



吉玛基因
www.genepharma.com

Annexin V-Alexa Fluor647/PI 细胞凋亡检测试剂盒 产品使用手册

上海电话：021-51320195 E-mail: support@genepharma.com
苏州电话：0512-86668828 E-mail: szsupport@genepharma.com
官网网址：www.genepharma.com



B061-V001-20240617

一、产品简介

Annexin V-Alexa Fluor647/PI细胞凋亡检测试剂盒是用Alexa Fluor647标记了的Annexin V作为探针，来检测细胞早期凋亡的发生，可用流式细胞仪或其他荧光检测设备进行检测。

其检测原理为：在正常的活细胞中，磷脂酰丝氨酸（phosphatidylserine, PS）位于细胞膜的内侧，但在早期凋亡的细胞中，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。AnnexinV（膜联蛋白-V）是一种分子量为35-36KD的Ca²⁺依赖性磷脂结合蛋白，能与PS高亲和力结合。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。

另外，本试剂盒中还提供了碘化丙啶（Propidium Iodide, PI）用来区分存活的早期细胞和坏死或晚期凋亡细胞。PI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AnnexinV与PI联合使用时，PI则被排除在活细胞（AnnexinV-/PI-）和早期凋亡细胞（AnnexinV+/PI-）之外，而晚期凋亡细胞和坏死细胞同时被Alexa Fluor647和PI结合染色呈现双阳性（AnnexinV+/PI+）。

二、产品信息

Component	G06122 (20 rxns)	G06125 (50 rxns)
Annexin V-Alexa Fluor647	50µl	100µl
Propidium iodide (PI)	50µl	100µl
1×Annexin V Binding Buffer	12.5 ml	25ml

注：需自备试剂 PBS

三、使用方法

（一）操作步骤

- (1) 细胞完成凋亡刺激后，500×g，2-8℃离心5分钟，收集1~5×10⁵个细胞。
 - a. 如果为悬浮细胞，直接离心收集细胞即可；
 - b. 如果为贴壁细胞，尽量使用不含EDTA的胰酶消化处理。消化结束后，使用含血清的培养基终止反应，离心收集细胞。贴壁细胞诱导凋亡后，如有漂浮细胞，请将培养液一并收集到离心管中，与消化处理的细胞一起离心以保证实验



c. 结果的可靠性。

- (2) 用预冷的1×PBS洗涤细胞两次，500×g，2-8℃离心10分钟，收集细胞。
- (3) 加入300μl预冷的1×Annexin V Binding Buffer，重悬细胞。
- (4) 加入2μl Annexin V-Alexa Fluor647和2μl PI，轻轻混匀。
- (5) 室温(20℃~25℃)条件下避光反应10分钟。
- (6) 将样品于冰上避光放置1小时内用流式细胞仪或荧光显微镜检测。

(二) 样品分析

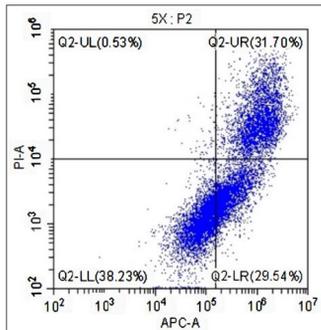
A. 流式细胞仪分析

流式细胞仪分析时需要选择合适的电压并调节光补偿，建议除待测样品外设置以下对照样品：

- (1) 阴性对照细胞，不加任何染料；
- (2) 凋亡阳性细胞，单染 Annexin V-Alexa Fluor647 (不加PI)；
- (3) 凋亡阳性细胞，单染PI (不加Annexin V-Alexa Fluor647)。

流式细胞仪分析参考实例：

凋亡诱导HpeG2细胞24小时，细胞发生凋亡后，参照以上实验步骤，用流式细胞仪检测，结果如下图所示。



B. 荧光显微镜检测

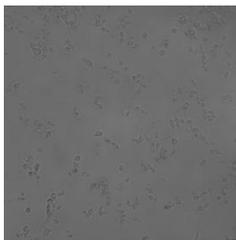
取10μl Annexin V-Alexa Fluor647/PI双染的细胞悬液于载玻片上，盖上盖玻片，在荧光显微镜下用双色滤光片观察。



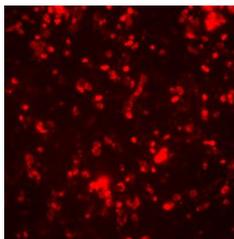
注：对于贴壁比较牢固的细胞，可直接用盖玻片培养细胞并诱导细胞凋亡，进行镜检，最好不要进行固定。如果必须固定，需要在完成Annexin V-Alexa Fluor647/PI双染后，洗掉未结合的探针再进行固定。贴壁不牢的细胞建议处理为细胞悬液后再进行镜检。

荧光显微镜分析参考实例：

凋亡诱导HpeG2细胞24小时，细胞发生凋亡后，参照以上实验步骤，用荧光显微镜检测，结果如下图所示：



白光



Annexin V-Alexa Fluor647

（三）注意事项：

- （1）整个操作过程尽量轻柔以避免出现细胞碎片，引起假阳性。
- （2）掌握好胰酶消化细胞的程度，无论消化不足或者消化过度都易产生细胞碎片，造成假阳性结果；用胰酶消化贴壁细胞后务必用血清终止消化反应。
- （3）预冷1×PBS洗涤细胞步骤不可省略，且需尽可能吸尽残留的1×PBS。
- （4）待测细胞样品不可以进行透化，否则Annexin V-Alexa Fluor 647/PI会直接进入被透化细胞内，造成实验误差。
- （5）细胞凋亡是一个持续变化的动态反应过程，并且Annexin V-Alexa Fluor 647和PI是光敏性物质，因此反应结束后应尽快进行检测，并且需要全程避光操作。
- （6）试剂在开盖前请短暂离心，将管盖及内壁上的液体甩至管底。
- （7）能否成功检测细胞的早期凋亡，取决于以下几个因素，包括细胞的状态及类型，诱导凋亡的方法及剂量，膜磷脂酰丝氨酸的表达水平及凋亡时外翻的程度，实验操作中细胞机械损伤的程度等。因此，建议进行预实验对相应步骤进行优化。
- （8）实验过程中请穿实验服并且戴一次性手套，确保安全。

