

Calbiochem®

Annexin V-FITC / PI Apoptosis Detection Kit

目录货号 PF032

背景介绍:

凋亡是细胞死亡的一种基本形式，它在胚胎发育，组织分化和一些疾病发生过程中起着重要的调控作用。在正常细胞中，磷脂酰丝氨酸（PS）位于细胞膜内侧，一旦发生细胞凋亡，可以从细胞膜的内侧迅速翻转到细胞膜外侧，使得 PS 暴露在细胞膜表面。在体内，巨噬细胞可以识别翻转到细胞膜表面的 PS 从而将这些程序性死亡的细胞清除，因此凋亡过程中并不伴随局部的炎症反应，而在细胞坏死的过程中则常常伴随着炎症反应。

在体外可以用 PS 与抗凝血剂 Annexin V 的相互作用检测外翻的 PS。在 Ca^{2+} 存在的条件下，Annexin V 与 PS 有很高的亲和力，可以与之迅速结合。PS 外翻发生在细胞核破裂，DNA 片段化以及凋亡相关蛋白出现之前，这使得 Annexin V 与 PS 的结合成为凋亡早期的一种重要检测标志事件。

检测原理:

在该方法中，基于流式细胞仪和荧光显微镜，FITC 标记的 Annexin V 可以用来检测细胞凋亡。由于细胞坏死的过程中也会发生细胞膜损伤，坏死的细胞同样也会结合 Annexin V-FITC。因此，Propidium Iodide (PI) 被用来区分存活的早期细胞和坏死或晚期凋亡细胞。坏死细胞可以同时与 Annexin V-FITC 和 PI 结合显色，而 PI 则被排除在活细胞（FITC 阴性）和早期凋亡细胞（FITC 阳性）之外。在没有巨噬细胞的情况下，凋亡的最后阶段会像细胞坏死一样发生整个细胞的解体，从而使凋亡晚期的细胞也同时被 FITC 和 PI 结合染色呈现双阳性。

一种直接在细胞培养基中完成 Annexin-FITC 结合反应的快速检测方法被开发出来，从而避免了反复的离心和清洗步骤，减少或避免在这些过程中对细胞膜可能造成的人为机械损伤。除此之外，凋亡是一个动态持续的过程，细胞脱离正常培养条件后就开始发生凋亡，在整个实验过程中凋亡都在进行，因此快速的检测方法对于检测细胞的早期凋亡也非常重要。

检测次数: 100 次

检测方法: 流式细胞仪或荧光显微镜

样本类型: 悬浮细胞，贴壁细胞

种属反应: 可适用于多种种属

储存与运输条件: 干冰运输，4°C 储存。为了防止由于沾在管盖上造成的试剂损失，移除管盖前需要轻轻旋转使沾在管盖上的液体落入管内。请参考注意事项和操作建议。

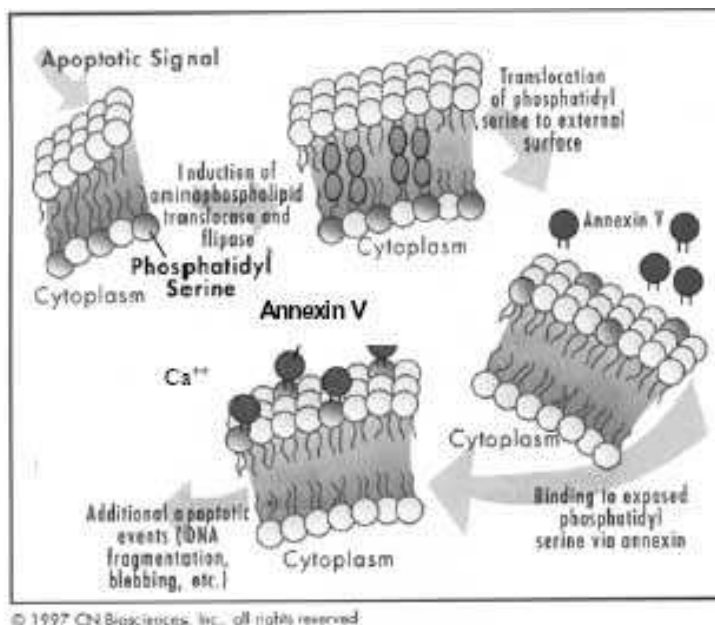


图 1. 试剂盒检测原理图

试剂盒组分:

注意: Annexin V-FITC Apoptosis Detection 试剂盒提供足够 100 次反应的试剂。

- (1) Annexin V-FITC (试剂盒组分目录号 JA1651-125UL): 200 $\mu\text{g/ml}$ FITC 标记的重组 Annexin V。
- (2) 5 \times 结合缓冲液 (试剂盒目录号 JA1652-12.5ML): 12.5 ml
- (3) 培养基结合试剂 (试剂盒目录号 JA1653-1.2ML): 用来增强 Annexin V 与 PS 在培养基中的结合效率。
- (4) Propidium Iodide (试剂盒目录号 JA11654-1.5ML): 30 $\mu\text{g/ml}$

注意事项:

- (1) 为了得到最好的实验结果, 请在使用该试剂盒前参考以下的说明。
- (2) 为了防止由于沾在管盖上造成的试剂损失, 移除管盖前需要轻轻旋转使沾在管盖上的液体落入管内。
- (3) Propidium iodide 可以通过吞咽或皮肤接触对身体造成伤害, 并且可以造成眼睛发炎疼痛。它应该被当作可能的致敏原对待。
- (4) 操作时需要戴手套, 穿实验服, 戴防护眼镜。
- (5) 使用 Annexin V-FITC 试剂盒检测凋亡需要针对活细胞。固定操作可能会干扰 FITC 信号强度。标记后固定细胞是一种可能的解决办法, 但是需要提供过量的 Ca^{2+} 确保 Annexin V 与 PS 相互作用在固定过程中不会消失。
- (6) Annexin V-FITC 结合后需要尽快进行检测分析, 因为凋亡是一个动态持续的过程。FITC 信号 1 小时后也会损失减弱。
- (7) Propidium Iodide 和 Annexin V-FITC 对光敏感, 尽量减少它们暴露在光下的时间。有必要时可以使用带盖子的冰盒或铝箔纸避光。
- (8) 用 Annexin V-FITC 成功检测早期凋亡依赖以下几个因素, 包括细胞类型, 膜 PS 表达水平, 凋亡过程中外翻 PS 的量, 诱导凋亡的方法 (或试剂), 诱导凋亡的时间以及实验过程中机械损伤的程度。推荐根据每次实验样本类型和操作流程对这些步骤进行优化。

操作流程:

共有三种不同的操作步骤。一种直接在培养基中完成 Annexin V-FITC 与 PS 的结合（快速 Annexin V-FITC 结合检测法），一种需要 PBS 清洗后在结合缓冲液中完成 Annexin V-FITC 与 PS 的结合（传统 Annexin V-FITC 结合检测法），一种用于 Annexin V-FITC 与贴壁细胞结合。如果可能推荐使用第一种快速检测法。三种方法都需要准备足够的 1×结合缓冲液（快速检测法 0.5 ml/样本，传统检测法 1.0 ml/样本），将 5×浓缩结合缓冲液按照 1: 5 的比例稀释在去离子水中即可。置于冰上。

一 快速 Annexin V-FITC 结合检测法

1. 调整细胞密度到大约 1×10^6 细胞/ml。
2. 将 0.5 ml 细胞悬液从细胞培养瓶中（ 5×10^5 个细胞）转移到一个干净的离心管内。
3. 加入 10 μ l 培养基结合试剂。
4. 加入 1.25 μ l Annexin V-FITC。
5. 室温（18-24°C）避光反应 15 分钟。
6. 室温 1000×g 离心 5 分钟，去除培养基。
7. 将细胞用 0.5 ml 1×结合缓冲液轻轻重悬。
8. 加入 10 μ l Propidium Iodide。
9. 将样本放置在冰上避光保存。
10. 立即用流式细胞仪或荧光显微镜检测分析。

