

## Annexin V-APC/PI Apoptosis Kit

Cat. No: PBCA006

Size: 100T/200T

| 产品编号    | 产品名称                                   | 100T        | 200T             |
|---------|----------------------------------------|-------------|------------------|
| PBCB007 | Annexin V-APC Reagent                  | 500 $\mu$ L | 1mL              |
| PBCB008 | Annexin V Binding Buffer(10 $\times$ ) | 11mL        | 11 mL $\times$ 2 |
| PBCB006 | PI Reagent                             | 500 $\mu$ L | 1mL              |
|         | 说明书                                    | 一份          |                  |

### 保存条件

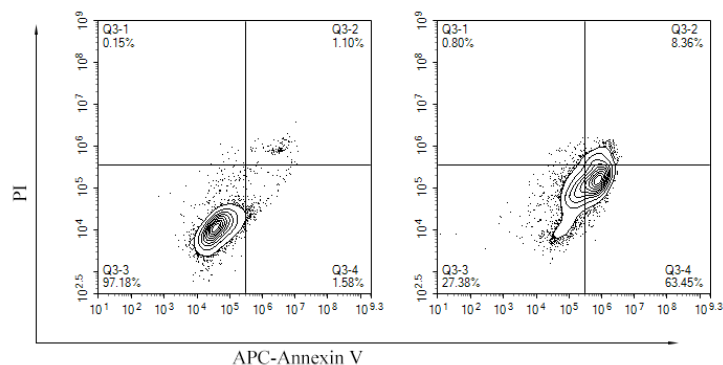
2~8℃可保存1年。Annexin V-APC 禁止冷冻保存。

### 实验原理

Annexin V-APC/PI Apoptosis Kit，可用于检测悬浮细胞和贴壁细胞的凋亡。

Annexin V 是一种钙离子依赖性磷脂结合蛋白，与磷脂酰丝氨酸 (PS) 有高度亲和力。当细胞发生凋亡时，膜内侧的磷脂酰丝氨酸 (PS) 外翻到膜表面，而被荧光染料 APC 标记的 Annexin V 结合，可通过流式细胞仪或荧光显微镜进行检测。

由于凋亡晚期或坏死细胞膜丧失完整性，而碘化丙啶 (Propidium Iodide, PI) 可与双链 DNA 特异性结合并产生强烈的荧光，与 Annexin V 搭配使用，可区分处于不同凋亡时期的细胞。



上图为 L929 细胞用 TNF- $\alpha$ +SM-164 诱导(右) 或未加药(左) 处理 24h，染色后流式检测结果。Annexin V-APC 单阳细胞 (Q3-4) 为早期凋亡细胞，Annexin V-APC 和 PI 双阳细胞 (Q3-2) 为坏死或晚期凋亡细胞，PI 单阳细胞 (Q3-1) 为裸核细胞。

### 试剂配制

1 $\times$ Annexin V Binding Buffer: 取 1 mL Annexin V Binding Buffer (10 $\times$ )加入 9 mL 去离子水中混匀。

## 实验操作

### 一步法

1. 细胞按照实验方案进行凋亡诱导， $300\times g$  离心 5min，弃上清，收集细胞，PBS 洗涤一次，轻轻重悬细胞并计数。
2. 取  $1\sim 5\times 10^5$  重悬的细胞， $300\times g$  离心 5min，弃上清。用 PBS 洗涤细胞一次，离心后弃上清，加入 500 $\mu$ L 稀释的  $1\times$  Annexin V Binding Buffer 重悬细胞。
3. 细胞悬液中加入 5 $\mu$ L 的 Annexin V-APC Reagent 和 5 $\mu$ L 的 PI Reagent。
4. 轻柔涡旋混匀后，室温避光孵育 15~20 min。
5. 立即上机检测。如不能及时检测，请于冰上避光静置并于 1h 内完成检测。

注：流式细胞仪检测时 Annexin V-APC 可用 APC 通道，PI 优先选择 ECD 通道，其次是 PE 通道；如果样本有 FITC 通道的自发荧光，则选择 PerCP/Cy5.5 通道。

### 两步法

1. 细胞按照实验方案进行凋亡诱导， $300\times g$  离心 5min，弃上清，收集细胞，PBS 洗涤一次，轻轻重悬细胞并计数。
2. 取  $1\sim 5\times 10^5$  重悬的细胞， $300\times g$  离心 5min，弃上清。用 PBS 洗涤细胞一次，离心后弃上清，加入 100 $\mu$ L 稀释的  $1\times$  Annexin V Binding Buffer 重悬细胞。
3. 细胞悬液中加入 2.5 $\mu$ L 的 Annexin V-APC Reagent 和 2.5 $\mu$ L 的 PI Reagent。（由于两步法分辨率更高，染色液用量减半依然可得到媲美一步法的效果；用户亦可根据自己的模型进行滴定后加入适量的染色液，用更少的量获得高质量的结果。）
4. 轻柔涡旋混匀后，室温避光孵育 15~20 min。
5. 加入 400 $\mu$ L 稀释的  $1\times$  Annexin V Binding Buffer，混匀样本。
6. 立即上机检测。如不能及时检测，请于冰上避光静置并于 1h 内完成检测。

注：流式细胞仪检测时 Annexin V-APC 可用 APC 通道，PI 优先选择 ECD 通道，其次是 PE 通道；如果样本有 FITC 通道的自发荧光，则选择 PerCP/Cy5.5 通道。

## 注意事项

1. 本产品仅供科研使用。
2. 检测贴壁细胞时，需收集诱导凋亡后产生的悬浮细胞，并与后续收集的贴壁细胞一起检测。
3. 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 与磷脂酰丝氨酸的结合。
4. 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。
5. 染色后宜尽快检测，时间过长可能会导致凋亡或坏死细胞的数量增加。
6. 荧光物质均易发生淬灭，在进行荧光观察时，尽量缩短观察时间，同时在操作和存放过程中也尽量注意避光保存。
7. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。