Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒（绿色荧光）

货号: KTA0006　　规格：20 T/50 T/100 T　　批号：见产品标签

	应用实验：流式细胞术/荧光显微镜
	荧光激发/发射波长：Annexin V-FITC: Ex/Em=491 nm/517 nm, PI: Ex/Em=535 nm/617 nm
	保质期：4℃，避光保存 12 个月

01 背景与原理

细胞凋亡，或称程序性细胞死亡，是一种用于清除不需要的细胞的正常生理过程。凋亡早期事件之一是膜磷脂酰丝氨酸（PS）从质膜内侧转移到细胞表面。

Annexin V 是一种 35-36 kDa Ca^{2+}依赖性磷脂结合蛋白，对 PS 具有高度亲和力。用荧光染料标记的 Annexin V 可通过与暴露的 PS 结合来识别凋亡细胞。PI 是一种膜不透性核酸染料，不能进入正常细胞和早期凋亡细胞（仍具有膜完整性结构），但能进入细胞膜受损的晚期凋亡和坏死细胞内与核酸结合，形成红色荧光。Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒为细胞凋亡提供了一种快速简便的检测方法，细胞在含 Ca^{2+}的结合缓冲液中用 Annexin V-FITC 和 PI 染色后，早期凋亡细胞显示仅细胞膜绿色荧光，死细胞显示细胞核红色荧光和细胞膜绿色荧光，活细胞几乎没有荧光。此外，针对凋亡检测和结果的非标准化问题，本试剂盒还特别提供细胞凋亡诱导剂。检测可通过流式细胞仪或荧光显微镜进行分析。

02 包装清单

试剂盒组分	规格			储存条件
	20 T	50 T	100 T	
Annexin V Binding Buffer (5×)	6 mL	15 mL	30 mL	4℃
Annexin V-FITC	50 μL	100 μL	200 μL	4℃，避光保存
Propidium Iodide (PI)	50 μL	125 μL	250μL	4℃，避光保存
Apoptosis Positive Control Solution	5 mL	5 mL	5 mL	4℃

03 自备仪器与试剂

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	流式细胞仪/荧光显微镜	流式推荐 FITC 和 PE 通道
耗材	吸头，载玻片	/
试剂	磷酸盐缓冲液（PBS，pH7.4），去离子水	清洗
其他	离心机、移液枪	/

04 注意事项

- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

05 实验流程

05-1 试剂准备

试剂名称	试剂准备	注意事项
1×Annexin V Binding Buffer	即用型；用去离子水把 Annexin V Binding Buffer (5×)稀释成 1×Annexin V Binding Buffer	未用完的试剂 4℃可保存 6 个月
Annexin V-FITC	即用型	4℃避光保存
Propidium Iodide (PI)	即用型	4℃避光保存
Apoptosis Positive Control Solution	即用型	4℃保存，含甲醛，使用过程中请注意安全。**适用于流式。**

05-2 实验步骤

05-2-1 流式细胞仪分析

1. 流式细胞仪器参数调节(可选)

(1) 收集 1- 3×10^6 个细胞，用预冷的 PBS 离心洗涤 2 次，弃上清。

(2) 加入 500 μL Apoptosis Positive Control Solution 重悬，置冰上孵育 30 min。

(3) 用预冷 PBS 离心洗涤，弃上清。

(4) 加入适量预冷 1×Annexin V Binding Buffer 重悬，并加入数量相同且未经处理的活细胞与之混合，用 1×Annexin V Binding buffer

清洗一次。

(5) 加入预冷 1×Annexin V Binding Buffer 补充至 1.5 mL，等分成三管，其中一管为空白对照管、两管为单染管。

(6) 单染管分别加入 2 μL Annexin V-FITC 或 2.5 μL PI，冰上避光孵育 15 min。

(7) 在流式细胞仪上，用空白管调节 FSC、SSC 和荧光通道的电压，并在此电压条件下，用单染管调节荧光通道的补偿。

2.样本检测

注意：选择合适的方法诱导细胞凋亡，同时设置无诱导的对照组。流式检测时推荐用跟实验组相同的细胞单独制备 Annexin V-FITC 单染管和 PI 单染管，用于增益和补偿调节，对后期分群非常有帮助。另外，根据细胞量和细胞类型调整合适的染料浓度对分群效果影响显著。

