

Annexin V-HF488/PI Apoptosis Kit

产品描述

Annexin V是一种Ca²⁺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进行荧光素（HF488）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分钟。PI可与双链DNA特异性结合产生红色荧光，正常情况下无法透过细胞膜。但在凋亡晚期的细胞和死细胞，PI能够透过细胞膜而使细胞核染色。当同时进行Annexin V-HF488和PI染色时可区分处于不同凋亡时期的细胞及死细胞。

组分和储存条件

Components	K2253-20 Assays	K2253-50 Assays	K2253-100 Assays
Annexin V-HF488	100 μ L	250 μ L	500 μ L
10X Binding Buffer	2.8 mL	5.5 mL	11 mL
PI	100 μ L	250 μ L	500 μ L

Store the kit at 2-8°C stable for 6 months. Annexin V-HF488 and PI should be stored away from light. Do not freeze Annexin V-HF488.

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。胰酶消化时间过长，细胞需要用力吹打才能脱落，容易造成细胞膜的损伤，导致PI摄入过多；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-HF488的结合。

3. 用预冷的PBS洗涤细胞，收集1-5×10⁵细胞。
4. 将细胞重悬于500 μ L预先稀释好的1X Binding Buffer中。

***Note:** 取 1 mL 10X Binding Buffer 稀释于 9 mL ddH₂O 中混匀即为 1X Binding Buffer。

5. 加入 5 μ L Annexin V-HF488 和 5 μ L PI，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-HF488 为绿色荧光 (Ex/Em: 490/525 nm)，可使用 FITC 通道检测；PI 为红色荧光 (Ex/Em: 535/615 nm)，可使用 PerCP/Cy5.5 通道检测。

荧光显微镜观察: 取步骤 5 中的 30-50 μ L 细胞悬浮液滴加于载玻片上，用盖玻片覆盖细胞，荧光显微镜/激光共聚焦下进行观察。

***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-HF488 和 PI 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 PI 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-HF488 和 PI 是光敏物质，在操作时请注意避光。
7. PI 是已知的诱变剂，使用时注意安全。
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。
9. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
10. 本产品仅限于科研使用，不得用于临床诊断或治疗。

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



APEX-BIO Technology

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