

Annexin V-FITC/PI 双染法细胞凋亡检测试剂盒

Annexin V-FITC/PI Apoptosis Assay Kit

使用说明书

◆货号及规格:

目录编号	包装规格
C202-01	50T

◆产品组成:

试剂盒组分	组分规格
Annexin V-FITC	250 uL
Propidium Iodide,PI	500 uL
Binding Buffer(4X)	10 mL

◆储存条件: 4°C 保存和运输, 有效期 12 个月。

◆产品概述:

磷脂酰丝氨酸(PS)是一种带负电荷的磷脂, 正常细胞中, 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 PS 由脂膜内侧翻向细胞膜外侧, 使 PS 暴露在细胞膜外表面。而 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 被公认为检测细胞早期凋亡的灵敏指标之一。

本产品将 Annexin V 进行绿色荧光素(FITC)标记, 以标记了的 Annexin V 作为探针, 利用荧光显微镜或流式细胞仪可检测细胞凋亡的发生。碘化丙啶(Propidium Iodide,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, 但对凋亡中晚期的细胞和坏死细胞, PI 能够透过细胞膜而使细胞核染红。因此采用 Annexin V 与 PI 双染的方法, 就可以将处于不同凋亡时期的细胞区分开来。

本试剂盒可应用于培养细胞凋亡检测 (不推荐用于检测组织样本)。

◆使用方法:

1. 细胞样品的准备:

A、悬浮细胞:

1) 收集细胞至离心管中 1000-2000rpm 离心 5min,小心去除上清。

2) 用 1mL 4℃ 预冷 PBS 轻轻重悬细胞并计数, 1000-2000rpm 离心 5min, 小心吸除上清。

3) 再加入 1mL 4℃ 预冷的 PBS 重悬细胞, 1000-2000rpm 离心 5min, 小心吸除上清。

B、贴壁细胞:

1) 吸出细胞培养液至离心管中, PBS 洗涤贴壁细胞一次, 加入适量不含 EDTA 的胰酶细胞消化液消化细胞。

2) 室温孵育至轻轻吹打可以使贴壁细胞吹打下来时, 吸除胰酶细胞消化液, 需避免胰酶的过度消化。

3) 加入以上步骤中收集的细胞培养液, 稍混匀, 转移到离心管内, 1000-2000rpm 离心 5min, 小心吸除上清。

注: 加入的细胞培养液一方面可以收集已经悬浮的发生凋亡或坏死的细胞, 另一方面细胞培养液中的血清可以有效抑制或中和残留的胰酶; 残留的胰酶会消化并降解后续加入的 Annexin V-FITC 导致染色失败。

4) 用 1mL 4℃ 预冷 PBS 轻轻重悬细胞并计数, 1000-2000rpm 离心 5min, 小心吸除上清。

5) 再加入 1mL 4℃ 预冷的 PBS 重悬细胞, 1000-2000rpm 离心 5min, 小心吸除上清。

2. 用去离子水按 1: 4 稀释 Binding Buffer(4 mL Binding Buffer+12mL 去离子水)。

3. 用 250 μl 稀释过的 Binding Buffer 重新悬浮细胞, 调节其浓度为 1×10^6 /mL。

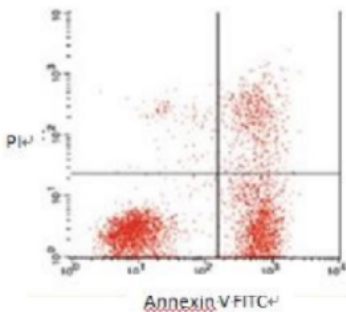
4. 取 100 μl 的细胞悬液于 5mL 流式管中, 加入 5 μl Annexin V-FITC, 轻轻混匀。

5. 室温(20-25℃)避光孵育 10min;

6. 上机前 5min 加入 10 μl 碘化丙啶溶液, 轻轻混匀;

7. 上机前在反应管中补加 400ul PBS 重悬细胞, 避光保存, 随即进行流式细胞仪(FACS)检测, Annexin V-FITC 为绿色荧光, PI 为红色荧光。

8. 下图为流式细胞仪检测早期凋亡细胞。在双变量流式细胞仪的散点图上, 左下象限显示活细胞, 右下象限为早期凋亡细胞, 右上象限是凋亡晚期细胞和坏死细胞。



◆注意事项:

1. 微量试剂取用前请离心收集。
2. Annexin V-FITC, Propidium Iodide(PI)避光保存及使用。
3. Propidium Iodide(PI)有毒, 操作时要戴手套, 使用时避免皮肤直接接触。
4. Annexin V-FITC 中含有剧毒成分叠氮化钠(NaN), 操作时要带手套, 使用时避免皮肤直接接触。
5. 本试剂盒适用于检测活细胞, 流式细胞仪检测时, 细胞数量不应低于 1×10^6 , 不推荐用于检测组织样本。
6. 本试剂盒推荐使用悬浮培养细胞。如果是贴壁细胞, 需用不含 EDTA 的胰酶消化, 如消化不当, 可能引起假阳性, 而用细胞刮子会造成细胞粘连成团, 而影响检测。可将胰酶消化后细胞的保存在含 2% BSA 的 PBS 中, 防止进一步的损伤。
7. 细胞固定后可能导致荧光的淬灭, 请不要固定样品。
8. 因检测细胞的类型、凋亡诱导剂种类、使用的检测仪器不同, 因而流式检测的荧光补偿也不同, 因此建议每次检测均需使用未经凋亡诱导处理的细胞作为对照, 进行荧光补偿的调节。
9. 为了您的安全和健康, 请穿戴实验服并戴一次性手套操作。
10. 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药品等用途。

=====



扫码关注我们