(1) 通过所需方法诱导细胞凋亡，同时培养未诱导的对照培养物。

(2) 4℃，300 g 离心 5 min 收集 0.1-1×10^6 细胞，用冰预冷的 PBS 洗涤 2 次。

注意：贴壁细胞使用胰酶（不含 EDTA）消化后离心收集细胞，如果消化时间过长，易造成细胞膜结构损伤而出现细胞坏死的假阳性，所以需控制胰酶消化时间（推荐使用温和消化液）。

(3) 用 500 μL 1×Annexin V Binding Buffer 重悬细胞。

(4) 每 500 μL 细胞悬液中加入 2 μL Annexin V-FITC 和 2.5 μL PI，轻柔混匀。

注意：染料使用量可以根据细胞量和细胞类型进行调整。

(5) 冰上避光孵育约 15 min。

(6) 孵育结束后置于冰上。染色后 30 min 内通过流式细胞仪分析细胞。使用 491 nm 和 535 nm 激发，在 517 nm（FITC 通道）和 617 nm（PE 或 PI 通道）附近测量荧光。

05-2-2 荧光显微镜分析

注意：在荧光显微镜凋亡分析实验中，为确保检测体系的有效性，建议设置阳性对照组。推荐使用本公司货号为 KTA0008 的细胞凋亡阳性对照试剂盒。

1. 对于悬浮细胞：

(1) 按照流式细胞分析步骤制样。

(2) 将染色好的细胞悬浮置于玻片上，用盖玻片盖住细胞。尽快使用适当的滤镜通过荧光显微镜分析细胞（Annexin V-FITC 可以使用 FITC 设置拍照，PI 可以使用 Cy®3 或 Texas Red®设置拍照）。

2. 对于贴壁细胞，按照以下操作步骤（以 24 孔板为例）：

试剂	96 孔板	48 孔板	24 孔板	12 孔板	6 孔板
染色工作液体积 (μL)	100	150	200	300	500

(1) 细胞接种于爬片或腔室载玻片上，培养细胞。

(2) 通过所需方法诱导细胞凋亡，同时设置无诱导的对照组。

(3) 除去培养基，用 PBS 洗涤细胞 2 次（可用 1×Annexin V Binding Buffer 清洗一次减少漂浮细胞丢失）。

(4) 准备工作液：每 100 μL 1×Annexin V Binding Buffer 添加 2 μL Annexin V-FITC 和 2.5 μL PI，轻柔混匀。

注意：染料使用量可以根据细胞量和细胞类型进行调整。

(5) 在细胞中加入适量的工作液（确保工作液完全覆盖细胞），室温避光孵育约 15 min。（可以适当延长时间增加染色的信号）

(6) 用 1×Annexin V Binding Buffer 洗涤细胞 1-2 次。（可选）

注意：此步不要使用 PBS 洗涤细胞。

(7) 使用适当的滤光片在荧光显微镜下分析细胞。

06 结果示例

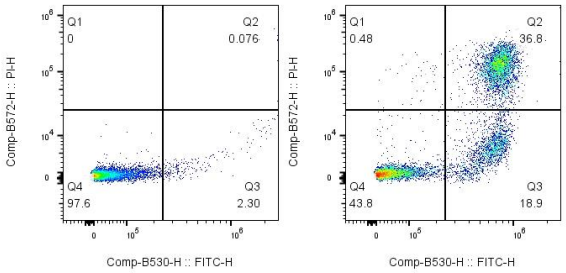


Figure 1. Jurkat 细胞不处理（左）或 Apoptosis Inducer A+Apoptosis Inducer B（货号：KTA0008）以 1:2000 处理 16 h（右），用 Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒染色。染色样本用流式细胞仪进行检测，PI 用 PE 通道检测; Annexin V-FITC 用 FITC 通道检测。细胞分群主要分为活细胞（Q4）,早期凋亡（Q3）和晚期凋亡（Q2），诱导后，凋亡细胞比例明显增加。

