

## Annexin V-Cy3/SYTOX Green Apoptosis Kit

### 产品描述

Annexin V是一种Ca<sup>2+</sup>依赖性磷脂结合蛋白，可与磷脂酰丝氨酸（Phosphatidylserine, PS）特异结合。PS正常位于细胞膜脂质双层的内侧，但在细胞凋亡早期PS可从细胞膜的内侧翻转到细胞膜的外表面，暴露在细胞外环境中。Annexin V对PS具有高亲和力，对Annexin V进行Cy3标记，以带有标记的Annexin V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，染色过程仅需10-20 min。SYTOX Green是一种非细胞膜渗透性的花菁荧光染料，正常情况下无法透过细胞膜。但对于凋亡晚期的细胞和死细胞，SYTOX Green能穿过细胞膜的无序区域而到达细胞核，并嵌入细胞的DNA双螺旋形成SYTOX Green-DNA复合物使荧光强度增加500倍以上，从而产生明亮的绿色荧光，因此SYTOX Green仅能对死细胞染色，从而被用来区分正常细胞与坏死细胞。

### 组分和储存条件

Components	K1140-20 20 Assays	K1140-50 50 Assays	K1140-100 100 Assays
Annexin V-Cy3	100 µL	250 µL	500 µL
1X Binding Buffer	10 mL	25 mL	50 mL
SYTOX Green	20 µL	50 µL	100 µL

请将 SYTOX Green 于-20°C 保存，其他组分于 2-8°C 保存。Annexin V-Cy3 和 SYTOX Green 均需要避光保存，有效期半年。Annexin V-Cy3 不可冷冻保存。

### 实验操作

1. 通过实验方案诱导细胞凋亡。

2. 收集细胞：

悬浮细胞：300×g离心5 min，弃培养基上清；

贴壁细胞：尽量使用不含EDTA的胰酶消化细胞，300×g离心5 min，弃上清。

**\*Note:** 对于贴壁细胞，消化是一个关键步骤。贴壁细胞诱导细胞凋亡时如有漂浮细胞，需收集漂浮细胞和贴壁细胞后合并染色（可以事先把含有漂浮细胞的细胞培养基吸出至一合适离心管内，待胰酶消化完成后加回培养皿中与消化下来的细胞合并进行离心）。处理贴壁细胞时要小心操作，尽量避免人为的损伤。胰酶消化时间过短，细胞需要用力吹打才能脱落，容易造成细胞膜的损伤；消化时间过长，细胞膜同样易造成损伤，甚至会影响细胞膜上 PS 与 Annexin V-Cy3 的结合。

3. 用预冷的PBS洗涤细胞，收集 $1-5 \times 10^5$ 细胞。
4. 将细胞重悬于500  $\mu\text{L}$  1X Binding Buffer中。
5. 加入5  $\mu\text{L}$  Annexin V-Cy3和1  $\mu\text{L}$  SYTOX Green（实验前请先将SYTOX Green从 $-20^\circ\text{C}$ 取出进行解冻），轻轻混匀，室温避光孵育10-20 min。
6. 反应结束后立即用流式细胞仪或荧光显微镜进行检测。如不能立即进行检测，请将样品放置于冰上并在1 h内进行检测。

流式细胞仪检测：Annexin V-Cy3的荧光发射波长570 nm，信号可以通过FL2通道检测；SYTOX Green-DNA 最大激发波长为 504 nm，最大发射波长为 523 nm，可以通过FL1（FITC接收器）通道检测。

荧光显微镜观察：将步骤5中的细胞悬浮液30-50  $\mu\text{L}$ 滴加于载玻片上，用盖玻片覆盖细胞，荧光显微镜/激光共聚焦下进行观察。正常细胞不会被Annexin V-Cy3和SYTOX Green所染色，凋亡细胞和坏死细胞都会被Annexin V-Cy3所染色，坏死细胞或晚期凋亡细胞的细胞核被SYTOX Green染成明亮的绿色荧光。

**\*Note:** 一般来说，相较于流式细胞术的用量，基于显微镜的分析推荐适当提高 Annexin V 的浓度。

## ■ 注意事项

1. 由于细胞凋亡是一个快速的过程，建议尽量在染色后1 h内完成分析。时间过长可能会导致凋亡或坏死细胞的数量增加。
2. 由于Annexin V法是通过检测细胞膜的变化来确定凋亡的发生及其所处阶段，所以Annexin V-Cy3和SYTOX Green染色前，不能使用破坏细胞膜完整性的固定剂或通透剂来固定或破膜。
3. 整个操作过程中动作要尽量轻柔，勿用力吹打细胞，避免对细胞造成机械性损伤，造成SYTOX Green假阳性增多。
4. 如果样品来源于血液，请务必除去血液中的血小板。因为血小板含有PS，能与Annexin V结合，从而干扰实验结果。可以使用含有EDTA的缓冲剂并在1,400 rpm ( $200 \times g$ )离心洗去血小板。
5. 试剂在开盖前请短暂离心，将盖内壁上的液体甩至管底，避免开盖时液体洒落。
6. Annexin V-Cy3和SYTOX Green是光敏物质，在操作时请注意避光。
7. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
8. 应尽量避免消化贴壁细胞带来的机械损伤。同时胰酶的消化液中应尽量不含EDTA，因为EDTA会影响Annexin V与PS的结合。如果使用含EDTA的胰酶，收集细胞后应充分清洗，确保EDTA被去除干净。

## ■ 常见问题解答

问题	可能原因	解决方案
高背景	<ul style="list-style-type: none"> <li>细胞密度高于推荐值</li> <li>染料加入过多</li> <li>细胞样品孵育时间过长</li> <li>细胞聚集融合</li> <li>细胞污染</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>使用推荐的细胞数量</li> <li>移液器吸取准确</li> <li>参照推荐的孵育时间</li> <li>细胞密度在 80-95%时进行实验</li> <li>检查细菌/酵母/支原体等污染</li> </ul>
信号弱	<ul style="list-style-type: none"> <li>贴壁细胞消化不当</li> <li>未成功诱导细胞凋亡</li> <li>用于分析的细胞数量过少</li> <li>用于检测的流式细胞仪/显微镜设置不当</li> <li>试剂盒过期失效或试剂储存不当失效</li> <li>使用了错误的通道</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>使用无 EDTA 的胰酶，或者消化后用 PBS 洗涤干净</li> <li>使用确切凋亡诱导效果的阳性药物做为对照，重新确定诱导后凋亡启动的时间点（时程实验）</li> <li>增加细胞数量</li> <li>调整使用正确的仪器设置</li> <li>检测试剂保质期并按要求储存</li> <li>使用正确的通道进行检测</li> </ul>
结果不准确	<ul style="list-style-type: none"> <li>细胞密度不均匀或活力太差</li> <li>实验中贴壁细胞脱落</li> <li>孵育时间不准确或孵育温度不对</li> <li>溶剂加入体积不准确</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>测定细胞活力，若细胞活力太差重新复苏细胞</li> <li>实验过程轻柔操作</li> <li>按照 protocol 提供的时间及温度进行孵育</li> <li>孵育时间不准确或孵育温度不对</li> <li>移液器吸取准确</li> </ul>

**For research use only! Not to be used in humans.**

**APEX BIO Technology**

**[www.apexbt.com](http://www.apexbt.com)**

7505 Fannin street, Suite 410, Houston, TX 77054.

Tel: +1-832-696-8203 | Fax: +1-832-641-3177 | Email: [info@apexbt.com](mailto:info@apexbt.com)