

Annexin V-FITC/PI Apoptosis Detection Kit

目录号: RC0071

保存条件: 2-8°C避光保存, 一年有效。Annexin V-FITC 不可冷冻。

产品内容

Component	50T	100T
Annexin V-FITC	250 µl	500 µl
Propidium iodide	500 µl	1 ml
Binding Buffer(10×)	25 ml	50 ml

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

使用方法

1. 样品染色

- 1) 将 Binding Buffer (10×) 稀释成 1×Binding buffer 工作液备用 (1ml Binding Buffer (10×) 需加入 9ml 无菌去离子水)。

2) 对于悬浮细胞，500-1000g 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，500-1000g 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吹打洗涤，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 100μl 细胞悬液（细胞总数为 1×10^5 cell）至一新管中，加入 5μl 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 400μl 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。

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。