



Annexin V-FITC/PI apoptosis kit (贴壁细胞专用)(C6专用)

I. 产品信息

目录号: AT101C

规格: 30T, 60T, 100T

保存: 见“试剂盒组分”

效期: 一年

II. 背景简介

Annexin V(或 Annexin A5)为胞内蛋白膜联蛋白家族成员, 以钙依赖的方式与磷脂酰丝氨酸(PS)结合。PS 存在于正常细胞浆膜的内层, 但在凋亡早期, 膜不对称性丧失, PS 易位至细胞表面。荧光标记的 Annexin V 可与之特异性结合, 表明该细胞为凋亡细胞。

PI(碘化丙啶)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荧光标记的 Annexin V 和 PI 结合染色呈现双阳性(Annexin V+/PI+)。

Accutase 是一种天然的酶, 兼具蛋白水解酶和胶原酶的活性。但它比胰酶和胶原酶更有效, 使用浓度更低, 使之毒性更小、更温和。因此对细胞的损伤更小, 可减少因消化处理带来的假阳性。即便长时间消化, 也可保持 90%以上的细胞活力。适合于各种贴壁细胞、胚胎和神经元干细胞等较敏感的细胞的消化。

本试剂盒仅需 15 分钟即可染色样本, 快速方便。提供阳性质控液, 便于制备单染管, 调节补偿。提供消化细胞更温和的 Accutase, 减少假阳性。

注: 此凋亡试剂盒针对BD的C6仪器进行优化。

III. 试剂盒组分

组分 \ 规格	目录号			储存条件
	AT101C-30	AT101C-60	AT101C-100	
	30 T	60 T	100 T	
Annexin V-FITC	150 μ l	300 μ l	500 μ l	2 - 8 $^{\circ}$ C, 避光
PI	300 μ l	600 μ l	1000 μ l	2 - 8 $^{\circ}$ C, 避光
5 \times Binding Buffer	5 ml	10 ml	15 ml	2 - 8 $^{\circ}$ C
Apoptosis Positive Control Solution	5 ml	5 ml	5 ml	2 - 8 $^{\circ}$ C
Accutase	100 ml	100 ml	100 ml	-20 $^{\circ}$ C, 解冻后-20 $^{\circ}$ C 分装保存, 或 2 - 8 $^{\circ}$ C 可保存 2 个月

IV. 使用方法

一、细胞消化(不同类型的细胞, 需要用户优化方案)

1. 将 Accutase 于 4 $^{\circ}$ C 或室温解冻, 切勿放于 37 $^{\circ}$ C 解冻。
2. 小心吸去细胞培养基 (如培养上清中存在凋亡细胞, 则应收集)。
3. (可选) 无菌 PBS 洗涤。
4. 加入适量解冻的 Accutase (不必温热至 37 $^{\circ}$ C), 覆盖住细胞。根据细胞汇合度和密度情况, 通常在 T25

Product For Research Use Only rev: AT101C-01

MultiSciences Biotech Co., Ltd

Technical Service: tech@liankebio.com

To place an order: order@liankebio.com



细胞瓶中加入 2.5 - 5 ml Accutase。

5. 室温放置 5 - 10 分钟，至多可长达 1 小时，无需终止。
6. 当细胞开始圆缩，用手掌轻拍培养瓶，使细胞脱落。
7. 温和地吹散细胞，收集细胞。

二、仪器参数调节

1. 收集 1×10^6 - 3×10^6 个细胞，用预冷 PBS 离心洗涤两次，弃上清。
2. 加入 500 μ l Apoptosis Positive Control Solution 重悬，置冰上孵育 30 分钟。
3. 用预冷 PBS 离心洗涤，弃上清。
4. 加入适量预冷 $1 \times$ Binding Buffer 重悬，并加入数量相同且未经处理的活细胞与之混合。加入预冷 $1 \times$ 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。
5. 单染管分别加入 5 μ l Annexin V-FITC 或 10 μ l PI，室温避光孵育 5 分钟。
6. 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。