二 传统 Annexin V-FITC 结合检测法

1. 调整细胞密度到大约 1×10^6 细胞/ml。
2. 将 0.5 ml 细胞悬液从细胞培养瓶中（ 5×10^5 个细胞）转移到一个干净的离心管内。
3. 室温 1000×g 离心 5 分钟，去除培养基。
4. 将细胞用 0.5 ml 预冷的 PBS 溶液轻轻重悬。
5. 室温 1000×g 离心 5 分钟，去除 PBS 溶液。
6. 将细胞用 0.5 ml 预冷的 1×结合缓冲液轻轻重悬。
7. 加入 1.25 μ l Annexin V-FITC。
8. 室温（18-24°C）避光反应 15 分钟。
9. 室温 1000×g 离心 5 分钟，去除上清。
10. 将细胞用 0.5 ml 预冷的 1×结合缓冲液轻轻重悬。
11. 加入 10 μ l Propidium Iodide。
12. 将样本放置在冰上避光保存。
13. 立即用流式细胞仪或荧光显微镜检测分析。

三 Annexin V-FITC 与贴壁细胞结合检测法

1. 将细胞培养瓶中的培养基转移到 15 ml 的锥形管中并置于冰上。
注意：这些培养基中可能包含有在细胞死亡过程中从培养瓶壁上脱落的细胞。
2. 用 10 ml PBS 溶液轻轻润洗培养瓶内细胞，去除 PBS 溶液。
3. 加入 1-2 ml 0.5×胰酶，孵育，直到显微镜下观察到细胞开始从培养瓶壁脱落。
4. 轻轻连续拍打使细胞从培养瓶壁上完全脱落。
5. 将细胞轻轻重悬于步骤 1 中的培养基或预冷的 1×结合缓冲液中使得其密度大约为 1×10^6 细胞/ml。
6. 将 0.5 ml 细胞悬液从细胞培养瓶中（ 5×10^5 个细胞）转移到一个干净的离心管内。按照**快速 Annexin V-FITC 结合检测法**中 3-10 步或**传统 Annexin V-FITC 结合检测法**中 7-13 步操作。

结果与判断:

一 流式细胞仪分析

流式细胞仪可以利用氩离子激光源发射波长为 488 nm 的激发光，从而定量 Annexin V-FITC 和 Propidium Iodide 的信号强度。为了建立流式细胞仪的检测标准，使用仅用 Annexin V-FITC 染色的诱导凋亡细胞和仅用 Propidium Iodide 染色的诱导凋亡细胞做仪器校准。FITC 信号可以在 518 nm 波长时被 FL1 (FITC 接收器) 通道检测到。Propidium Iodide 在波长 620 nm 处发出荧光，可以被 FL2 (Propidium Iodide 接收器) 通道检测。进行合适的参数调整从而避免这两种测量的交叉重叠。Annexin V-FITC 荧光强度的对数值作为 X 轴，Propidium Iodide 荧光强度的对数值作为 Y 轴。流式细胞仪也可以编程展示其他参数，比如前散射和侧散射 (90°)。

