

Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒产品说明书

产品编号:

FY600003-20T

FY600003-100T

存储条件:

2-8 °C 避光保存, 有效期6个月;

-20 °C 避光保存, 有效期12个月或更久;

避免反复冻融。

产品组分:

编号	名称	20T	100T
A	Annexin V-FITC	100 μ l	0.5 ml
B	PI	100 μ l	0.5 ml
C	Binding Buffer	5 ml	20 ml

产品简介:

Annexin V-FITC/PI双染细胞凋亡检测试剂盒(Annexin V-FITC/PI Apoptosis Detection Kit)是用FITC标记的重组人Annexin V来检测细胞凋亡时出现在细胞膜表面的磷脂酰丝氨酸的一种细胞凋亡检测试剂盒。可以使用流式细胞仪、荧光显微镜或其它荧光检测设备进行检测。

磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, 简称PS)主要分布在细胞膜内侧, 即与细胞浆一侧。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, 即细胞膜外侧。磷脂酰丝氨酸暴露到细胞表面后会促进凝血和炎症反应。而Annexin V和外翻到细胞表面的磷脂酰丝氨酸结合后可以阻断磷脂酰丝氨酸的促凝血和促炎症反应活性。

用带荧光染料FITC标记Annexin V, 即Annexin V-FITC, 便可用流式细胞仪或荧光显微镜非常简单且直接地检测到磷脂酰丝氨酸的外翻这一细胞凋亡的重要特征。

本试剂盒还提供了碘化丙啶(PI)染色液, PI不能通过完整的细胞膜, 可以染色坏死细胞或凋亡晚期丧失细胞膜完整性的细胞, 呈现红色荧光。对于坏死细胞, 由于细胞膜的

完整性已经丧失, Annexin V-FITC可以进入到细胞浆内, 与位于细胞膜内侧的磷脂酰丝氨酸结合, 从而也使坏死细胞呈现绿色荧光, PI双染可以确定坏死细胞群。

综上所述, 用Annexin V-FITC和PI染色后, 正常的活细胞不被Annexin V-FITC和碘化丙啶染色; 凋亡早期的细胞仅被Annexin V-FITC染色, PI染色呈阴性; 坏死细胞和凋亡晚期的细胞可以同时被Annexin V-FITC和PI染色。

自备耗材和设备:

1 ml 移液器;

200 μ l 移液器;

20 μ l 移液器;

旋窝混匀仪;

流式细胞仪;

PBS。

适用实验与操作过程:

1. 调整细胞密度到大约 1×10^6 细胞/ml。
2. 将0.2 ml 细胞悬液从细胞培养瓶中(2×10^5 细胞)转移到干净的离心管内。
3. 室温1000 g 离心5 分钟, 去除培养基。
4. 细胞沉淀用0.2 ml 预冷的PBS 溶液轻轻重悬。
5. 室温1000 g 离心5 分钟, 去除PBS。
6. 细胞沉淀用0.2 ml 预冷的结合缓冲液(组分C. Binding Buffer)轻轻重悬。
7. 加入5 μ l Annexin V-FITC(组分A), 5 μ l PI染液(组分B), 轻轻混匀。
8. 室温(18-24°C)避光孵育10-15 分钟。
9. 选作, 用结合缓冲液或PBS补充体积至0.4 ml。
10. 将样本放置在冰上避光保存, 尽快检测。
11. 用流式细胞仪或荧光显微镜检测分析。



注意事项与常见问题:

1. 是否需要防护?

PI具有毒性,操作时应注意防护,保护眼睛、避免吸入、并戴一次性手套。

2. 是否需要避光?

荧光物质均易发生淬灭,在进行荧光观察时,尽量缩短观察时间,同时在操作和存放过程中也尽量注意避光保存。

3. 单个反应的细胞数量是否有要求?

推荐细胞数量 10^5 - 10^6 个之间。若细胞数量太低,流式细胞仪分析时会花费时间更长,同时得到数据在统计上可能会有偏差。

4. 细胞污染是否有影响?

如果有细菌或真菌污染,会严重影响检测效果。

5. 检测时间要求?

染色后宜尽快检测,时间过长可能会导致凋亡或坏死细胞的数量增加。最好在半小时内完成检测。

6. 胰酶消化是否有影响?

如果细胞收集过程中使用了胰酶,需注意设法去除残留的胰酶。残留的胰酶会消化并降解Annexin V-FITC,最终导致染色失败。

7. 细胞数要求?

推荐细胞数量为 2×10^5 ,实际操作中细胞数量可以再 10^5 - 10^6 之间,不推荐更高的细胞数量。一般6孔板中的一孔或者6 cm培养皿中,80%汇合度的细胞数量足够一次检测。

8. 使用时需及时清洗流式细胞仪。

PI流式上机时具有一定的粘性,请及时清洗流式细胞仪,避免堵塞。连续上机数量过多也可能导致仪器堵塞导致数据误差,可在检测到一定数量的样本时进行次氯酸清洗,然后进行剩余样本的检测。

相关产品

名称	货号
TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒 (FITC)	FY600017
CCK-8 试剂盒	FY600001
Annexin V-GFP/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒	FY600016
PI 细胞周期与凋亡试剂盒	FY600002