三、样本检测

1. 按实验方案诱导凋亡。
2. 用预冷 PBS 离心洗涤，收集 $1 - 10 \times 10^5$ 个细胞(包括培养上清中的细胞)。用双蒸水稀释 $5 \times$ Binding Buffer 为 $1 \times$ 工作液，取 500 μ l $1 \times$ Binding Buffer 重悬细胞。
3. 每管加入 5 μ l Annexin V-FITC 和 10 μ l PI。
4. 轻柔涡旋混匀后，室温避光孵育 5 分钟。
5. 根据实验方法，进行流式分析(A)或荧光显微镜检测(B)。

A. 流式分析

在流式细胞仪上，通过 FITC 检测通道检测 Annexin V-FITC (Ex = 488 nm; Em = 530 nm)和通过 PI 检测通道(Ex = 535 nm; Em = 615 nm)检测 PI。

B. 荧光显微镜检测

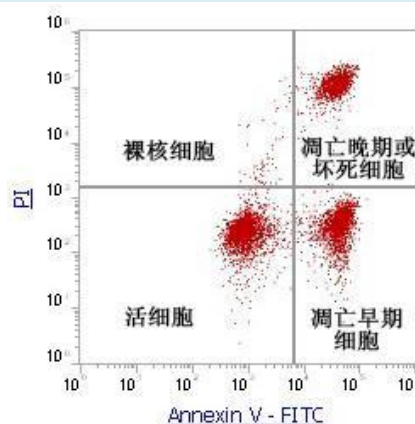
- a. 将染色后的细胞置于载玻片上，盖上盖玻片。

对于贴壁细胞，将细胞直接种在盖玻片上。在步骤 3 的染色后，将盖玻片反转盖到载玻片上。观察前可将细胞洗涤并用 2%福尔马林固定。(细胞必须在固定前孵育 Annexin V-FITC，因为细胞固定后其细胞膜被破坏，会使Annexin V 与细胞膜内层的 PS 结合，产生人为的假阳性。)

- b. 使用荧光显微镜上的FITC 和罗丹明通道进行观察。

被 Annexin V 结合的细胞显示浆膜上有绿色光环。丧失细胞膜完整性的细胞，细胞核显示红色，膜上有绿色光环。

V. 结果示例



rev: AT101C-01

MultiSciences Biotech Co., Ltd



VI. 注意事项

1. 请在使用本产品前仔细阅读说明书。本产品仅用于科研，不可用于诊断。
2. 为了您的安全和健康，请穿戴实验防护服、手套、口罩等必要的防护装备。
3. 更多凋亡相关产品敬请关注联科生物网站或来电咨询。

VII. 部分相关产品

目录号	产品名称	规格
AP101	Annexin V-FITC/PI apoptosis kit (适用于除 C6 以外的流式细胞仪)	30T/60T/100T
AP101C	Annexin V-FITC/PI apoptosis kit (C6 专用)	30T/60T/100T
AP104	Annexin V-PE/7-AAD apoptosis kit	30T/60T/100T
AP105	Annexin V-APC/7-AAD apoptosis kit	30T/60T/100T
AP107	Annexin V-APC/PI apoptosis kit	30T/60T/100T
APC03	Caspase 3 活性检测试剂盒	20T/50T/100T
APC08	Caspase 8 活性检测试剂盒	20T/50T/100T
APC09	Caspase 9 活性检测试剂盒	20T/50T/100T
APO001	Direct TUNEL Apoptosis Assay Kit	50T
AT001	Accutase Enzyme	100ml
AT101	Annexin V-FITC/PI apoptosis kit (贴壁细胞专用)	30T/60T/100T
AT104	Annexin V-PE/7-AAD apoptosis kit (贴壁细胞专用)	30T/60T/100T
AT105	Annexin V-APC/7-AAD apoptosis kit (贴壁细胞专用)	30T/60T/100T
AT107	Annexin V-APC/PI apoptosis kit (贴壁细胞专用)	30T/60T/100T
CC01	胰蛋白酶-EDTA 消化液(含酚红)	100ml
CC03	胰蛋白酶消化液(含酚红)	100ml
CCS012	Cell cycle staining Kit	50T
CP001	BrdU Cell Proliferation Assay Kit	50T
MJ101	Mitochondria Staining Kit (JC-1)	125T