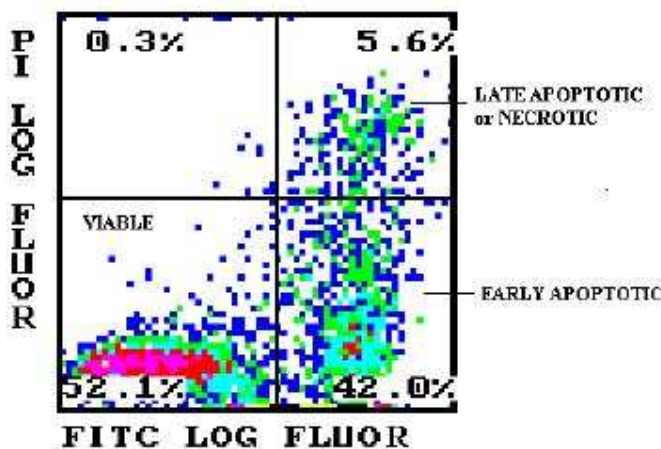


图 2. 样本流式细胞术检测图如上所示 活细胞既不结合 Annexin V-FITC，也不结合 Propidium Iodide，出现在上面散点图的左下方。早期凋亡细胞有外翻的 PS 和完整的细胞膜，因而可以结合 Annexin V-FITC 而将 Propidium Iodide 排除在细胞外，这群细胞显示在右下角。坏死或晚期凋亡细胞可以同时与 Annexin V-FITC 和 Propidium Iodide 结合显示双阳性，这群细胞出现在图的右上角。正常的细胞培养中会有一小部分细胞处于细胞死亡阶段。

二 荧光显微镜分析

加入 Propidium Iodide 后将 25-50 μ l 细胞重悬液转移至显微镜玻片上。盖上盖玻片后迅速用装备有 FITC 和 Rhodamine 滤镜的荧光显微镜观察细胞。向样本中加入的封片剂可能造成 Ca^{2+} 浓度的降低从而引起 Annexin V-FITC 的去结合。

流式细胞仪光散射属性的不同设置也可以用来监测细胞正在发生的凋亡过程。例如，未处理的 Jurkat 细胞有很高的前散射。诱导凋亡后，Jurkat 细胞开始皱缩，细胞膜出现泡状结构，从而可以观测到侧散射的显著增强。将光散射属性的变化与 Annexin V-FITC 检测方法相结合可以用来验证或支持利用单一参数测量得到的结论。

荧光显微镜:

使用荧光显微镜上的 FITC 滤镜 (蓝光)，Annexin V-FITC 染色阳性的细胞将在细胞膜表面呈现明亮的苹果绿色。使用 Rhodamine 滤镜 (绿光)，Propidium Iodide 染色阳性的细胞则会在整个胞质内呈现不同强度的黄-红色。早期凋亡细胞不会被 Propidium Iodide 染色或显示背景荧光，而坏死或晚期凋亡细胞则会显示出黄-红色的胞质，红色的胞核和环绕细胞的绿色胞膜。在晚期凋亡细胞中还可以观察到胞膜皱缩和起泡。