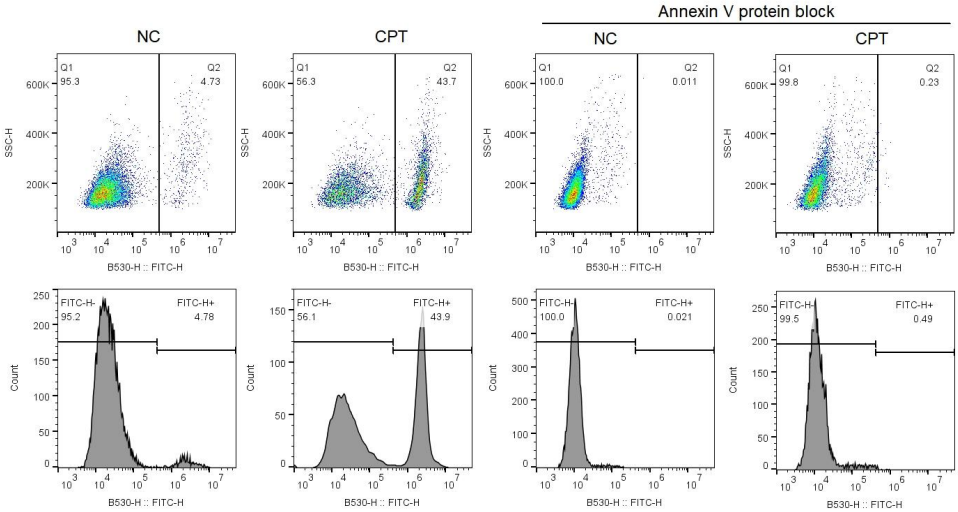


Figure 2. Annexin V-FITC 染色和阻断流式细胞检测实验。Jurkat 细胞分别用 DMSO（NC 组）或 10 μM 喜树碱（货号：KTA0009）诱导 5 h（CPT 组）,然后用 Annexin V-FITC 染色（左 1-2），或用 15 μg 重组蛋白 Annexin V（货号：PRP3003）在 1x Annexin V binding buffer 中阻断 15 min 后再用 Annexin V-FITC 染色(右 1-2)，可以发现重组蛋白 Annexin V 完全阻断了 Annexin V-FITC 信号，表明 Annexin V-FITC 染色特异性好。

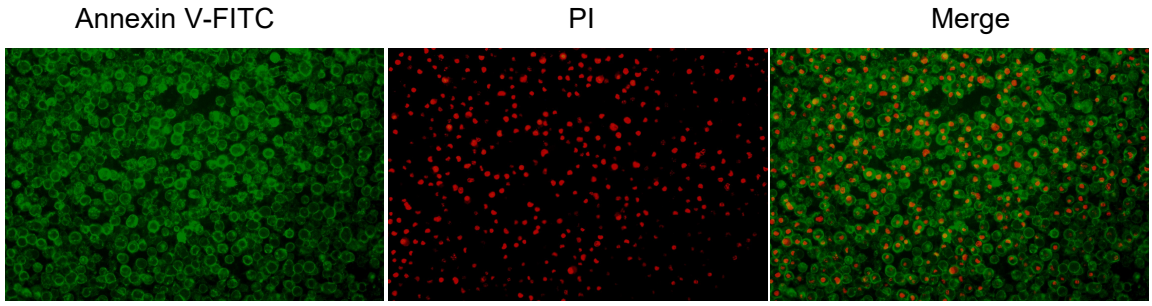


Figure 3. L929 细胞用 Apoptosis Inducer A+Apoptosis Inducer B（货号：KTA0008）以 1:2000 处理 16 h（右），然后用 Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒染色后检测的凋亡效果图。

