

Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒

【产品编码】

210837/210838

【包装规格】

产品组成	210837/50T	210838/100T
Annexin V-FITC	250 uL	500 uL
Propidium iodide	500 uL	1 mL
Binding buffer(10×)	25 mL	50 mL
说明书	1份	1份

【产品简介】

本试剂盒用于检测细胞凋亡早期的发生,其中Annexin V为胞内蛋白膜联蛋白家族成员,以钙离子依赖的方式选择性与磷脂酰丝氨酸(PS)结合。

PS正常分布在细胞膜内侧,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PS外翻到细胞膜外侧。用带有FITC标记的Annexin V,即Annexin V-FITC,就可以通过流式细胞仪或荧光显微镜检测到PS外翻这一细胞凋亡的重要特征。

碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)是一种可对DNA染色的细胞核染色试剂,在嵌入DNA后释放红色荧光。PI不能穿透完整的细胞膜,但可以穿透坏死细胞或凋亡晚期丧失细胞膜完整性的细胞。因此,将Annexin V与PI联合使用时,PI被排除在活细胞(Annexin V-/PI-)和早期凋亡细胞(Annexin V+/PI-)外,而晚期凋亡细胞和坏死细胞同时被FITC和PI结合染色呈现双阳性(Annexin V+/PI+)。

FITC最大吸收波长为490nm,发射波长为525nm,PI-DNA复合物的最大吸收和发射波长分别为535nm和615nm。

【注意事项】

- 1、可立式离心管内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。
- 2、Annexin V-FITC和碘化丙啶(PI)是光敏物质,在保存与操作时请注意避光。
- 3、在细胞洗涤的最后一步,请尽量将上清弃净,以免PBS残留影响实验结果。
- 4、为获得准确试验结果,建议样品在染色后1小时内进行分析。
- 5、为了您的安全和健康,请穿戴实验防护服、手套、口罩等必要的防护装备。

【操作步骤】

1. 样品染色
- 1) 将Binding buffer(10×)稀释成1×Binding buffer工作液备用(1 mL Binding buffer(10×)需加入9 mL无菌去离子水)。
- 2) 对于悬浮细胞, 500-1000×g 离心 5min 收集细胞。

对于贴壁细胞,要用不含 EDTA 的胰酶消化细胞,胰酶消化时间不宜过长或过短,最好是在轻轻吹打可以使贴壁细胞吹打下来时,加入细胞培养液,将细胞轻轻吹打下来,转移到离心管内, 500-1000×g离心5min收集细胞。

3) 收集细胞后,加入预冷PBS溶液轻摇或用移液器轻柔敲打洗涤,离心收集细胞,共洗涤两次。

4) 在细胞沉淀中加入1×Binding buffer工作液,重悬细胞,使细胞浓度达到 1×10^6 cell/mL。

5) 吸取100 μL细胞悬液(细胞总数为 1×10^5 cell)至一新管中,加入5 μL Annexin V-FITC 和 5-10 μL PI,轻轻混匀,室温避光孵育15min。

2. 样品检测

1) 流式细胞仪检测:

染色孵育后,每管加入400 μL 1×Binding buffer工作液,混匀后使用流式细胞仪检测(1小时内检测)。

建议设置正常细胞、PI单染和 Annexin V-FITC 单染3个对照组,正常细胞组可作为荧光补偿调节去除光谱重叠和设定十字门的位置。若十字门的位置不易设定,可采用经凋亡诱导的细胞进行设定。结果可用CellQuest等软件进行分析,绘制双色散点图(two-color dot plot),FITC为横坐标,PI为纵坐标。Annexin V-FITC和PI联合使用时,活细胞仅有很低强度的背景荧光,早期凋亡细胞仅有较强的绿色荧光,晚期凋亡细胞有绿色和红色双重荧光。

2) 荧光显微镜检测:

染色孵育后涂片,显微镜下观察。使用荧光显微镜上的蓝光和绿光通道分别观察FITC和PI。被Annexin V-FITC结合的细胞显示浆膜上有绿色光环。丧失细胞膜完整性的细胞,细胞核显示红色,膜上有绿色光环。

【储存条件及有效期】

2-8℃避光保存,有效期1年。Annexin V-FITC不可冷冻。

【基本信息】

生产企业: 无锡耐思生命科技股份有限公司
 生产地址: 无锡市新吴区梅村工业园锡达路530号
 售后服务单位: 无锡耐思生命科技股份有限公司
 售后地址: 无锡市新吴区梅村工业园锡达路530号
 联系方式: +86-510-68006788
 邮箱: info@nest-wuxi.com