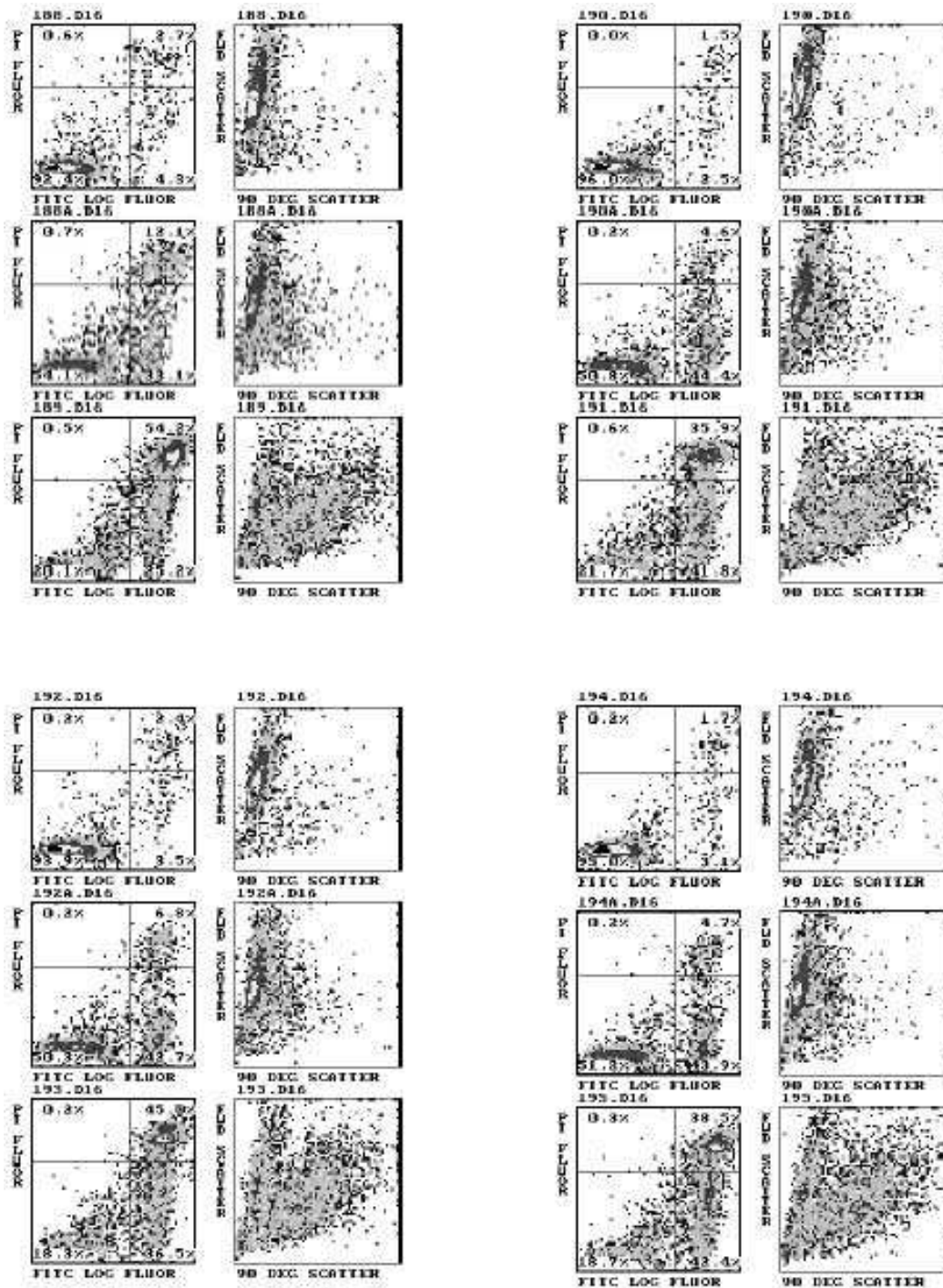


图 3 快速检测法与传统检测法结果一致 Jurkat 细胞用 0.5 $\mu\text{g/ml}$ Actinomycin D 处理 4.5 (中间) 或 19 小时 (底部), 未处理的细胞在上图中每部分的上端。然后在结合缓冲液中加入 Annexin V-FITC (传统检测法) 或直接在 RPMI, DMEM 或 McCoy's 5A 培养基中加入 Annexin V-FITC (快速检测法)。

