



Annexin V-EGFP/PI 双染细胞凋亡测试盒说明书（简化版）

（货号：G004-1）

一、测定原理：

Annexin 是一类广泛分布于真核细胞细胞浆内钙离子依赖的磷脂结合蛋白，参与细胞内的信号转导。Annexin V 选择性结合磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, 简称 PS)。磷脂酰丝氨酸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，即细胞膜外侧。磷脂酰丝氨酸暴露到细胞表面后会促进凝血和炎症反应。而 Annexin V 和外翻到细胞表面的磷脂酰丝氨酸结合后可以阻断磷脂酰丝氨酸的促凝血和促炎症反应活性。因此 Annexin V 被作为检测细胞早期凋亡的灵敏指标之一。用带有绿色荧光的荧光探针 EGFP 标记的 Annexin V，即 Annexin V-EGFP，就可以用流式细胞仪或荧光显微镜非常简单而直接地检测到磷脂酰丝氨酸的外翻这一细胞凋亡的重要特征。与 FITC 的绿色荧光信号相比，EGFP 的绿色荧光信号具有信号强，不易淬灭，稳定性高等优点。

本试剂盒还提供了碘化丙啶染色液，碘化丙啶可以染色坏死细胞或凋亡晚期丧失细胞膜完整性的细胞，呈现红色荧光。对于坏死细胞，由于细胞膜的完整性已经丧失，Annexin V-EGFP 可以进入到细胞浆内，与位于细胞膜内侧的磷脂酰丝氨酸结合，从而也使坏死细胞呈现绿色荧光。因此将 Annexin V 与 PI 匹配使用，就可以将处于不同凋亡时期的细胞区分开来。

二、试剂盒组份

试剂	G004-1-1 10T	G004-1-2 20T	G004-1-3 50T	保存条件
Annexin V-EGFP	50μl	100μl	250μl	4℃避光保存
结合液	5ml	10ml	25 ml	4℃保存
碘化丙啶（PI）	50μl	100μl	250μl	4℃避光保存

三、试剂盒以外自备仪器和试剂

流式细胞仪或荧光显微镜、低速离心机、移液器、1.5ml 离心管、载玻片、盖玻片、PBS、不含 EDTA 的胰酶消化液

四、保存条件：

4℃保存，Annexin V-EGFP和碘化丙啶染色液需避光保存，一年有效。为长期保存，可以把Annexin V-EGFP和碘化丙啶染色液适当分装后-20℃保存，Annexin V-EGFP结合液可以直接-20℃保存。



五、操作规程

1、对于悬浮细胞：

- A、在进行完细胞凋亡刺激后，1000g (约1000~2000rpm) 离心5分钟，弃上清，收集细胞，用PBS轻轻重悬细胞并计数。
- B、取 $1\sim 5\times 10^5$ 重悬的细胞，1000g离心5分钟，弃上清，加入500 μ l 结合液轻轻重悬细胞。
- C、加入5 μ l Annexin V-EGFP，轻轻混匀；再加入5 μ l 碘化丙啶，轻轻混匀。
- D、室温(20~25℃)避光孵育10分钟。可以使用铝箔进行避光。
- E、随即进行流式细胞仪检测，Annexin V-EGFP为绿色荧光，PI为红色荧光。如果用于荧光显微镜下检测，滴一滴上述染色后的细胞悬液于载玻片上，并用盖玻片盖上细胞即可检测。

2、对于贴壁细胞：

- A、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，用胰酶细胞消化液(最好不用含有EDTA)消化细胞。B、细胞消化下来后，加入步骤2A中收集的细胞培养液，稍混匀，转移到离心管内，1000g离心5分钟，弃上清，收集细胞，用PBS轻轻重悬细胞并计数。。
- C、取 $1\sim 5\times 10^5$ 重悬的细胞，1000g离心5分钟，弃上清，加入500 μ l结合液轻轻重悬细胞。
- D、加入5 μ l Annexin V-EGFP，轻轻混匀；再加入5 μ l碘化丙啶，轻轻混匀。
- E、室温(20~25℃)避光孵育10分钟。可以使用铝箔进行避光。
- F、随即进行流式细胞仪检测，Annexin V-EGFP为绿色荧光，PI为红色荧光。如果用于荧光显微镜下检测，滴一滴上述染色后的细胞悬液于载玻片上，并用盖玻片盖上细胞即可检测。

3、对于贴壁细胞的原位荧光显微镜检测：

- A、(选做)如果条件许可，把细胞培养于24孔板、48孔板或96孔板内；或将细胞于盖玻片上生长，用适当的凋亡诱导剂诱导细胞凋亡，并设立阴性对照组。
- B、吸除细胞培养液，加入PBS洗涤两次；或将盖玻片用PBS洗涤两次。
- C、在500 μ l 的结合液中加入5 μ l Annexin V-EGFP， 5 μ l碘化丙啶，轻轻混匀。
- D、将上述溶液滴加于培养板孔中，或滴加于盖玻片表面，使长有细胞的盖玻片表面均匀覆盖。
- E、室温(20~25℃)避光孵育10分钟
- F、随即在荧光显微镜下观察，Annexin V-EGFP为绿色荧光，PI为红色荧光。