

Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒

【产品描述】

本试剂盒为 Annexin V 与 PI 联合使用的试剂盒，用于检测细胞凋亡早期的发生，可区分凋亡早期凋亡细胞和晚期凋亡或坏死细胞。

Annexin V 为胞内蛋白膜联蛋白家族成员，以钙离子依赖的方式选择性与磷脂酰丝氨酸(PS)结合。PS 正常分布在细胞膜内侧。PS 外翻到细胞膜外是不同类型的细胞在凋亡早期的明显特征，用带有 FITC 标记的 Annexin V，即 Annexin V-FITC，可通过流式细胞仪或荧光显微镜检测到这一重要特征。FITC 呈现黄绿色荧光。

PI (Propidium Iodide, 碘化丙啶) 是一种可对 DNA 染色的细胞核染色试剂，在嵌入 DNA 后释放红色荧光。PI 不能穿透完整的细胞膜，但可以穿透坏死细胞或凋亡晚期丧失细胞膜完整性的细胞。

Annexin V-FITC 与 PI 联合使用时，PI 被排除在活细胞 (Annexin V-/PI-) 和早期凋亡细胞 (Annexin V+/PI-) 外，而晚期凋亡细胞和坏死细胞同时被 FITC 和 PI 结合染色呈现双阳性 (Annexin V+/PI+)。

FITC 最大吸收波长和激发波长分别为 494nm 和 518 nm，PI-DNA 复合物的最大吸收和发射波长分别为 535 nm 和 617 nm。

【产品信息】

| 货号 | 名称 | 规格 |
|------------|-----------------------------|------|
| 91-05-0002 | Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒 | 100T |

【产品组分】

| 产品组成 | 91-05-0002 |
|-----------------------------|-------------|
| Annexin V-FITC | 500 μ L |
| Propidium iodide | 1 mL |
| Binding Buffer(1 \times) | 50 mL*2 |

【运输保存】

蓝冰运输。4°C避光保存，有效期 24 个月。【注】：不可冷冻。

【使用说明】

下列实验方案以利用星形孢菌素诱导 Jurkat 细胞凋亡为例,如果使用其他诱导剂和其他类型的细胞,实验条件需要略作调整。

1.流式细胞检测

(1) 根据实验要求诱导细胞凋亡。检测样品中应包含未经处理的细胞样品,作为阴性对照。此外,建议设定一组样品做单染,用于调节补偿。

(2) 收集细胞。

悬浮细胞: 300 g, 4°C离心 5 min 收集细胞;

贴壁细胞: 用不含 EDTA 的胰酶消化后 300 g, 4°C离心 5 min 收集细胞,胰酶消化时间不宜过长,以防引起假阳性。

【注】: 用胰蛋白酶消化然后使细胞在最佳细胞培养条件和培养基中恢复约 30 min,然后再染色。胰蛋白酶消化会暂时破坏质膜,允许 Annexin V 结合磷脂酰丝氨酸在细胞膜的细胞质表面上,从而导致假阳性染色。

(3) 用预冷的 PBS 洗涤细胞两次,每次均在 300 g, 4°C下离心 5 min,收集 $1-5 \times 10^5$ 个细胞并用 100 μ L 1 \times 结合缓冲液重悬细胞。

(4) 每管加入 4-5 μ L 的 FITC-Annexin V 和 5 μ L 的 PI 工作液。

【注】: 我们推荐准备两管额外的流式管,每管只加入一种单染染料 (FITC-Annexin V 和 PI),用于流式单染的补偿调节。

(5) 室温避光孵育 10-15 min,为避免细胞凋亡进程,孵育过程可在冰上操作。

(6) 每管加入 400 μ L 的 PBS 或 1 \times 结合缓冲液,尽快通过流式细胞仪检测细胞凋亡情况。FITC-Annexin V 可以由 488nm 激光激发,检测荧光发射光谱约在 530 nm 处 (FITC 通道),PI 通道发射光谱约在 617nm 处。

【注】: PBS 或 1 \times 结合缓冲液的选择根据不同凋亡处理以及不同细胞具体选择。

2. 荧光显微镜检测

对于悬浮细胞，可参照流式细胞检测的方法进行具体操作。

- (1) 在盖玻片或载玻片小室中接种细胞。
- (2) 根据实验要求诱导细胞凋亡。检测样品中应包含未经处理的细胞样品，作为阴性对照。
- (3) 用 PBS 洗涤细胞。

【注】：细胞收集后如果不用 PBS 清洗，可以用含血清的培养基直接替代 Annexin V 结合缓冲液，但是 Annexin V 的使用浓度需要重新优化。

- (4) 每 100 μL 的 Annexin V 结合缓冲液中加入 5-25 μL 的 FITC-Annexin V 和 5 μL 的 PI。

【注】：最佳使用浓度由具体实验要求确定。

(5) 向培养板中加入足量的染液以覆盖全部细胞，室温避光孵育 15-30 min。为避免细胞凋亡进程，孵育过程可在冰上操作，但孵育时间至少延长至 30 min。

- (6) 用 1 \times 结合缓冲液清洗细胞。

(7) 将孵育有细胞的盖玻片置于载玻片上，载玻片可提前加一滴 1 \times 结合缓冲液；对于培养在小室内的细胞，可直接加入足量的 1 \times 结合缓冲液覆盖细胞。

(8) 使用合适的滤光片在荧光显微镜下观察细胞。FITC-Annexin V 可用 FITC 适用的滤光片，PI 可用 Cy3 或者 Texas。

【注意事项】

1. 本产品仅限于科学实验研究使用，不得用于临床诊断、治疗等领域。
2. 荧光染料均存在淬灭问题，保存和使用过程中请尽量注意避光，以减缓荧光淬灭。
3. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。