

Product Manual

产品说明书

产品货号

PR01479

产品介绍

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, 即与细胞浆相邻的一侧, 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 APC-Annexin V 与外翻的磷脂酰丝氨酸 (PS) 结合, 就可用流式细胞仪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。正常细胞不会被 APC-Annexin V 所染色, 发生凋亡或坏死的细胞会被 APC-Annexin V 所染色。APC-Annexin V 可以与部分非渗透性的细胞核染料 (7-AAD/PI) 等联合使用, 区分处于不同凋亡时期的细胞。

应用范围

细胞凋亡检测

储运条件

4 °C 避光保存, 有效期见外包装; 冰袋运输。

产品特点

选择性多: 类型选择多, 选择范围广;
稳定性好: 荧光亮度高且抗淬灭性好;
分群效果好: 分群明显, 特异性强。

产品参数

APC-Annexin V : Ex/Em: 650/660 nm

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.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 APC-Annexin V 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。
- 5.贴壁细胞用胰蛋白酶消化后, 建议在最佳培养条件和培养基中恢复约 30 min 后染色, 避免假阳性。
- 6.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。
- 7.染料的最佳使用浓度由具体实验要求确定。
- 8.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。
- 9.本产品仅限于科研, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品和药品, 不得存放于普通住宅内。
- 10.为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

自备材料

- 1.耗材
- 离心管
- 2.试剂
- (1) 细胞样本 (2) PBS (3) 培养基
- 3.仪器
- 流式细胞仪

操作步骤

- 1.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

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

- 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。

2.收集细胞

- (1) 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。**
- 2) 取 50~1 × 10⁶ 个重悬的细胞，1000 rpm 离心 5 min，弃上清，加入 100 μL 1 × Annexin V 结合缓冲液轻轻重悬细胞。
- 3) 加入 5 μL FITC-Annexin V，轻轻混匀。
- 4) 加入 5 μL PI 染色液，轻轻混匀。
- 5) 室温 (20~25 °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。

(2) 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 $100 \mu\text{L } 1 \times \text{Annexin V}$ 结合缓冲液轻轻重悬细胞。
- 4) 加入 $5 \mu\text{L}$ FITC-Annexin V，轻轻混匀。
- 5) 加入 $5 \mu\text{L}$ PI 染色液，轻轻混匀。
- 6) 室温 ($20 \sim 25^\circ\text{C}$) 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。

3.结果分析

(1) 流式细胞仪检测

- 1) 孵育完成后，可直接加入 $400 \mu\text{L } 1 \times \text{Annexin V}$ 结合缓冲液重悬细胞，立即上机检测，FITC-Annexin V 由 488 nm 激光激发，检测荧光发射光谱在 530 nm 处 (FITC 通道)，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 (FITC-Annexin V-/PI-); 右下象限为早期凋亡细胞，为 (FITC-Annexin V+/PI-); 右上象限是坏死与晚期凋亡细胞，为 (FITC-Annexin V+/PI+); 左上象限显示裸核细胞，为 (FITC-Annexin V-/PI+)。

(2) 荧光显微镜检测

- 1) 1000 rpm 离心 5 min，收集细胞，用 $400 \mu\text{L } 1 \times \text{Annexin V}$ 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) FITC-Annexin V 可用 FITC 适用滤光片。PI 可用 Cy3 或者 Texas 适用的滤光片。

4.结果展示

(1) 图 1 中左图为没有做任何处理的正常细胞，右图为诱导细胞凋亡后的细胞组。两图中均有十字门划分出各个象限，左上角：Annexin V-/PI+，机械损伤细胞；右上角：Annexin V+/PI+，晚期凋亡细胞或坏死；右下角：Annexin V+/PI-，早期凋亡细胞；左下角：Annexin V-/PI-，正常细胞。

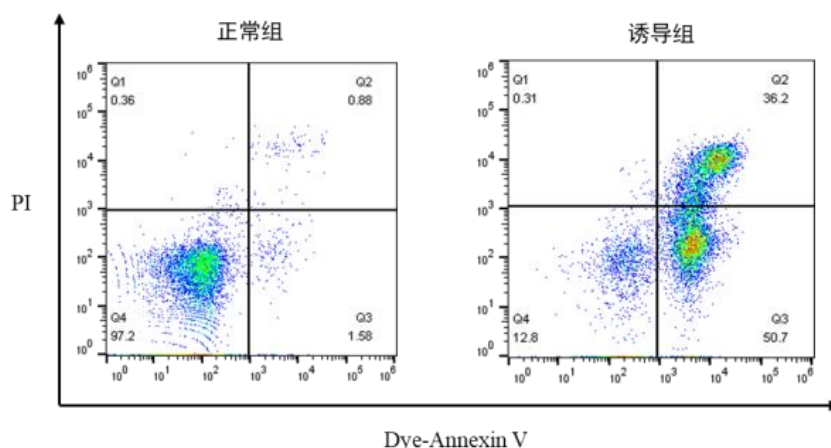


图 1 正常细胞和诱导凋亡细胞染色后流式细胞仪结果图

(2) 图 2 是悬浮细胞 Jurkat 诱导凋亡后染色图。其中绿色为 Annexin V 染色细胞膜 (以 FITC 为例)，红色为染色细胞核 (以 PI 为例)

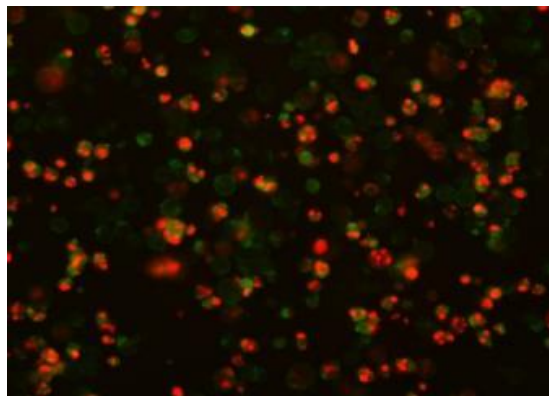


图 2 悬浮细胞 Jurkat 诱导凋亡染色后荧光显微镜结果图