

Annexin V-Fluor 488/PI 细胞凋亡检测试剂盒

货号: PMK0988

保存: 4℃避光保存 12 个月

规格: 20T/50T/100T

用途: 可用于检测细胞早期凋亡, 将处于不同凋亡时期的细胞区分开来。

产品简介

磷脂酰丝氨酸 (PS) 是一种带负电荷的磷脂, 正常细胞中, PS 只分布在细胞膜脂质双层的内侧, 而在细胞凋亡早期, 细胞膜 PS 由脂膜内侧翻向细胞膜外侧, 使 PS 暴露在细胞膜外表面。Annexin V 是一种分子量为 35~36kD 的 Ca²⁺依赖性磷脂结合蛋白, 与磷脂酰丝氨酸有高度亲和力, 故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。因此 Annexin V 被公认为检测细胞早期凋亡的灵敏指标之一。

将 Annexin V 进行绿色荧光 Fluor 488 标记, 以标记了的 Annexin V 作为探针, 利用荧光显微镜或流式细胞仪可检测细胞凋亡的发生。碘化丙啶 (Propidium Iodide, 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, 但对凋亡中晚期的细胞和坏死细胞, PI 能够透过细胞膜而使细胞核染红。因此采用 Annexin V 与 PI 双染的方法, 就可以将处于不同凋亡时期的细胞区分开来。

产品内容

产品组分	20T	50T	100T	保存条件
Annexin V-Fluor 488	100u1	250u1	500u1	4℃避光
Propidium Iodide, PI	200u1	500u1	1ml	4℃避光
Binding Buffer (4x)	4ml	10ml	20ml	4℃

操作步骤:

1. 细胞样品的准备:

a) 悬浮细胞:

- 1) 收集细胞至离心管中 1000-2000rpm 离心 5min, 小心去除上清。
- 2) 用 1ml 4℃预冷 PBS 轻轻重悬细胞并计数, 1000-2000rpm 离心 5min, 小心吸除上清。
- 3) 再加入 1ml 4℃预冷的 PBS 重悬细胞, 1000-2000rpm 离心 5min, 小心吸除上清。

b) 贴壁细胞:

- 1) 吸出细胞培养液至离心管中, PBS 洗涤贴壁细胞一次, 加入适量不含 EDTA 的胰酶细胞消化液消化细胞。
- 2) 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。
- 3) 加入步骤 1 中收集的细胞培养液, 稍混匀, 转移到离心管内, 1000-2000rpm 离心 5min, 小心吸除上清。

注: 加入步骤 1 中的细胞培养液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-Alexa Fluor 488 导致染色失败。

4) 用 1ml 4℃预冷 PBS 轻轻重悬细胞并计数, 1000-2000rpm 离心 5min, 小心吸除上清。

5) 再加入 1ml 4℃预冷的 PBS 重悬细胞, 1000-2000rpm 离心 5min, 小心吸除上清。

2. 用去离子水按 1: 4 稀释 Binding Buffer (4ml Binding Buffer+12ml 去离子水);

3. 用 250ml 结合缓冲液重新悬浮细胞, 调节其浓度为 1×10^6 /ml;

4. 取 100ul 的细胞悬液于 5 ml 流式管中, 加入 Annexin V-Fluor 488, 轻轻混匀;

5. 室温(20-25℃)避光孵育 10min;

6. 上机前 5min 加入 10ul 碘化丙啶溶液, 轻轻混匀;

7. 上机前在反应管中补加 400ml PBS 重悬细胞, 避光保存, 随即进行流式细胞仪 (FACS) 检测, Annexin V-Fluor 488 为绿色荧光和 PI 为红色荧光。

产品说明书

注意事项:

- 1) 此试剂盒仅供研究使用。
- 2) 微量试剂需离心数秒将试剂收集至管底后再开盖取用。
- 3) Propidium Iodide (PI) 有毒, 操作时要带手套, 使用时避免与皮肤, 眼睛和黏膜接触。
- 4) 本试剂盒用于检测活细胞, 流式细胞仪检测时, 细胞数量不应低于 1×10^6 。
- 5) 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。
- 6) Annexin V 检测凋亡细胞的方法适用于悬浮生长的细胞, 如: 淋巴细胞等细胞的检测。对于贴壁生长的细胞, 由于在胰酶等消化处理过程中会造成细胞膜的损伤, 会造成较高的假阳性, 而用细胞刮子会造成细胞粘连成团, 而影响检测, 可将胰酶消化后的细胞保存在含 2%BSA 的 PBS 中, 防止进一步的损伤。尽管目前, 包括国外也有一些单位采用该方法检测贴壁生长的细胞。我不推荐用该方法检测。因为其重复性较差, 且需要操作时非常小心。
- 7) 消化贴壁细胞残留的胰酶会消化并降解 Annexin V-Fluor 488, 最终导致染色失败。
- 8) 细胞固定后可能导致荧光的淬灭, 请不要固定样品。

相关产品:

PMK1300 考马斯亮蓝蛋白胶快速染色液
PMK053 GAPDHmAb-HRP conjugated
PMK0312 抗体稀释液 PMK1700PBST 缓冲液
PMK1020 IPTG 溶液 (50mg/ml)
PMK1010 30%丙烯酰胺 (29:1)
PMK1070 5×Tris-甘氨酸电泳缓冲液
PMK0012 SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒
更多产品详情了解, 请关注公众号:

