



## Apoptotic, Necrotic, and Healthy Cells Detection Kit

### ——细胞凋亡检测试剂盒

产品货号	包装规格
<b>A028</b>	<b>50 次</b>

储存条件：2~6℃，避光保存。

激发/发射波长：Andy Fluor 488: 495/520 nm; PI: 535/617 nm; Hoechst 33342: 350/450 nm。

## 产品说明书

GeneCopoeia, Inc.      广州易锦生物技术有限公司

广州高新技术产业开发区广州科学城  
掬泉路 3 号广州国际企业孵化器 F 区 8 楼

邮编：510663

电话：4006-020-200

邮箱：sales@igenebio.com

网址：[www.abpbio.com](http://www.abpbio.com) [www.igenebio.com](http://www.igenebio.com)

© 2015 GeneCopoeia, Inc.

## Apoptotic, Necrotic, and Healthy Cells Detection Kit

产品货号: A028

### 试剂盒组份:

组份	试剂名称	包装	储存条件
组份 A	Andy Fluor 488 Annexin V	250 $\mu$ l	2~6 $^{\circ}$ C, 避光。
组份 B	PI	250 $\mu$ l	2~6 $^{\circ}$ C, 避光。
组份 C	Hoechst 33342	250 $\mu$ l	2~6 $^{\circ}$ C, 避光。
组份 D	5 $\times$ Annexin-binding buffer	25 ml	2~6 $^{\circ}$ C。

注: 按照推荐的储存条件保存有效期为 1 年, 请注意不要冷冻保存。

### 产品介绍

细胞凋亡 (apoptosis) 和细胞坏死 (Necrosis) 是细胞死亡的两种方式。细胞凋亡是细胞正常生理活动的一部分, 在正常细胞中, 磷脂酰丝氨酸 (PS) 只分布在细胞膜脂质双层的内侧, 而在细胞凋亡早期, 细胞膜中的磷脂酰丝氨酸 (PS) 由脂膜内侧翻向外侧。Annexin V 是一种分子量为 35~36 kD 的  $\text{Ca}^{2+}$  依赖性磷脂结合蛋白, 与磷脂酰丝氨酸有高度亲和力, 故可通过细胞外侧暴露的磷脂酰丝氨酸与凋亡早期细胞的胞膜结合。因此 Annexin V 被作为检测细胞早期凋亡的灵敏指标之一。将 Annexin V 进行荧光素 (eGFP, FITC, Andy Fluor) 或生物素标记, 以标记了的 Annexin V 作为荧光探针, 利用荧光显微镜或流式细胞仪可检测细胞凋亡的发生。

Apoptotic, Necrotic, and Healthy Cells 检测试剂盒提供了一种快速、方便分析细胞凋亡的方法。本试剂盒包括含 Andy Fluor 488 标记的 Annexin V 用于检测早期凋亡细胞, 即用型的核酸染料 PI 用于检测晚期凋亡细胞和死细胞, 和即用型的核酸染料 Hoechst 33342 用于全细胞的核染色。碘化丙啶 (Propidium Iodide, PI) 是一种红色核酸染料, 它不能透过完整的细胞膜, 但对凋亡晚期的细胞和死细胞, PI 能够透过破损细胞膜而使细胞核染红。Hoechst 33342 可以透过细胞膜对所有细胞染色发蓝色荧光。因此, 将 Annexin V, PI 及 Hoechst 33342 联合使用时, 就可以将处于不同凋亡时期的细胞, 活细胞和死细胞区分开来。

### 注意事项

- 荧光染料均存在淬灭问题, 请尽量注意避光, 以减缓荧光淬灭。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

## 实验所需耗材（不包含在试剂盒中）

- 1×PBS (pH 7.2~7.6)
- 去离子水
- 诱导剂
- 18×18 mm 盖玻片

## 实验步骤

### 样品染色

1. a) 悬浮细胞: 300×g, 4℃离心 5 min 收集细胞。  
b) 贴壁细胞: 用不含 EDTA 的胰酶消化后, 300×g, 4℃离心 5 min 收集细胞。（注: 胰酶消化时间不易过长, 否则容易引起假阳性）
2. 准备阳性实验对照组, 使用合适的方法诱导细胞凋亡。同时准备未经凋亡诱导处理的细胞作为阴性实验对照组。
3. 用 4℃预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次, 每次均需 300×g, 4℃离心 5 min。
4. 配制 1×Annexin-binding buffer: 用去离子水按 1:5 稀释 5×Annexin-binding buffer (组份 D) (2ml 5×Annexin-binding buffer +8ml 去离子水)。
5. 用 1×Annexin-binding buffer 重悬细胞, 调节其浓度为~1×10<sup>6</sup> 细胞/ml。
6. 取 100 μl 细胞悬液于 5 ml 流式管中, 加入 5 μl Andy Fluor 488 Annexin V (组份 A), 5 μl PI (组份 B), 和 5 μl Hoechst33342 (组份 C), 轻轻混匀。
7. 室温、避光、反应 15 min。
8. 加入 400 μl 1×Annexin-binding buffer, 轻柔混匀, 冰上放置。
9. 请在 1 小时内, 进行下述荧光显微镜或流式细胞仪的观察和检测。

### 荧光显微镜观察

1. 用 1×Annexin-binding buffer 洗涤细胞, 300×g, 4℃离心 5 min。然后用 1×Annexin-binding buffer 重悬细胞。
2. 滴一滴上述细胞悬液于载玻片上, 并用盖玻片盖上细胞。
3. 对于贴壁细胞来说, 也可直接用盖玻片来培养细胞并诱导细胞凋亡。
  - (1) 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。
  - (2) 用 PBS 洗涤细胞两次。
  - (3) 在 100 μl 1×Annexin-binding buffer 中加入 5~25 μl Andy Fluor 488 Annexin V, 5 μl Propidium Iodide, 5 μl Hoechst33342, 混匀。

- (4) 将上述溶液滴加于盖玻片表面，使盖玻片表面均匀覆盖。
  - (5) 避光、室温反应 5~15 min。
  - (6) 用 1×Annexin-binding buffer 洗涤细胞两次。
4. 将盖玻片倒置于载玻片上，于荧光显微镜下用 FITC 滤光片观察 Andy Fluor 488 Annexin V 荧光信号呈绿色，用 Texas Red 滤光片观察 PI 荧光信号呈红色，用 DAPI 滤光片观察 Hoechst33342 荧光信号呈蓝色。

### 流式细胞仪分析

用流式细胞仪检测，激发波长 Ex=488 nm；发射波长 Em=530 nm。

Andy Fluor 488 Annexin V 绿色荧光通过 FITC 通道（FL1）检测；PI 红色荧光通过 PI 通道（FL2）检测；Hoechst33342 蓝色荧光通过 DAPI 通道（FL3）检测。

荧光补偿调节：使用未经凋亡诱导处理的正常细胞，作为对照进行荧光补偿调节去除光谱重迭和设定十字门的位置。

© 2015, GeneCopoeia, Inc.

广州易锦生物技术有限公司

广州高新技术产业开发区广州科学城掬泉路 3 号

广州国际企业孵化器 F 区 8 楼

邮编：510663

电话：4006-020-200

邮箱：sales@igenebio.com

网址：[www.abpbio.com](http://www.abpbio.com)（英文） [www.igenebio.com](http://www.igenebio.com)（中文）