

Annexin V/PI 细胞凋亡试剂盒 (远红/红色)

细胞凋亡试剂盒 说明书

产品信息

产品名称	Annexin V/PI 细胞凋亡试剂盒 (远红/红色)
产品货号	CA102S、CA102M、CA102L
产品规格	10T、50T、100T
保存条件	4℃避光保存, 请勿冻存
光谱信息	Annexin V: Ex/Em=650/665 nm PI: Ex/Em=535/617 nm(with DNA)

产品组分

组分	CA101S	CA101M	CA101L
1×Annexin V 结合缓冲液	10 mL	50 mL	50 mL*2
Annexin V	50 μL	250 μL	500 μL
RedNucleus II	100 μL	500 μL	1 mL

产品介绍

Annexin V 和 PI 凋亡试剂盒提供了一种快速简便的方法, 通过标记早期凋亡细胞 (远红) 和坏死或晚期凋亡的细胞 (红色), 用于检测细胞凋亡水平。产品可以使用流式细胞仪或其它荧光检测设备进行检测。

Annexin V (膜联蛋白-V) 是一种分子量为 35-36KD 的 Ca^{2+} 依赖性磷脂结合蛋白, 可于磷脂酰丝氨酸 (PS) 选择性结合。PS 主要分布在细胞膜内侧, 即与细胞浆相邻的一侧。在细胞发生凋亡的早期, 不同类型的细胞都会把磷脂酰丝氨酸外翻到细胞表面, 暴露在细胞外环境中。此时, 使用远红荧光探针标记的 Annexin V, 与外翻的 PS 结合, 就可用流式细胞仪或荧光显微镜直接检测到 PS 的外翻这一细胞凋亡的重要特征。对于坏死或晚期凋亡的细胞, 由于细胞完整性已经被破坏, Annexin V

则可以进入胞浆与处于磷脂层内侧的 PS 结合，从而也使坏死细胞呈现远红外荧光。

碘化丙啶 (Propidium Iodide, PI) 是一种 DNA 结合染料，它可以染色坏死细胞或凋亡晚期丧失细胞膜完整性的细胞的细胞核。PI 可以由 488, 532 或 546 nm 的激光激发，呈现红色荧光。

使用方法

1. 实验设计：

- 空白管：阴性对照组细胞，不加 Annexin V/PI，用于调节电压。
- 单染管：阳性对照组细胞，只加 Annexin V/只加 PI，用于调节补偿。
- 检测管：处理的细胞，加 Annexin V/PI。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。

2. 收集细胞

- 对于悬浮细胞：
 - a. 在进行完细胞凋亡刺激后，1000 rpm 离心 5 min，弃上清，收集细胞，用 PBS 轻轻重悬细胞并计数。注：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。
 - b. 取 5×10^4 - 1×10^5 个重悬的细胞，1000 rpm 离心 5 min，弃上清，加入 100 μ L 1 \times Annexin V 结合缓冲液轻轻重悬细胞。
 - c. 加入 5 μ L Annexin V，轻轻混匀。
 - d. 加入 5 μ L PI 染色液，轻轻混匀。
 - e. 室温 (20°C-25°C) 避光孵育 15 min，可以使用铝箔进行避光。孵育过程中可以重悬细胞 2-3 次以改善染色效果。
- 对于贴壁细胞：
 - a. 把细胞培养液吸出至一合适离心管内，PBS 洗涤贴壁细胞一次，加入适量胰酶细胞消化液 (不含 EDTA) 消化细胞。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。注：对于贴壁细胞，胰酶消化步骤很关键。胰酶消化时间如果过短，细胞需要用力吹打才能脱落，容易造成细胞膜的损伤，从而导致细胞坏死的假阳性；消化时间如果过长，同样易造成细胞膜损伤而出现细胞坏死的假阳性，甚至会影响细胞膜上磷脂酰丝氨酸与 Annexin V 的结合从而干扰对于细胞凋亡的检测。
 - b. 加入上步中收集的细胞培养液，把细胞轻轻吹打下来，转移到离心管内，1000 rpm 离心 5 min，弃上清，收集细胞，用 PBS 轻轻重悬细胞并计数。注：加入上步中的细胞培养液非常重要，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，导致染色失败。
 - c. 取 5×10^4 - 1×10^5 个重悬的细胞，1000 rpm 离心 5 min，弃上清，加入 100 μ L 1 \times Annexin V 结合

缓冲液轻轻重悬细胞。

- d. 加入 5 μ L Annexin V, 轻轻混匀。
- e. 加入 5 μ L PI 染色液, 轻轻混匀。
- f. 室温 (20°C -25°C) 避光孵育 15 min, 可以使用铝箔进行避光。孵育过程中可以重悬细胞 2-3 次以改善染色效果。

3. 结果分析:

➤ 流式细胞仪检测:

- a. 孵育完成后, 可直接加入 400 μ L 1 \times Annexin V 结合缓冲液重悬细胞, 立即上机检测, Annexin V 由 647 nm 激光激发, 检测荧光发射光谱在 647 nm 处(APC 通道), PI 通道发射光谱约在 617 nm 处。
- b. 在双变量流式细胞仪的散点图上: 左下象限显示活细胞, 为 (Annexin V-/PI-); 右下象限为早期凋亡细胞, 为 (Annexin V+/PI-); 右上象限是坏死与晚期凋亡细胞, 为 (Annexin V+/PI+); 左上象限显示裸核细胞, 为 (Annexin V-/PI+)。

➤ 荧光显微镜检测:

- a. 1000 rpm 离心 5 min, 收集细胞, 用 400 μ L 1 \times Annexin V 结合缓冲液轻轻重悬细胞。将细胞移至 96 孔板中沉降片刻或进行细胞涂片后, 置于荧光显微镜下观察。
- b. Annexin V 可用 APC 适用的滤光片; PI 可用 Cy3 或 Texas 适用的滤光片。

注意事项

1. 使用前请将产品瞬时离心至管底, 再进行后续实验。
2. 为降低细胞凋亡进程, 孵育过程可在冰上操作, 但孵育时间至少延长至 30 min。
3. 由于细胞凋亡是一个快速的过程, 建议样品在染色后 1 h 之内进行分析。
4. 对于贴壁细胞, 消化是一个关键步骤: 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后合并染色。处理贴壁细胞时要小心操作, 尽量避免人为的损伤细胞。胰酶消化时间过短, 细胞需要用力吹打才能脱落, 容易造成细胞膜的损伤, PI 摄入过多; 消化时间过长, 细胞膜同样易造成损伤, 甚至会影响细胞膜上磷脂酰丝氨酸与 Annexin V 的结合。消化时将胰酶铺满孔板底后, 轻摇时胰酶与细胞充分接触, 然后倒掉大部分胰酶, 利用剩余的少量胰酶再消化一段时间, 待细胞间空隙增大, 瓶底呈花斑状即可终止。在消化液中尽量不用 EDTA, EDTA 会影响 Annexin V 与 PS 的结合。
5. 贴壁细胞用胰蛋白酶消化后, 建议在最佳培养条件和培养基中恢复 30 min 后染色, 避免假阳性。
6. 为了避免洗涤细胞时损失细胞, 在吸液时可以用大的 Tip 头套上小的 Tip 头吸液。
7. 染料的最佳使用浓度由具体实验要求确定。
8. 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。

9. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

★本产品仅限研使用★



(官网)



(公众号)