

Annexin V-EGFP 细胞凋亡检测试剂盒

Annexin V-EGFP Apoptosis Detection Kit

说明书修订日期: 2019.11.27

Cat number: KGA101-KGA104

Store at 2-8°C for 12 months, protected from light

For Research Use Only(科研专用)

一、试剂盒说明

在正常细胞中, 磷脂酰丝氨酸 (PS) 只分布在细胞膜脂质双层的内侧, 而在细胞凋亡早期, 细胞膜中的磷脂酰丝氨酸 (PS) 由脂膜内侧翻向外侧。Annexin V 是一种分子量为 35~36kD 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, 故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结合。因此 Annexin V 被作为检测细胞早期凋亡的灵敏指标之一。将 Annexin V 进行荧光素 (EGFP、FITC) 标记, 以标记了的 Annexin V 作为荧光探针, 利用荧光显微镜或流式细胞仪可检测细胞凋亡的发生。与 FITC 的绿色荧光信号相比, EGFP 的绿色荧光信号具有信号强, 不易淬灭, 稳定性高等优点, 故本试剂盒采用 EGFP 作为荧光标记探针。碘化丙啶 (Propidium iodide, PI) 是一种核酸染料, 它不能透过完整的细胞膜, 但对凋亡中晚期的细胞和死细胞, PI 能够透过细胞膜而使细胞核染红。因此将 Annexin V 与 PI 匹配使用, 就可以将处于不同凋亡时期的细胞区分开来。

本试剂盒可应用于培养细胞凋亡检测 (不推荐用于检测组织样本)。

二、试剂盒组份

组份	Cat: KGA101 10 assays	Cat: KGA102 20 assays	Cat: KGA103 50 assays	Cat: KGA104 100 assays	储存条件
AnnexinV-EGFP	50 μ L	100 μ L	250 μ L	500 μ L	2-8°C, 避光
Propidium iodide	50 μ L	100 μ L	250 μ L	500 μ L	2-8°C, 避光
Binding Buffer	5 mL	10.0 mL	25 mL	50 mL	2-8°C

三、试剂盒以外自备仪器和试剂

流式细胞仪或荧光显微镜、低速离心机、微量移液器

1.5m L Microtube、载玻片、盖玻片 (荧光显微镜观察需用)、PBS、不含 EDTA 的胰酶消化液

四、使用注意事项

1. 微量试剂取用前请离心集液。
2. Annexin V-EGFP, Propidium Iodide (PI) 避光保存及使用。
3. Propidium Iodide (PI) 有毒, 操作时请戴手套。
4. 本试剂盒适用于检测活细胞, 流式细胞仪检测时, 细胞数量不应低于 1×10^5 , 不推荐用于检测组织样本。
5. 推荐使用悬浮培养细胞。如果是贴壁细胞, 需用不含 EDTA 的胰酶消化, 如消化不当, 可能引起假阳性, 而用细胞刮子会造成细胞粘连成团, 而影响检测。可将胰酶消化后细胞的保存在含 2%BSA 的 PBS 中, 防止进一步的损伤。
6. 细胞固定后可能导致荧光的淬灭, 请不要固定样品。
7. 因检测细胞的类型、凋亡诱导剂种类、使用的检测仪器不同, 因而流式检测的荧光补偿也不同, 因此建议每次检测均需使用经凋亡诱导处理的细胞作为对照, 进行荧光补偿的调节。

五、操作方法

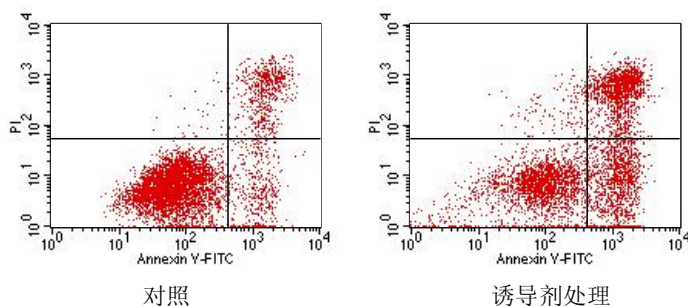
1. 悬浮细胞离心（800g 离心力，离心 5min）收集；贴壁细胞用不含 EDTA 的胰酶消化收集（注：胰酶消化时间不易过长，否则容易引起假阳性）；
2. 用 PBS 洗涤细胞二次（800g 离心力，离心 5min）收集 $1\sim 5\times 10^5$ 细胞；
3. 加入 500 μ L 的 Binding Buffer 悬浮细胞；
4. 加入 5 μ L Annexin V-EGFP 混匀后，加入 5 μ L Propidium Iodide，混匀；
5. 室温、避光、反应 10~20min；
6. 请在 1 hour 内，进行流式细胞仪的观察和检测。

流式细胞仪分析

- 1) 用流式细胞仪检测，激发波长 Ex=488 nm；发射波长 Em=530 nm。
- 2) 对于 BD 流式细胞仪来说，Annexin V-EGFP 的绿色荧光通过 FITC 通道（FL1）检测；PI 红色荧光通过 PI 通道（FL2 或 FL3）检测，建议使用 FL3。
- 3) 荧光补偿调节：使用经凋亡诱导处理的正常细胞，作为对照进行荧光补偿调节去除光谱重叠和设定十字门的位置。

六、实验范例

用凋亡诱导剂诱导 P388 细胞凋亡，在 37°C，5%CO₂ 培养箱培养 4~6h 后，参照说明书的操作方法进行检测，经流式细胞仪检测结果见下图。



七、凯基相关产品（详见凯基网站 <http://www.keygentec.com.cn>）

细胞株、细胞提取物及细胞培养产品

细胞凋亡

细胞增殖/毒性/活力与细胞周期

细胞染色产品

亚细胞组分制备