07 FAQ

1．孵育结束后加入，做流式可以不加 1×Annexin V Binding Buffer 吗？

可以，加入 1×Annexin V Binding Buffer 的体积是根据流式细胞仪要求的上样体积来确定，如果细胞孵育悬液的体积足够，可以不加入该 Buffer 来补齐体积。

2．实验结果如何判断？

活细胞—没有荧光（Annexin V-/PI-）、早期凋亡细胞—细胞膜绿色荧光（Annexin V+/PI-）、晚期凋亡细胞和坏死细胞呈现双阳性—细胞膜绿色荧光，细胞核红色荧光（Annexin V+/PI+）、机械损伤或裸核—细胞核红色荧光（Annexin V-/PI+）。

3．有其它方法做阳性对照吗？

将细胞 55℃水浴/金属浴孵育 30min，与正常细胞 1:1 混合可作为单阳管及阳性对照管。但如果要跟实验组对比和调补尝建议采用相同方式诱导。

4．可以用 PBS 代替 1×Annexin V Binding Buffer 吗？

不可以，因为 Annexin V 与磷脂酰丝氨酸（PS）的结合依赖 Ca^{2+}，而常见的 PBS 溶液中不含 Ca^{2+}，不加 Binding Buffer，会导致 Annexin V 的结合能力降低，造成阳性信号大幅下降甚至无阳性信号。因为这个实验是活细胞染色，先染完第一种染料，如果间隔时间太长，细胞活力会受到影响。

5．用含 EDTA 的胰酶处理细胞，会不会受影响？

细胞消化时尽量避免使用 EDTA，若使用含 EDTA 的胰酶处理可使用 PBS 增加洗涤次数。

6．该试剂盒可替换 Annexin V-EGFP/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒吗？

可以的，使用的检测通道是一致的。

08 相关产品

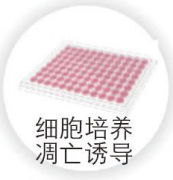
货号	试剂盒名称
KTA0002	Annexin V-AbFluor™ 488/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒（绿色荧光）
KTA2010	一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒（绿色荧光）
KTA2011	一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒（红色荧光）
KTA3020	Caspase-1 活性分析试剂盒（比色法）
KTA3022	Caspase-3 活性分析试剂盒（比色法）
KTA3023	Caspase-4 活性分析试剂盒（比色法）
KTA3026	Caspase-9 活性分析试剂盒（比色法）
KTA4001	线粒体膜电位分析试剂盒（JC-1）

Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒（绿色荧光）

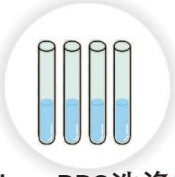
（Abbkine 货号：KTA0006）

预处理成单细胞悬液

①

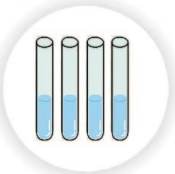


收集细胞，转移到流式管



300 g×5 min，PBS洗涤2次，弃上清

加入染色工作液



避光孵育15 min

转移到载玻片或24孔板
(悬浮细胞)

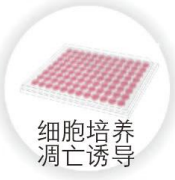


流式细胞仪分析
（FITC和PE）



荧光显微镜分析

②



弃上清，PBS洗涤2次

加入染色工作液



避光孵育15-30 min



荧光显微镜分析

贴壁细胞

100 μL工作液 (荧光成像):

1×Annexin V Binding Buffer	100μL
Annexin V-FITC	2μL
Propidium Iodide (PI)	2.5μL

500 μL工作液 (流式):

1×Annexin V Binding Buffer	500μL
Annexin V-FITC	2μL
Propidium Iodide (PI)	2.5μL

Annexin V Binding Buffer用去离子水稀释

V1.0