



Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒说明书

货号：WGD-X-3100144

产品简介

Annexin V（膜联蛋白-V）是一种 35~36 kDa 的 Ca^{2+} 依赖性磷脂结合蛋白，以绿色荧光 FITC 进行标记后作为探针进行细胞凋亡的检测。其检测原理为：在正常的活细胞中，磷脂酰丝氨酸（phosphatidylserine, PS）位于细胞膜脂质双层的内侧，而在细胞凋亡早期，PS 从细胞膜的内侧翻转到细胞膜的表面，暴露在细胞外环境中，Annexin V 与 PS 具有高度亲和力，故可在凋亡早期识别凋亡的发生。

碘化丙啶（PI）是一种常用的高灵敏度、高特异性的细胞核荧光染料。PI 能够嵌入双链 DNA 或 RNA 碱基之间，在激发光下发出红色荧光。PI 在水溶液中的最大激发/发射波长是 493/636 nm，当与核酸结合后，荧光信号明显放大到 20~30 倍，其最大激发/发射波长转变为 535/617 nm。PI 作为一种非细胞膜渗透性荧光染料，不能穿透具有生物活性的细胞膜而被排斥在活细胞外，广泛应用于细胞凋亡与坏死检测、细胞周期分析及死细胞鉴定等。

Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒，是用 FITC 标记的 Annexin V 作为探针，并结合碘化丙啶（PI）染料，通过流式细胞仪或荧光显微镜等手段，实现对细胞凋亡不同阶段的特异性检测与区分，晚期凋亡细胞或坏死细胞为双阳性(Annexin V-FITC⁺/PI⁺)，早期凋亡细胞为单阳性(Annexin V-FITC⁺/PI⁻)，活细胞为双阴性(Annexin V-FITC⁻/PI⁻)。

产品目录

产品名称	规格
Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒	20 次
	100 次

产品组成

组分	20 次	100 次
Annexin V-FITC	100 μL	100 $\mu\text{L} \times 5$
PI 染色液	100 μL	100 $\mu\text{L} \times 5$
结合缓冲液 (1 $\times$)	10 mL	10 mL $\times 5$

产品用途

本产品用于细胞凋亡不同阶段的特异性检测与区分，通过流式细胞仪、荧光显微镜等设备进行检测。

产品特点

- 1. 高灵敏度：Annexin-V 探针高特异性识别和标记凋亡早期外翻的 PS，可检测出极少量的凋亡细胞。
- 2. 精准检测：基于流式细胞仪可实现单细胞精度的细胞凋亡不同阶段检测。

注意事项

- 1. 荧光染料均存在淬灭问题，应尽量避免光，以减缓荧光淬灭。
- 2. 建议样品在染色后 1 小时之内进行分析，PI 染色后宜尽快检测，时间过长可能会导致假阳性。
- 3. 处理贴壁细胞时避免使用含 EDTA 消化液，EDTA 会影响 Annexin V 与 PS 的结合。
- 4. 请勿使用破坏细胞膜完整性的试剂处理细胞，会检测结果导致假阳性，处理细胞时要小心操作，尽量避免造成细胞膜结构损伤。
- 5. PI 是已知的诱变剂，属于潜在致癌物，因此 PI 溶液在丢弃之前需要先经过活性炭处理。
- 6. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴口罩与一次性手套操作。



7. 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。

操作步骤

一、细胞处理步骤：

- 1. 根据实验需求诱导细胞凋亡，收集待检测的细胞进行相应处理。待检测样品中应包含未经处理的细胞样品，作为阴性对照。此外，进行流式检测时需取实验组分别进行 Annexin V-FITC 和 PI 单染，用于调节补偿。
- 2. 收集细胞：收集 1 ~ 10 × 10⁵ 个细胞
悬浮细胞：300 ×g，4℃离心 5 min 弃上清。
贴壁细胞：用不含 EDTA 的胰酶消化后，300 ×g，4℃离心 5 min 弃上清。胰酶消化时间不宜过长，以防引起假阳性。
- 3. 洗涤细胞：用预冷的 PBS 洗涤细胞，300 ×g，4℃离心 5min，弃上清。重复操作一次，弃上清。
- 4. 重悬细胞：加入 100 μL 1×结合缓冲液，轻轻吹匀至单细胞悬液。
- 5. 加入 5 μL Annexin V-FITC 和 5 μL PI 染色液，轻轻混匀。避光、室温反应 10 ~ 15min。加入 400 μL 1×结合缓冲液混匀，样品在 1 小时内用流式细胞仪或荧光显微镜检测。

二、细胞检测步骤：

- 1. 流式细胞仪检测：FITC 的绿色荧光在 FL1 通道检测；PI 的红色荧光在 FL2 或 FL3 通道检测，建议使用 FL3，每个样本采集 10,000 events。用 FlowJo 等软件进行数据分析，FITC 为横坐标，PI 为纵坐标，根据 FITC 和 PI 荧光值分群划定十字门。典型的实验中细胞可分为三个亚群：晚期凋亡细胞或坏死细胞为双阳性(Annexin V-FITC⁺/PI⁺)，早期凋亡细胞为单阳性(Annexin V-FITC⁺/PI⁻)，活细胞为双阴性(Annexin V-FITC⁻/PI⁻)。
- 2. 荧光显微镜检测（可选）：用双色滤光片观察。Annexin V-FITC 荧光信号呈绿色，PI 荧光信号呈红色。晚期凋亡细胞或坏死细胞同时带有红色与绿色荧光，早期凋亡细胞仅带有绿色荧光。

储存及运输条件

-25 ~ -15℃避光保存，避免反复冻融，有效期为 12 个月。短期使用可放置于 2 ~ 8℃避光保存。冰袋运输。

常见问题及解决方法

常见问题	可能原因	解决方法
细胞的 Annexin V-FITC 阳性率偏高	消化时间过长，造成细胞膜损伤。	适量降低消化时间。
	细胞状态差。	阴性对照细胞活率>95%。
	操作过程中吹打细胞过于剧烈。	处理细胞时小心操作，避免人为的损伤。
细胞的 Annexin V-FITC 阳性率偏低	EDTA 未去除干净。	使用无 EDTA 的胰酶，若使用含 EDTA 的胰酶，必须通过洗涤步骤彻底去除 EDTA。
	一些细胞其细胞膜上 PS 的密度较低，染色效果很差。	建议更换细胞株或者采用 TUNEL 法检测凋亡。
	离心后 PBS 未去除干净，与缓冲液形成碳酸钙沉淀，游离 Ca ²⁺ 减少。	离心后 PBS 需去除干净。
	诱导时间过短或所用药物对细胞无凋亡作用。	延长诱导凋亡时间或更换诱导凋亡方法。