

产品名称：Fluorescein 647-Annexin V/PI 细胞凋亡试剂盒（远红/红色）

产品货号：RA20077

基本信息

中文名称	Fluorescein 647-Annexin V/PI 细胞凋亡试剂盒（远红/红色）
英文名称	Fluorescein 647-Annexin V/PI Apoptosis Kits(Far-Red/Red)
产品规格	10 T、50 T、100 T
存储条件	2-8℃，避光保存
运输条件	冰袋运输
有效期	12 个月
激发/发射波长	Fluorescein 647-Annexin V：650/668 nm；PI：535/617 nm

产品介绍

Fluorescein 647-Annexin V/PI 凋亡试剂盒提供了一种通过标记早期凋亡细胞（远红）和坏死或晚期凋亡的细胞（红色）快速简便地检测细胞凋亡水平的方法。Annexin V（膜联蛋白-V）是一种分子量为 35~36 KD 的 Ca^{2+} 依赖性磷脂结合蛋白，可与磷脂酰丝氨酸 (PS) 选择性结合。磷脂酰丝氨酸 (PS) 主要分布在细胞膜内侧，即与细胞质相邻的一侧。在细胞发生凋亡的早期，不同类型的细胞都会把磷脂酰丝氨酸外翻到细胞表面，暴露在细胞外环境中。此时，使用绿色荧光探针 Fluorescein 647-Annexin V 与外翻的磷脂酰丝氨酸 (PS) 结合，就可用流式细胞仪或荧光显微镜直接检测到磷脂酰丝氨酸的外翻这一细胞凋亡的重要特征。

碘化丙啶 (Propidium Iodide, PI) 是一种 DNA 结合染料，它可以染色坏死细胞或凋亡晚期丧失细胞膜完整性的细胞的细胞核，激发后呈现红色荧光。

产品组分

组分	10 T	50 T	100 T
A. 1 × Annexin V 结合缓冲液	10 mL	50 mL	2 × 50 mL
B. Fluorescein 647-Annexin V	50 μL	250 μL	500 μL
C. PI	100 μL	500 μL	1 mL

注：B 组分请勿冻存。

自备材料

1. 耗材

96/24/12/6 孔培养板或培养皿

2. 试剂

产品名称：Fluorescein 647-Annexin V/PI 细胞凋亡试剂盒（远红/红色）

产品货号：RA20077

(1) 细胞样本；(2) PBS；(3) 培养基

3.仪器

流式细胞仪、荧光显微镜

实验步骤

操作步骤

一、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	-	-	不做任何处理无自发荧光的细胞
阴性对照组	+	+	不做任何处理有自发荧光的细胞
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

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

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。

二、收集细胞

(一) 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。

产品名称：Fluorescein 647-Annexin V/PI 细胞凋亡试剂盒（远红/红色）

产品货号：RA20077

2.取 $50 \sim 1 \times 10^6$ 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 Fluorescein 647-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 $^{\circ}$ 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。

（二）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可以使贴壁细胞吹打下来时，即可停止消化。这一步需避免胰酶的过度消化。

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 $50 \sim 1 \times 10^6$ 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 Fluorescein 647-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 $^{\circ}$ 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。

三、结果分析

（一）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，Fluorescein 647-Annexin V 由 650 nm 激光激发，检测荧光发射光谱在 668 nm 处，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 (Fluorescein 647-Annexin V-/PI-)；右下象限为早期凋亡细胞，为 (Fluorescein 647-Annexin V+/PI-)；右上象限是坏死与晚期凋亡细胞，为 (Fluorescein 647-Annexin V+/PI+)；左上象限显示裸核细胞，为 (Fluorescein 647-Annexin V-/PI+)。

（二）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. Fluorescein 647-Annexin V 可用 Cy5 适用滤光片。PI 可用 Cy3 或者 Texas 适用的滤光片。

产品名称：Fluorescein 647-Annexin V/PI 细胞凋亡试剂盒（远红/红色）

产品货号：RA20077

注意事项

- 1.使用前请将产品瞬时离心至管底，再进行后续实验。
- 2.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。
- 3.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。
- 4.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。
- 5.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。
- 6.本产品仅限于科研，不得用于临床诊断或治疗。
- 7.为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

备注：该试剂仅供科研使用！