



明睿生物 卓越服务

## Annexin V-FITC试剂盒

Catalog No. MR-KA050

Size 50T

(仅供研究使用)

Store at 4°C

### 实验原理:

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 35~36kD 的  $Ca^{2+}$  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 FITC 标记, 以标记了的 Annexin V 作为荧光探针, 利用流式细胞仪可检测细胞凋亡的发生。碘化丙啶 (Propidium Iodide, PI) 是一种核酸染料, 它不能透过完整的细胞膜, 但对凋亡中晚期的细胞和死细胞, PI 能够透过细胞膜而使细胞核染红。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。

### 试剂盒组份:

#### 1、浓缩结合缓冲液 4x (Binding Buffer 4x)

体积: 8ml (4 倍浓缩液)

稀释后溶液中各组分浓度: 10mM Hepes/NaOH, pH 7.4, 140mM NaCl, 2.5mM  $CaCl_2$

#### 2、碘化丙啶溶液 (Propidium Iodide) (避光保存及使用)

体积: 500ul

浓度: 20ug/ml

#### 3、重组人 Annexin V-FITC (避光保存及使用)

来源: 大肠杆菌 (E.coli)

分子量: 35.8 KDa

样品量: 250ul, 可用于 50 次实验

保存方法: 于 50mM TRIS, 100mM NaCl, 1% BSA, 0.02%  $NaN_3$ , pH7.4 溶液中保存

纯度: SDS-PAGE 和反相 HPLC 检测表明其纯度大于 98%

### 实验染色方法:

标记的 Annexin V 可用流式细胞仪进行检测细胞外膜上的磷脂酰丝氨酸, 实验操作流程如下:

- 1、用无菌的去离子水按 1:4 稀释结合缓冲液, 可根据实际需要量稀释;
- 2、用预冷, 4°C 无菌的 PBS 充分洗涤细胞两次, 取总数约为  $1 \times 10^6$ /ml 的细胞待检测;

- 3、 用 250ul 结合缓冲液重新悬浮细胞并使其浓度为  $2-5 \times 10^5$ /ml;
- 4、 取 195ul 的细胞悬液加入 5ul Annexin V-FITC, 轻轻混匀后间隔 3 分钟, 再加入 10ul 浓度为 20ug/ml 的碘化丙锭溶液。
- 5、 混匀后于室温避光孵育 10 分钟;
- 6、 加 300ul 结合缓冲液, 轻轻混匀, 上流式细胞仪 (FACS) 进行检测分析。

**注意事项:**

- 1: 细胞标记染色后请尽快上机检测, 不宜长时间放置。
- 2: PI 有毒, 操作时请戴手套, 注意防护。

**建议:**

对于初次检测的实验者为了调试机器的补偿和象限的分区, 建议设立实验对照管:

- 1: 未染色的细胞管
- 2: 只用 Annexin V-FITC 染色的细胞管
- 3: 只用 PI 染色的细胞管

**参考文献:**

1. Raynal, P. and H.B. Pollard. 1994. Annexins: The problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium and phospholipid-binding proteins. *Biochemica et Biophysica Acta*. 1197:63-93.
2. Vermes, I., C. Haanen, H. Steffens-Nakken, and C. Reutelingsperger. 1995. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Meth.* 184:39-51.
3. Martin, S.J., C.P. Reutelingsperger, A.J. McGahon, J.A. Rader, R.C. van Schie, D.M. LaFace, and D.R. Green. 1995. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: Inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J. Exp. Med.* 182:1545-1556.
4. Koopman, G., C.P. Reutelingsperger, G.A. Kuijten, R.M. Keehnen, S.T. Pals and M.H. van Oers. 1994. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 84:1415-1420.
5. Homburg, C.H., M. de Haas, A.E. von dem Borne, A.J. Verhoeven, C.P. Reutelingsperger and D. Roos. 1995. Human neutrophils lose their surface Fc  $\gamma$  RIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis in vitro. *Blood* 85:532-540.
6. Andree, H.A., C.P. Reutelingsperger, R. Hauptmann, H.C. Hemker, W.T. Hermens and G.M. Willems. 1990. Binding of vascular anticoagulant  $\alpha$  (VAC  $\alpha$ ) to planar phospholipid-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 265:4923-4928.

Version:04/09



上海明睿生物技术有限公司

电话: 021 6418 1584

传真: 021 5116 3850

Email: [tech@mrbiotech.com.cn](mailto:tech@mrbiotech.com.cn)