

Annexin V-Alexa Fluor 647/PI Apoptosis Detection Kit

Annexin V-Alexa Fluor 647/PI 凋亡检测试剂盒

产品简介

Annexin V-Alexa Fluor 647/PI 细胞凋亡检测试剂盒 (Annexin V-Alexa Fluor 647/PI Apoptosis Detection Kit) 是用 Alexa Fluor 647 标记了的 Annexin V 作为探针, 来检测细胞早期凋亡的发生, 可用流式细胞仪或其他荧光检测设备进行检测。

检测原理: 在正常的活细胞中, 磷脂酰丝氨酸 (phosphatidylserine, PS) 位于细胞膜的内侧, 但在早期凋亡的细胞中, PS 从细胞膜的内侧翻转到细胞膜的表面, 暴露在细胞外环境中。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, 能与 PS 高亲和力结合。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。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, 但可以透过凋亡晚期和坏死细胞的细胞膜而使细胞核染红。因此, 将 Annexin V 与 PI 联合使用时, PI 则被排除在活细胞 (Annexin V-/PI-) 和早期凋亡细胞 (Annexin V+/PI-) 之外, 而晚期凋亡细胞和坏死细胞同时被 Alexa Fluor 647 和 PI 结合染色呈现双阳性 (Annexin V+/PI+)。

本试剂盒需要使用流式细胞仪进行检测。

产品规格

货号	C331405E/C331405S/C331405M
规格	20 T/50 T/100 T

组分信息

组分编号	组分名称	C331404E	C331404S	C331404M
C331405-A	Annexin V-Alexa Fluor 647	100 μL	250 μL	500 μL
C331405-B	PI Staining Solution (20 $\mu\text{g/mL}$)	200 μL	500 μL	1 mL
C331405-C	1×Binding Buffer	10 mL	25 mL	50 mL

储存条件

冰袋 (wet ice) 运输。-20°C 避光保存, 避免反复冻融, 一年有效期。如果需要在短时间内多次重复使用, 可以在 4°C 避光保存, 半年有效期。

注意事项

1. 由于细胞凋亡是一个快速的过程, 建议样品在染色后 1 小时之内进行分析。
2. 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-Alexa Fluor 647 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。

3. 如果样品来源于血液，请务必除去血液中的血小板。血小板含有 PS，可与 Annexin V 结合，从而干扰实验结果。可以使用含有 EDTA 的缓冲剂并以 200 g 离心洗去血小板。
4. 试剂在开盖前请短暂离心，将盖内壁上的液体集中至管底，避免开盖时液体洒落引起损失。
5. Annexin V-Alexa Fluor 647 和 PI 是光敏物质，操作时请注意避光。
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. 本产品仅用于科研。

使用说明

1. 样品染色

- 1) 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。
- 2) 用 4°C 预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次，每次均需 300 g，4°C 离心 5 min。
- 3) 加入 1×Binding Buffer 重悬细胞，调节其浓度为 $1-5 \times 10^6$ 细胞/mL。
- 4) 取 100 μ L 细胞悬液于 5 mL 流式管中，加入 5 μ L Annexin V-Alexa Fluor 647，轻轻混匀后于室温避光孵育 5min。
- 5) 加入 10 μ L PI (20 μ g/mL)。
- 6) 加入 400 μ L PBS Buffer，混匀，样品在 1 小时内检测。

【注意】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。

2. 流式细胞仪分析

Annexin V-Alexa Fluor 647 最大激发波长为 651 nm，最大发射波长为 667 nm；PI-DNA 复合物的最大激发波长为 535 nm，最大发射波长为 615 nm。用 CellQuest 等软件进行分析，绘制双色散点图 (two-color dot plot)，Annexin V-Alexa Fluor 647 为横坐标，PI 为纵坐标。每个样采集 10,000 events。