Fluor 647/PI Kit 凋亡检测试剂盒说明书

货号: AC10862

规格: 20T/50T/100T

保存: 2-8°C 避光保存, 勿冰冻。

产品说明:

产品内容:	AC10862-20	AC10862-50	AC10862-100
Annexin V/Alexa Fluor 647	100µl	250µl	500µl
Propidium iodide(PI)(20µg/ml)	100µl	250µl	500µl
Binding Buffer (10×)	2ml	5ml	10ml

细胞凋亡早期改变发生在细胞膜表面, 这些细胞膜表面的改变之一是磷脂酰丝氨酸 (PS) 从细胞膜内转移到细胞膜外, 使 PS 暴露在细胞膜外表面。PS 是一种带负电荷的磷脂, 正常主要存在于细胞膜的内面, 在细胞发生凋亡时细胞膜上的这种磷脂分布的不对称性被破坏而使 PS 暴露在细胞膜外。Annexin V 具有易于结合到磷脂类如 PS 的特性, 对 PS 有高度的亲和性。因此, 该蛋白可充当一敏感的探针检测暴露在细胞膜表面的 PS。PS 转移到细胞膜外不是凋亡所独特的, 也可发生在细胞坏死中。两种细胞死亡方式间的差别是在凋亡的初始阶段细胞膜是完好的, 而细胞坏死在其早期阶段细胞膜的完整性就破坏了。因此, 可以采用 AnnexinV 与 PI 双染的方法, 通过流式检测细胞早期凋亡。

操作步骤:

1、细胞样品的准备:

a)对于贴壁细胞: 小心收集细胞培养液到一离心管内备用。用不含 EDTA 的胰酶消化细胞, 至细胞可以被轻轻用移液管或枪头吹打下来时, 加入前面收集的细胞培养液, 吹打下所有的贴壁细胞, 并轻轻吹散细胞。再次收集到离心管内。1000rpm 左右离心 5min, 沉淀细胞。对于特定的细胞, 如果细胞无法完全离心至离心管底, 可以适当延长离心时间或稍加大离心力。小心吸除上清, 可以残留约 50µl 左右的培养液, 以避免吸走细胞。加入约 1ml 4°C 预冷的 PBS, 重悬细胞, 再次离心沉淀细胞, 小心吸除上清。

b)对于悬浮细胞: 1000rpm 左右离心 5min, 沉淀细胞。对于特定的细胞, 如果细胞无法完全离心至离心管底, 可以适当延长离心时间或稍加大离心力。小心吸除上清, 可以残留约 50µl 左右的培养液, 以避免吸走细胞。加入约 1ml 4°C 预冷的 PBS, 重悬细胞, 再次离心沉淀细胞, 小心吸除上清。

2、用去离子水按 1:9 稀释结合缓冲液 (2 ml 10×结合缓冲液+18ml 去离子水)。

3、用 1×结合缓冲液重新悬浮细胞, 调节其浓度为 $1-5 \times 10^6$ /ml。

4、取 100µl 的细胞悬液于 5ml 流式管中, 加入 5µl Annexin V/Alexa Fluor 647 混匀后于室温避光孵育 5 分钟。

5、加入 5µl 20µg/ml 的碘化丙啶溶液 (PI), 并加 400µl PBS, 立刻进行流式检测。

实验设计:

1)未转染细胞

空白管: 阴性对照组细胞, 不加 Annexin V/Alexa Fluor647, 碘化丙啶溶液 (PI)。用于调节电压。

检测管: 处理的细胞, 加 Annexin V/Alexa Fluor 647, 碘化丙啶溶液 (PI)。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。

注：无需单染管 Annexin V/Alexa Fluor 647 调补偿。

2)转染 GFP 细胞

未转染空白管：未转染细胞，不加 Annexin V/Alexa Fluor647，碘化丙啶溶液（PI）。用于调电压。

转染 GFP 空白管：转染 GFP 对照组细胞，不加 Annexin V/Alexa Fluor 647，碘化丙啶溶液（PI）。用于调补偿。

检测管：处理的细胞，加 Annexin V/Alexa Fluor 647，碘化丙啶溶液（PI）。调节好电压补偿后，获得所需要的流式数据。

常见问题：

1、Annexin V/PI 凋亡检测的试剂盒能否检测人以外其他动物的细胞凋亡情况。

可以，因为 Annexin V 是与磷脂酰丝氨酸（PS）亲和，而 PS 在不同种属间没差异。在正常细胞中，PS 只分布在细胞膜脂质双层的内侧，而在细胞凋亡早期，PS 由脂膜内侧翻向外侧。

2、贴壁细胞做凋亡用胰酶消化下来对细胞膜损伤？

低浓度胰酶消化，轻柔吹打贴壁细胞 2-3 次，离心机 4°C 1000rpm 左右离心 5min，处理得当的话，胰酶造成的损伤可以控制在 5%以内，有对照组的情况下对实验结果不会造成明显影响。

3、为什么只能用不含 EDTA 的胰酶消化细胞，用含 EDTA 的胰酶消化细胞对结果有什么影响？

因为 Annexin V 是钙依赖的蛋白，所以不能加入 EDTA，防止 EDTA 螯合钙离子从而影响 Annexin V，进而影响结果。

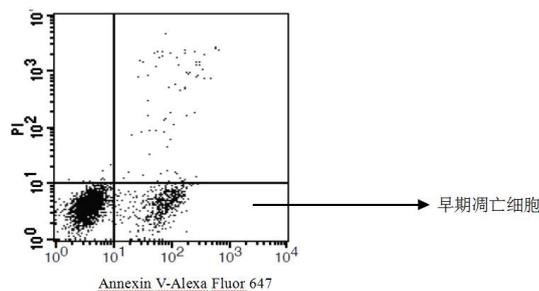
4、贴壁细胞可以先染 PI 然后再消化下来吗？这样是否可以减小由于消化液造成的细胞膜破损而染上的 PI 的误差？

先加 PI 不仅染色是否每组都均匀充分很难判断，而且 PI 本身对细胞也是有毒性的，对实验结果影响会比胰酶大，不建议这样做。

5、有些厂家说明书 Annexin V 和 PI 一起加？为什么你们先加 Annexin V 后加 PI？

用流式检测凋亡时，PI 受时间的影响很大，因标记了 PI 后会加大细胞毒性，随着时间延长会导致 PI 的染色增加，特别是检测早期凋亡时，如果时间延长除了会导致在流式细胞仪上的细胞分群差距加大外，误差会明显加大。一般 PI 加上后立刻上机，然后在一个小时內检测完成。两种方法都可以，但是按照我们的操作步骤造成的误差会更小。

实验参考图：



Jurkat 细胞用顺铂诱导凋亡后用 Annexin V-Alexa Fluor 647/PI 双染流式分析图谱

相关文献：

- [1] Ruifeng Zhao, Jing Jin, Xinyu Sun, et al. The establishment of clonally derived chicken embryonic fibroblast cell line (CSC) with high transfection efficiency and ability as a feeder cell. Journal of cellular Biochemistry. August 2018. (IF 2.959)