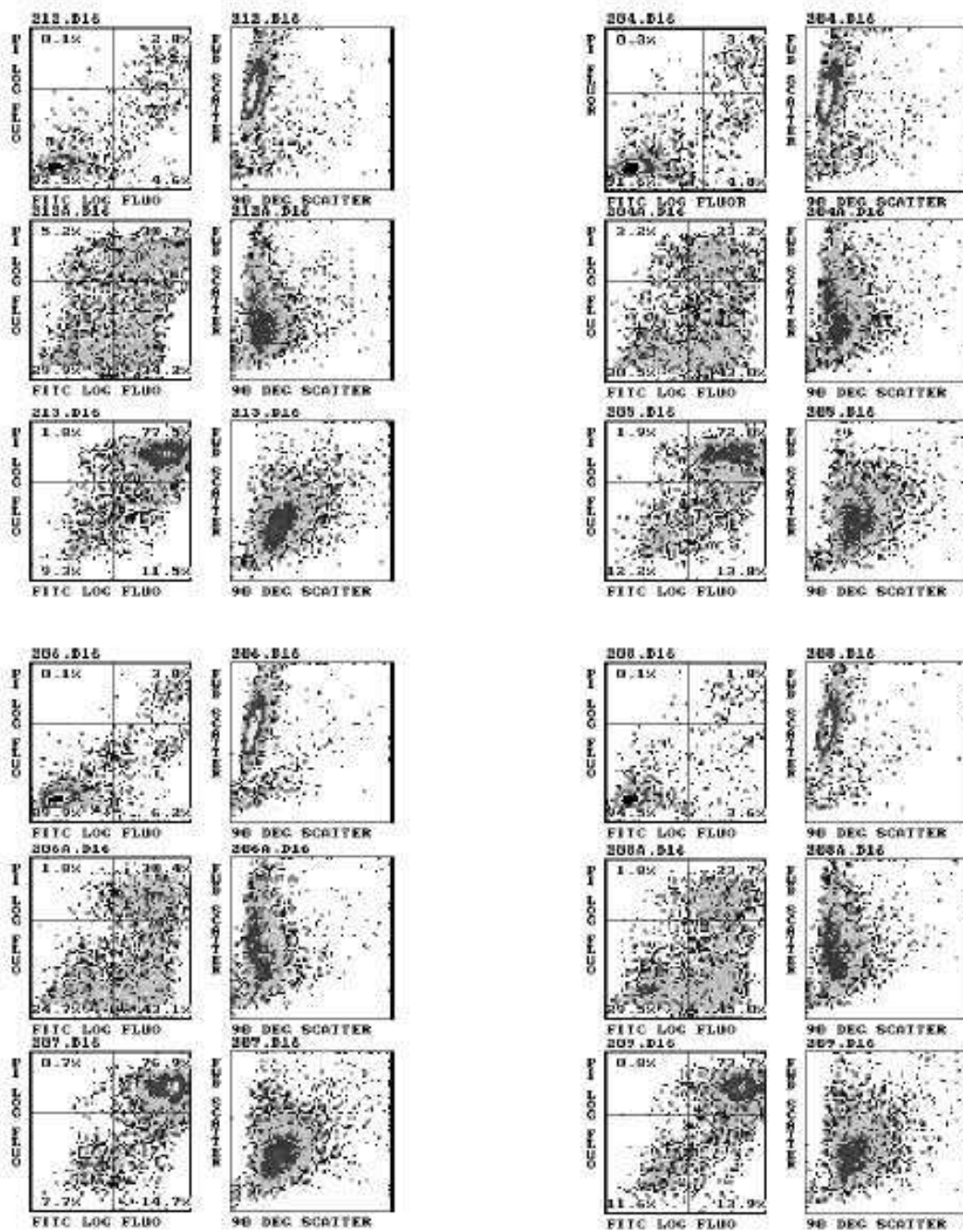


图 4 快速检测法与传统检测法结果一致 30 分钟紫外线照射后分别在恒温培养箱中孵育 4（中间）或 18（底部）小时诱导细胞凋亡，未处理的细胞在上图中每部分的上端。然后在结合缓冲液中加入 Annexin V-FITC（传统检测法）或直接在 RPMI，DMEM 或 McCoy's 5A 培养基中加入 Annexin V-FITC（快速检测法）。

引用文献:

Laxminarayana R. Devireddy, Jose G. Teodoro, Fabien A. Richard, Michael R. Green(2001) Induction of Apoptosis by a Secreted Lipocalin That is Transcriptionally Regulated by IL-3 Deprivation. *Science* 293 (5531): 829-834

Nigel J. Waterhouse, Joshua C. Goldstein, Oliver von Ahsen, Martin Schuler, Donald D. Newmeyer, and Douglas R. Green(2001). Cytochrome c Maintains Mitochondrial Transmembrane Potential and ATP Generation after Outer Mitochondrial Membrane Permeabilization during the Apoptotic Process. *The Journal of Cell Biology*, 153(2): 319–328

Laxminarayana R. Devireddy, Jose G. Teodoro, Fabien A. Richard, Michael R. Green(2001). Induction of Apoptosis by a Secreted Lipocalin That is Transcriptionally Regulated by IL-3 Deprivation . *Science*, 293(5531): 829 – 834

