

本产品仅用于科研, 不可用于诊断

Annexin V-Alexa Fluor 647/PI apoptosis kit 细胞凋亡检测试剂盒

RG100-102-30

一、产品简介

本试剂盒用于细胞凋亡的快速检测。在细胞凋亡早期, 细胞膜内侧的磷脂酰丝氨酸 (Phosphatidylserine, PS) 会外翻至细胞膜表面。Annexin V 为胞内蛋白膜联蛋白家族成员, 以钙依赖的方式与 PS 结合。荧光标记的 Annexin V 可与 PS 特异性结合, 表明该细胞为凋亡细胞。

二、试剂盒组份

试剂盒组份	RG100-102-30 (30T)
Annexin V-AF647	150 μ L
PI solution	150 μ L
10 \times Binding buffer	3 mL

三、步骤

(一)、样本检测

- 按实验方案诱导凋亡。
- 收集细胞:
 - 对于悬浮细胞: 在进行完细胞凋亡刺激后, 1500 rpm 离心 5 min, 弃上清, 收集细胞。用预冷的 PBS 轻轻重悬细胞, 离心沉淀细胞, 共洗涤两次。注意: PBS 重悬不能省略, PBS 重悬的过程同时也起到了洗涤细胞的作用, 可以保证后续 Annexin V 的结合。
 - 对于贴壁细胞: 小心收集细胞培养液到一离心管内备用, 用不含 EDTA 的胰酶消化细胞, 至细胞可以被轻轻用移液管或枪头吹打下来时, 加入前面收集的细胞培养液, 吹打下所有的贴壁细胞, 并轻轻吹散细胞。再次收集到离心管内。1500 rpm 左右离心 5 min, 沉淀细胞。小心吸除上清, 可以残留约 50 μ l 左右的培养液, 以避免吸走细胞。加入 4 $^{\circ}$ C 预冷的 PBS 重悬细胞, 再次离心沉淀细胞, 小心吸除上清。重复洗涤步骤, 共洗涤两次。

注: a. 某些将贴壁细胞处理为单个细胞的过程中会造成细胞膜损伤, 从而造成 Annexin V 假阳性。
b. 贴壁细胞诱导细胞凋亡时如有漂浮细胞, 需收集漂浮细胞和贴壁细胞合并染色。
- 用去离子水稀释 10 \times Binding buffer 为 1 \times 工作液, 再用 1 \times Binding buffer 重悬细胞, 调整细胞浓度为 $1-5 \times 10^6$ cells/mL。
- 吸取 100 μ L 细胞悬液 (细胞总数为 $1-5 \times 10^5$ cells) 至一新离心管中, 加入 5 μ L Annexin V-AF647, 轻柔混匀; 再加入 5 μ L PI solution, 轻柔混匀, 室温避光孵育 10~15 min。
- 加入 400 μ L 1 \times Binding buffer, 轻柔混匀。染色后样品尽量在 1 小时内检测。
- 根据实验方法, 进行流式分析。Annexin V-AF647 最大激发波长为 651 nm, 发射波长为 665 nm; PI 建议使用 FL3 通道 (最大激发波长为 535 nm, 发射波长为 615 nm, 红色荧光)。根据 AF647 和 PI 荧光值确定两荧光参数阴阳界限, 划定十字门。

(二)、仪器参数调节

空白管：阴性对照组细胞，不加Annexin V-AF647和PI solution。用空白管调节FSC、SSC和荧光通道的电压，并在此电压条件下，用单染管调节荧光通道的补偿。

单染管：阳性对照组细胞，单染管分别加入Annexin V-AF647或PI solution染色，用于调节补偿。

检测管：处理的细胞，加Annexin V-AF647和PI solution，用空白管和单染管调节好电压补偿后，获得所需要的流式数据。

四、保存

4°C保存，Annexin V-AF647和PI solution需避光保存；试剂长期不用放-20°C保存；避免反复冻融。

五、注意事项

1. Annexin V-AF647和PI染色前，不能用破坏细胞膜完整性的固定剂和穿透剂固定或透膜。
2. PI有毒性，能通过皮肤吸收，对眼睛有刺激作用，使用时需戴手套。
3. Annexin V-AF647和PI是光敏物质，在操作时请注意避光。在处理和标记时，尽可能在暗处进行。在孵育阶段，用铝箔包裹容器或置于抽屉中。原位染色时，在细胞标记后应在暗室内用荧光显微镜观察。
4. 尽量使用不含EDTA的胰酶，EDTA会影响Annexin V与PS的结合。
5. 如果样品来源于血液，务必除去血小板。因血小板含有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，在1500 rpm下离心洗去血小板。
6. 整个操作过程动作要尽量轻柔，勿用力吹打细胞，以免影响细胞状态。