Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒

产品编号：M009

包装规格：10T/20T/50T

产品简介

细胞凋亡是发生在胚胎发育和维持组织稳态过程中的正常生理过程，伴随着许多形态学特征改变。在细胞凋亡早期，PS 会从脂膜的内侧翻转外侧，使其暴露于细胞外侧。Annexin V(膜联蛋白 V)是一种 Ca^{2+}依赖的磷脂结合蛋白，对 PS 具有高度亲和力，会与暴露 PS 的细胞特异性结合，因此 Annexin V 被作为检测细胞早期凋亡的指标之一。用带有绿色荧光的荧光探针 FITC 标记的 Annexin V，即 Annexin V-FITC，就可以用流式细胞仪或荧光显微镜非常简单而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。

碘化丙啶(Propidium Iodide，PI)是一种核酸染料，它不能透过具有完整细胞膜的正常细胞和早期凋亡细胞，但凋亡中晚期的细胞和死细胞由于细胞膜通透性的增加，PI 能够透过细胞膜而使细胞核染红。因此将 Annexin V 与 PI 匹配使用，就可以将处于不同凋亡时期的细胞区分开来。

试剂盒组成

组分	10T	20T	50T
Annexin V-FITC	50μL	100μL	250μL
PI Staining Solution	100μL	200μL	500μL
Binding Buffer	5mL	10mL	25mL

保存：-20℃避光保存，避免反复冻融，一年有效。如果需要在短时间内多次重复使用，可以在 4℃避光保存，半年有效。

注意事项

- ✓ 本产品仅限于科学研究使用。
- ✓ 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套和口罩操作。
- ✓ 微量试剂取用前请离心收集。
- ✓ Annexin V-FITC 和 PI Staining Solution 避光保存及使用。
- ✓ 细胞固定后可能导致荧光的淬灭，请不要固定样品。
- ✓ EDTA 会影响 Annexin V 与 PS 的结合，贴壁细胞需用不含 EDTA 的胰酶适当消化。如消化不当，可能引起假阳性，同时残留的胰酶会消化并降解 Annexin V-FITC，导致染色失败。而用细胞刮子会造成细胞粘连成团。可将胰酶消化后细胞的保存在含 2%BSA 的 PBS 中，防止进一步的损伤。
- ✓ 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。
- ✓ 因检测细胞的类型、凋亡诱导剂种类、使用的检测仪器不同，因而流式检测的荧光补偿也不同，因此建议每次检测均需使用未经凋亡诱导处理的细胞作为对照，进行荧光补偿的调节。

操作说明

1 样品染色

1）悬浮细胞：300 g，4℃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℃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）预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次(300 g，4℃离心 5 min)，收集 1～5×10^5 细胞。

3）加入 500 μL 1×Binding Buffer 重悬细胞。

4）加入 5 μL Annexin V-FITC 和 10 μL PI Staining Solution，轻轻混匀。

5）室温、避光反应 10-15 min。

6）在 1 小时内用流式细胞仪或荧光显微镜检测。

2　样品分析

A．流式细胞仪分析：

1)　FITC 最大激发波长为 488 nm，最大发射波长 525 nm，FITC 的绿色荧光在 FL1 通道检测。

2)　PI-DNA 复合物的最大激发波长为 535 nm，最大发射波长为 615 nm，PI 的红色荧光在 FL2 或 FL3 通道检测，建议使用 FL3。

3)　流式细胞仪检测分析时选择合适的电压并调好光补偿，除实验组外建议设置阴性对照(不加 Annexin V-FITC 和 PI 标记)用于调节电压，单标对照(只加 Annexin V-FITC，以及只加 PI 的细胞)用于调节补偿。

4)　绘制双色散点图(two-color dot plot)，FITC 为横坐标，PI 为纵坐标。典型的实验中，细胞可以分成三个亚群，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荧光双重染色。

B．荧光显微镜分析：

1）滴一滴用 Annexin V-FITC/PI 双染的细胞悬液于载玻片上，并用盖玻片盖上细胞。

2）在荧光显微镜下用双色滤光片观察。Annexin V-FITC 荧光信号呈绿色，PI 荧光信号呈红色。

示例