Katja C. Zimmermann, Jean-Ehrland Ricci, Nathalie M. Droin, and Douglas R. Green(2002). The role of ARK in stress-induced apoptosis in Drosophila cells. *The Journal of Cell Biology*, 156, (6): 1077–1087

A Asumendi, MC Morales, A Alvarez, J Are´chaga and G Pe´rez-Yarza(2002). Implication of mitochondria-derived ROS and cardiolipin peroxidation in N-(4-hydroxyphenyl) retinamide-induced apoptosis. *British Journal of Cancer*, 86: 1951 – 1956

Caroline Sievers, Nick Platt, V. Hugh Perry, Michael P. Coleman, Laura Conforti (2003). Neurites undergoing Wallerian degeneration show an apoptotic-like process with annexin V positive staining and loss of mitochondrial membrane potential. *Neuroscience Research*, 46: 161-169

Vladimír Leksa, Samuel Godar, Herbert B. Schiller, Elke Fuertbauer, Arshad Muhammad, Katarina Slezakova, Vaclav Horejsi, Peter Steinlein⁵, Ulrich H. Weidle, Bernd R. Binder and Hannes Stockinger(2005). TGF- β -induced apoptosis in endothelial cells mediated by M6P/IGFII-R and mini-plasminogen. *Journal of Cell Science* , 118: 4577-4586

A Burchert, Y Wang, D Cai, N von Bubnoff, P Paschka, S Mu¨ller-Bru¨sselbach, OG Ottmann, J Duyster, A Hochhaus and A Neubauer (2005) . Compensatory PI3-kinase/Akt/mTor activation regulates imatinib resistance development. *Leukemia*, 19:1774–1782

Shawn D. Larson, Jing Li, Dai H. Chung, and B. Mark Evers(2007). Molecular mechanisms contributing to glutamine-mediated intestinal cell survival. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293: 1262–1271

ANNA-MARIA LOBASCIO, FRANCESCA-GIOIA KLINGER and MASSIMO DE FELICI (2007) . Isolation of apoptotic mouse fetal oocytes by AnnexinV assay. *Int. J. Dev. Biol.* 51: 157-160

Siriporn Jitkaew, Erika Witasp, Shouting Zhang, Valerian E. Kagan, and Bengt Fadeel(2009). Induction of caspase- and reactive oxygen speciesindependent phosphatidylserine externalization in primary human neutrophils: role in macrophage recognition and engulfment. *Journal of Leukocyte Biology*, 85: 427–437

Hyun Sun Cho, Seung Hee Chang, Youn Sun Chung, Ji Young Shin, Sung Jin Park, Eun Sun Lee, Soon Kyung Hwang, Jung Taek Kwon, Arash Minai Tehrani, Minah Woo, Mi Sook Noh, Huda Hanifah, Hua Jin, Cheng Xiong Xu, Myung Haing Cho(2009). Synergistic effect of ERK inhibition on tetrandrine-induced apoptosis in A549 human lung carcinoma cells. *J. Vet. Sci.* 10(1), 23-28

Christopher S Bryant, Sanjeev Kumar, Sreedhar Chamala, Jay Shah, Jagannath Pal, Mahdi Haider, Shelly Seward, Aamer M Qazi, Robert Morris, Assaad Semaan, Masood A Shammas, Christopher Steffes, Ravindra B Potti, Madhu Prasad, Donald W Weaver, Ramesh B Batchu(2010). Sulforaphane induces cell cycle arrest by protecting RB-E2F-1 complex in epithelial ovarian cancer cells. *Molecular Cancer*, 9:47

Jiamin Chen, Harriet E. Feilotter, Genevieve C. Pare´, Xiao Zhang, Joshua G.W. Pemberton, Cherif Garady, Dulcie Lai, Xiaolong Yang, and Victor A. Tron(2010). MicroRNA-193b Represses Cell Proliferation and Regulates Cyclin D1 in Melanoma. *The American Journal of Pathology*, 176(5):2520-2529