

## Annexin V-YSFluor™ 488/PI Apoptosis Detection Kit

### 产品信息

产品名称	货号	规格
Annexin V- YSFluor™ 488/PI Apoptosis Detection Kit	40305ES20	20 T
Annexin V- YSFluor™ 488/PI 细胞凋亡检测试剂盒	40305ES50	50 T
	40305ES60	100 T

### 产品描述

Annexin V-YSFluor™ 488/PI 细胞凋亡检测试剂盒 (Annexin V-YSFluor™ 488/PI Apoptosis Detection Kit) 是用 YSFluor™ 488 标记的 Annexin V 作为探针, 来检测细胞早期凋亡的发生, 可用流式细胞仪或其他荧光检测设备进行检测。

其检测原理为: 在正常的活细胞中, 磷脂酰丝氨酸 (phosphatidylserine, PS) 位于细胞膜的内侧, 但在早期凋亡的细胞中, PS 从细胞膜的内侧翻转到细胞膜的表面, 暴露在细胞外环境中。Annexin-V (膜联蛋白-V) 是一种分子量为 35-36KD 的 Ca<sup>2+</sup> 依赖性磷脂结合蛋白, 能与 PS 高亲和力结合。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。

另外, 本试剂盒中还提供了碘化丙啶 (Propidium Iodide, PI) 用来区分存活的早期细胞和坏死或晚期凋亡细胞。PI 是一种核酸染料, 它不能透过正常细胞或早期凋亡细胞的完整的细胞膜, 但可以透过凋亡晚期和坏死细胞的细胞膜而使细胞核染红。因此, 将 Annexin V 与 PI 联合使用时, PI 则被排除在活细胞 (Annexin V-/PI-) 和早期凋亡细胞 (Annexin V+/PI-) 之外, 而晚期凋亡细胞和坏死细胞同时被 YSFluor™ 488 和 PI 结合染色呈现双阳性 (Annexin V+/PI+)。

### 产品组分

编号	组分	产品编号/规格		
		40305ES20 (20T)	40305ES50 (50T)	40305ES60 (100T)
40305-A	Annexin V-YSFluor™ 488	100 µL	250 µL	500 µL
40305-B	PI Staining Solution (20 µg/mL)	200 µL	500 µL	1.0 mL
40305-C	1×Binding Buffer	10 mL	25 mL	50 mL

### 运输与保存方法

冰袋 (wet ice) 运输。-20 °C 避光长期保存, 避免反复冻融, 一年有效。

**【注】:** 如果需要在短时间内多次重复使用, 可以在 4 °C 避光保存, 半年有效。

### 注意事项

- 1) 由于细胞凋亡是一个快速的过程, 建议样品在染色后 1 小时之内进行分析。
- 2) 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。处理贴壁细胞时要小心操作, 尽量避免人为的损伤细胞。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, 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磷脂酰丝氨酸与 Annexin V-YSFluor™ 488 的结合。消化时将胰酶铺满孔板底后, 轻摇时胰酶与细胞充分接触, 然后倒掉大部分胰酶, 利用剩余的少量胰酶再消化一段时间, 待细胞间空隙增大, 瓶底呈花斑状即可终止。在消化液中尽量不用 EDTA, EDTA 会影响 Annexin V 与 PS 的结合。
- 3) 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 200 g 离心洗去血小板。
- 4) 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。

- 5) Annexin V-YSFluor™ 488 和 PI 是光敏物质，在操作时请注意避光。
- 6) 本产品仅作科研用途！

## 使用说明

### 1.1 样品染色

1. a) 悬浮细胞：300 g，4℃离心 5 min 收集细胞。  
b) 贴壁细胞：用不含 EDTA 的胰酶消化后，300 g，4℃离心 5 min 收集细胞。胰酶消化时间不宜过长，以防引起假阳性。
2. 用 4℃预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次，每次均需 300g，4℃离心 5 min。
3. 吸弃 PBS，加入 100 μL 1×Binding Buffer 重悬细胞。
4. 加入 5μL Annexin V-YSFluor™ 488 和 10 μL PI，轻轻混匀。
5. 避光、室温反应 15 min。
6. 加入 400 μL 1×Binding Buffer，混匀，样品在 1 小时内用流式细胞仪检测。

**【注】：**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。

### 1.2 流式细胞仪分析

YSFluor™ 488 最大激发波长为 488 nm，最大发射波长为 519 nm；PI-DNA 复合物的最大激发波长为 535 nm，最大发射波长为 615 nm。用 CellQuest 等软件进行分析，绘制双色散点图（two-color dot plot），YSFluor™ 488 为横坐标，PI 为纵坐标。每个样采集 10,000 events。

### 1.3 荧光显微镜分析

- 1) 滴一滴滴用 Annexin V-FITC/PI 双染的细胞悬液于载玻片上，并用盖玻片盖上细胞。
- 2) 在荧光显微镜下用双色滤光片观察。Annexin V-FITC 荧光信号呈绿色，PI 荧光信号呈红色。