

Annexin V-FITC/PI双染法细胞凋亡检测试剂盒

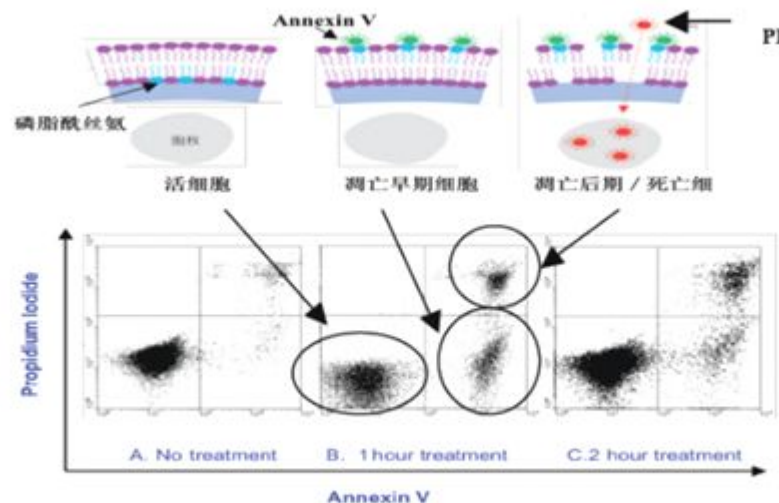
产品简介:

细胞凋亡普遍存在于生物界,是细胞的基本特征之一,对胚胎发育及形态发生、组织修复、内环境的稳定、机体的防御和免疫反应等方面都起到十分重要的作用。

Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒 (Annexin V-FITC/PI Apoptosis Detection Kit)是用FITC融合的重组人Annexin V来检测细胞凋亡时出现在细胞膜表面的磷脂酰丝氨酸(PS)的一种细胞凋亡检测试剂盒。可以使用流式细胞仪、荧光显微镜或其它荧光检测设备进行检测。Annexin V是一种分子量为35.8kD的Ca²⁺依赖性磷脂结合蛋白,广泛分布于真核细胞浆内,参与细胞信号转导。Annexin V能与磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine,简称PS)高亲和力、特异地结合。在正常细胞中,PS主要分布在细胞膜内侧,在细胞发生凋亡的早期,细胞膜上的PS会外翻到细胞表面。用带有绿色荧光的Annexin V-FITC标识出凋亡细胞。

本试剂盒还提供了碘化丙啶(Propidium Iodide, PI),PI可以染色坏死细胞或凋亡晚期丧失细胞膜完整性的细胞,呈现红色荧光。

综上所述,参考下图,用Annexin V-FITC和碘化丙啶染色后,正常的活细胞不被Annexin V-FITC和PI染色(如箭头指示);凋亡早期的细胞仅被Annexin V-FITC染色,PI染色呈阴性(如箭头指示);坏死细胞和凋亡晚期的细胞可以同时被Annexin V-FITC和PI双重染色(如箭头指示),以区别凋亡早期细胞。



保存条件:

4℃保存, Annexin V-FITC、PI染色液需避光保存,半年有效。若长期保存,可以把PI染色液适当分装后-20℃保存, Annexin V-FITC结合液可以直接-20℃保存。

所需试剂及仪器:

1. PBS
2. 蒸馏水或去离子水
3. 水平离心机
4. 流式细胞仪或荧光显微镜
5. 移液器

使用说明:

A. 细胞样品制备:

- 1A 对于悬浮细胞,在进行完细胞凋亡刺激后,1000g离心5分钟;

地址:上海市杨浦区邯郸路96号1号楼203—206室

邮编:200437

电话:021-51012878-801(市场服务部)

021-51012878-802(技术服务部)

传真:021-35323921

邮箱:office@7seapharmtech.com

网址:<http://www.7seapharmtech.com>

1B 对于贴壁细胞，把细胞培养液吸出至一合适离心管内（内含已经悬浮的发生凋亡或坏死的细胞），PBS洗涤贴壁细胞一次，加入适量胰酶消化细胞。室温孵育至轻轻吹打可以使细胞吹打下来时，吸除胰酶，避免胰酶消化不够或消化过度。加入收集的细胞培养液，轻轻吹打均匀，转移到离心管内，500g 离心5分钟。

☆注意 I: 中晚期凋亡细胞因失去贴壁能力而悬浮于上清中，此部分细胞对于结果是否显著具有重大影响，不可任意丢弃，需离心收集后一起检测才能全面反映出细胞凋亡的整体情况。

☆注意 II: 胰酶消化时细胞处理需要小心操作，尽量避免人为的损伤细胞。

2. 弃上清，用1ml PBS 轻轻重悬细胞并计数（细胞数量不少于 10^5 ），然后500g 离心5分钟，收集细胞。

☆注意: PBS 洗涤细胞，洗掉残留的胰酶，否则残留的胰酶会消化并降解Annexin V-FITC，最终导致染色失败。

3. 加入400 μ l 1 \times Binding Buffer 轻轻重悬细胞。如果消化液中含有EDTA则需加入400 μ l 1 \times binding buffer洗涤一次。

4. 加入5 μ l Annexin V-FITC，轻轻混匀，室温避光孵育15分钟。

5. 加入10 μ l PI 染色液，轻轻混匀，冰浴避光放置5分钟。

6. 在30分钟内进行流式细胞仪检测，Annexin V-FITC 为绿色荧光，PI 为红色荧光。

B. 荧光显微镜分析

如果用荧光显微镜下检测，则1000g 离心5分钟，收集细胞，用50-100 μ l 1 \times Binding Buffer轻轻重悬细胞，涂片后，荧光显微镜下观察。

C. 流式细胞仪分析

1. 流式细胞仪激发光采用激发波长488nm，发射波长530 nm 检测FITC 和>575 nm 检测PI。Annexin V-FITC 的绿色荧光通过FITC 通道（FL1）检测；PI 红色荧光通过PI 通道（FL3/FL2 建议使用FL3）检测。细胞应可分成三个亚群：正常活细胞仅有很低的荧光强度，凋亡细胞有较强的绿色荧光，坏死细胞有绿色和红色荧光双重染色。

注意事项:

1. 该试剂盒只能检测活细胞，而不能用于切片、擦刮、固定或浸润细胞样品的检测。
2. 细胞凋亡是一种持续变化的动态过程，选择合适的诱导时间对观察凋亡比较重要。染色后宜尽快检测，时间过长可能会导致凋亡或坏死细胞的数量增加。
3. 如果有细菌或真菌污染，会严重影响检测效果。
4. PBS 洗涤细胞，洗掉残留的胰酶，否则残留的胰酶会消化并降解Annexin V-FITC，最终导致染色失败。
5. 荧光物质均易发生淬灭，在进行荧光观察时，尽量缩短观察时间，同时在操作和存放过程中也尽量注意避光保存。
6. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
7. 检测血液样品时，如果含有血小板，请使用含有EDTA 的缓冲剂并200 \times g 离心洗去血小板。因为血小板含有PS，能与Annexin V 结合，从而干扰实验结果。
8. 旋帽离心管装的试剂在开盖前请短暂离心，将盖内壁上的液体甩至管底，避免开盖时液体洒落。
9. Annexin V-FITC 和PI 是光敏物质，在操作时请注意避光。

包装规格:

货号	规格	包装规格		
		Annexin V-FITC	1 \times Binding Buffer	PI
A005-1	5 assays	25ul	2ml	50ul
A005-2	20 assays	100ul	8ml	200ul
A005-3	50 assays	250ul	20ml	500ul
A005-4	100 assays	500ul	40ml	1ml
A005-X	100 次以上			