

Annexin V-Alexa Flour 488/PI 细胞凋亡检测试剂盒

产品信息

产品名称	编号	规格
Annexin V- Alexa Flour 488/PI 细胞凋亡检测试剂盒	DY20212	20T/50T/100T

产品描述

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 PS 由脂膜内侧翻向细胞膜外侧, 使 PS 暴露在细胞膜外表面。Annexin V 是一种分子量为 35~36kD 的 Ca²⁺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。

本试剂盒用 Alexa Flour 488 对 Annexin V 进行标记, 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色。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。

保存方式

4℃避光可保存 12 个月。

试剂盒组份

货号	名称	规格		
		20T	50T	100T
DY20212-A	Annexin V- Alexa Flour 488	100 uL	250 uL	500 uL
DY20212-B	Propidium Iodide, PI	200 uL	500 uL	1000 uL
DY20212-C	Binding Buffer (4×)	4 ml	10 ml	20 ml

操作说明

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- Alexa Flour 488 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 (4ml Binding Buffer+12ml 去离子水) 至 1×结合缓冲液；
3. 用 250ul 的 1×结合缓冲液重新悬浮细胞，调节其浓度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$ ；
4. 取 100ul 的细胞悬液于 5 ml 流式管中，加入 5ul Annexin V- Alexa Flour488，轻轻混匀；
5. 室温(20-25℃)避光孵育 10min；
6. 上机前 5min 加入10ul 碘化丙啶溶液，轻轻混匀，避光；
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检测， Annexin V- Alexa Flour488 为绿色荧光，PI 为红色荧光。如使用荧光显微镜，可直接观察。

注意事项：

1. 微量试剂需离心数秒将试剂收集至管底后再开盖取用。
2. Propidium Iodide (PI)、Annexin V- Alexa Flour 488 有毒，操作时要带手套，使用时避免与皮肤，眼睛和黏膜接触。
3. 染色后宜尽快检测，时间过 可能会导致凋亡或坏死细胞的数量增加。
4. 贴壁细胞消化时，加入最初收集的细胞培养液，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；胰酶的消化条件需要摸索或参考相应文献。
5. 细胞固定后可能导致荧光的淬灭，请不要固定样品。
6. 如果样品来源于血液，请务必除去血液中的血小板。因为血小板含有 PS，能与 Annexin V 结合，从而干扰实验结果。可以使用含有 EDTA 的缓冲剂并在 200g 离心洗去血小板。

本产品仅作科研用途