



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

Annexin V-EGFP 细胞凋亡检测试剂盒

产品编号	产品名称	包装
R32120-20T	Annexin V-EGFP 细胞凋亡检测试剂盒	20T
R32120-50T	Annexin V-EGFP 细胞凋亡检测试剂盒	50T

产品简介:

Annexin V-EGFP 细胞凋亡检测试剂盒(Annexin V-EGFP Apoptosis Detection Kit)是用 EGFP 标记的重组人 Annexin V 来检测细胞凋亡时出现在细胞膜表面的磷脂酰丝氨酸的一种细胞凋亡检测试剂盒。可以使用流式细胞仪、荧光显微镜或其它荧光检测设备进行检测。

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。但仅 Annexin V 被报道可以调控一些 PKC 的活性。

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。

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。

本试剂盒还提供了碘化丙啶染色液,碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)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。

综上所述,用 Annexin V-EGFP 和碘化丙啶染色后,正常的活细胞不被 Annexin V-EGFP 和碘化丙啶染色;凋亡早期的细胞仅被 Annexin V-EGFP 染



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

色, 碘化丙啶染色呈阴性; 坏死细胞和凋亡晚期的细胞可以同时被 Annexin V-EGFP 和碘化丙啶染色。

本试剂盒小包装 R32120-20T 可以检测 20 个样品, 中包装 R32120-50T 可以检测 50 个样品。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
R32120-20T	Annexin V-EGFP	100 μ l
	Annexin V-EGFP 结合液	12ml
	碘化丙啶染色液	220 μ l
—	说明书	1 份

产品编号	产品名称	包装
R32120-50T	Annexin V-EGFP	250 μ l
	Annexin V-EGFP 结合液	26ml
	碘化丙啶染色液	550 μ l
—	说明书	1 份

保存条件:

2-8°C 保存, 一年有效。

注意事项:

尽管经测试 Annexin V-EGFP 反复冻融 5 次对于其检测效果无显著影响, 但为取得良好的使用效果, 3-6 个月内推荐 4°C 保存, 并适当注意避免反复冻融。

如果有细菌或真菌污染, 会严重影响检测效果。

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。

如果细胞收集过程中使用了胰酶, 需注意设法去除残留的胰酶。残留的胰酶会消化并降解 Annexin V-EGFP, 最终导致染色失败。

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。

需自备 PBS。

本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。



为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

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。注意：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-EGFP 的结合。

b. 取 5-10 万重悬的细胞，1000g 离心 5 分钟，弃上清，加入 195μl Annexin V-EGFP 结合液轻轻重悬细胞。

c. 加入 5μl Annexin V-EGFP，轻轻混匀。

d. 加入 10μl 碘化丙啶染色液，轻轻混匀。

e. 室温(20-25℃)避光孵育 10-20 分钟，随后置于冰浴中。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。

f. 随即进行流式细胞仪检测，Annexin V-EGFP 为绿色荧光，碘化丙啶(PI)为红色荧光。如果用于荧光显微镜检测，1000g 离心 5 分钟，收集细胞，用 50-100μl Annexin V-EGFP 结合液轻轻重悬细胞，涂片后，荧光显微镜下观察。

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，加入适量胰酶细胞消化液(可含有 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，吸除胰酶细胞消化液。需避免胰酶的过度消化。

b. 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。注意：加入步骤 2A 中的细胞培养液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-EGFP 导致染色失败。

c. 取 5-10 万重悬的细胞，1000g 离心 5 分钟，弃上清，加入 195μl Annexin V-EGFP 结合液轻轻重悬细胞。



- d. 加入 5 μ l Annexin V-EGFP, 轻轻混匀。
- e. 加入 10 μ l 碘化丙啶染色液, 轻轻混匀。
- f. 室温(20-25 $^{\circ}$ C)避光孵育 10-20 分钟, 随后置于冰浴中。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。
- g. 随即进行流式细胞仪检测, Annexin V-EGFP 为绿色荧光, 碘化丙啶(PI)为红色荧光。如果用于荧光显微镜检测, 1000g 离心 5 分钟, 收集细胞, 用 50-100 μ l Annexin V-EGFP 结合液轻轻重悬细胞, 涂片后, 荧光显微镜下观察。

3. 对于贴壁细胞的原位荧光显微镜检测:

注: 本方法的优点是可以原位观察细胞凋亡, 缺点是部分凋亡由于不贴壁而检测不到。

- 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。在凋亡诱导结束后, 用可以对多孔板进行离心的离心机 1000g 离心 5 分钟。
- b. 吸除细胞培养液, 加入 PBS 洗涤一次。(如果条件许可, 在吸除 PBS 前 1000g 离心 5 分钟。)
- c. 加入 195 μ l Annexin V-EGFP 结合液。
- d. 加入 5 μ l Annexin V-EGFP, 轻轻混匀。
- e. 加入 10 μ l 碘化丙啶染色液, 轻轻混匀。
- f. 室温(20-25 $^{\circ}$ C)避光孵育 10-20 分钟, 随后置于冰浴中。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。
- g. 随即在荧光显微镜下观察, Annexin V-EGFP 为绿色荧光, 碘化丙啶(PI)为红色荧光。